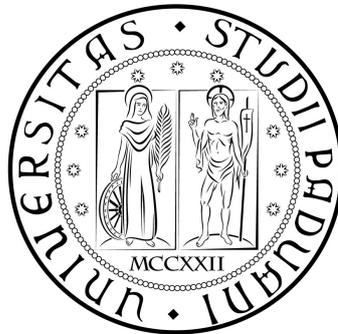


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOLOGIA E MEDICINA
DELLA RIGENERAZIONE
INDIRIZZO: ENDOCRINOLOGIA COMPARATA
CICLO XXIV



Effetti del *knockdown* del recettore degli estrogeni $\beta 2$ (*esr2a*) sullo sviluppo di *Danio rerio*

Direttore della Scuola: Prof.ssa Maria Teresa Conconi

Coordinatore d'indirizzo: Dott.ssa Luisa Dalla Valle

Supervisore: Dott.ssa Luisa Dalla Valle

Dottorando: Andrea Celeghin

31 gennaio 2012

INDICE

	PAGINA
Riassunto	1
1. Introduzione	9
1.1. <i>Zebrafish (Danio rerio)</i> come modello animale	9
1.2. Lo sviluppo dello <i>zebrafish</i>	11
1.3. Presenza e ruolo degli ormoni steroidei nel tuorlo di ovociti ovulati	14
1.4. Sintesi degli estrogeni	17
1.5. I recettori nucleari	19
1.6. I recettori ER	21
1.7. La trasduzione del segnale del recettore degli estrogeni (ER)	22
1.8. I trascritti materni e zigotici per <i>Esr2a</i> in <i>zebrafish</i>	24
1.9. Il <i>Knockdown</i> genico	27
1.9.1. Il <i>phosphorothioato-linked</i> DNA (S-DNA)	28
1.9.2. Gli <i>short interfering</i> RNA (siRNA)	29
1.9.3. Il morfolino	30
2. Materiali e metodi	35
2.1. Allevamento del pesce zebra (<i>Danio rerio</i>)	35
2.2. Microiniezione di morfolino	36
2.2.1. Preparazione delle <i>working solution</i>	37
2.2.2. Preparazione degli aghi	38
2.2.3. Raccolta e iniezione delle uova	39
2.3. Estrazione dell'RNA totale	40
2.3.1. Controllo qualitativo dell'RNA	41
2.3.2. Quantificazione dell'RNA	41
2.4. Trascrizione inversa dell'RNA con <i>random</i> esameri	42
2.5. Amplificazione del cDNA mediante PCR	43
2.5.1. <i>Touchdown</i> PCR	43
2.5.2. Analisi di espressione	45
2.5.3. PCR con <i>AccuPrimeTMPCR System</i>	45
2.5.4. Elenco degli oligonucleotidi utilizzati	46
2.6. Analisi di prodotti di amplificazione mediante separazione in gel d'agarosio	47
2.6.1. Quantificazione su gel di agarosio del DNA	48
2.7. Estrazione e purificazione del DNA da gel d'agarosio	49
2.7.1. Estrazione del DNA da gel d'agarosio	49
2.7.2. Purificazione dei prodotti di PCR	50
2.8. Sequenziamento automatico del DNA	50
2.9. Amplificazione rapida dell'estremità del cDNA mediata da RNA ligasi: RLM-RACE (<i>RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	51
2.10. Clonaggio	53
2.10.1. Reazione di ligazione	53
2.10.2. Trasformazione di batteri chemiocompetenti tramite <i>shock</i> termico	55
2.10.2.1. Preparazione dei batteri JM109 competenti	55

2.10.2.2. Trasformazione mediante <i>shock</i> termico	56
2.10.3. Controllo dell'avvenuto clonaggio mediante PCR	57
2.11. Preparazione e purificazione del DNA plasmidico mediante miniprep	58
2.12. Digestione del DNA con endonucleasi di restrizione	60
2.13. Sintesi di RNA messaggero	62
2.14. Sintesi delle sonde antisense a RNA	63
2.14.1. Purificazione della sonda a RNA	64
2.14.2. Verifica e quantificazione della sonda	64
2.15. Fissazione e conservazione degli embrioni	65
2.16. Ibridazione <i>in-situ</i>	65
2.17. Analisi dei processi apoptotici mediante TUNEL	69
2.18. Colorazione delle cartilagini con Blu di Alcian	71
2.19. Analisi dei vasi sanguigni	72
2.19.1. Analisi dei vasi sanguigni utilizzando la linea transgenica fli-EGFP	72
2.19.2. Colorazione dei vasi sanguigni	72
2.20. Microscopia ed acquisizione delle immagini	73
2.21. Esperimento di <i>microarray</i>	74
2.21.1. Analisi dei dati di <i>microarray</i>	75
2.22. PCR quantitativa (qRT-PCR)	76
3. Risultati	77
3.1. Analisi del profilo di espressione di <i>esr2a</i> durante l'embriogenesi	77
3.2. Descrizione dei diversi morfolino utilizzati e analisi della concentrazione ottimale	80
3.3. Analisi fenotipiche dei morfanti	84
3.4. Verifica della specificità degli effetti del morfolino	88
3.5. Saggio di morte cellulare	93
3.6. Colorazione dei vasi sanguigni	94
3.7. Colorazione delle cartilagini craniche con Blu di Alcian	96
3.8. Ibridazione <i>in situ</i> con marcatori della regione cranica	99
3.9. Ibridazione <i>in situ</i> con marcatori di sviluppo	101
3.10. Analisi di <i>microarray</i>	106
3.11. Validazione dei dati di espressione genica	109
3.12. <i>Gain of function</i> e trattamento con 17 β -estradiolo	110
4. Discussione	115
5. Bibliografia	121

RIASSUNTO

Il mio lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio del ruolo svolto dagli mRNA ovocitari di origine materna codificanti la forma *erb2* (*esr2a*) del recettore degli estrogeni nella modulazione epigenetica a lungo termine dello sviluppo in *zebrafish* (*Danio rerio*).

Crescenti evidenze indicano che gli ormoni steroidei possono partecipare alla programmazione materna nei processi di sviluppo dei pesci (Auperin e Geslin, 2008) e dei mammiferi (Darnaudéry e Maccari, 2007). In particolare, gli estrogeni secreti dalle cellule della granulosa durante la vitellogenesi possono essere accumulati negli ovociti dei pesci (Hines *et al.*, 1999) con un possibile ruolo di *programming* iniziale avente effetti profondi sulla ontogenesi successiva.

Nel presente lavoro sullo *zebrafish*, è stato osservato mediante ibridazione *in situ* che i livelli di espressione degli mRNA che codificano per il recettore Esr2a sono alti negli oociti ovulati e nell'embrione subito dopo la fecondazione. La concentrazione di questi trascritti diminuisce nelle 8 ore che seguono la fecondazione (hpf), per poi riprendere a crescere dopo l'inizio della trascrizione embrionale, confermando precedenti dati di qRT-PCR (Pikulkaew *et al.*, 2010).

Il ruolo funzionale del gene *esr2a* è stato studiato mediante silenziamento genico ottenuto con la tecnologia del morfolino antisense utilizzando due diversi morfolini microiniettati nelle uova appena deposte: il primo, progettato sull'ATG d'inizio traduzione, determina il *knockdown* mediante blocco della traduzione dei trascritti di origine materna e zigotica (*esr2a*^{ATG}MO), mentre il secondo interferisce nel corretto processo di *splicing* per bloccare la maturazione post-trascrizionale del solo messaggero zigotico (*esr2a*^{SPLIC}MO).

Gli embrioni ottenuti dopo microiniezione di *esr2a*^{ATG}MO presentano numerose alterazioni morfologiche rispetto agli embrioni non iniettati (WT) o microiniettati con morfolino *standard* di controllo (^{Std}MO) e muoiono tra i 12 e i 14 giorni dopo la fecondazione (dpf). Il fenotipo morfante è caratterizzato da: ritardo nella crescita corporea, forma ricurva, anormale sviluppo di cervello e splanocranio, cavità pericardica ampia ed emorragica, vescica natatoria non insufflata, pinna

caudale rudimentale e anomala natazione circolare.

La specificità degli effetti ottenuti con la microiniezione è stata verificata anche mediante coiniezione, con l'*esr2a*^{ATG}MO, di un morfolino inattivante la proteina p53. Il fenotipo ottenuto silenziando anche p53 corrisponde a quello morfante; questo dimostra che gli effetti di *esr2a*^{ATG}MO sono specifici e non collegati ad un'iperattivazione di p53 causata dall'iniezione. È stato possibile inoltre riottenere il fenotipo WT mediante la coiniezione con l'*esr2a*^{ATG}MO del trascritto di *zebrafish* per *Esr2a* mutato nella regione complementare al morfolino. Questo dimostra che il legame dell'oligonucleotide al *target* è estremamente specifico.

Per approfondire in maniera più dettagliata la funzione del gene *esr2a* ho eseguito un esperimento di *gain of function* con il quale ho aumentato la concentrazione del trascritto del recettore. In un esperimento successivo ho iniettato l'mRNA per *esr2a* e trattato le uova con 17β-estradiolo (E₂) per osservare eventuali anomalie nei primi giorni dopo la fecondazione.

Dalla microiniezione di *esr2a*^{SPLIC}MO si ottengono embrioni con fenotipo paragonabile ai controlli. Questo morfolino interferisce nel processo di maturazione del messaggero zigotico, portando alla perdita del terzo esone e a una proteina tradotta non funzionante. Il risultato che ho ottenuto è un dato importante, perché suggerisce come le variazioni osservabili nel fenotipo *esr2a*^{ATG}MO siano imputabili principalmente all'inattivazione del trascritto materno.

Un'analisi mediante ibridazione *in situ* utilizzando marcatori di sviluppo ha evidenziato nei morfanti *esr2a*^{ATG}MO una possibile *up*-regolazione di *empty spiracles homeobox 1 (emx1)* e *sine oculis homeobox homolog 3a (six3a)* a 24 e 48 hpf e di *sonic hedgehog a (shha)* a 48 hpf. La colorazione con alcian blu delle cartilagini craniche ha rivelato un *pattern* alterato a 6 dpf. Le successive analisi mediante *in situ* di alcuni marcatori della regione cranica hanno evidenziato un profilo di espressione lievemente differente tra WT e morfanti per il gene *distal-less homeobox gene 2a (dlx2a)* a 48 hpf e di *neurogenic differentiation (neurod)* a 24 hpf.

Un'analisi di *microarray two-color* sul genoma totale di *zebrafish* è stata utilizzata per studiare l'espressione genica su embrioni di 8 e 48 hpf trattati con *esr2a*^{ATG}MO rispetto ai controlli iniettati con ^{Std}MO. Con l'analisi *microarray* a 8

hpf, si possono evidenziare le variazioni nell'espressione dovute principalmente al *knockdown* del recettore materno. L'analisi a 48 hpf permette invece di rilevare effetti del morfolino dovuti all'inattivazione anche dei trascritti embrionali.

L'analisi pangenomica di *microarray* a 8 hpf, ha individuato 237 trascritti significativamente *up*-regolati e 219 *down*-regolati a causa dell'assenza del recettore *Esr2a* materno negli embrioni iniettati con *esr2a*^{ATG}MO. A 48 hpf, 165 e 124 trascritti, presumibilmente zigotici, sono rispettivamente *up*-e *down*-regolati. Tra questi solo 8 sono in comune con quelli *up*-regolati a 8 hpf e 17 con quelli *down*-regolati.

È interessante osservare la presenza di un'*up*-regolazione dei trascritti implicati nella regolazione negativa della proliferazione cellulare. Si può ipotizzare che l'assenza di *Esr2a* porti ad una diminuzione della proliferazione cellulare, forse dovuta ad un aumento dell'apoptosi. Il dato è in accordo con i risultati del saggio di morte cellulare, mediante TUNEL, che ha evidenziato un numero di cellule apoptotiche nei morfanti notevolmente aumentato e concentrato nell'area cerebrale a 24 e 48 hpf.

L'analisi della vascolarizzazione embrionale sfruttando l'attività vasale della fosfatasi alcalina endogena e mediante l'utilizzo della linea transgenica TG(*fli1*:EGFP) a 3 e 6 dpf ha mostrato nei morfanti *esr2a*^{ATG}MO una netta diminuzione dei vasi subintestinali ed un *pattern* di distribuzione dei vasi lungo il tronco e la coda meno definito.

I risultati ottenuti suggeriscono che nello sviluppo di *zebrafish* sia presente un controllo epigenetico dipendente dall'mRNA materno di *Esr2a* e da un'interazione con gli estrogeni di eredità materna.

ABSTRACT

This thesis work is focused on the study of the role of the maternal mRNA for the estrogen receptor $er\beta 2$ (*esr2a*) on the long-term epigenetic modulation of development in zebrafish (*Danio rerio*).

Experimental evidence indicates that steroid hormones may participate in the maternal programming of the development in fish (Auperin and Geslin, 2008) and mammals (Darnaudéry and Maccari, 2007). In particular, estrogens secreted by the granulosa cells during vitellogenesis may be incorporated in fish oocytes (Hines *et al*, 1999) with possible significant effects on the subsequent ontogeny of the offspring.

In the present work on zebrafish, the expression levels of the mRNA coding for the Esr2a receptor were found to be high in ovulated oocytes and early embryos. The concentration of these transcripts decreased along the 8 hours post-fertilization (hpf) and then returned to rise with the onset of embryonic transcription.

The gene knockdown by morpholino antisense technology was applied to investigate the functional role of the *esr2a* in zebrafish development. Two different morpholinos were used: the first, designed on the ATG start translation codon, determines the knockdown by blocking the translation of both maternal and zygotic transcripts (*esr2a*^{ATG}MO); the second interferes with the correct splicing process to block only the post-transcriptional maturation of the zygotic messenger (*esr2a*^{SPLIC}MO).

The embryos microinjected with *esr2a*^{ATG}MO died between 12 and 14 days after fertilization (dpf) and displayed several morphological alterations compared to non-injected embryos (WT) or to controls microinjected with a standard unrelated morpholino (^{Std}MO). The morphant phenotype of fish treated with *esr2a*^{ATG}MO was characterized by delayed body growth, curved shape, abnormal development of brain and splanchnocranium, enlarged and hemorrhagic pericardial cavity, uninflated swim bladder, rudimental caudal fin and abnormal circular swimming. The specificity of the effects was verified by co-injecting the *esr2a*^{ATG}MO with a morpholino inactivating the p53 protein. The phenotype obtained with the co-

injection corresponded to that of fish injected with *esr2a*^{ATG}MO alone. This shows that the effects of the morpholino for *esr2a* are specific and not due to the hyperactivation of p53 caused by the microinjection. Resumption of the WT phenotype was achieved by co-injecting *esr2a*^{ATG}MO with the transcript for zebrafish *Ers2a* bearing 8 silent mutations in the region complementary to the morpholino. This demonstrates that the binding of the oligonucleotide to its target was very specific.

To further investigate the role of the gene *esr2a*, an experiment of gain of function was performed by increasing the concentration of the receptor transcript. Developmental abnormalities were also monitored during first days after fertilization following the microinjection of the mRNA for *esr2a* into eggs permeated with a solution of 17 β -estradiol (E₂).

The embryos treated with *esr2a*^{SPLIC}MO were comparable to controls. This morpholino interferes in the process of maturation of the zygotic transcript, leading to the loss of the third exon and to a translated protein that doesn't work. Significantly, this result suggests that the observed phenotypic changes after treatment with *esr2a*^{ATG}MO are mainly due to the inactivation of the maternal transcript.

The *in situ* hybridization analysis using developmental markers highlighted a possible up-regulation of *empty spiracles homeobox 1 (emx1)* and of *sine oculis homeobox homolog 3a (six3a)* at 24 and 48 hpf and of *sonic hedgehog (shha)* at 48 hpf. Staining with alcian blue revealed an altered pattern of cranial cartilage organization at 6 dpf in fish treated with *esr2a*^{ATG}MO. Subsequent hybridization with cranial markers showed a slightly different expression profiles between WT and morphants of the gene *distal-less homeobox gene 2a (dlx2a)* at 48 hpf and *neurogenic differentiation (NeuroD)* at 24 hpf.

Two-color microarray analysis of the total genome of zebrafish was used to study gene expression in embryos at 8 and 48 hpf after treatment with *esr2a*^{ATG}MO compared to controls injected with ^{Std}MO. Analysis at 8 hpf highlights changes in gene expression due mainly to the maternal receptor knockdown. The analysis at 48 hpf allows to detect morpholino effects due to the inactivation of embryonic transcripts as well. At 8 hpf, 237 transcripts were significantly up-regulated, while 219 were down-regulated as a result of the absence of the *Esr2a* receptor in

embryos injected with *esr2a*^{ATG}MO. At 48 hpf, 165 and 124 transcripts, presumably of zygotic origin, were up- and down-regulated, respectively. Among these, only 8 were in common with those up-regulated at 8 hpf and 17 with the down-regulated ones.

Interestingly, transcripts involved in the negative regulation of cell proliferation were up-regulated. It can be assumed that the absence of Esr2a leads to a decrease in cell proliferation, perhaps due to an increased apoptosis. This would be in keeping with the TUNEL analysis on the rate of cell death, which showed a greater number of apoptotic cells in the brain of morphant fish at 24 and 48 hpf as compared to controls.

The analysis of embryonic vascularization in the transgenic line TG (*flil*:EGFP) at 3 and 6 dpf, based on the vascular activity of endogenous alkaline phosphatase, evidenced a marked decrease in subintestinal vessel formation and derangement in the distribution patterns of trunk and tail vessels in fish treated with *esr2a*^{ATG}MO. These results suggest that the development of zebrafish is influenced by epigenetic control dependent on maternal *esr2a* mRNA and interaction with the inheritance of maternal estrogens.

INTRODUZIONE

1.1. *Zebrafish* (*Danio rerio*) come modello animale

Lo *zebrafish* o *Danio rerio* (detto anche *Brachydanio rerio*) è un pesce tropicale d'acqua dolce appartenente alla famiglia dei ciprinidi (*Cyprinidae*). Vive nelle acque del Sud Est Asiatico e suoi habitat naturali sono piccoli corsi d'acqua, fiumi, canali e stagni vicino a risaie (Dahm e Geisler, 2006). Il pesce è onnivoro: si ciba di zoo- e fitoplancton, e di larve e adulti di insetti.

Il periodo riproduttivo in natura avviene tra i mesi di aprile e agosto, varia però a seconda della latitudine, altitudine e delle condizioni climatiche (Engeszer *et al.*, 2007).

Phylum: *Chordata*
Classe: *Actinopterygii*
Ordine: *Cypriniformes*
Famiglia: *Cyprinidae*
Sottofamiglia: *Danioninae*
Genere: *Danio*
Specie: *Danio rerio*



Fig. 1: Maschio adulto (sopra) di *zebrafish* e femmina (in basso). Il nome deriva dalle caratteristiche strisce orizzontali che corrono lungo il corpo e le pinne. Le femmine possono essere riconosciute per le maggiori dimensioni del ventre mentre i maschi tendono a presentare un colore più giallastro.

Lo *zebrafish* si è affermato come organismo modello negli studi di genetica, biologia dello sviluppo, neurofisiologia e biomedicina (Aleström *et al.*, 2006; Dahm e Geisler 2006; Sumanas e Lin, 2004).

Il suo allevamento in laboratorio è semplice ed economicamente conveniente rispetto ad altri organismi modello, grazie alle ridotte dimensioni (raggiunge un massimo di 5-6 cm di lunghezza) che ne permettono il mantenimento in spazi

ristretti e alle limitate richieste alimentari. L'accoppiamento in laboratorio inoltre non presenta difficoltà: le femmine arrivano a deporre uova in grande quantità lungo tutto il corso dell'anno, fino a 200 uova a settimana se mantenute in condizioni ottimali (Dahm e Geisler, 2006). Questo permette di condurre studi genetici su larga scala. Il raggiungimento della maturità sessuale dopo un periodo dalla fecondazione di 3-4 mesi approssimativamente, rende l'organismo adatto per esperimenti di selezione. L'aspettativa media di vita è tra i 2 e i 4 anni.

L'osservazione e la manipolazione degli embrioni fin dalle prime ore di vita sono rese possibili dall'oviparità della specie e dalla fecondazione esterna (Spitsbergen e Kent, 2003), senza la necessità del sacrificio della madre come nei modelli murini e di mammifero in generale.

Gli embrioni si sviluppano rapidamente e, alla temperatura di 28,5°C, tutti i principali organi si formano entro le 72 ore dopo la fecondazione (hpf), (Kimmel *et al.*, 1995; Schaaf *et al.*, 2009). Il piano corporeo è riconoscibile come tipico dei Vertebrati già entro le 24 hpf.

Un notevole vantaggio di questo organismo modello è rappresentato dal rivestimento dell'uovo costituito dal *corion* che permette esperimenti di microiniezione finalizzati alla produzione di pesci transgenici, la sovra-espressione di mRNA e il knockdown di geni mediante l'utilizzo di morfolino (oligonucleotidi antisense modificati).

Caratteristica di quest'organismo è la trasparenza, sia dell'embrione che del *corion* presente fino alle 24 ore di sviluppo, e prolungabile grazie all'utilizzo dell'inibitore della sintesi di melanina, la fenil-tiourea (PTU). Questo permette di seguire *in vivo* e con alta precisione la migrazione e la differenziazione di singole cellule e di definire delle mappe presuntive dello sviluppo, "fate maps" (Woo *et al.*, 1995).

Inoltre, la trasparenza permette di analizzare gli embrioni mediante ibridazione *in situ whole mount* (Fjose *et al.*, 1992) e reazioni di immunistochemica (Wilson *et al.*, 1990).

Lo *zebrafish* è un ottimo organismo modello dal punto di vista della biologia molecolare dato che l'intero genoma è stato sequenziato ed è disponibile sul sito internet Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Sviluppi notevoli sono stati compiuti nel mappaggio genico, nell'analisi fenotipica e nella realizzazione di

estese librerie EST. Sono inoltre reperibili in rete informazioni sulla genetica, sulla genomica e sullo sviluppo grazie a *database* pubblici e privati (<http://www.zfin.org>).

Questi dati sono utilizzabili in acquacoltura, dove la genomica funzionale e la biologia molecolare sono applicate allo studio della crescita, della riproduzione, della qualità del cibo e dello sviluppo di malattie al fine di preparare vaccini e terapie mirate per specie di interesse commerciale. È utilizzato inoltre per biomonitorare gli effetti di tossine e inquinanti nell'ambiente (Aleström *et al.*, 2006) e nello studio della patogenesi di alcune malattie umane, così come nella ricerca farmaceutica ed in tossicologia (Hill *et al.*, 2005). Infatti, la conservazione del 70-80% delle posizioni geniche sui cromosomi tra i mammiferi, uomo incluso, e *Danio rerio*, come pure l'elevata omologia di sequenza permette l'utilizzo di questo animale in studi riguardanti diversi ambiti della ricerca medica e la sua applicazione come modello per varie patologie umane (Sumanas e Lin, 2004).

1.2. Lo sviluppo dello *zebrafish*

Il processo di sviluppo può essere diviso in 7 fasi, corrispondenti, a 28,5°C, a determinati intervalli di tempo: zigote (0 - 45 min dopo la fecondazione, pf), fase di divisione (45 min - 2 h e ¼ pf), blastula (2 h e ¼ - 5 h e ¼ dopo la fecondazione), gastrula (5 h e ¼ - 10 h dopo la fecondazione), fase di segmentazione corporea (10 - 24 h dopo la fecondazione), faringula (24 - 48 h dopo la fecondazione), fase di schiusa (48 - 72 h dopo la fecondazione). Nelle fasi di blastula e gastrula avviene la maggior parte dei processi di determinazione del destino cellulare.

Prima della fecondazione, citoplasma e tuorlo sono mescolati nella cellula uovo, circondata da un *corion* trasparente. Allo stadio di 1 cellula, il citoplasma si accumula al polo animale sotto il micropilo e forma il blastodisco, dove verrà a svilupparsi il futuro embrione. Lo zigote fecondato contiene tutte le informazioni necessarie al suo sviluppo nel genoma zigotico e negli mRNA materni e proteine depositate nel tuorlo.

Le divisioni cellulari sono di tipo meroblastico - discoidale, avvengono cioè solo nel blastodisco, e i blastomeri rimangono interconnessi da ponti citoplasmatici e comunicanti con il tuorlo. La prima divisione avviene dopo 45 min e le successive hanno luogo ogni 15 min. Dalla quarta divisione (stadio a 16 cellule), le cellule centrali diventano completamente divise dalle altre, che rimangono ai margini e connesse al tuorlo. Già durante le prime divisioni si riconoscono due linee cellulari: una linea germinale e una somatica.

Alla decima divisione cellulare, durante lo stadio di blastula, il ciclo cellulare rallenta e diviene asincrono. Questo evento è denominato transizione di medio-blastula (MBT).

Alla fine dello stadio di blastula inizia il processo di epibolia. Il blastoderma, che si forma per assottigliamento del blastodisco, si muove gradualmente verso il polo vegetativo sopra il tuorlo, fino ad avvolgerlo totalmente. Al 50% di epibolia, per ispessimento del margine prominente del blastoderma si forma l'anello germinale, una struttura a doppio strato costituita dall'epiblasto esterno e l'ipoblasto interno. Le cellule in migrazione convergono verso il futuro dorso embrionale, formando lo scudo embrionale (*shield*, 6 hpf).

Alla fine della gastrulazione l'epibolia è completa, il tuorlo è totalmente ricoperto dal blastoderma e gli assi corporei dorso-ventrale e antero-posteriore sono ormai stabiliti. Dopo la gastrulazione l'embrione si accresce lungo il suo asse nel periodo della segmentazione. L'abbozzo della coda (*tail bud*) è visibile alle 10 h dopo la fecondazione.

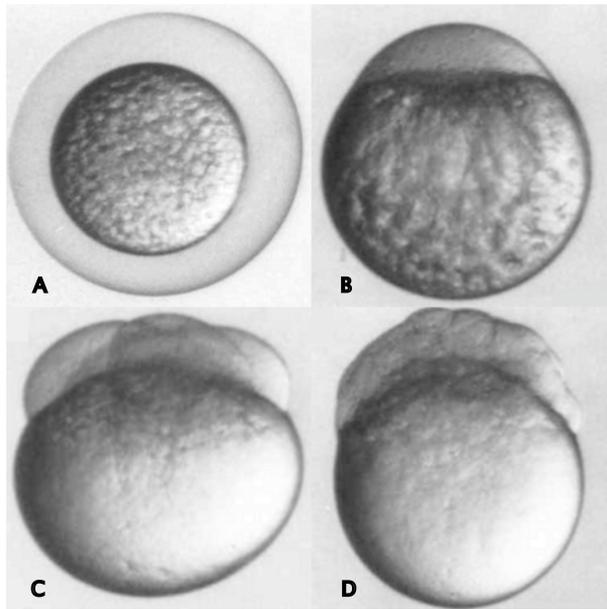


Fig. 2: Stadi di sviluppo di *zebrafish* (modificata da Kimmel *et al.*, 1995).

A: 0 h, zigote.

B: 12 min, 1 cellula.

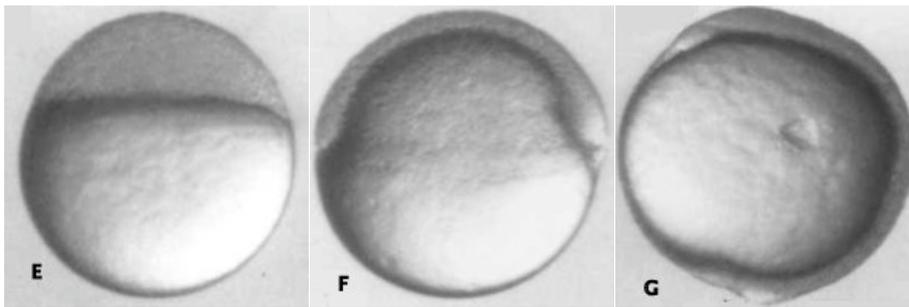
C: 1 h, 4 cellule.

D: 2 h, 64 cellule.

E: 4 h, sfera.

F: 6 h, *shield*.

G: 10 h, *tail bud*.



Durante la fase della segmentazione corporea il mesoderma somitico è diviso nei somiti. Allo stadio di 18 somiti è visibile la segmentazione del cervello in anteriore, intermedio e posteriore.

A circa 24 ore l'embrione è composto da 8.000 -10.000 cellule. Si distinguono occhi, otoliti, somiti, dotti pronefrici, epifisi, placodi olfattivi, sistema vascolare, precursori delle cellule sanguigne e un sistema nervoso ben organizzato. A 48 ore si osserva la pompa cardiaca e l'apparato intestinale in formazione, che sarà completo al quinto giorno.

Tra il secondo e il terzo giorno si ha la schiusa; l'embrione fuoriesce dal *corion* ed è in grado di nuotare. A 5 giorni si sviluppa la vescica natatoria. A 6 giorni il tuorlo è stato riassorbito e l'embrione inizia a nutrirsi in modo autonomo (Kimmel *et al.*, 1995).

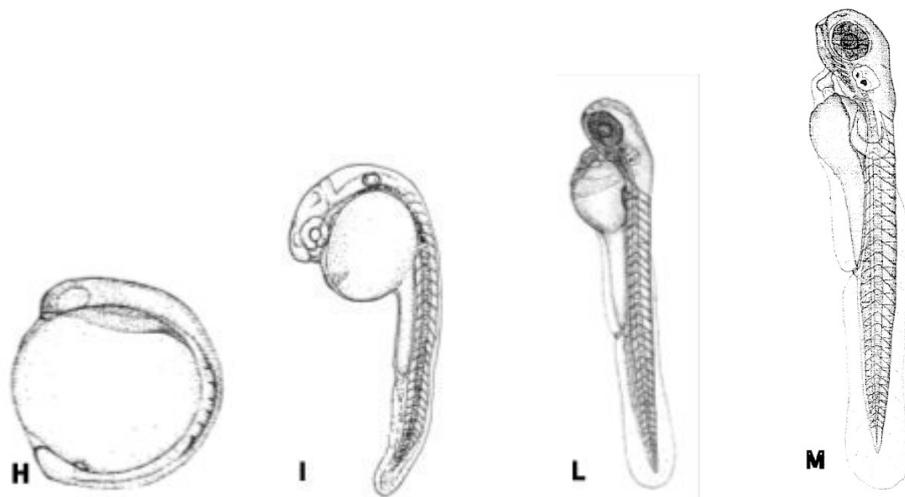


Fig. 3: Stadi di sviluppo di *zebrafish* (modificata da Kimmel *et al.*, 1995).

H: 12 h, 6 somiti. I: 24 h. L: 48 h. M: 72 h.

1.3. Presenza e ruolo degli ormoni steroidei nel tuorlo di ovociti ovulati

Il tuorlo degli ovociti ovulati nei pesci teleostei, come in altri vertebrati ovipari, contiene grandi quantità di ormoni liposolubili, come steroidi, ormoni tiroidei e retinoidi (McCormick, 1999; Irie e Seki, 2002), provenienti dalla circolazione materna o dall'*envelope* follicolare. Nello *zebrafish*, lo sviluppo embrionale e la schiusa sono influenzati dall'attività degli ormoni tiroidei. Poiché la ghiandola tiroidea diventa attiva solo dopo la schiusa, questa influenza viene esercitata dagli ormoni depositi dalla madre nel tuorlo dell'ovocita (Walpita *et al.*, 2010).

Evidenze sempre più numerose dimostrano come gli ormoni steroidei possano partecipare al *programming* materno nei processi di sviluppo nei pesci (Auperin e Geslin, 2008) e nei mammiferi (Darnaudéry e Maccari, 2007). Negli ovociti dei pesci sono presenti estrogeni secreti dalle cellule della granulosa durante il processo di vitellogenesi (Hines *et al.*, 1999) e le loro concentrazioni iniziali possono esercitare conseguenze profonde sulla ontogenesi successiva. Inoltre ormoni steroidei sessuali sono stati trovati in uova di salmone coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Feist *et al.*, 1990),

cortisolo nelle uova della tilapia mossambica (*Oreochromis mossambicus*) (Shiraishi et al., 1999) e testosterone in medaka (*Oryzias latipes*) (Iwamatsu et al., 2006). E' stato inoltre dimostrato come ci sia un continuo scambio di proteine e steroidi tra l'ovocita e le cellule follicolari (Hanna et al., 2011).

Esami effettuati su alcune specie hanno dimostrato che gli steroidi materni possono essere coinvolti nello sviluppo iniziale della prole e che la modificazione sperimentale della loro concentrazione determina effetti evidenziabili sulla progenie. Ciò dimostra che queste molecole non rappresentano dei semplici correlati alla condizione ormonale materna durante l'ovogenesi, ma sono composti biologicamente attivi fin dalle prime fasi dell'embriogenesi come suggerito da Brooks e collaboratori (1997).

Si sviluppano embrioni di lunghezza ridotta ad esempio da uova embrionate trattate con soluzioni di cortisolo, principale ormone dello stress, sia nella cernia, *Epinephelus coioides* (Tay et al., 1997), che nel pomacentride, *Pomacentrus amboinensis* (MacCormick, 1999). Una breve immersione di ovociti di trota iridea, *Oncorhynchus mykiss*, in una soluzione di cortisolo prima della fecondazione comporta una diminuzione del tasso di accrescimento postmetamorfico della progenie, senza alterazioni significative di quello premetamorfico (Belvedere et al., 1999).

Nello *zebrafish* il pregnenolone, primo steroide prodotto dal colesterolo nel sentiero metabolico degli ormoni steroidei, è invece implicato nella promozione della migrazione cellulare durante il processo di epibolia, un momento fondamentale dello sviluppo (Hsu et al., 2006).

Numerosi dati derivano inoltre da studi condotti sugli uccelli, dove l'aumento delle concentrazioni di androgeni presenti nel tuorlo porta ad uno sviluppo maggiore della massa muscolare e della crescita dopo la schiusa, ad un aumento dell'aggressività e della dominanza sociale e ad un aumentata percentuale di sopravvivenza. I risultati inoltre portano ad ipotizzare che alcuni di questi effetti possano essere a lungo termine e influire in modo permanente sul fenotipo (Carere e Balthazart, 2007).

Gli ormoni steroidei interagiscono con proteine nucleari che hanno funzione prevalente di fattori di trascrizione inducibili da ligando. La presenza dell'mRNA materno codificante questi recettori nucleari è stata dimostrata, mediante qRT-PCR nelle uova di *Danio rerio* durante le prime ore di sviluppo embrionale. In particolare è stato rilevato un alto contenuto dei trascritti codificanti il recettore dei corticosteroidi, *gr*, e di estrogeni, *esr2a*. Entrambi mostrano un sensibile decremento durante le prime

ore di sviluppo e i trascritti materni vengono poi sostituiti dai corrispondenti mRNA embrionali (Pikulkaew *et al.*, 2010).

Inoltre, il controllo esogeno dell'ovulazione, mediante induzione ormonale o manipolazione del fotoperiodo è risultato alterare le concentrazioni di alcuni trascritti specifici in uova di trota, compromettendo la qualità delle uova e la sopravvivenza della progenie (Bonnet *et al.*, 2007).

Si può quindi ipotizzare che esista un'influenza persistente di *programming* ormonale materno, vale a dire che la presenza dei recettori nucleari di origine materna e dei relativi ormoni potrebbe permettere un condizionamento epigenetico a lungo termine sull'espressione genica a partire dai primi stadi di sviluppo.

È necessario però che il tempo di persistenza ormonale coincida con quello di comparsa dei recettori, dato che nei teleostei la segmentazione sino allo stadio di discoblastula non comporta trascrizione, ma solo replicazione del DNA nucleare (Kimmel *et al.*, 1995). In questo modo è possibile che piccole variazioni nella concentrazione di ormoni e di mRNA materni ad essi correlati influenzino le prime tappe dei processi di sviluppo in *zebrafish*. Variazioni consistenti, come quelle osservate negli ovociti indotti artificialmente all'ovulazione, possono invece molto probabilmente compromettere la vitalità dell'embrione.

Per le loro caratteristiche di liposolubilità, questi ormoni materni, già presenti negli ovociti, potrebbero rappresentare un diretto collegamento di comunicazione chimica tra l'esperienza di vita materna e la capacità della progenie di superare le sfide ambientali e sociali.

Gli estrogeni in particolare giocano un ruolo importante nella corretta organogenesi di *zebrafish*. Sono richiesti per lo sviluppo del sistema nervoso centrale dove influenzano la migrazione delle cellule nervose, la loro sopravvivenza e morte, e la plasticità neuronale; sono coinvolti inoltre nello sviluppo dell'epitelio retinico (Hamad *et al.*, 2007). È dimostrato un coinvolgimento nel sistema nervoso periferico, dove influenzano risposte sensitivo-motorie. Inoltre lo studio di Fushimi *et al.* (2009) ha dimostrato che un'alta concentrazione di 17 β -estradiolo, E₂, causa un'anomala formazione della cartilagine e una *down*-regolazione dell'espressione degli mRNA del suo recettore. Ciò porta ad effetti teratogenici sulla condrogenesi degli embrioni di *zebrafish*. La loro presenza è inoltre indispensabile per un corretto funzionamento del sistema cardiovascolare e per la crescita corporea (Nelson *et al.*, 2008).

1.4. Sintesi degli estrogeni

Gli estrogeni influenzano la crescita, il differenziamento e il funzionamento di molti tessuti connessi e non alla riproduzione, incluso il sistema nervoso centrale (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2004).

Gli estrogeni naturali sono ormoni steroidei costituiti da 18 atomi di C, derivati dal colesterolo. La struttura di base è costituita da 4 anelli fusi (ciclopentanoperiidrofenantrene o estrano). Gli estrogeni naturali sono l'E₂, l'estrone e l'estriolo (prodotto principalmente, nei mammiferi, dalla placenta a partire dal 16-idrossideidroepiandrosterone-solfato sintetizzato dal fegato embrionale).

Il processo di biosintesi degli estrogeni vede inizialmente la formazione del pregnenolone dal colesterolo tramite l'attività C-20 α ,22 idrossilasi e C-20,22 liasi del citocromo mitocondriale P450_{scc} (*side chain cleavage*) codificato dal gene *cyp11a*. Nella reazione successiva il citocromo microsomiale P450_{c17} (CYP17) catalizza la sintesi del deidroepiandrosterone (DHEA) grazie all'attività C-17 α idrossilasi e C-17,20 liasi (con la produzione dell'intermedio 17 α -OH-pregnenolone). Nell'uomo e nei primati, il DHEA può essere recuperato anche grazie alla captazione dal circolo sanguigno del deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) prodotto dalla zona reticolare surrenalica, mediante l'attività di un trasportatore di anioni organici quali l'OATP-B e la successiva desulfurilazione ad opera di una steroide solfatasi, STS.

Il DHEA è convertito in androstenedione dal 3 β -idrossisteroide deidrogenasi/ Δ^5 - Δ^4 -3-cheto-isomerasi (3 β -HSD), enzima microsomiale che converte il gruppo idrossilico in C3 in un gruppo chetonico e sposta il doppio legame da C5-C6 a C4-C5 del primo anello.

Dall'androstenedione si ottiene l'estrone, composto a 18 atomi di C, grazie all'attività del citocromo P450_{arom} (CYP19), sito nel reticolo endoplasmatico liscio. La reazione di aromatizzazione comprende tre successive idrossilazioni dello steroide a 19 atomi di carbonio e quindi uno spontaneo riarrangiamento strutturale di aromatizzazione ad estrogeno, insieme al distacco di una molecola di acido formico. L'estrone può essere anche captato dal circolo come estrone solfato mediante un trasportatore anionico di membrana e desulfurilato.

L'aromatasi catalizza un'analogo reazione con formazione di E_2 a partire dal testosterone. L' E_2 si ottiene anche dall'estrone mediante l'azione della 17 β -idrossisteroide deidrogenasi (17 β -HSD), che converte il gruppo chetonico in C17 in un gruppo ossidrilico.

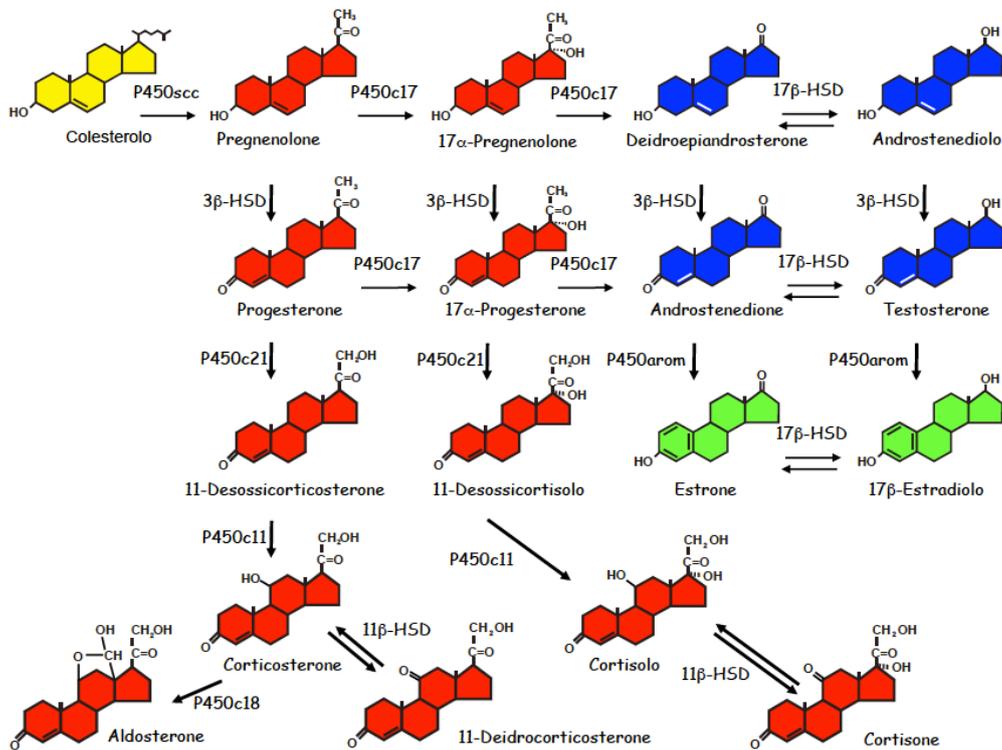


Fig. 4: Vie di sintesi degli ormoni steroidei.

1.5. I recettori nucleari

I recettori per gli estrogeni appartengono ad una superfamiglia di recettori nucleari. Si definisce recettore nucleare una classe di proteine che si trovano all'interno delle cellule e che, fungendo da recettore, mediano, dopo il legame con il ligando, specifiche risposte all'interno della cellula.

I recettori nucleari funzionano come fattori di trascrizione. Le loro azioni possono essere: genomiche o non-genomiche, ligando dipendenti o indipendenti, contribuire alla attivazione del gene o alla sua repressione.

Tutti i recettori nucleari presentano una struttura caratteristica che consiste di domini di omologia A/B, C (*DNA-binding*), D (regione cerniera) e E/F (ligando vincolante o LBD) sulla base della funzione e delle regioni di sequenza conservata.

Il dominio A/B N-terminale è altamente variabile per sequenza e lunghezza, tipicamente maggiore di 550 residui nel caso di recettori per alcuni ormoni steroidei (Enmark e Gustafsson, 1999), ma molto più breve nei recettori estrogenici (185 aa in hERa e 148 aa in hERb). Contiene il sito per la funzione di attivazione ligando-indipendente AF-1, coinvolto nell'attivazione della trascrizione dei geni bersaglio mediante il reclutamento di cofattori (Nilsson *et al.*, 2001).

Il dominio C contiene al suo interno un motivo a due dita di zinco, che lega sequenze specifiche di DNA (*ligand response elements*) ed è coinvolto nella dimerizzazione del recettore.

Segue il dominio D, o regione cerniera, che conferisce flessibilità alla struttura e serve da sito di ancoraggio per alcune proteine con funzione di corepressori.

Il dominio E ha funzione di legame del ligando e presenta la superficie di dimerizzazione del recettore. Il dominio F costituisce la regione di estensione C-terminale di LBD (Enmark e Gustafsson, 1999).

I domini C e E sono molto conservati tra i vertebrati (Kumar e Thompson, 2005).

I recettori nucleari funzionano come monomeri o come omo- o eterodimeri, in cui ciascun monomero si lega a specifici elementi di risposta (RE) formati da siti polinucleotidici uguali per omodimeri (o diversi per eterodimeri) separati da sequenze spaziatrici di lunghezza variabile.

Possono essere suddivisi in quattro classi basate sulla dimerizzazione e sulla proprietà di legame al DNA.

La classe “1” include i recettori per gli ormoni steroidei noti. L’attivazione mediata dal ligando induce una omodimerizzazione del recettore e il suo legame a sequenze di DNA ripetute invertite (*half sites RE inverted repeats*).

I recettori di classe “2” eterodimerizzano con recettori RXR (recettore dell’acido retinoico) e legano siti diretti del DNA; questa classe include tutti gli altri recettori dipendenti da ligando noti.

La classe “3” comprende recettori orfani omodimerici che si legano a siti ripetuti diretti (*half-site RE direct repeats*).

La classe “4” infine annovera recettori orfani monomerici che si legano ad un sito RE. I recettori orfani ricadono quindi nelle classi 3 e 4 (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

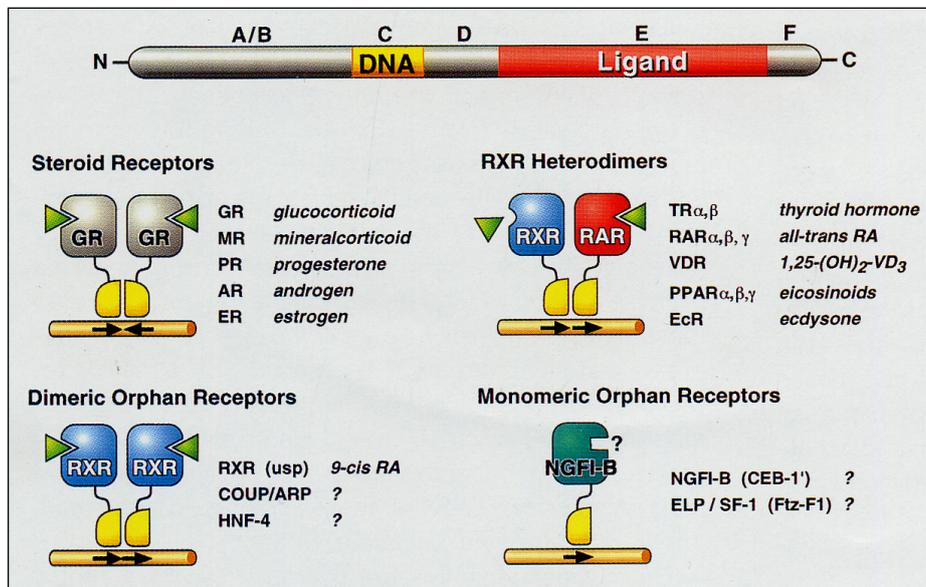


Fig. 5: Struttura comune dei recettori nucleari e suddivisione nelle quattro classi (Mangelsdorf *et al.*, 1995).

1.6. I Recettori ER

I genomi dei vertebrati, dai teleostei ai mammiferi, contengono almeno due sottotipi di recettore per gli estrogeni (ER), ER α (*esr1*) e ER β (*esr2*). Questi due sottotipi presentano una struttura generale simile derivata da un antico recettore per steroidi con funzionalità ER-like (Thornton et al., 2003).

ER α e ER β sono stati clonati in diverse specie di pesci teleostei e i dati sulla specificità ormonale e sulle caratteristiche sono disponibili in letteratura in numerose *review* (Menuet et al., 2002).

Inoltre, due sottotipi ER, filogeneticamente correlati al sottotipo ER β dei tetrapodi, sono stati isolati in diverse specie di pesci (Hawkins et al, 2000) tra cui lo *zebrafish* (Bardet et al, 2002; Lassiter et al, 2002; Menuet et al., 2002). Queste due varianti ER β sembrano derivare da duplicazione genica e sono state nominate rispettivamente Er β a e Er β b (Lassiter et al., 2002) o Esr2a e Esr2b o ER β 1 e ER β 2 (nomenclatura di *zebrafish*, <http://zfin.org>) (Tingaud-Sequeira et al., 2004).

Il profilo di espressione genica dei tre recettori ER α (*esr1*) e ER β 1 (*esr2b*) e ER β 2 (*esr2a*) è molto preciso in termini spazio-temporali durante lo sviluppo di *zebrafish* e rilevabile mediante ibridazione *in situ whole-mount*. In particolare, prima della transizione di medio-blastula (MBT), gli *esr2a* materni sono presenti nel tuorlo prima delle divisioni cellulari e migrano poi nei primi blastomeri attraverso flussi ooplasmici. Dall'inizio della segmentazione tutti e tre i recettori sono rilevabili lungo l'embrione. A 24 h una diffusa espressione è visibile nell'epidermide, nella testa, nel tronco e negli abbozzi delle pinne pettorali. Sezioni trasversali mostrano una marcata espressione di *esr2a* nell'epidermide e una colorazione diffusa nel sistema nervoso centrale in via di sviluppo. Dalle 24 h in poi, il segnale epidermico per i tre recettori diviene più diffuso e i trascritti rimangono ben rilevabili nel cervello che si sta sviluppando, nelle arcate branchiali e nelle pinne pettorali. A 60 h dopo la fecondazione l'mRNA di *esr2a* si distingue chiaramente nei neuromasti primari maturi del sistema anteriore (sistema meccanocettivo derivato da placodi ectodermici). A 3 giorni anche nei neuromasti della linea laterale posteriore si rileva l'espressione di *esr2a*, e in misura minore di *esr2b* e *esr1*. Dai 6 giorni in poi i trascritti di *esr2a* e *esr2b* sono co-espressi nelle cilia e nelle cellule di supporto dei neuromasti primari

maturi, nelle arcate branchiali, nelle pinne pettorali, e nella papilla anale. Il segnale di *esr1* è debole (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2004).

1.7. La trasduzione del segnale del recettore degli estrogeni (ER)

Esistono tre differenti vie di attivazione del recettore degli estrogeni: genomica classica, genomica ligando-indipendente e non genomica.

L'attivazione del recettore ligando-dipendente o genomica "classica", a partire dal momento del legame con il ligando, richiede da 30 min a diverse ore per la sua attivazione.

L'E₂ è in grado di penetrare nella cellula attraversando liberamente il doppio strato lipidico. La penetrazione nel nucleo del recettore può avvenire invece sia per diffusione passiva attraverso il canale centrale del poro nucleare sempre aperto sia per trasporto attivo. In questo caso è fondamentale l'interazione tra la NLS (*nuclear localization sequence*) posta nel dominio D dell'ER e la proteina Hsp90 (Klinge, 2000).

Il legame del recettore con l'estradiolo induce un cambiamento conformazionale che attiva il recettore, promuove l'omodimerizzazione e il legame con alta affinità a specifici ERE (*estrogen response elements*), elementi di risposta sul DNA che agiscono da *enhancers* e che sono posti nelle regioni regolative dei geni bersaglio (Hall *et al.*, 2001).

Il recettore legato al DNA richiama l'apparato di trascrizione che richiede l'assemblaggio di varie proteine tra cui il *TATA-box-binding protein* (TBP) e altri fattori associati alla *TATA-box*. Tali componenti, necessari per il complesso di inizio della trascrizione, sono correlati alla RNA polimerasi II.

Esistono inoltre delle proteine co-fattori associate all'ER che hanno la funzione di richiamare l'apparato trascrizionale. Alcune di queste sono state identificate, come SRC-1, GRIP1, AIB1, CBP/p300, TRAP220, PGC-1, p68 RNA *helicase* e SRA (Hall *et al.*, 2001).

I coattivatori trascrizionali, interagendo con l'ER, formano un complesso stabile che facilita l'azione di *disruption* della cromatina a livello della sequenza ERE.

In assenza del ligando, il recettore è sequestrato in un complesso inibitorio multiproteico all'interno dei nuclei delle cellule bersaglio, complessato con la chaperonina Hsp90, che insieme ad altre proteine stabilizza la struttura del recettore fino al legame con l'estrogeno.

In mancanza dell'ormone il recettore può comunque modificare la sua attività mediante una cascata di fosforilazioni che ne comportano ugualmente l'attivazione.

La stimolazione ligando-indipendente ha origine da fattori di crescita (EGF, IGF, TGF α), aumenti della concentrazione di cAMP, attivazione della fosfochinasi A (PKA) e alterazioni nello stato di fosforilazione dell'ER (Schreihofner *et al.*, 2001).

La via non-genomica, al contrario di quella genomica, è caratterizzata da una certa rapidità di risposta compresa in un intervallo dai pochi secondi a 10 minuti (Kajiwara *et al.*, 2006). Alcuni effetti degli estrogeni non possono essere giustificati con meccanismi genomici, a causa della loro rapidità (Gruber *et al.*, 2002).

Nella via non-genomica, l'estrogeno prende contatto con forme del recettore collocate sulla superficie cellulare e media direttamente le risposte biologiche. I recettori degli estrogeni si trovano inoltre in invaginazioni della membrana cellulare chiamate *caveolae*. Studi su cellule umane (osteoblasti, endotelio, neuroni e cellule tumorali della mammella) hanno dimostrato che l'interazione tra estrogeno e recettore causa l'attivazione della cascata di *signaling* delle *mitogen-activated protein kinase* (MAP) chinasi (Collins e Webb, 1999).

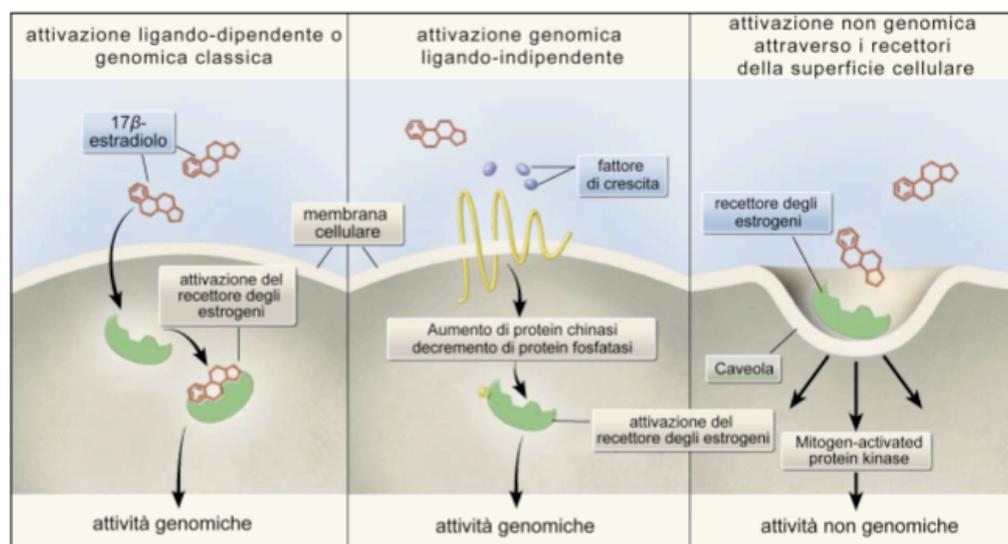


Fig. 6: Le tre vie di attivazione del recettore degli estrogeni (Gruber *et al.*, 2002).

1.8. I trascritti materni e zigotici per *Esr2a* in *zebrafish*

In un precedente lavoro (Pilkukaew et al., 2010) i trascritti per i principali recettori degli ormoni steroidei sono stati analizzati mediante qRT-PCR durante le prime fasi di sviluppo dello *zebrafish*. Come riportato in precedenza i due trascritti presenti in concentrazioni maggiori sono risultati essere quelli per *gr* e per la forma beta 2 del recettore degli estrogeni (*Esr2a*). Per quanto riguarda i trascritti per le altre forme di recettore degli estrogeni, quelli codificanti la forma *Esr1* sono poco espressi nelle prime ore dello sviluppo embrionale dello *zebrafish* ed aumentano leggermente a partire dalla trascrizione embrionale.

Il trascritto per la forma *esr2b* viene espresso con valori crescenti dalle 12 hpf successive alla fecondazione, dopo quindi la transizione di media-blastula (MBT) e l'inizio della trascrizione embrionale. È stato dimostrato che il gene dell'aromatasi cerebrale *cyp19b* è molto espresso in *zebrafish* tra le 24 e le 48 ore (Lassiter e Linney, 2007). Gli estrogeni sintetizzati nel periodo di schiusa possono perciò interagire con il recettore *Esr2b* di origine embrionale.

È soprattutto *Esr2a* a interagire nelle prime 4-8 hpf con gli estrogeni materni presenti nel tuorlo e derivanti dalle cellule della granulosa dell'*envelope* follicolare (Pilkukaew et al., 2010).

Nell'analisi di espressione degli mRNA dei recettori degli ormoni steroidei durante l'embriogenesi di *zebrafish* mediante qRT-PCR (Pilkukaew et al., 2010), i trascritti codificanti *Esr2a* risultano essere cospicui nelle primissime ore di sviluppo (Fig. 7). I messaggeri di origine materna sono presenti in concentrazioni abbastanza elevate subito dopo la fecondazione, subiscono poi un declino nella fase di blastula e raggiungono un minimo allo stadio di gastrula, per poi risalire lievemente con l'inizio della trascrizione embrionale. La presenza di significativi livelli di mRNA di *esr2a* di origine materna nell'embrione *zebrafish* è stata dimostrata anche in altri lavori sia con tecniche semi-quantitative (Bardet et al., 2002; Lassiter et al., 2002) che mediante qRT-PCR (Tingaud-Sequeira et al., 2004; Froehlicher et al., 2009).

Nei primi stadi embrionali il messaggero è evidenziabile nell'epidermide, nelle pinne pettorali, nel cervello in via di sviluppo e nei neuromasti (Tingaud-Sequeira et al., 2004). Nell'adulto i trascritti sono presenti nel cervello, nel fegato, nelle gonadi e in

due regioni neuroendocrine, l'area preottica e l'ipotalamo medio basale (Menuet *et al.*, 2002).

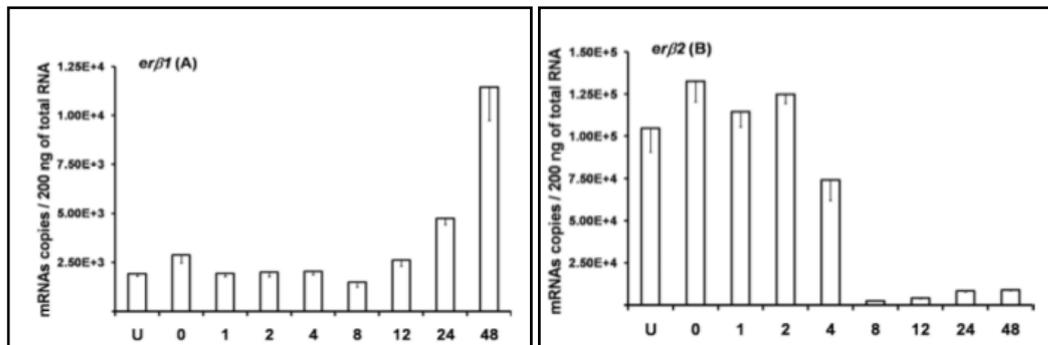


Fig. 7: Numero di copie di trascritti di recettori steroidei dopo normalizzazione con mRNA di *efla* come controllo interno. In ascissa le ore dopo la fecondazione (U=ovociti ovulati). A: *erβ1* (*esr2b*). B: *esr2a* (*erβ2*) (Pikulkaew *et al.*, 2010).

Come è stato possibile evidenziare in questa tesi (vedi risultati), la trascrizione zigotica per il recettore Esr2a inizia circa 6 ore dopo la fecondazione, seppur a livelli ancora molto bassi. Nel corso di questa transizione materno - zigotica gli mRNA materni vengono degradati negli ovociti. È stato documentato che un gran numero di mRNA della madre possono essere distrutti da parte dell'attività di un microRNA, miR430, che viene trascritto durante la transizione (Giraldez *et al.*, 2006). Lo sviluppo precoce degli embrioni avviene quindi in gran parte nel contesto di un accumulo di mRNA materni e proteine, che hanno un ruolo fondamentale nel dirigere i primi processi di sviluppo nei teleostei.

La presenza dei recettori nucleari, tradotti da mRNA di origine materna, e dei relativi ormoni potrebbe dar luogo a un condizionamento epigenetico a lungo termine sull'espressione genica a partire dai primi stadi di sviluppo. La trascrizione embrionale negli stadi iniziali è in gran parte silenziosa e le prime rapide divisioni cellulari sono sostenute dagli RNA messengeri che la madre colloca nelle uova.

Scopo della mia tesi di dottorato è stato lo studio della funzione dei trascritti di origine materna per la forma *esr2a* del recettore degli estrogeni sullo sviluppo dello zebrafish. Durante lo svolgimento di questa tesi un gruppo di ricerca svizzero (Froehlicher *et al.*, 2009) ha pubblicato un lavoro riguardante le possibili funzioni degli estrogeni nello

sviluppo iniziale del sistema sensoriale di *zebrafish*. Anche nel loro caso è stata utilizzata la tecnica di *knockdown* genico mediante morfolino. Il *knockdown* di *esr2a* dimostra un ruolo importante degli estrogeni nello sviluppo del sistema sensoriale di *zebrafish*: *esr2a* risulta infatti essenziale per il differenziamento e lo sviluppo delle cellule ciliate dei neuromasti. I neuromasti sono composti da due gruppi di cellule, quelle di supporto e quelle ciliate, innervate da neuroni sensoriali che inviano le informazioni al sistema nervoso centrale. Fanno parte degli organi della linea laterale anteriore e posteriore, organi superficiali del sistema sensoriale con la funzione di percepire variazioni pressorie dell'acqua, facilitando così la cattura della preda o la fuga dal predatore.

Il *knockdown* porta inoltre a morfanti con coda ricurva, minor tasso di schiusa e movimenti natatori circolari dopo stimolazione con un ago, dovuti probabilmente al mancato differenziamento di cellule ciliate funzionali nell'orecchio interno.

Due esperimenti di *microarray* con differenti concentrazioni di morfolino per *esr2a* (15 e 50 μM) e rispettivi controlli su campioni di RNA estratti a 72 ore rivelano 631 geni influenzati con entrambe le concentrazioni (Froehlicher *et al.*, 2009).

I dati ottenuti dall'esperimento di *microarray* indicano un'alterazione generale del processo di neurogenesi nei morfanti. I geni *neurogenina* (*ngn1*) e *neuroD* (*nrd*) risultano sovraespressi. L'ibridazione *in situ* per *ngn1* rivela un *pattern* di espressione alterato: il trascritto si ritrova nei neuroni motori del tubo neurale e non nei neuroni sensitivi della linea laterale. Questo potrebbe spiegare la mancata reattività dei morfanti a stimoli tattili.

Nei morfanti si rileva inoltre un'anomala iperattivazione della via di segnale *Notch*, che può essere implicato nella determinazione del destino cellulare e nel processo di maturazione dei neuromasti.

La conclusione dei ricercatori è che l'isoforma *Esr2a* sia necessaria per il normale sviluppo del sistema sensoriale (Froehlicher *et al.*, 2009).

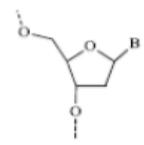
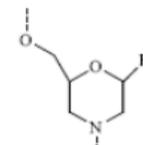
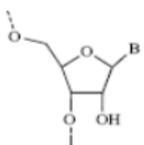
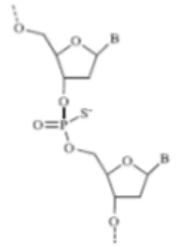
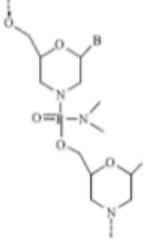
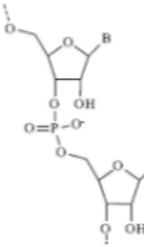
1.9. Il *Knockdown* genico

In questo studio, ho esaminato la funzione della forma beta2 del recettore degli estrogeni durante l'embriogenesi di *zebrafish* utilizzando la tecnologia dell'oligonucleotide antisense morfolino, disegnato sul codone di inizio traduzione ATG (*esr2a*^{ATG}MO) e quindi in grado di inibire la traduzione degli mRNA codificanti. Gli agenti che inibiscono l'espressione di un gene selezionato, attraverso un meccanismo fondato sull'appaiamento Watson-Crick delle basi, vengono chiamati antisense o agenti di *knockdown* genico (Summerton, 2007).

Questi si dividono in tre classi principali:

- *phosphorothioate-linked* DNA (S-DNA);
- *short interfering* RNA (siRNA);
- morfolino

La struttura molecolare di un rappresentante per classe è visualizzabile nella tabella 1.

Classe	RNAasi H dipendente	Blocco sterico	Interferenza su RNA
Tipo	<i>Phosphorothioate-linked</i> DNA	Morfolino	<i>Short interfering</i> RNA
Struttura delle subunità	 Anello deossiriboso	 Anello morfolino	 Anello riboso
Struttura	 S-DNA	 Morfolino	 siRNA
Principali siti d'azione	Nucleo	Nucleo e citoplasma	Citoplasma

Tab. 1: Configurazione molecolare delle tre principali classi di agenti di *knockdown* genico (Summerton, 2007).

A partire dalla natura della molecola stessa e dal suo meccanismo d'azione, è possibile eseguire una valutazione degli aspetti positivi e negativi delle tre tipologie di agenti *knockdown*. Le qualità principali richieste sono un'alta specificità di sequenza, ovvero la capacità di bloccare la funzione solo dell'RNA *target*, e l'assenza di effetti non-antisenso (*off-target effects*), legati cioè ad interazioni dell'oligo con strutture diverse dal trascritto genico di interesse come proteine extracellulari, di membrana o intracellulari.

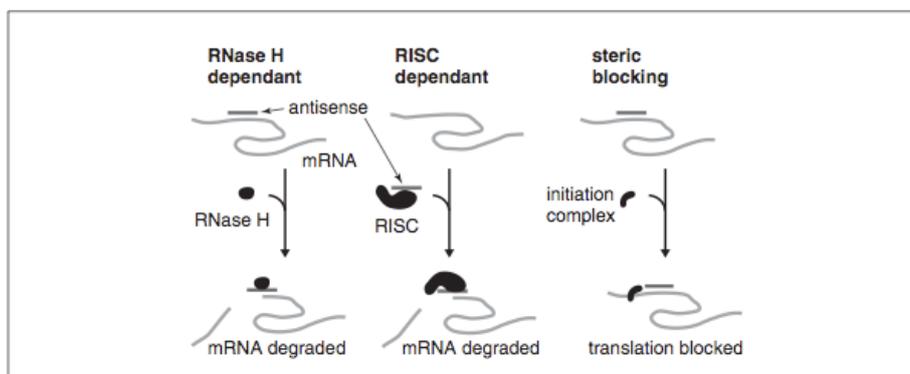


Fig. 8: Meccanismi di silenziamento genico a confronto (Moulton e Yan, 2008).

1.9.1. Il *phosphorothioato-linked DNA (S-DNA)*

Questa prima classe di agenti antisenso sfrutta l'enzima RNasi H cellulare per il taglio della sequenza di interesse. La specificità di sequenza è bassa: è sufficiente un appaiamento S-DNA/RNA di solo 7 basi perché avvenga il taglio enzimatico.

L'unica variazione strutturale di questa molecola rispetto al DNA è la sostituzione di un ossigeno di ogni gruppo fosfato con un zolfo (vedi tabella). Da questo deriva il loro nome, S-DNA (Cohen *et al.*, 1993). Questa sostituzione comporta una più lenta degradazione dell'agente antisenso per opera delle nucleasi. La presenza del zolfo sullo scheletro fosfato del DNA diminuisce però notevolmente l'affinità dello stesso per il trascritto *target* (Summerton e Weller, 1997) e limita la possibilità dell'oligo di invadere la struttura secondaria moderatamente stabile dei trascritti di RNA in

condizioni fisiologiche: solo il 10-20% degli S-DNA ha effetti sulla loro sequenza complementare. Porta invece alla formazione di legami aspecifici con un vasto numero di proteine (Krieg e Stein, 1995). Di conseguenza, gli effetti *off-target* di questa tecnica sono così numerosi e vari da rendere difficile determinare se la risposta biologica osservata sia data davvero da un'inibizione selettiva mediante meccanismo antisenso.

1.9.2. Gli *short interfering* RNA (siRNA)

Il siRNA (*short interfering RNA*) è una molecola di RNA a doppio filamento lunga tra i 20 ed i 25 nucleotidi utilizzata negli studi sulla funzione genica e sullo sviluppo di nuovi farmaci. Il doppio filamento viene processato all'interno della cellula. Nel processamento un filamento del *duplex* deve combinarsi con proteine cellulari per formare il complesso RISC (*RNA-induced silencing complex*). Il complesso attivato, localizzato soprattutto nel citoplasma, sotto la guida del singolo filamento antisenso di siRNA, blocca la traduzione di sequenze di mRNA parzialmente complementari e taglia quelle altamente complementari.

Una delle sue funzioni è quella di *knockdown* genico. La specificità del silenziamento è limitata dalla brevità della sequenza guida (segmento di 11 paia di basi nella regione 5'- del siRNA), che può riconoscere anche sequenze diverse da quella bersaglio. La tecnica porta inoltre a degli effetti *off-target*, principalmente legati all'attivazione della risposta mediata da interferone. Generalmente l'iniezione di siRNA in *zebrafish* porta molti effetti aspecifici, ma, nell'embrione in via di sviluppo, i siRNA riescono a bloccare con efficacia la traduzione di trascritti bersaglio se diretti verso la regione 3'-terminale non tradotta (3'-UTR). In media il 50% dei siRNA è effettivo verso il proprio bersaglio (Summerton, 2007).

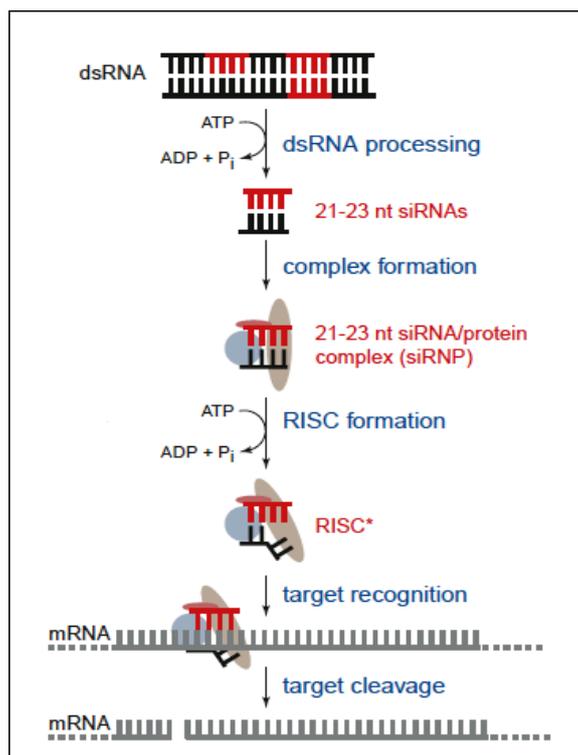


Fig. 9: Il processo di silenziamento mediante *interfering* RNA (siRNA) (Zamore, 2001).

1.9.3. Il morfolino

Gli oligonucleotidi antisenso morfolino sono validi mezzi per investigare lo sviluppo dei Vertebrati. Il loro funzionamento si basa su un semplice meccanismo di ingombro sterico RNasi-H indipendente, analogo a quello degli agenti antisenso di tipo PNA (*Peptide Nucleic Acid*). I morfolini sono normalmente applicati a sistemi complessi che richiedono un'alta specificità, come gli embrioni in via di sviluppo, mentre gli PNAs dominano dove è richiesta un'elevata affinità di legame, come nell'invasione di un *duplex* di DNA. I morfolini vengono molto utilizzati negli studi di *knockdown* genico negli embrioni per la mancanza, o la minore incidenza, di effetti *off-target*, l'elevata specificità di sequenza, la completa stabilità nei sistemi biologici e l'alta predicibilità del *targeting* (Summerton, 2007). L'oligo morfolino è un analogo sintetico degli acidi nucleici, lungo in genere 25 paia di basi, progettato e sintetizzato nella maggior parte dei casi dalla ditta *Gene Tools* (*Gene Tools LLC*, Philomath, OR 97370 USA). Presenta due differenze strutturali rispetto al DNA: nel morfolino il legame fosfodiesterico a carica negativa è sostituito da un legame fosfordiamidato

senza carica ionica e al posto dell'anello desossiribonucleico a 5 atomi si trova un anello morfolinico a 6 atomi che lega una delle 4 basi azotate. Queste modificazioni lo rendono estremamente resistente alla degradazione enzimatica senza influenzarne la capacità di legame mediante appaiamento Watson-Crick (Egger, 2000).

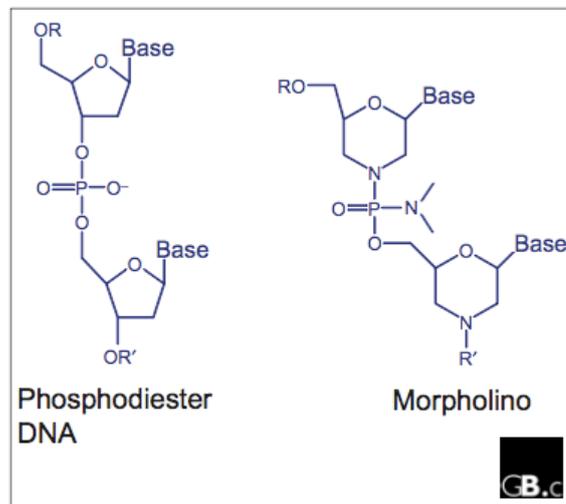


Fig. 10: Confronto tra le strutture del DNA e del morfolino (Corey e Abrams, 2001).

Se il morfolino viene utilizzato a 37°C il funzionamento è ottimale e nel 70-80% dei casi si ottiene l'effetto desiderato sul gene bersaglio. È inoltre necessario che vengano rispettati dei parametri precisi nella scelta della sequenza: un contenuto in GC in un intervallo compreso tra il 35 e il 65%; l'assenza di 4 o più G consecutive o di un contenuto di G maggiore del 36% per evitare un calo nella solubilità ed una riduzione dell'attività. Si deve evitare infine che nel morfolino ci siano più di 5 basi consecutive di autocomplementarietà o più di 16 legami ad idrogeno che portino alla formazione di dimeri (Moulton e Yan, 2008).

I vantaggi del morfolino sono numerosi (Summerton, 2007):

- ha un'alta affinità per la sequenza di RNA complementare bersaglio ed è disegnato per riuscire efficacemente ad invadere la maggior parte delle strutture secondarie dell'RNA;
- è stabile nei sistemi biologici e la sua mancata degradazione non porta alla produzione di composti tossici per la cellula;
- passa liberamente tra citoplasma e nucleo;

- è estremamente solubile in soluzioni acquose;
- presenta meno effetti *off-target* data l'assenza di carica nello scheletro della struttura e la conseguente mancata interazione elettrostatica con proteine;
- non innesca la cascata del complemento;
- l'eventuale presenza di sequenze contenenti quartetti-G non porta a effetti biologici aspecifici come l'attivazione del fattore di trascrizione Sp1;
- non lega in maniera significativa le componenti macromolecolari di sangue e siero;
- non attiva il sistema di risposta interferonica;
- non ha interazioni con i farmaci e non chela ioni metallici, che potrebbero interferire con l'apoptosi (Iversen, 2007).

I morfolini possono agire sulla traduzione proteica o sullo *splicing* dei pre-mRNA.

I morfolini bloccanti la traduzione hanno come bersaglio una sequenza dell'mRNA maturo compresa in una regione dal *cap* in 5'- alla posizione + 25 nella sequenza aminoacidica codificante. Oltre questa distanza l'attività inibitoria dell'oligo viene a mancare. È preferibile comunque che il morfolino abbia come bersaglio una sequenza sovrapposta o molto vicina all'AUG di inizio traduzione. La traduzione proteica viene bloccata, perché l'oligo antisense invade la struttura secondaria del messaggero e non permette il legame con i ribosomi (Summerton, 2007).

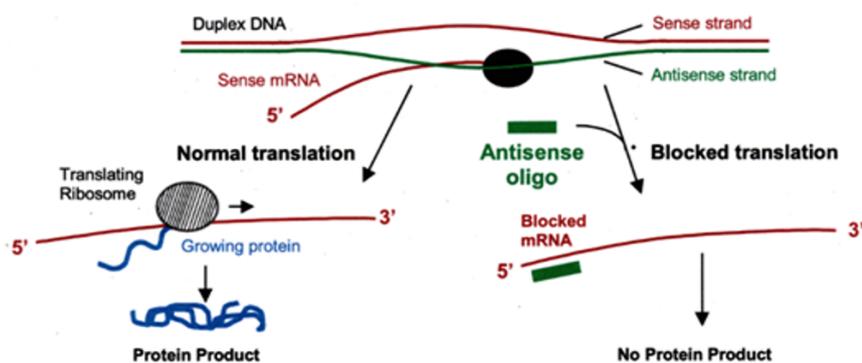


Fig. 11: Blocco della traduzione mediante oligo antisense morfolino (<http://www.gene-tools.com>).

Un altro approccio basato sul morfolino, che permette anche una quantificazione dell'efficienza del *knockdown* genico, ha come fine il blocco dello *splicing* dei pre-mRNA. I morfolini bloccanti lo *splicing* sono complementari ai siti accettori (limite tra introne ed esone) e donatori (limite tra esone ed introne) nell'RNA, e competono con il meccanismo di *splicing* per il legame. Il legame del morfolino porta ad un'erronea escissione di un esone o ritenzione di un introne (Draper *et al.*, 2001).

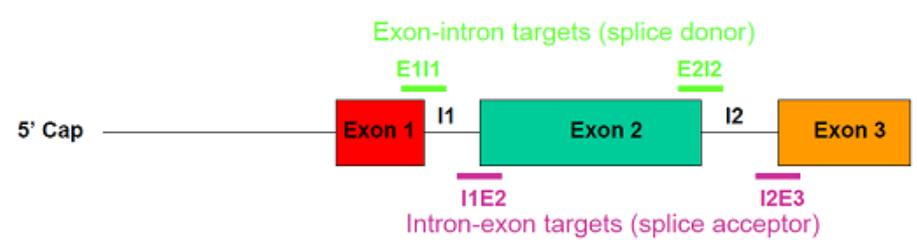


Fig. 12: Blocco dello *splicing* mediante oligo antisense morfolino (<http://www.genetools.com>).

Il morfolino può a volte essere tossico per le cellule e indurre alcuni effetti *off-target*. Può causare inoltre morte cellulare indotta da stress nel sistema nervoso centrale e nei somiti. Esiste infine la possibilità del blocco della traduzione di geni contenenti sequenze simili al *target*.

Eventuali effetti aspecifici del morfolino possono essere controllati mediante l'iniezione di un oligonucleotide *mismatch*, che differisce per almeno 5 basi dal morfolino funzionante. Da questa iniezione è atteso un fenotipo WT (Eisen e Smith, 2008).

La tecnica del morfolino è ampiamente utilizzata in *zebrafish*, come strumento di *knockdown* di specifici geni e di indagine del loro ruolo nei processi di sviluppo ma non solo.

Il morfolino è normalmente microiniettato negli embrioni di *zebrafish* allo stadio di 1 cellula per inibire la traduzione o il corretto *splicing* dei geni di interesse e l'effetto è dipendente dalla concentrazione (Nasevicius e Ekker, 2000). Gli embrioni con fenotipo modificato dal morfolino sono chiamati morfanti (Ekker, 2000).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Allevamento di *zebrafish* (*Danio rerio*)

L'acqua in cui vengono allevati gli *zebrafish* viene prodotta artificialmente e mantenuta ad una temperatura di 28°C. Per ottenere la concentrazione salina ed il pH ottimale, a 150 L più di acqua deionizzata vengono aggiunti i seguenti sali: 23,5 g CaSO₄, 3 g NaHCO₃, 15 g *instant ocean*. L'acqua inoltre deve essere priva di cloro ed i nitrati non devono superare il valore di 30 mg/L.

L'allevamento prevede la somministrazione di tre pasti giornalieri: uno costituito da cibo secco a scaglie (AZ300, Tetra), e due da *nauplii* di *Artemia salina*. Queste ultime sono acquistate come cisti (*Artemia cysts*, INVE) e vengono fatte schiudere in laboratorio con un semplice apparato costituito da un cono in *pvc*, da 8 L di acqua e sale, un areatore e una lampadina. Dopo circa 48 ore si possono raccogliere i *nauplii*, filtrandoli per eliminare eventuali cisti non schiuse.

In vasche da 5 L vengono tenuti fino a 20 pesci adulti, utilizzati come riproduttori. In genere il numero dei maschi è pari a quello delle femmine.

La sera prima della microiniezione vengono selezionate coppie di pesci e trasferite in vaschette da 1 L dotate di un separatore in plastica trasparente e di un doppio fondo attraverso il quale possono passare le uova. Il maschio e la femmina rimangono divisi tutta la notte. La mattina seguente il separatore viene tolto e le vasche vengono poste alla luce per indurre l'accoppiamento e la deposizione delle uova.

Il doppio fondo, dove si raccolgono le uova, evita che i pesci si cibino delle uova appena deposte, per compensare le perdite energetiche dovute al frenetico corteggiamento e alla produzione dei gameti.

Gli *zebrafish* hanno un fotoperiodo ottimale di 14 ore di luce e 10 ore di buio, ottenuto utilizzando lampade regolate da un *timer* per l'erogazione della luce artificiale.

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

La soluzione è composta da:

- *fish water stock 50X*: 25g *instant ocean*, 39,25 g CaSO₄, 5 g NaHCO₃, dH₂O fino ad un volume finale di 5 L;
- *fish water (1X)*: 200 ml *fish water stock (50x)*, 0,00004% blu di metilene, dH₂O fino ad un volume finale di 10 L.

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

Per determinare l'andamento di crescita in relazione alla temperatura (HT), Kimmel ha utilizzato la seguente funzione:

$$HT = h/(0,055*T-0,57)$$

dove T = temperatura, h = ore di sviluppo a 28,5 °C.

La schiusa avviene circa 72 h dopo la fecondazione e le riserve del tuorlo si esauriscono dopo 5-6 giorni. Quindi, al sesto giorno, inizia l'alimentazione delle larve che prevede la somministrazione, tre volte al giorno, di cibo secco in polvere finissima (*Novo Tom*, JBL). A 7 giorni, le larve vengono trasferite in vasche da 1 L, con un numero massimo di 200 per vasca. A tre settimane gli esemplari vengono spostati nell'armadio per lo stoccaggio degli adulti ed alimentati inizialmente con cibo secco a scaglie sottili (AZ300, Tetra) ed artemie ed infine, all'età di circa 2-3 mesi, come gli adulti.

2.2. Microiniezione di morfolino

La microiniezione è la tecnica che permette l'introduzione di costrutti in uova fecondate di *zebrafish*. Viene utilizzata solitamente con lo scopo di creare pesci transgenici o di studiare *in vivo* la funzione di specifiche sequenze geniche, bloccandone l'espressione grazie all'utilizzo del morfolino.

2.2.1. Preparazione della *working solution*

Gli oligonucleotidi antisenso morfolino sono sintetizzati dalla ditta “Gene Tools” che li spedisce in forma liofilizzata. In seguito vengono risospesi in H₂O mQ per ottenere una soluzione madre 1 mM e conservati a temperatura ambiente.

Le sequenze di morfolino che ho utilizzato sono le seguenti:

esr2a^{ATG}MO: 5'-TGTCTCCTTCGGGATACTCGGACAT-3'

esr2a^{SPLIC}MO: 5'-GTACTTTCAGAGAGTCTTACCTTGT-3'

^{Std}MO: 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'

*p53*MO: 5'-GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG-3'

Lo *standard control* ^{Std}MO non si appaia alla sequenza bersaglio o ad altre sequenze specifiche in *zebrafish* e costituisce per questo un valido controllo dell'esperimento di microiniezione.

Soluzione da iniettare nella microiniezione di morfolino:

· **Danieau buffer** 1X, stock 10X (Mullins, 2005)

- 58 mM NaCl
- 0,7 mM KCl
- 0,4 nM MgSO₄
- 0,6 nM Ca(NO₃)₂
- 5,0 mM HEPES pH 7,6

Al termine della preparazione la soluzione va autoclavata.

- **Morfolino** *esr2a*^{ATG}MO, *esr2a*^{SPLIC}MO, ^{Std}MO, o ^{p53}MO in concentrazione ottimizzata pari a 10,3 ng/embrione.
- **Rosso fenolo** 0,15 %.
- **H₂O mQ** fino a volume.

Soluzione da iniettare nella microiniezione di mRNA *rescue*:

- **Danieau buffer** 1X, stock 10X (Mullins, 2005)
- ***esr2a*^{ATG}MO** 10,3 ng/embrione, stock 1 mg/ml.
- **mRNA di *esr2a*** di *zebrafish* con mutazioni silenti nella regione di appaiamento del morfolino (0,5-8 ng/uovo fecondato).
- **Rosso fenolo** 0,15%.
- **H₂O mQ** fino a volume.

Il rosso fenolo è un colorante vitale usato per visualizzare la quantità di soluzione iniettata.

La soluzione da iniettare viene preparata a partire dal tampone *Danieau* 10X, in modo da contenere la concentrazione finale desiderata di morfolino in tampone 1X. La soluzione *Danieau* causa un minor tasso di mortalità negli embrioni microiniettati, senza alterare la penetranza dei fenotipi osservati (Nasevicius ed Ekker, 2000).

In generale, le concentrazioni di morfolino da iniettare variano da 0,8 mg/ml a un massimo di 2 mg/ml.

Normalmente è possibile osservare una variabilità nel grado di alterazione dell'embrione iniettato, dipendente dal dosaggio del morfolino. A concentrazioni maggiori gli effetti sono più marcati ma è comunque sconsigliato eccedere nella quantità perché concentrazioni elevate possono indurre effetti aspecifici.

Il morfolino, prima della microiniezione, viene riscaldato a 65°C per 10 min per denaturarlo e per evitare che si formino precipitati.

2.2.2. Preparazione degli aghi

Gli aghi da microiniezione sono stati preparati da capillari di vetro di 1,2 mm di spessore (*World Precision Instruments*, WPI, Germania) mediante un *puller* per micropipette che sfrutta il calore per fondere il vetro e tirarlo (Flaming / Brown p-97 Micropipette Puller, Strumenti Setter, Strumenti Crisel, Roma Italia). Per la preparazione di questo tipo di capillari si esegue un test per resettare e settare lo

strumento. Successivamente ho usato dei parametri che sono stati fissati come segue :
calore = 395, velocità = 60, tempo = 50, tirare = 60.

2.2.3. Raccolta e iniezione delle uova

Le uova appena deposte sono raccolte e poste in una capsula petri contenente *fish water* 1X. Sono quindi poste in fila e accostate al bordo bagnato di un vetrino portaoggetto inserito in una capsula petri, per facilitare l'iniezione.

La microiniezione è effettuata utilizzando una pompa ad aria controllata a pedale (*Pneumatic Picopump* PV82 della *Word Precision Instrument, Inc*), un micromanipolatore (Leitz) e uno stereomicroscopio (Wild) con ingrandimento 3,2X per monitorare la procedura. Utilizzando un puntale Eppendorf® *GELoader Tips* 1-10 µl si prelevano 2,5 µl di soluzione da iniettare (mantenuta in ghiaccio) e si trasferiscono nell'ago da microiniezione.

L'ago caricato viene inserito nell'apposito supporto del micromanipolatore. La punta dell'ago, ancora sigillata, viene spezzata con una pinzetta, per consentire l'uscita della soluzione al momento della microiniezione. Si regola, quindi, la pressione di iniezione, in modo che esca una quantità di soluzione tale da formare un'area di grandezza pari a 1/8 rispetto al volume totale dell'uovo.

Sebbene la microiniezione venga definita citoplasmatica, è preferibile non iniettare direttamente la soluzione nella cellula ma penetrare nel tuorlo dal polo vegetativo, per limitare i danni derivanti dalla microiniezione. Se la microiniezione è stata effettuata correttamente si osserva una piccola area rossa nel tuorlo dell'uovo determinata dal rosso fenolo usato come indicatore.

Dopo l'iniezione le uova vengono trasferite in capsule petri contenenti *fish water* 1X, sostituita giornalmente per diminuire la probabilità di crescita fungina.

Le piastre vengono incubate a 28,5 °C per consentire lo sviluppo ottimale degli embrioni. Nelle ore successive alla microiniezione, le uova vengono osservate al microscopio per eliminare quelle non fecondate, che possono essere nocive per quelle sane.

2.3. Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il prodotto TRIzol della ditta Invitrogen.

Le fasi sperimentali di estrazione e di manipolazione dell'RNA devono essere svolte sotto cappa chimica, usando vetreria sterilizzata o trattata a 200°C in stufa per l'intera notte.

Reagenti

- TRIzol (Invitrogen)
- Cloroformio
- Isopropanolo
- Etanolo 70%

Procedimento

Per l'estrazione dell'RNA, vengono selezionati 50-60 embrioni dello stadio di sviluppo d'interesse.

Gli embrioni per l'estrazione sono fissati in azoto liquido o in TRIzol e messi subito a -80°C in eppendorf da 2 ml. Il congelamento immediato è necessario per evitare la degradazione dell'RNA.

Per estrarre l'RNA totale il tessuto viene scongelato e frantumato mediante l'aggiunta di alcune sferette sterilizzate di vetro (Sigma) nella provetta contenente gli embrioni, 500 µl di TRIzol e l'inserimento per 10 s in un agitatore *Mini-BeadbeaterTM*. Questo determina la rottura delle cellule e la fuoriuscita dell'RNA. Dopo 1 min di riposo in ghiaccio, vengono aggiunti 500 µl di Trizol e il campione viene reinserito nell'agitatore *Mini-BeadbeaterTM* per 10 s.

Dopo un altro minuto di raffreddamento in ghiaccio, all'omogenato ottenuto si aggiungono 200 µl di cloroformio. La provetta viene invertita 6-9 volte e poi lasciata in ghiaccio per 1 min. Il campione viene quindi centrifugato per 15 min a 4°C alla massima velocità. In questo modo si ottengono due fasi separate da un anello bianco. Si preleva la fase acquosa sovrastante che contiene l'RNA, la si trasferisce in una nuova provetta e si aggiunge un uguale volume di isopropanolo.

Il tutto viene lasciato O/N o per almeno 3 h a -20°C per consentire la precipitazione dell'RNA. Il campione viene poi centrifugato nuovamente per 15 min a 4°C ed il

pellet così ottenuto, dopo la rimozione del surnatante, viene lavato con 500 µl di etanolo 70% freddo (conservato a -20°C). Quindi si centrifuga, per 15 min a 4°C, si rimuove l'etanolo, e si procede con un secondo lavaggio per meglio purificare l'RNA, utilizzando ancora etanolo 70%. Dopo un'ulteriore centrifugazione si rimuove l'etanolo e si lascia asciugare il *pellet* a temperatura ambiente, in modo tale che l'alcool evapori completamente. A questo punto, il *pellet* viene risospeso con 15-25 µl di H₂O mQ, secondo la quantità di RNA sedimentato. Infine L'RNA viene conservato a -80°C.

2.3.1. Controllo qualitativo dell'RNA

La qualità dell'RNA estratto viene controllata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%. In seguito alla corsa elettroforetica dovranno essere visibili al transilluminatore due bande: una più alta corrispondente all'RNA ribosomiale 28S, l'altra più bassa corrispondente all'RNA ribosomiale 18S. La presenza di ulteriori bande o di uno striscio (*smear*) sono il segno di RNA degradato.

2.3.2. Quantificazione dell'RNA

La concentrazione dell'RNA può essere determinata attraverso l'analisi al *NanoDrop* presso il CRIBI che consente anche una valutazione dello stato di purezza o contaminazione proteica.

Procedimento

La misurazione viene eseguita su 1,3 µl di RNA totale, determinando l'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Si risale alla concentrazione di RNA utilizzando la relazione:

1 unità di O.D. = 40 µg/ml di RNA

Il *NanoDrop* misura automaticamente anche l'assorbanza a 280 nm, picco d'assorbimento delle proteine, per valutare l'entità di una eventuale contaminazione proteica nel campione.

retrotrascrizione. I campioni vengono poi trasferiti nel termociclatore, con le seguenti condizioni:

Fasi	Temperatura	Tempo
Legame degli esameri all'RNA	25°C	5 min
Reazione di retrotrascrizione	50°C	60 min
Inattivazione dell'enzima	70°C	15 min

Per degradare l'RNA rimasto inutilizzato, al termine delle suddette fasi, viene aggiunto ad ogni reazione 1 µl di RNAsi H e si lascia incubare a 37°C per 20 min. I campioni infine vengono conservati a -20°C.

2.5. Amplificazione del cDNA mediante PCR

La PCR (reazione di polimerizzazione a catena) è una reazione enzimatica, condotta *in vitro*, utilizzata per produrre molte copie di uno specifico frammento di DNA. La specificità della reazione è assicurata dagli oligonucleotidi d'innescio, complementari alla zona fiancheggiante la sequenza d'interesse.

La reazione avviene tramite ripetuti cicli costituiti da tre fasi distinte:

1. denaturazione termica del DNA stampo;
2. appaiamento dell'oligonucleotide alla sequenza complementare del DNA stampo;
3. estensione dell'oligonucleotide con sintesi di una nuova catena di DNA complementare a quella dello stampo, mediante l'uso di una polimerasi batterica termostabile, la *Taq* polimerasi.

2.5.1. Touchdown PCR

Questa metodica utilizza un programma in cui viene variata la temperatura di *annealing*, in modo tale da aumentare la specificità nella formazione del complesso iniziale *primer*-templato e quindi del prodotto finale di PCR. La temperatura di *annealing* nel ciclo iniziale è 5-10°C sopra alla T_m (temperatura di *melting*) dei *primer* utilizzati e nei cicli seguenti la temperatura viene gradualmente ridotta di 1°C

per ogni ciclo fino al corrispondente valore più basso della T_m dei *primer*, che viene mantenuto per i cicli successivi. Risulta quindi possibile evitare complicate misure di ottimizzazione della temperatura di *annealing*, per *primer* che presentano T_m anche molto diverse tra loro.

Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

Fasi	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Pre-denaturazione	95°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	30 s	40 cicli
Appaiamento	62°-50°C	30 s	
Estensione	72°C	1 min per kb	
Estensione finale	72°C	10 min	1
Terminazione	20°C	2 min	1

Il numero di cicli dipende dal *range* di temperatura scelto per la reazione, in base alla temperatura di *melting* dei *primer* utilizzati. La durata della fase di estensione dipende dalla lunghezza attesa dell'amplificato. L'indicazione del tempo di estensione richiesto per amplificare 1.000 paia di basi (pb) varia a seconda dell'enzima utilizzato.

I reagenti utilizzati sono:

Mix per un campione	Quantità (µl)
<i>Buffer Biotherm</i> 10X	2,5
MgCl ₂ [50 mM]	1,0
dNTPs <i>Mix</i> [10 mM]	0,5
Oligo <i>forward</i> [10 µM]	0,5
Oligo <i>reverse</i> [10 µM]	0,5
DNA	1-4
<i>Taq Biotherm</i> [5U/µl]	0,2
H ₂ O mQ	fino a 25 µl

La quantità di cDNA aggiunto può variare. Generalmente si parte con 1 µl del prodotto di retrotrascrizione. Sulla base dei risultati ottenuti il materiale di partenza

può essere ridotto mediante diluizione o aumentato per ottenere una banda maggiormente visibile nella corsa elettroforetica. La diminuzione della concentrazione di magnesio aumenta la specificità della reazione. La reazione di amplificazione avviene in un volume finale di 25 µl, in un unico passaggio, inserendo nel termociclatore i campioni in cui è stata aliquotata la miscela di reazione precedentemente preparata. I prodotti di PCR sono poi conservati a -20°C.

2.5.2. Analisi di espressione

L'espressione del trascritto di *esr2a* è stata analizzata negli embrioni wild type (WT) e micro-iniettati con *esr2a*^{SPLIC}MO di 24 ore. Prima della PCR, i campioni di cDNA sono stati analizzati mediante PCR (28 cicli di amplificazione) con una coppia di oligonucleotidi in grado di amplificare il gene codificante *ef1a* (*elongation factor 1a*), utilizzato come gene *housekeeping*. In questo modo abbiamo potuto verificare e correggere eventuali differenze nel cDNA di partenza. Le condizioni di amplificazione e i reagenti sono quelli di una *Touchdown* PCR.

2.5.3. PCR con *AccuPrime*TM PCR System

La PCR con *AccuPrime*TM PCR System utilizza una *Taq* polimerasi ad elevata accuratezza, che garantisce l'assenza di errori nella sequenza amplificata.

I reagenti utilizzati sono:

Mix per un campione	Quantità (µl)
10X <i>AccuPrime</i> TM PCR Buffer II	2,5
Oligo <i>forward</i> [10 µM]	0,5
Oligo <i>reverse</i> [10 µM]	0,5
DNA	1-200 ng
<i>AccuPrime</i> TM <i>Taq</i> DNA polimerasi [2U/µl]	0,5
H ₂ O mQ	fino a 25 µl

Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

Fasi	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Pre-denaturazione	94°C	2 min	1
Denaturazione	94°C	30 s	35 cicli
Appaiamento	60°C	30 s	
Estensione	68°C	2 min	
Estensione finale	68°C	10 min	1
Terminazione	20°C	2 min	1

2.5.4. Elenco degli oligonucleotidi utilizzati

Z-ERB2-F+<i>Bam</i>HI	Senso	5'-CGGGATCCCGGAACTCATCCGCCTTCACC-3'
Z-ERB2-R+<i>Xba</i>I	Antisenso	5'-GCTCTAGAGCGTGTTTAGGGTCCGTGCTGT-3'
Mis-ERb2	Senso	5'-GTACCATGAGCGAATACCCAGAGGGTGATAGTCC-3'
ERβ2-F	Senso	5'-CAGACCTCTGTCTCAGCA-3'
ERβ2-F1	Senso	5'-CAACAGAGTCGACTTCAACAG-3'
ERβ2-R	Antisenso	5'-CAGCAGACACAGCAGCTT-3'
ef1a-F	Senso	5'-GACAAGAGAACCATCGAG-3'
ef1a-R	Antisenso	5'-CCTCAAACCTACCGACAC-3'

Tab. 2: Tabella riassuntiva degli oligonucleotidi utilizzati. Sono evidenziati in grigio i siti di taglio degli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Xba*I.

2.6. Analisi di prodotti di amplificazione mediante separazione in gel di agarosio

La reazione di amplificazione viene verificata prelevando 6 µl di campione che, dopo aggiunta del tampone di caricamento, vengono sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio a concentrazione variabile a seconda della lunghezza del frammento atteso, in parallelo con una scala di riferimento.

L'elettroforesi in gel di agarosio consente la separazione di frammenti di DNA in base al loro peso molecolare e alla loro struttura. La presenza dei gruppi fosfato attribuisce al DNA carica negativa e quindi in un campo elettrico la migrazione avviene verso l'elettrodo positivo.

La scelta della concentrazione del gel viene operata a seconda della lunghezza dei frammenti di DNA da analizzare. La velocità di migrazione risulta inversamente proporzionale alla lunghezza della molecola. La mobilità di una molecola di DNA dipende inoltre anche dalla sua topologia e dal fatto che sia a singolo o doppio filamento.

Con il gel di agarosio si possono separare sequenze che vanno da 70 pb (agarosio 3%) fino a 80.000 pb (agarosio 0,1%). Anche il potere risolutivo del gel dipende dalla sua concentrazione.

Reagenti e materiali utilizzati

- Agarosio

- Tampone di corsa TAE 10X:

Tris base 48,4 g

EDTA 0,5 M pH 8 20 ml

Acido acetico glaciale 11,4 ml

Portare a 1 l L con acqua deionizzata

- 20.000X *Gel red*TM (*Nucleic Acid Gel Stain in water*)

- Tampone di caricamento 10X:

Blu di xilene/ bromofenolo 0,25%

Glicerolo 5 ml

H₂O mQ 5 ml

- Soluzione di DNA di riferimento (1 Kb DNA *Ladder*, Invitrogen)

- Apparecchio per elettroforesi con alimentatore di corrente
- Transilluminatore a luce UV

Procedimento

L'agarosio in polvere è sciolto nel tampone di corsa TAE 1X mediante riscaldamento fino ad ebollizione.

Il gel è successivamente versato in un'apposita vaschetta munita di pettine per la formazione dei pozzetti in cui verranno caricati i campioni. Dopo la solidificazione del gel si versa il tampone di corsa 1X nella camera elettroforetica e si rimuove il pettine.

Ai campioni da analizzare è aggiunto il tampone di caricamento (1/6 rispetto al volume da caricare) in cui è presente il colorante blu di bromofenolo o di xilene che, co-migrando con molecole di DNA di 500 o 1.000 pb rispettivamente, permette la visualizzazione della corsa elettroforetica. Come scala di riferimento per i pesi molecolari si fanno correre, in parallelo ai campioni, 6 µl di DNA *standard* (1 kb DNA *Ladder*, Invitrogen).

Durante la corsa elettroforetica viene applicato un campo elettrico di circa 5 Volt/cm, ponendo sempre attenzione che il gel non si surriscaldi troppo.

La colorazione del DNA si effettua con *Gel redTM*, molecola che, intercalandosi fra le basi del DNA, ne permette la visualizzazione dopo esposizione a raggi UV (302-312 nm), in quanto assorbe la luce a queste lunghezze d'onda e la riemette per fluorescenza a 590 nm nella regione del rosso.

2.6.1. Quantificazione su gel di agarosio del DNA

Per determinare la concentrazione di un campione di DNA se ne preleva un'aliquota e si fa correre in un gel di agarosio in parallelo con una scala di DNA a concentrazione e peso molecolare noti (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen). Dal confronto dell'intensità delle bande del campione con quella del *ladder* è possibile stimare la concentrazione ignota della soluzione del DNA di partenza.

2.7. Estrazione e purificazione del DNA da gel d'agarosio

Per l'estrazione e la purificazione dei prodotti di PCR dal gel d'agarosio è stato utilizzato il *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* della Promega seguendo il protocollo fornito. Queste reazioni si basano sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul legame selettivo degli acidi nucleici alla matrice della colonnina *SV Minicolumn*.

2.7.1. Estrazione del DNA da gel d'agarosio

Procedimento

Con l'aiuto di un bisturi si isolano dal gel di agarosio le bande di interesse e si inseriscono in una provetta *ependorf* da 1,5 ml sterile. Dopo aver pesato il frammento di gel contenente il DNA vengono aggiunti 10 µl di *Membrane Binding Solution* ogni 10 mg di gel isolato. Si vortica e si lascia incubare a 50–65°C finchè il gel non si scoglie completamente.

Poi si procede con le seguenti fasi:

- Inserire la *SV Minicolumn* nel *Collection Tube*;
- Trasferire il gel disciolto nella *SV Minicolumn*;
- Incubare a temperatura ambiente per 1 min;
- Centrifugare a $16.000 \times g$ per 1 min, svuotare il *Collection tube*;
- Aggiungere nella colonnina 700 µl di *Membrane Wash Solution*;
- Centrifugare a $16.000 \times g$ per 1 min, svuotare il *Collection tube*;
- Aggiungere nella colonnina 500 µl di *Membrane Wash Solution*;
- Centrifugare a $16.000 \times g$ per 5 min, svuotare il *Collection tube*;
- Ricentrifugare per 1 min a $16.000 \times g$ con il coperchio aperto per permettere l'evaporazione dell'etanolo;
- Trasferire la colonnina in una *ependorf* da 1,5ml e aggiungere 50 µl di *Nuclease-Free Water*, incubare a temperatura ambiente per 1 min.
- Centrifugare a $16.000 \times g$ per 1 min.
- Conservare il DNA a 4°C o a -20°

2.7.2. Purificazione dei prodotti di PCR

Per purificare i prodotti di PCR viene utilizzato lo stesso kit dell'estrazione da banda, *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* della Promega. In questo caso viene aggiunto, alla reazione di PCR da purificare, lo stesso volume di *Membrane Binding Solution*.

2.8. Sequenziamento automatico del DNA

Il sequenziamento del DNA è stato eseguito presso il servizio di sequenziamento del DNA di BMR *Genomics* (Padova).

Per sequenziare frammenti di DNA ottenuti tramite estrazione da gel di agarosio, si determina la quantità di DNA necessaria alla reazione di sequenziamento sulla base della lunghezza del template e del tipo di DNA (DNA a doppia o a singola elica, plasmidico o da PCR). Al DNA si aggiunge il *primer* alla concentrazione di 3,2 μM . Il tutto viene quindi portato a secco a 65°C e consegnato al centro di sequenziamento al *BMR-Genomics*.

Nel caso in cui il prodotto di PCR sia molto pulito e si presenti, in gel di agarosio, come un'unica banda, è possibile mandare a sequenziare il frammento direttamente come prodotto di PCR, mediante reazione enzimatica. In questo caso si utilizzano gli enzimi del kit *ExoSAP-IT (Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase Method)* della ditta *USB Corporation*. L'azione enzimatica sui prodotti di PCR, di lunghezza compresa tra 100 pb e 20 kb, permette di rimuovere *primer*, dNTPs, enzimi e altri prodotti secondari rimasti in soluzione.

Procedimento

In una provetta da sequenziamento vengono posti 5 μl del prodotto di PCR e si aggiungono 2 μl di enzima *ExoSAP-IT*, corrispondenti a 5 Unità di Esonucleasi I (*Exo*) e 1 Unità di Fosfatasi alcalina (SAP, *Shrimp Alkaline Phosphatase*).

La provetta da sequenziamento viene posta nel termociclatore con il seguente programma:

Fasi	Temperatura	Tempo
Primo ciclo	37°C	15 min
Secondo ciclo	80°C	15 min

Durante il primo ciclo, a 37°C, avviene la degradazione dei *primer* e dei nucleotidi rimanenti ad opera dell'enzima Esonucleasi, mentre nel secondo ciclo a 80°C l'enzima stesso viene inattivato. Il campione viene poi messo in ghiaccio per 10 min, per bloccare completamente la reazione enzimatica.

Una quantità variabile del DNA purificato ottenuto dalla reazione con *ExoSAP-IT*, in base alla lunghezza del frammento e alla quantificazione precedentemente ottenuta mediante metodo spettrofotometrico o su gel, viene portata a secco a 65°C dopo aggiunta di 2 µl di primer alla concentrazione di 3,2 µM.

2.9. Amplificazione rapida dell'estremità del cDNA mediata da RNA ligasi: RLM-RACE (*RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Questa tecnica permette di amplificare, utilizzando la reazione di PCR, regioni di cDNA comprese tra un sito interno conosciuto, e la parte terminale 3'- o 5'- di un determinato trascritto. Nel caso di questa tesi sono state eseguite reazioni di 3'-RACE (di seguito descritte). Le reazioni sono state effettuate utilizzando il kit *FirstChoice*[®] *RLM-RACE* della ditta Ambion.

3'-RLM-RACE

Il kit RLM-RACE è stato utilizzato anche per amplificare l'estremità 3'-terminale del messaggero di interesse. In questo caso si opera una retrotrascrizione dell'RNA totale

con l'impiego di un oligonucleotide 3'-adattatore che ha la seguente sequenza:

3'-RACE adattatore:

5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGT₁₂VN-3'

I reagenti utilizzati sono:

Mix per un campione	Quantità (µl)
RNA	1 µg
dNTPs Mix (2,5 mM)	4
3'RACE Adapter	2
RT buffer 10X	2
RNase inhibitor (10 U/µl)	1
M-MLV Reverse transcriptase	1
Nuclease-free water	fino a 20 µl

La provetta contenente la miscela di reazione viene centrifugata rapidamente e incubata a 42°C per un'ora.

Con il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione si procede facendo le reazioni di PCR utilizzando i seguenti oligonucleotidi 3':

3'-RACE esterno (*outer*):

5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT-3'

3'-RACE interno (*inner*):

5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'

Si esegue una prima PCR con l'oligonucleotide 3'-RACE esterno e un oligonucleotide senso specifico del gene *target*. Se nessun amplificato è visibile su gel d'agarosio, si procede con una seconda PCR, utilizzando l'oligonucleotide 3'-RACE interno e un altro oligonucleotide senso specifico per il gene. In alcuni casi può essere necessario l'utilizzo di un terzo primer senso gene-specifico.

2.10. Clonaggio

2.10.1. Reazione di ligazione

La ligazione di un frammento di DNA, con un vettore plasmidico linearizzato avviene tramite la formazione di nuovi legami tra i residui fosfato delle terminazioni in 5'- della doppia elica del vettore e gli ossidrili in 3'- dell'inserto con l'utilizzo della DNA ligasi del batteriofago T4.

Per la reazione di ligazione diretta dei frammenti di PCR, è stato impiegato il kit commerciale *pGEM[®]-T Easy Vector* (Promega) che permette la successiva identificazione dei cloni ricombinanti tramite selezione delle colonie bianco/blu (Fig.13).

Come plasmide di espressione, è stato utilizzato il vettore *pCS2+*, contenente il sito di poliadenilazione di SV40, in cui è stato inserito il cDNA del recettore degli estrogeni *Esr2a* dopo escissione dal plasmide *pGEM* con apposite endonucleasi di restrizione (Fig. 14).

Per il calcolo della quantità di cDNA da utilizzare nella reazione di ligazione abbiamo utilizzato la seguente formula:

$$\text{ng inserto} = \frac{\text{lunghezza inserto (Kb)} \times \text{ng vettore}}{\text{lunghezza vettore (Kb)}} \times \frac{\text{rapporto molare inserto}}{\text{vettore}}$$

Si mette insieme la reazione di ligazione come segue:

Mix per un campione	Quantità (µl)
<i>2X Rapid Ligation buffer</i>	5
T4 DNA ligasi (3 U/µl)	1
Inserto di DNA	x
Vettore (50 ng/µl)	1
H ₂ O mQ	fino a 10 µl

Il campione viene tenuto a 4°C per tutta la notte.

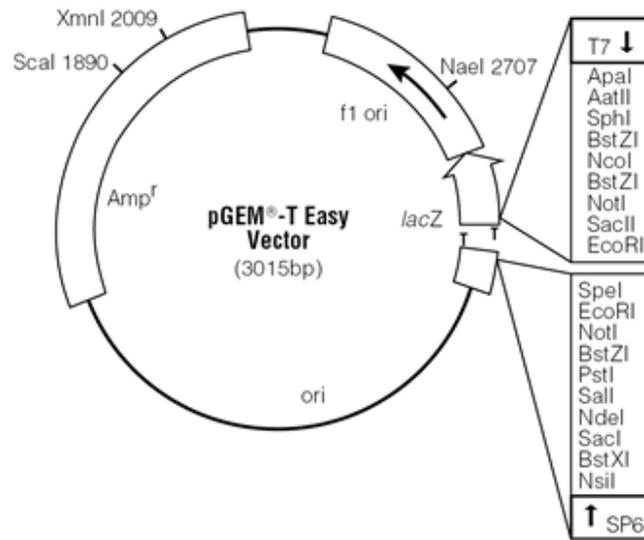


Fig.13: Mappa del vettore plasmidico *pGEM[®]-T Easy Vector* (http://www.promega.com/paguide/images/1473VA05_6A.jpg).

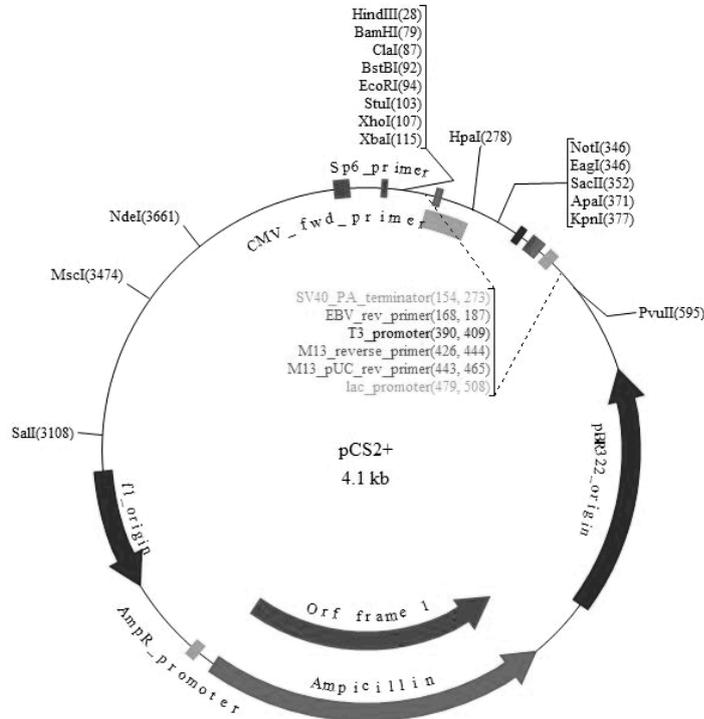


Fig. 14: Mappa del vettore plasmidico *pCS2⁺* (www.biovisualtech.com/bvplasmid/pCS2+.htm)

2.10.2. Trasformazione di batteri chemiocompetenti tramite *shock* termico

La trasformazione comporta l'introduzione di DNA esogeno in una cellula procariote. Per favorire questo processo si possono trattare le cellule in modo da cambiare temporaneamente le caratteristiche della membrana cellulare, per esempio, mediante *shock* termico oppure applicando un campo elettrico tra due elettrodi immersi nella sospensione cellulare. In entrambi i casi si provoca la formazione sulle membrane di punti di rottura localizzati che permettono lo scambio di molecole tra l'interno e l'esterno della cellula. Per aumentare l'efficienza di trasformazione i batteri vengono sottoposti ad un particolare trattamento, sono cioè resi competenti.

2.10.2.1. Preparazione dei batteri JM109 competenti

Reagenti

- Terreno LB

Il terreno LB sterile si prepara sciogliendo 20 g di terreno LB BROTH in polvere (Invitrogen) in un litro di H₂O. La soluzione ottenuta viene autoclavata e conservata a 4°C.

- CaCl₂ (0,1M)
- Glicerolo

Procedimento

I batteri della specie *Escherichia coli*, ceppo JM109, prelevati da uno stock conservato a -80°C, vengono inoculati in 5 ml di terreno LB a 37°C e lasciati per tutta la notte in agitazione. Il giorno seguente si preleva 1 ml di coltura e lo si diluisce in 100 ml di terreno LB. Il tutto viene incubato a 37°C, in agitazione, finché l'assorbanza della coltura batterica a 600 nm non raggiunge una densità ottica pari a 0,3 O.D.. La coltura viene quindi raffreddata in ghiaccio per 30 min in modo da bloccare la crescita batterica. I batteri vengono infine raccolti dal brodo di coltura mediante centrifugazione a 4°C per 15 min a 2.500-3.000 × g.

Eliminato il surnatante, si risospendono i sedimenti con 50 ml di CaCl₂ 0,1M freddo. Dopo aver lasciato le cellule in ghiaccio per almeno 30 min si procede con una seconda centrifugazione e si risospende il *pellet* in 5 ml di una soluzione di CaCl₂ 0,1M e glicerolo 10%. A questo punto i batteri vengono aliquotati in provette da 1,5 ml e conservati a -80°C.

2.10.2.2. Trasformazione mediante *shock* termico

Reagenti

- Terreno di coltura LB
- Una soluzione pari a 100 ml di terreno SOC (pH 7) contiene:
 - 2 g Bacto-Tryptone
 - 0,5 g di estratto di lievito
 - 1 ml NaCl (1M); 0,25 ml KCl (1M); 1 ml Mg²⁺ (2M)
 - 1 ml glucosio (2M)

La miscela viene autoclavata e conservata a -20°C.

- Ampicillina (100 µg/ml)
- IPTG (100 mM)
- *X-Gal* (80 µg/ml)

Procedimento

I batteri, conservati a -80°C in aliquote da 150 µl, sono posti in ghiaccio e lasciati scongelare per circa 5 min. In seguito ai batteri sono aggiunti dai 2 ai 4 µl della reazione di ligazione. Il tutto viene tenuto in ghiaccio per circa 30 min a 4°C. Si effettua quindi uno *shock* termico a 42°C per 40 s al termine del quale i batteri vengono nuovamente posti in ghiaccio per 2 min. Si aggiungono 250 µl di terreno di coltura SOC a temperatura ambiente. I batteri in terreno SOC sono incubati per 1h a 37°C in agitatore a 200 rpm e quindi seminati in piastre di terreno solido LB (cioè addizionato di agar all'1,2%), contenenti l'ampicillina e a cui sono stati aggiunti 80 µl di *X-Gal* e 100 µl di IPTG. Sulle piastre vengono lasciati crescere per tutta la notte a

37°C. Le piastre così preparate permettono di selezionare i batteri che contengono il plasmide ricombinante portante la resistenza all'antibiotico.

2.10.3. Controllo dell'avvenuto clonaggio mediante PCR

La verifica dell'avvenuto inserimento del frammento di DNA nel plasmide viene eseguita mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi T7 e SP6 o M13F e M13R che si trovano a monte e a valle del sito di policlونaggio. Si divide una piastra contenente LB-agar e ampicillina in settori numerati.

Usando un puntale sterile si preleva una colonia isolata, la si striscia su un settore numerato della nuova piastra e poi la si immerge nella corrispondente provetta da PCR contenente 20 µl di una soluzione così composta:

Mix per un campione	Quantità (µl)
<i>Buffer Biotherm</i> 10X	2,0
MgCl ₂ [50 mM]	1,2
dNTPs <i>Mix</i> [10 µM]	0,6
Oligo <i>forward</i> [10 µM]	0,6
Oligo <i>reverse</i> [10 µM]	0,6
<i>Taq Biotherm</i> [5U/µl]	0,2
H ₂ O mQ	15,0

Le provette vengono incubate per 10 min a 98°C in modo da rompere le pareti batteriche e far fuoriuscire il DNA.

Al termine di questa fase vengono aggiunti 10 µl di una soluzione contenente:

Mix per un campione	Quantità (µl)
<i>Buffer Biotherm</i> 10X	1,0
<i>Taq Biotherm</i> [5U/µl]	0,2
H ₂ O mQ	8,8

Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

Fasi	Temperatura	Tempo	Numero di cicli
Pre-denaturazione	95°C	2 min	1
Denaturazione	95°C	45 s	40 cicli
Appaiamento	55°C	1 min e 10 s	
Estensione	72°C	1 min per kb	
Estensione finale	72°C	10 min	1
Terminazione	20°C	2 min	1

Sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi:

- **T7:** 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
- **SP6:** 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
- **M13F:** 5' -TTGTAAAACGACGGCCAGT-3'
- **M13R:** 5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'

2.11. Preparazione e purificazione del DNA plasmidico mediante miniprep

Per la purificazione del DNA plasmidico è stato usato il kit *EuroGOLD Plasmid Miniprep* (Euroclone), seguendo le istruzioni riportate nel manuale.

Primo giorno: inoculo del ceppo batterico d'interesse.

Una singola colonia di batteri *E. coli* trasformati col plasmide da isolare o una piccola aliquota di terreno congelato contenente i batteri conservati a -80°C vengono prelevate con una punta sterile ed inoculate in 5 ml di terreno LB sterile, al quale sono stati precedentemente aggiunti 5 µl di ampicillina (per ottenere la concentrazione finale di 50 µg/ml).

La coltura viene incubata tutta la notte a 37°C in continua agitazione a 200 giri al min.

Secondo giorno: estrazione e purificazione del DNA plasmidico.

Reagenti

Soluzione I:

- Tris-HCl 50 mM pH 8
- EDTA 10 mM (acido etilendiamminotetracetico)
- RNasi A 10 µg/ml

Soluzione II:

- NaOH 0,2 mM
- SDS 1%

Soluzione III:

- Guanidina- HCl 4M
- Potassio Acetato 0,5M pH 4,2

Soluzione di lavaggio II:

- Guanidina-HCl 5M
- Tris-HCl 20 mM
- 0,6 volumi etanolo assoluto

soluzione di lavaggio III:

- NaCl 20 mM
- Tris-HCl 2 mM, pH 7,5
- 4 volumi etanolo assoluto

Procedimento

Il mattino successivo la coltura satura di batteri viene trasferita in provette da 2 ml e successivamente viene centrifugata alla massima velocità per 10 min a temperatura ambiente in microcentrifuga a $5.000 \times g$.

Il sedimento batterico viene risospeso, utilizzando 250 µl di soluzione I che è conservata a 4°C.

Si aggiungono 250 µl di soluzione II di lisi, si mescola delicatamente invertendo la provetta 5-6 volte e si incuba a temperatura ambiente per un massimo di 2 min.

Si aggiungono 350 µl di soluzione III per neutralizzare il lisato, si mescola per inversione fino alla formazione di un flocculo bianco. Si centrifuga alla massima velocità per 10 min.

Si preleva il surnatante e lo si inserisce nel filtrino (*HiBind® miniprep column*) e quindi si centrifuga alla massima velocità per 1 min.

Per eliminare l'alta quantità di nucleasi presenti, che possono danneggiare il DNA, si aggiungono 750 µl di soluzione di lavaggio II. Si centrifuga per 1 min a $10.000 \times g$ e quindi si elimina la soluzione raccolta nel serbatoio collettore. Al campione si aggiungono 750 µl di soluzione di lavaggio III e si centrifuga per 1 min a $10.000 \times g$. In questo modo vengono eliminati tutti i componenti batterici che si sono legati in modo aspecifico al filtro.

Si elimina la soluzione contenuta nel tubo collettore inferiore e si centrifuga nuovamente a $10.000 \times g$ per 1 min per eliminare il tampone residuo contenuto nella colonnina.

Si scarta la soluzione che è passata attraverso il filtro e si inserisce la colonnina superiore in una provetta da 1,5 ml. Il DNA plasmidico, legato mediante legami non covalenti alla resina, viene eluito aggiungendo 30-50 µl di H₂O mQ e centrifugando per 1 min a $5.000 \times g$. L'eluizione può essere ripetuta una seconda volta per recuperare tutto il DNA presente.

Il plasmide viene poi analizzato mediante sequenziamento presso il servizio *BMR genomics*.

2.12. Digestione del DNA con endonucleasi di restrizione

Per linearizzare i plasmidi contenenti gli inserti da utilizzare per la sintesi delle sonde a RNA per l'ibridazione *in situ* sono state utilizzate differenti endonucleasi di restrizione.

La digestione enzimatica è stata sfruttata anche per inserire la sequenza codificante il recettore degli estrogeni *Esr2a*, precedentemente clonata nel vettore *pGEM*, in *pCS2+*. Un'endonucleasi di restrizione è stata usata per linearizzare il costrutto, prima della trascrizione *in vitro* dell'mRNA.

La miscela di reazione è la seguente:

Mix per un campione	Quantità
<i>Restriction enzyme buffer</i> 10X	1X
<i>Acetylated BSA</i> (10µg/ µl) 100X	1X
DNA plasmidico	5µg
Enzima (10 U/ µl)	1U per µg
H ₂ O mQ	fino ad un volume di 50 µl

Gli enzimi di restrizione utilizzati in questo lavoro di tesi sono riportati in Tabella 3.

Enzima di restrizione	Sequenza di riconoscimento (5' – 3')
<i>ApaI</i>	GGGCC [^] C
<i>BamHI</i>	G [^] GATCC
<i>EcoRI</i>	G [^] AATTC
<i>HindIII</i>	A [^] AGCTT
<i>KpnI</i>	GGTAC [^] C
<i>NotI</i>	GC [^] GGCCGC
<i>PstI</i>	CTGCA [^] G
<i>SalI</i>	G [^] TCGAC
<i>SpeI</i>	A [^] CTAGT
<i>XbaI</i>	T [^] CTAGA
<i>XhoI</i>	C [^] TCGAG

Tab. 3: Tabella riassuntiva degli enzimi di restrizione utilizzati in questo elaborato di tesi

2.13. Sintesi di RNA messaggero

Per la trascrizione *in vitro* dell'mRNA codificante Esr2a di *zebrafish* è stato utilizzato il kit *mMESSAGE mMACHINE SP6* (Ambion). Cinque µg del costrutto costituito dal vettore di espressione *pCS2+* contenente la sequenza codificante il recettore degli estrogeni Esr2a vengono linearizzati con l'enzima di restrizione (*NotI*).

Si procede quindi alla reazione di trascrizione come segue:

Mix per un campione	Quantità
<i>pCS2+</i> linearizzato	1 µg
2X NTP/CAP	1 X
10X <i>buffer</i> (sali e DTT)	1 X
SP6 <i>mix</i>	2 µl
<i>Nuclease-free Water</i>	fino a volume di 20 µl

Si incuba la miscela di reazione per 2 ore a 37°C.

Si aggiungono alla provetta 1 µl di TURBO DNasi e, dopo aver mescolato, si incuba per 15 min a 37°C. In questo modo viene degradato lo stampo di DNA.

Per bloccare la reazione e precipitare l'RNA:

- si aggiungono 30 µl di soluzione di precipitazione contenente LiCl;
- si aggiungono 30 µl di *Nuclease-free Water*;
- si mescola e incuba la reazione a -20°C per almeno 30 min;
- si centrifuga per 15 min a 14.000 × g a 4°C;
- si rimuove il surnatante e si lava il *pellet* con etanolo 70%;
- si centrifuga per 15 min a 14.000 × g a 4°C;
- si rimuove il surnatante e si lascia asciugare sotto cappa e si risospende in 20 µl di *Nuclease-free Water*.

-

2.14. Sintesi delle sonde antisenso a RNA

Le sonde antisenso a RNA sono state sintetizzate utilizzando le polimerasi fagiche SP6, T3 e T7 i cui promotori sono presenti ai due lati dei *polilinker* dei vettori plasmidici in cui queste sono state clonate.

Per la marcatura delle sonde sono state utilizzate miscele di ribonucleotidi contenenti una frazione di UTP marcato con digossigenina (NTPs-DIG). Questa molecola può essere in seguito riconosciuta grazie ad uno specifico anticorpo.

Prima della sintesi, il vettore plasmidico, dopo essere stato sequenziato per verificare la specificità e l'orientamento dell'inserto, viene linearizzato mediante enzimi di restrizione. Per la trascrizione delle sonde sono state utilizzate le polimerasi della ditta Promega. Partendo da DNA plasmidico sottoposto a restrizione e purificato si allestisce la seguente reazione:

Mix per un campione	Quantità (µl)
DNA stampo	1 µg
Buffer di trascrizione 5X	4,0
DIG RNA <i>Lab mix</i> 10X	2,0
DTT 0,1M	2,0
<i>rRNasin</i> ®	0,5
SP6/T7/T3 RNA polimerasi	2,0
H ₂ O trattata con DEPC	fino a 20 µl

Dopo aver mescolato e centrifugato, il campione viene incubato per 2 h a 37°C; al termine dell'incubazione si aggiunge 1 µl di DNasi I priva di RNasi e si incuba per altri 15 min sempre a 37°C. Per terminare la reazione si aggiunge quindi 1 µl di EDTA 0,5 M, pH 8.

Gene	Endonucleasi di restrizione	RNA polimerasi
<i>chordin</i>	<i>SpeI</i>	T7
<i>dlx2a</i>	<i>KpnI</i>	T3
<i>egr2b</i>	<i>PstI</i>	T3
<i>emx1</i>	<i>BamHI</i>	T7
<i>foxd3</i>	<i>BamHI</i>	T7
<i>mx1</i>	<i>BamHI</i>	T7
<i>myod1</i>	<i>BamHI</i>	T7
<i>neurod</i>	<i>NotI</i>	T3
<i>pax2a</i>	<i>BamHI</i>	T7
<i>shha</i>	<i>HindIII</i>	T7
<i>six3a</i>	<i>XhoI</i>	T7
<i>sox9a</i>	<i>BamHI</i>	T3
<i>sox10</i>	<i>SalI</i>	T7
<i>Z-erβ2-3'</i> (sonda sulla 3'-UTR)	<i>ApaI</i>	SP6
<i>Z-erβ2</i> (sonda <i>full length</i>)	<i>BamHI</i>	T7

Tab. 4: Tabella riassuntiva delle sonde a RNA utilizzate in questo elaborato di tesi.

2.14.1. Purificazione della sonda a RNA

Al campione si aggiungono 2,5 µl LiCl 4M e 75 µl di etanolo assoluto freddo. Dopo l'aggiunta di ogni reagente il campione viene vorticato e lasciato precipitare per almeno 2 h a -80°C. Si centrifuga alla massima velocità a 4°C per 20 min, si elimina il surnatante e si lava il pellet con 500 µl di etanolo 70% freddo. Dopo aver centrifugato nuovamente come sopra si elimina il surnatante e si lascia asciugare il sedimento all'aria. Quando il sedimento è completamente asciutto si risospende l'RNA in 20 µl di H₂O mQ, si aggiungono 20 µl di formammide deionizzata (Sigma), 0,5 µl di *rRNasin*® e si conservano a -80°C.

2.14.2. Verifica e quantificazione della sonda

Un'aliquota della sonda, dopo denaturazione a 70°C per 10 min, viene fatta correre in gel di agarosio all'1% in parallelo con una scala di DNA a concentrazione nota (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen). Il gel viene colorato con *Gel red*TM. La sonda deve essere conservata a -80°C in piccole aliquote in modo da evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Le sonde così conservate sono stabili per un anno.

2.15. Fissazione e conservazione degli embrioni

Gli embrioni, dopo essere stati decorionati, vengono fissati in PFA (paraformaldeide) al 4% allo stadio di sviluppo di interesse. Se nell'esperimento si utilizzano embrioni di stadio superiore alle 24 ore, la pigmentazione viene bloccata mediante l'aggiunta alla *fish water* di una soluzione allo 0,03% di PTU 10X (1-fenil-2-tiourea, Sigma).

Il tempo di fissazione può essere di 2 ore a temperatura ambiente o di una notte a 4°C.

Gli embrioni vengono poi lavati in PBT (PBS e 0,1% di *Tween* 20, Sigma).

Il PBT successivamente viene sostituito con metanolo assoluto, mediante passaggi intermedi a concentrazioni crescenti di metanolo in PBS. Questa serie di passaggi permette la disidratazione dei tessuti. Dopo il trasferimento in metanolo 100%, gli embrioni possono essere conservati a -20°C per lunghi periodi di tempo.

Soluzioni

PTU (10X):

0,03% 1-fenil-2-tiourea in PBS 1X

2.16. Ibridazione *in situ*

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

Primo giorno

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

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

Per ottenere una migliore permeabilità alle sonde a RNA e agli anticorpi, gli embrioni fissati sono trattati con l'enzima proteinasi K (10 µg/ml in PBT). La durata della digestione dipende dallo stadio di sviluppo dell'embrione (vedi Tab. 5). L'attività dell'enzima viene bloccata mediante post-fissaggio degli embrioni in PFA al 4% per almeno 20 min. Dopo questo passaggio i campioni sono lavati in PBT 1X 5 volte per 5 min.

Stadi di sviluppo	Tempo di digestione
24 <i>hpf</i>	15 min
48 <i>hpf</i>	30 min
72 <i>hpf</i>	45 min
5 giorni	1 ora e 15 min

Tab. 5: Tempo di digestione mediante proteinasi K in funzione dello stadio di sviluppo.

2. *Ibridazione della sonda.* Dopo i lavaggi in PBT, gli embrioni sono incubati a 65°C per un tempo di 2-5 ore in 300-400 µl di soluzione di pre-ibridazione HM (*Hybridization Mix*). La soluzione viene poi sostituita con 200 µl di HM contenente 100-200 ng di sonda antisense a RNA marcata con digossigenina.

L'incubazione a 65°C dura tutta la notte.

La presenza di eparina e di tRNA nella miscela di ibridazione (HM) riduce i legami aspecifici della sonda.

Secondo giorno

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

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

- 100% 0,2X SSC per 15 min;
- 100% SSC 0,2X per 15 min a temperatura ambiente.

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

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

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

Terzo giorno

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

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

colorazione desiderata. La colorazione viene fermata con due lavaggi in PBT (2 per 5 min) e fissata in PFA al 4% a 4°C O/N.

Soluzioni

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

60% formammide

460 µl Acido citrico(1M) pH 6

25 ml SSC 20X

0,1% *Tween*-20

100 µl 50 mg/ml eparina

1 ml 50 mg/ml tRNA

Soluzione di ibridazione per lavaggi:

HM senza tRNA ed eparina

PFA:

4% PFA in 1X PBS

SSC (20X), 1 L di soluzione:

175 g di NaCl

88,2 g citrato sodico

Portare a volume con H₂O trattata con DEPC a pH 7 e autoclavare

PBS (1X), 0,1M:

8 g di NaCl

0,2 g di KCl

1,15 g di Na₂PO₄*7H₂O

0,25 g di KH₂PO₄

Portare a volume con H₂O mQ a pH 7,4

PBT:

1X PBS

0,1% *Tween*-20

Soluzione di colorazione per fosfatasi alcalina:

100 mM Tris-HCl pH 9,5

50 mM MgCl₂

100 mM NaCl

0,1% Tween-20

Soluzione di colorazione per fosfatasi alcalina con NBT/BCIP:

3,4 µl NBT (100 mg/ml)

3,5 µl BCIP (50 mg/ml)

in soluzione di colorazione

2.17. Analisi dei processi apoptotici mediante TUNEL

L'esperimento di TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated-dUTP-nick end labeling*) *whole-mount* è stato utilizzato per evidenziare la presenza di cellule apoptotiche nei morfanti e nei controlli e per determinarne l'eventuale variazione nella quantità e nella distribuzione. La tecnica è in grado di rilevare la morte cellulare sfruttando la caratteristica frammentazione del DNA nucleare nelle cellule apoptotiche, mediante la colorazione dell'estremità 3'-terminale dei frammenti di acidi nucleici. La frammentazione del DNA, a causa delle endonucleasi attivate dalle caspasi durante il processo apoptotico, porta alla formazione di terminazioni libere 3'-OH che possono servire come substrato per l'enzima terminal deossinucleotidil transferasi (TdT).

L'enzima con attività transferasica TdT catalizza la reazione nella quale nucleotidi dUTP, marcati con digossigenina, vengono legati all'estremità 3'- dei frammenti di DNA nucleare.

Anticorpi specifici anti-DIG riconoscono quindi i dUTP, rivelando le cellule apoptotiche.

La procedura seguita è la seguente:

Primo giorno

1. *Reidratazione.* Gli embrioni fissati, privi del *corion* e conservati in metanolo a -20°C, vengono reidratati attraverso passaggi seriali (di 5 min) in soluzioni decrescenti di metanolo e crescenti di PBS e poi sottoposti ai seguenti lavaggi (dove non specificato sono effettuati a temperatura ambiente):

- 1X PBS, 3 lavaggi da 5 min.
- Proteinasi K 10 µg/ml in PBS, per permeabilizzare gli embrioni. La durata del trattamento varia in base allo stadio dell'embrione (vedi protocollo ibridazione *in situ*).
- PFA 4% in PBS, per almeno 30 min.
- PBS, 5 lavaggi da 5 min.
- Soluzione etanolo: acido acetico 2:1 (conservata a -20°C), per 20 min.
- PBS, 3 lavaggi da 5 min.

2. *Reazione di marcatura.* In questo passaggio i dUTP marcati si legano al 3'-terminale degli eventuali frammenti di DNA nucleare. Le fasi da seguire sono:

- Lavare gli embrioni nel tampone per TdT (Roche®) 1X (soluzione madre 5X) per 30 min a temperatura ambiente.
- Lavare gli embrioni nel tampone per TdT (Roche®) con l'aggiunta di 1 µl di TdT per altri 30 min a temperatura ambiente.
- Incubare gli embrioni 1 ora a 37°C oppure O/N a temperatura ambiente nel tampone per TdT (Roche®) contenente:
 - dUTP marcati con disossigenina 0,5 µM (Roche®)
 - Enzima TdT 1,5 µl (Roche®)
 - CoCl₂ 2,5 mM 1X (soluzione madre 10X)

Secondo giorno

1. *Lavaggi.* Lavare gli embrioni per rimuovere l'eccesso di enzima e i dUTP che non si sono legati in maniera specifica:

- PBS/EDTA (1mM), 2 lavaggi da 1 ora a temperatura ambiente.

- PBS, 4 lavaggi da 1 ora a temperatura ambiente.

2. Legame dell'anticorpo.

- Incubare con una soluzione di PBT contenente siero di pecora al 2% e 2 mg/ml di BSA per 2-5 ore a temperatura ambiente.
- Incubare con anticorpo anti-digossigenina-AP, coniugato con la fosfatasi alcalina (Roche), diluito 1:3.000 in PBT contenente siero di pecora al 2% e 2 mg/ml di BSA, in agitazione O/N a 4°C.

Terzo giorno

1. Colorazione, da effettuare a temperatura ambiente.

- Recuperare l'anticorpo e lavare il campione con PBT, 6 lavaggi da 15 min.
- Lavare gli embrioni nella soluzione di colorazione specifica, 3 lavaggi da 5 min.
- Lavare gli embrioni nella soluzione di colorazione contenente il substrato della reazione enzimatica della fosfatasi alcalina (*Fast Red*), 3 lavaggi da 5 min. Il precipitato che si forma è di colore rosso.
-

Soluzioni

Soluzione di colorazione per fosfatasi alcalina:

100 mM Tris-HCl pH 8,2

0,1% *Tween*-20

Soluzione di colorazione contenente FAST RED:

Sciogliere 1 tavoletta di FAST RED (Roche®) ogni 2 ml di soluzione di colorazione.

Filtrare la soluzione finale.

2.18. Colorazione delle cartilagini con Blu di Alcian

Il Blu di Alcian è un colorante carico positivamente, che forma legami elettrostatici con alcuni polianioni tissutali legando o il gruppo carbossilico o quello solforico.

Rappresenta un metodo per la rilevazione specifica delle mucine acide. È stato utilizzato per osservare lo sviluppo embrionale delle cartilagini.

Procedimento

Le larve di 5 o 6 giorni conservate in metanolo al 100% a -20°C sono reidratate aumentando gradualmente la concentrazione di PBT in metanolo finché non si raggiunge il 100% di PBT. Si eseguono poi 3 lavaggi da 5 min con PBT.

Si trasferiscono le larve in una nuova provetta da 2 ml e si aggiunge la soluzione *Alcian blue* (70% etanolo, 1% HCl, 0,1% Blu di Alcian) in cui le larve rimangono O/N a temperatura ambiente. In seguito le larve sono decolorate con una soluzione costituita da H₂O₂ al 3% e l'1% di KOH finché gli occhi delle larve da pigmentati diventano chiari. Si esegue quindi una graduale disidratazione aumentando sempre di più la concentrazione di etanolo in PBS. Gli embrioni possono quindi essere conservati in glicerolo a 4°C. I campioni sono montati su vetrini e fotografati.

2.19. Analisi dei vasi sanguigni

2.19.1. Analisi dei vasi sanguigni utilizzando la linea transgenica *fli-EGFP*

Per visualizzare ed analizzare la vascolarizzazione embrionale dello *zebrafish* abbiamo utilizzato la linea transgenica Tg(*fli1a*:EGFP), gentilmente messa a disposizione dal Prof. Argenton e dalla Dott.ssa Tiso, che esprime la proteina fluorescente verde EGFP in tutti i vasi sanguigni sotto la guida del promotore di *fli1a* (Lawson and Weinstein, 2002b). Le uova transgeniche sono state microiniettate con *esr2a*^{ATG}MO seguendo il protocollo di microiniezione descritto in precedenza.

2.19.2. Colorazione dei vasi sanguigni

Ho analizzato la rete vasale nell'embrione sfruttando l'attività della fosfatasi alcalina endogena. Embrioni di 3 giorni, trattati con PTU e fissati come per l'ibridazione *in situ* vengono reidratati con soluzioni a concentrazione crescente di PBS e decrescente

di metanolo. Gli embrioni vengono preparati ad un ambiente compatibile come valore di pH con quello della fosfatasi alcalina mediante 3 lavaggi da 5 min con la soluzione di colorazione specifica.

Vengono poi trasferiti in un vetrino da orologio e incubati al buio nella soluzione di colorazione. Il substrato utilizzato è l'NBT/BCIP che, nella reazione con la fosfatasi alcalina, forma un precipitato di colore blu. Per monitorare la reazione colorimetrica è necessario osservare gli embrioni al microscopio da dissezione ogni 10-15 min. Una volta raggiunto il livello di colorazione desiderato, gli embrioni sono lavati in PBT e poi fissati in PFA al 4% in PBS. Se gli embrioni non sono stati trattati con PTU è possibile dopo la colorazione trattare gli embrioni con una soluzione di PBS + 5% formammide e 10% H₂O₂ per 20 min per rimuovere la pigmentazione.

2.20. Microscopia ed acquisizione delle immagini

Per acquisire le immagini dopo ibridazione *in situ*, gli embrioni marcati di stadi di sviluppo precoci sono stati schiariti utilizzando una miscela 2:1 di benzil benzoato e alcol benzilico (Sigma) dopo disidratazione in soluzioni a concentrazione crescente di metanolo e decrescente di PBS. Gli embrioni sono quindi stati osservati al microscopio *Leica* DMR e fotografati con una fotocamera digitale *Leica* DC500 montata su un microscopio *Leica* DMR, dotato di ottica *Nomarski*. Le immagini ottenute sono state elaborate con il programma *Adobe Photoshop CS5*.

Gli embrioni fluorescenti dopo la colorazione con la metodica TUNEL e gli embrioni e le larve della linea transgenica Tg(*fli1a*:EGFP) sono stati fotografati usando la camera digitale *Leica* DC500 connessa a un microscopio a fluorescenza MZFLIII (Leica).

Gli embrioni e le larve utilizzati per l'analisi morfologica del fenotipo e per l'analisi dei vasi sanguigni sono stati fotografati *in vivo*. Sono stati decorionati manualmente, anestetizzati con tricaina e posti su vetrini portaoggetto a depressione immersi in metilcellulosa (Sigma) al 3% in H₂O. Queste immagini sono state acquisite usando un stereomicroscopio *Leica* DMR.

Le larve di 6 giorni fotografate con un microscopio *Leica* DMR dopo la reazione con Blu di Alcian, sono state montate con glicerolo all'80% in PBS su vetrini portaoggetto

e sono state private degli occhi che impediscono altrimenti una buona visualizzazione della colorazione.

Soluzioni

Tricaina (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt) 25X :

0,4% tricaina

20 mM Tris (pH 9)

portare a pH 7,2

2.21. Esperimento di *microarray*

Il *microarray* è una tecnica che permette di analizzare contemporaneamente l'espressione genica di decine di migliaia di geni in tessuti e cellule. I *chip* che compongono il vetrino da *microarray* sono formati da sonde a RNA, depositate in una posizione nota su un vetrino da microscopio, a formare una microgriglia, da cui deriva il nome *microarray*, che consente di identificarle in modo univoco.

Quando il cDNA trova la sua sequenza di basi complementare tra le decine di migliaia di sonde depositate sul *chip*, vi si appaia. In quel punto del *microarray* si ha emissione di fluorescenza, indice dell'espressione di quel determinato gene. Uno *scanner* rileva la fluorescenza che viene elaborata dal computer sottoforma di una sorta di mappa a colori, detta profilo di espressione, in cui si ha: segnale rosso se un gene è espresso solo nei tessuti trattati, verde se un gene è espresso solo nei controlli e diverse gradazioni di giallo (rosso + verde) se un gene è espresso in entrambi i tessuti.

È stato eseguito un *microarray* a due colori Agilent dell'intero genoma di *zebrafish* per analizzare l'espressione genica di embrioni trattati con *esr2a*^{ATG}MO rispetto agli embrioni microiniettati con ^{Std}MO dopo 8 e 48 *hpf*. L'RNA è stato isolato usando il reagente Trizol come descritto in precedenza e successivamente purificato. Il controllo di qualità dei campioni di RNA è stato eseguito utilizzando la piattaforma Agilent 2100 *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Cernusco, Milano, Italia) e il software Agilent 2100 *Bioanalyzer*.

Il software genera un numero di integrità dell'RNA (RIN), che rappresenta la qualità e

l'integrità di ogni campione di RNA.

In questo esperimento sono stati utilizzati 500 ng di RNA per ogni campione. Dopo aver preparato le *Spike Mix* è stato sintetizzato il cDNA a doppio filamento partendo dall'RNA. Successivamente avviene la sintesi del cRNA marcato con la cianina 3 (Cy3) e la cianina 5 (Cy5) rispettivamente per i campioni estratti dagli embrioni di controllo e da quelli trattati con il morfolino. Il cRNA viene purificato (Kit RNeasy MiniKit, QiAgen) e quantificato al Nanodrop. Si calcola il volume esatto per ciascun campione necessario ad ottenere 825 ng di cRNA marcato. I rapporti 260/280 e 260/230 si devono avvicinare il più possibile a 2 altrimenti la qualità non è ottimale per procedere. Mediante analisi al Nanodrop è stata analizzata l'incorporazione delle cianine con valori che devono essere compresi tra 0.8 e 2.

A questo punto i campioni vengono ibridati in 2X Gene Expression Hybridization Buffer per tutta la notte a 65°C. Infine dopo aver eseguito due lavaggi si caricano i vetrini (Agilent) nello scanner e procede con la lettura e l'analisi dei dati.

2.21.1. Analisi dei dati del *microarray*

Nell'immagine l'intensità dei colori delle sonde è proporzionale all'espressione dei geni presenti sul vetrino. Viene estratto un file testo con i dati grezzi che presenta i valori di qualità dell'esperimento per ogni pozzetto, il nome delle sonde, i nomi dei geni e i segnali di espressione processati e normalizzati. Attraverso un'analisi statistica sono stati scelti geni up o down regolati al di sopra di un valore di espressione limite e con un *fold change* uguale o superiore a 2 tra il gruppo di trattati e il gruppo di controllo. Successivamente i geni sono stati raggruppati in classi tramite gene ontology e analizzati singolarmente presso il sito "Entrez gene" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

2.22. PCR quantitativa (qRT-PCR)

Per quantificare l'espressione dei geni *anxa2a*, *ccng1* e *hmox1* è stata utilizzata la tecnica della Real-Time PCR relativa utilizzando la strumentazione disponibile presso il MicroCribi. Tutti i campioni utilizzati sono stati analizzati in triplicato in un volume di 20 µl ciascuno usando il Kit *DyNAmoTM HS SYBR® Green qPCR kit* (Finnzymes, Euroclone, Milano, Italia). Le PCR sono state eseguite con il software *Applied Biosystem 7500 Real Time System*. I valori soglia (Ct) sono stati generati automaticamente dal sistema. Questi valori sono stati poi usati per normalizzare e valutare l'espressione degli amplificati utilizzando il programma *REST2009* (<http://www.gene-quantification.de/rest-2009.html>). La specificità della reazione è stata verificata tramite l'analisi delle curve di melting alla fine dell'amplificazione. Tutti i valori ottenuti sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene housekeeping *ef1α*.

Nella tabella sottostante sono elencati gli oligo usati nella qRT-PCR:

Nome degli oligo	Sequenza
ANX2a-F1	5'-GCACAGATGTGAAGTGCTG-3'
ANX2a-R1	5'-CAGTCGTCTCCATTGCAC-3'
CCNG1-F1	5'-GATTGAGGATCAGCACGAG-3'
CCNG1-R1	5'-CAGTTATGGGCACTCAACAC-3'
HMOX1-F1	5'-CCACACACCGATATGCAC-3'
HMOX1-R1	5'-CAACGTGATGCCCACTCC-3'
EF1α-F	5'-GACAAGAGAACCATCGAG-3'
EF1α-R	5'-CCTCAAACCTCACCGACAC-3'

Tab.6: oligo usati nella qRT-PCR

3.RISULTATI

3.1. Analisi del profilo di espressione di *esr2a* durante l'embriogenesi

L'espressione spazio-temporale dei trascritti materni e zigotici codificanti il recettore per gli estrogeni *esr2a* è stata analizzata mediante la tecnica di ibridazione *in situ whole-mount*, durante le prime fasi dello sviluppo embrionale e cioè da subito dopo la fecondazione fino alle 72 ore di sviluppo.

Per questo tipo di analisi ho utilizzato due sonde antisense a RNA marcate con digossigenina e specifiche per il trascritto *esr2a*. La prima sonda si appaia alla regione codificante del messaggero. Questo tipo di sonda, vista l'elevata conservazione di sequenza del modulo di legame al DNA e del modulo di legame agli estrogeni tra i diversi tipi di recettore, potrebbe cross-reagire con i messaggeri delle altre forme. Per questo motivo ho preferito condurre anche una seconda analisi con una sonda diretta contro l'ultima parte della regione codificante, molto meno conservata, e contro la regione 3'-UTR del messaggero.

La sonda *full length* è stata sintetizzata a partire dal DNA plasmidico comprendente l'intera regione codificante il gene *esr2a*.

Per sintetizzare la sonda *Z-erβ2-3'* è stata inizialmente condotta una reazione di 3'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) sull'RNA estratto da embrioni WT di 2 ore, stadio embrionale durante il quale sono presenti elevate concentrazioni di questo messaggero (Pikulkaew et al., 2010).

A partire da questo cDNA, abbiamo amplificato la regione 3'-UTR con l'oligonucleotide *3'-RACE-outer* appaiato a ERβ2-F1 e poi con una seconda PCR interna alla prima (Nested PCR) con la coppia *3'-RACE-inner* e ERβ2-F (Vedi fig.15).

3' - AGAGACAGTGTGGTATACCGCCTTGCTCACTGTCTTGCTACAACACTGAGGAGTATCGAGGACTGAGA
Z-ERB2-F (*esr2a*^{ATGMO})
AGTTCACCATGACACACATCAACAGTCCCCGTTACTGATGCGACAGCTCT**GA**ACT**CATCCGCCTTACC**AT**GTCCGAG**
Mis-ERb2
TATCCCGAAGGAGACAGTCTCTTCTTTCAGCTGCAGGAAGTGGACTCAGGCCGTGTTGGGAGTGCACATCTCTCCCCA
TCTTCAACTCATCTCTCCATCTCTGCCAGTGGAGAATCACCCATCTGCATCCCATCGCCCTACACAGACCTTGGCCA
CGACTTCAGCACTCTGCCCTTTTACAGTCCCGCTCTGCTGGGTACAGCACATCGCCTTTATCGGACTGCTCGTCTGTG
ERβ2-F1
CGCCAGTCGCTAAGCCCGACTTTATTTTGGCCACCTCACAGCCATGTTTCTCACTCACATTGCAA**CAACAGAGT**CGAC
TTCAACAGAACCATGCTACTAGTGGGACTTGGACAGAACATACCCACATGATCATGTTGAAGAGGAAAAACAGCAAACC
ACTGGTGAAGCGGGTAGCAGATACAGAGGAGACGCTCTGTCTCTGAGAGGTAAAGCTGACATGCACACTGTGCCCGTC
TGCAGTGATTACGCCCTCTGGATATCATTATGGAGTGTGGTCTGTGAAGGCTGCAAAGCCTTTTCAAGAGGAGTATAC
AAGGACACAATGACTACATCTGTCTGCCACAAACCAATGCACTATCGACAAGAACCGCCGCAAAAGCTGCCAGGCCGTG
CCGACTCCGAAAGTGTATGAAGTTGGAATGATGAAATGTGGTTCGCGCGAGATCGTAGCAGCTACCAACAAAGAGGA
GCACAGCAGAAACGACTGGTCCGATTCTCTGGCAGAATGAGAATGACTGGTCCGAGGTCTCAAGAGATAAAGAGTATCC
CGCGTCTCTCAGTGGGAATGAGGTGGTGCATATCACTGAGCCCAGAGGAGCTAATCTCCCGGATCATGGAAGCAGA
GCCGCCGGAGATTTATCTCATGAAAGACATGAAGAAGCCCTTCACTGAGGCAAACGTCATGATGCTACTGACCAACCTG
GCTGACAAAGACTTGTGCACATGATCAGCTGGGCCAAGAAGATCCAGGTTTTGTGGAGCTCAGTCTTTTCGATCAGG
TGCATTTGTGGAGTCTGCTGGTTAGAGGTGCTTATGCTGGGATTGATGTGGCGCTCCGTTAATCACCCCTGGAAAGCT
ERβ2-F
CATTTTCTCTC**CAGACCTCTGTCTCAGCA**GGGATGAAAGCAGCTGTGTGCAGGGGTTGGTGGAGATCTTTGATATGCTG
CTGGCAGCCACGTCCAGATTAGAGAGTTGAAGTTACAGAGAGAAGAGTACGTGTCTCAAAGCCATGATCTCTCTGA
ERβ2-R
ACTCCAACATGTGTCTGGGCTCGTCTGAGGGAGGAGAAGATCTGCAGAGCCGCTCC**AAGCTGCTGTGTCTGCTGG**ACTC
GGTGACTGACGCTCTGGTTTTGGGCCATCTCGAAGACCGGCCCTTAGCTTCCAGCAGCGCTCCACCAGACTGGCCCATCTG
CTCATGTGCTCTCACACATACGCCACGTCACTAACAAGGCATGGACCACCTGCACTGCATGAAGATGAAGAAGATGG
TTCTCTGTATGACCTGCTCCTGGAGATGCTGGACGCTCACATCATGCACAGCTCCCGTTTTGTCTCACCTCCGSCCTCG
Z-ERB2-R
AGCCCTGCTGCTCACAAGACAACAAGAGTGTCCAGGAGGCCCTTCCCTGCAGCTC**ACAGCACGGACCTAAACACGG**
CCCTCACAGTCACACAAAACACAGTACTTAAGGATGATCTGTAGTTTCGGGAGGATGGACAACCAAAACACCCACATAAAA
AGCAAGGAGTAGGATTCACAAGACGAAAAGCATCATGGATATCTTGAATGTTTTTCCTGTTTTTAAATGTTGGCAATT
GCTGTGAAATCTCTTTATTGTTTCCACACAACCTCTGACAACCTTTTTAATGATTTTATGTAGCACAACCTGCAAAAGAAA
GAAAAAAGAAATGAATACCCACATTGGATTTCAAGAGATTTTGGAACTTCATTACACGGTGAACATAAATTTCTGG
CATTATATGCATAATGGAGGCCATCTAGTAGGAGAAAACCAAGTAAACCAATCATGCCACCTCTTTTTTAAAGAAC
CAGTTCAAACCTCAATTGAGAGAGTGCATTGGTGCATGACCCGGATGACAGTAGGTTTTATTAATCTGTCATCTCTGG
CCTTGAGAGACTGTGGCCTTTAGCATTAGCCTTGTAGCAGCCTGCCTCTCAAGTACTCACCAAGTTCAGATCCCGCTGT
AAGTAGGACGGGTTATAATGTCCATGAAAGTTTTGGCCTCATTTCATGACATCCGTGACAACATGGACAAGAGCAGT
GTGCGATCTCTACTTTTTCTCTTTCTTACATAAGCTTGTGCTTTTACATTTTGTAAAATGAAACAAAATATCGTAAAC
TCATTACTTTGACAATACTGGCAGTAAAATCAAATTTGATTTAGTCTGTTGTAATGGACAGAATCATTCCTGATAGA
TGAGACAAAGCATTGTATGCTGAGTGAGCAAACCATATCTGGACTAAGGGCAAGCAGTATTTAGACTTACAAAACAA
AAAACCTGAATGATTGAATGAATGTCAGCTGGATGTTTCATTTACATCTGTTGTTATTGAGAAATGGAACCATTTGCAAA
ATGGCCCTGTGCACATTTTAGTGATTAATCTTTTTTGCAAAACAAACATTTATGTACAGGAGTGACAGCCGCAATTTTAC
AGCCATCGCCGTGACCATATCTTGAACATTTGGAGGGTTTTGTGTTAGAAATTATAAAGTAGGACATTTAGGCCATAATTC
TAGTGGAAAGGTATTTGCAAAAAAAAATTAACAAATCAATTTGTAAACCTAATATGTTTACATTCAGTTAGAAAAGA
CTATAATTAGGTAACATCTCAGTTACAAATGATGAAATCTGAGTTAAAAGCATATTACTGCTGGCTATTGAATATTT
CTACCATAAAACCATTGTATAACAAAAAATAAAAAA - 5'

Fig. 15: Sequenza del trascritto di *esr2a* con le posizioni degli oligo senso e antisense utilizzati nel lavoro. È inoltre evidenziata la sequenza del morfolino che blocca la traduzione disegnato a partire dall'ATG. L'oligo Miss-ERb2 è progettato in modo che non si appai alla sequenza grazie alla presenza di 8 mutazioni silenti. I codoni di inizio trascrizione e di fine trascrizione sono evidenziati in rosso.

Il frammento ottenuto è stato estratto da banda, inserito nel vettore *pGEM[®]-T Easy* e trasformato in batteri competenti JM109. Dopo PCR di controllo con la coppia di *primer* M13 senso e antisenso, la specificità della sequenza e l'orientamento del frammento nel plasmide sono stati analizzati mediante sequenziamento. La sintesi della sonda è stata eseguita con l'utilizzo della polimerasi SP6 (Promega).

Entrambe le sonde hanno evidenziato lo stesso profilo di espressione spazio-temporale per i trascritti codificanti *esr2a* (Fig. 16). Negli ovociti gli mRNA materni codificanti *esr2a* sono presenti in forma di strutture granulari e filamentose nel volume centrale dell'ooplasma. Già allo stadio di 1 cellula si può notare che quasi tutti i trascritti sono collocati nell'area del blastodisco. Allo stadio di 2 e 8 cellule, il messaggero è equamente distribuito tra i blastomeri. Se analizzata a 6 ore (stadio di *shield*), l'espressione del recettore degli estrogeni *Esr2a* si osserva nel blastodisco. Allo stadio di 10 ore (*tail bud*) si può notare la presenza di un segnale non molto intenso, ma maggiormente concentrato nella regione cefalica. A 24 ore la marcatura è localizzata nella regione della testa ed in particolare nella regione degli occhi, della vescicola otica e del cervello anteriore. A 48 ore permane il segnale nella regione cefalica ma risulta anche visibile anteriormente e ventralmente al sacco del tuorlo. L'espressione a 72 ore è molto bassa (non mostrato in figura).

I risultati ottenuti con questo tipo di analisi sono in accordo, dal punto di vista quantitativo, con quelli ottenuti mediante analisi di real time PCR (Pikulkaew et al., 2010).

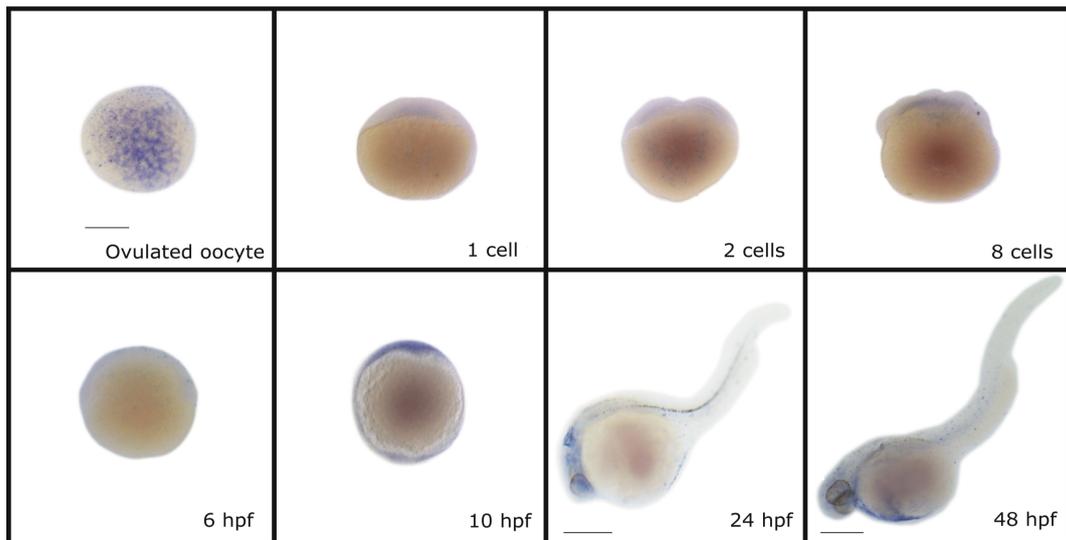


Fig. 16: Analisi del *pattern* di espressione dell'mRNA di *esr2a* durante l'embriogenesi mediante ibridazione *in situ* con le sonde *Z-erβ2* e *Z-erβ2-3'* su ovociti ovulati, embrioni WT di 1-2-8 cellule, embrioni di 6-10-24-48 ore. *Scale bar* di 300 μm.

3.2. Descrizione dei diversi morfolino utilizzati e analisi della concentrazione ottimale

Nell'analisi dell'espressione degli mRNA dei recettori degli ormoni steroidei durante l'embriogenesi di *zebrafish* mediante qRT-PCR (Pikulkaew *et al.*, 2010), i trascritti codificanti *Esr2a* sono risultati essere presenti, come messaggeri di origine materna, in concentrazioni elevate durante le prime 4-6 ore di sviluppo. Il trascritto raggiunge una concentrazione minima allo stadio di gastrula, per poi aumentare lievemente con l'inizio della trascrizione embrionale.

Per studiare più a fondo il ruolo di *esr2a* nello sviluppo di *Danio rerio*, ho sfruttato la tecnologia di *knockdown* mediante oligonucleotide antisense morfolino in grado di inibire l'espressione del recettore degli estrogeni *esr2a*.

Il silenziamento del trascritto per *Esr2a* è stato ottenuto mediante un morfolino *esr2a*^{ATG}MO, che è stato disegnato in corrispondenza del codone d'inizio della traduzione (Fig. 17). La microiniezione dell'oligonucleotide antisense complementare a questa regione porta al blocco della traduzione proteica del recettore.

```

esr2aATGMO 3'- TACAGGCTCATAGGGCTTCCTCTGT - 5'
esr2a mRNA: 3'- ACCATGTCCGAGTATCCCGAAGGAGACAGTC - 5'

```

Fig. 17: Posizione di *esr2a*^{ATG}MO nella sequenza dell'mRNA del recettore degli estrogeni Esr2a (AF516874) di *Danio rerio*. In rosso la tripletta di inizio traduzione e in azzurro le basi in cui il morfolino lega il messaggero.

Il controllo che ho utilizzato è costituito da uno *standard control* (^{Std}MO), oligonucleotide morfolino standard, con sequenza di 25 paia di basi, che non solo non si appaia al trascritto per il recettore degli estrogeni, ma non ha nessun gene bersaglio in *zebrafish* e non presenta alcuna significativa attività biologica. L'utilizzo di quest'oligo permette di verificare che gli effetti osservati non derivino dalla microiniezione stessa, ma siano legati all'inattivazione specifica del gene *target* del morfolino.

Allo scopo di studiare gli effetti dovuti all'inattivazione della trascrizione embrionale del gene *esr2a* rispetto al blocco della traduzione dei messaggeri materni abbiamo utilizzato un morfolino diretto contro la sequenza tra l'esone 3 e l'introne 3, *esr2a*^{SPLIC}MO (Fig. 18).

```

esr2aSPLICMO: 3'- TGTTCcattctgagagactttcatg -5'
esr2a mRNA: 3'-TTTCAAGAGGAGTATACAAGgtaagactctctgaaagtacccatg - 5'

```

Fig. 18: Posizione di *esr2a*^{SPLIC}MO nella sequenza dell'mRNA del recettore degli estrogeni Esr2a (AF516874) di *Danio rerio*. Nella sequenza del messaggero, in maiuscolo è rappresentato l'esone, in minuscolo l'introne.

Questo morfolino agisce dopo l'inizio della trascrizione embrionale, durante il processo di maturazione post-trascrizionale del messaggero determinando la

manca, nel trascritto finale, del terzo esone. Questo porta ad un *frameshift*, con inserimento di un codone di stop che interrompe il processo di traduzione. La proteina eventualmente prodotta manca dei moduli DBD e LBD e non è quindi in grado di espletare la sua funzione. La morfologia dei morfanti ottenuta dall'iniezione di *esr2a*^{SPLIC}MO è dovuta al silenziamento del messaggero ottenuto per trascrizione embrionale e non per eredità materna.

La concentrazione ottimale di un morfolino è quella che produce alterazioni fenotipiche caratteristiche e riproducibili in una percentuale elevata di embrioni, senza causare elevati valori di mortalità. Gli embrioni con fenotipo modificato dal morfolino vengono definiti morfanti (Ekker, 2000). La maggior parte dei morfolino richiede concentrazioni che vanno da 1 µg/µl a 2 µg/µl.

Per determinare la concentrazione ottimale ho eseguito il trattamento di microiniezione con morfolino alle concentrazioni di 0,5, 1, 2 µg/µl, corrispondenti rispettivamente a 5,2, 10,3 e 20,3 ng per ogni embrione. Le tre diverse concentrazioni sono state iniettate in embrioni allo stadio di 1 cellula. L'esperimento è stato ripetuto in triplicato e gli embrioni sono stati osservati fino a 5 giorni dopo la fecondazione.

I risultati mostrano che il fenotipo morfante più severo e la mortalità più elevata si ottengono dalla microiniezione con la concentrazione più alta di morfolino *esr2a*^{ATG}MO (Tab. 7). Risultati opposti si ottengono, come atteso, utilizzando la concentrazione più bassa.

L'iniezione di *esr2a*^{ATG}MO alla massima concentrazione utilizzata (20,3 ng per embrione) porta a una percentuale di anormalità media dell'84% e ad un 23% di mortalità. Con la concentrazione di morfolino di 10,3 ng per embrione l'anormalità media scende al 63% e la mortalità al 16%.

Lo stesso tipo di analisi è stata condotta anche con il morfolino di controllo. Utilizzando la concentrazione di 20,3 ng per embrione, l'anormalità media raggiunge il 25% con una mortalità del 16%, mentre gli embrioni anormali si abbassano al 11% iniettando il morfolino alla concentrazione di 10,3. L'alto numero di anormali ottenuti dall'iniezione di 20,3 ng per embrione è imputabile a effetti tossici di questo morfolino quando viene utilizzato ad elevate concentrazioni. Il fenotipo osservato è quindi determinato da possibili effetti *off-target*. Iniettando 10,3 ng per embrione ottengo embrioni più correttamente utilizzabili come controlli, vista la buona percentuale di embrioni normali e la maggiore percentuale di sopravvivenza.

Al termine di questi esperimenti di ottimizzazione della microiniezione si è deciso che la concentrazione di 10.3 ng per embrione (1µg/µl), a differenza della altre, era quella più adatta per eseguire gli esperimenti successivi. Questa quantità di morfolino porta infatti ad un alto valore di anormalità nei morfanti iniettati con *esr2a*^{ATG}MO e ad un valore molto più basso e accettabile negli embrioni di controllo iniettati con ^{Std}MO. Risulta quindi ottimale per ottenere embrioni morfanti vitali con alterazioni morfologiche costanti.

La stessa concentrazione è stata scelta, dopo l'esecuzione delle prove appena descritte, anche per *esr2a*^{SPLIC}MO.

Anche in questo caso gli effetti del *knockdown* sono dosaggio dipendenti e difetti maggiori sono osservabili con l'aumento della concentrazione di morfolino (Tab. 7).

^{Std} MO ng per embrione	Numero totale	Morti (%) Media ± DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media ± DS	Anormali (%) Media ± DS
5,2	251	12 ± 3	88 ± 3	96 ± 2	4 ± 2
10,3	291	12 ± 1	88 ± 1	89 ± 1	11 ± 1
20,3	258	16 ± 5	84 ± 5	75 ± 2	25 ± 2

<i>esr2a</i> ^{ATG} MO ng per embrione	Numero totale	Morti (%) Media ± DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media ± DS	Anormali (%) Media ± DS
5,2	268	14 ± 3	86 ± 3	84 ± 1	16 ± 1
10,3	246	16 ± 5	84 ± 5	37 ± 4	63 ± 4
20,3	346	23 ± 3	77 ± 3	16 ± 6	84 ± 6

<i>esr2a</i> ^{SPLIC} MO ng per embrione	Numero totale	Morti (%) Media ± DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media ± DS	Anormali (%) Media ± DS
5,2	279	10 ± 5	90 ± 5	93 ± 3	7 ± 3
10,3	270	10 ± 5	90 ± 5	90 ± 4	10 ± 4
20,3	384	15 ± 5	85 ± 5	87 ± 7	13 ± 7

Tab. 7: Studio fenotipico degli embrioni iniettati con ^{Std}MO, *esr2a*^{ATG}MO e *esr2a*^{SPLIC}MO. I risultati corrispondono al valore medio di tre esperimenti di microiniezione e le larve sono state analizzate per cinque giorni dopo la fecondazione.

3.3. Analisi fenotipiche dei morfanti

Nelle prime 6 ore di sviluppo non è possibile distinguere, sulla base delle loro caratteristiche fenotipiche, i morfanti iniettati con *esr2a*^{ATG}MO dai controlli (*wild type* e iniettati con ^{Std}MO) o dagli embrioni iniettati con *esr2a*^{SPLIC}MO.

Nelle fasi successive si osserva invece un lieve ritardo nella crescita e nella schiusa dei morfanti (*esr2a*^{ATG}MO), ritardo che diviene palese ad 1 giorno dopo la fecondazione (dpf).

Normalmente negli embrioni di *zebrafish* WT ad 1 dpf iniziano ad apparire i melanofori e l'apparato circolatorio è in formazione. Compaiono gli abbozzi delle pinne pettorali e nel cervello si possono riconoscere i ventricoli cerebrali. Lo sviluppo dei somiti e del tubo neurale è completo. Il sacco del tuorlo costituisce la fonte di nutrimento dell'embrione in quanto non sono ancora presenti né gli archi faringei né l'apparato buccale e lo sviluppo del tratto gastrointestinale è incompleto.

Nelle larve di *zebrafish* a 5 giorni di sviluppo gli organi interni sono già completamente formati e collocati nella loro sede definitiva. Gli individui sono forniti di pinne pettorali per nuotare attivamente. Iniziano ad alimentarsi in modo autonomo con cibo di piccole dimensioni, mentre il sacco del tuorlo è quasi completamente riassorbito. La testa appare di grandi dimensioni rispetto al corpo e da questo stadio di sviluppo si inizia a osservare la vescica natatoria.

Le larve dei morfanti iniettate con *esr2a*^{ATG}MO a 3 e 5 dpf sono invece caratterizzate, oltre che dal ritardo nella crescita corporea e da un minor tasso di schiusa, da una forma ricurva, un irregolare sviluppo di cervello e splancnocranio e una cavità pericardica ampia e emorragica. La vescica natatoria non è insufflata, mentre la pinna caudale risulta rudimentale (Fig. 19). Le larve mostrano anomali movimenti circolari nel nuoto dopo stimolo meccanico. Il cervello, gli occhi e le vescicole otiche sono di dimensioni ridotte rispetto ai controlli.



Fig. 19: Analisi fenotipica di embrioni e larve WT, iniettati con *esr2a*^{ATG}MO, *esr2a*^{SPLIC}MO e *std*^DMO a 1-3-5 giorni dopo la fecondazione. *Scale bar* di 300 μ m.

Le analisi morfologiche mostrano, come sopra descritto, una mancata insufflazione della vescica natatoria, processo che inizia normalmente circa allo stadio di 96 hpf (vedi Fig. 20).

Per determinare se questa anomalia sia stata causata dal mancato sviluppo della vescica o semplicemente dalla mancata insufflazione della stessa ho analizzato l'espressione del gene *mnx1* (*motor neuron and pancreas homeobox protein*), che codifica per un fattore di trascrizione. Nello *zebrafish* il gene *mnx1* è espresso nel pancreas endocrino e nel midollo spinale ma anche nell'abbozzo della vescica natatoria a partire dalle 36 hpf e per questo può essere utilizzato come un marcatore precoce di questa struttura.

Dai risultati ottenuti si può notare che nelle larve di 5 dpf il marcatore è visibile nell'epitelio che circonda la vescica natatoria nelle larve WT, mentre nelle larve morfanti la marcatura è concentrata nella zona della vescica natatoria non insufflata. Questo dimostra un normale sviluppo della vescica natatoria come struttura, ma la sua mancata insufflazione.

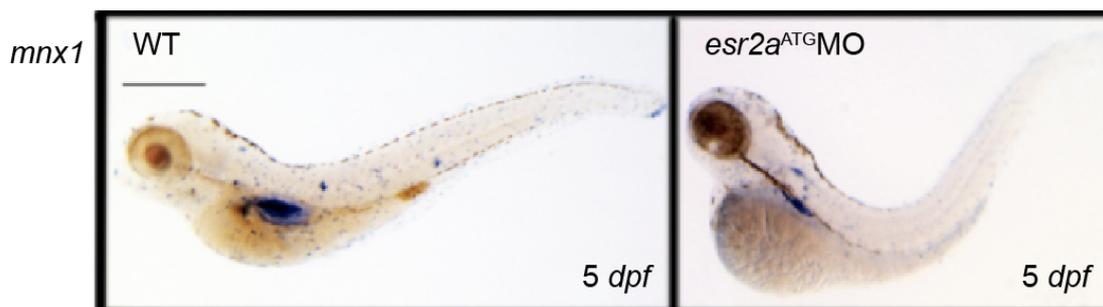


Fig. 20: Ibridazione *in situ* su embrioni WT e *esr2a*^{ATG}MO con il marcatore *mnx1* a 5 giorni. Scale bar di 300 μ m.

Gli iniettati con il morfolino *esr2a*^{ATG}MO sopravvivono al massimo fino a 12-14 giorni. Gli effetti ottenuti con questo morfolino sono paragonabili a quelli descritti da Froehlicher e collaboratori (2009) e ottenuti utilizzando un diverso morfolino contro la regione contenente il codone di inizio traduzione. Le sole differenze corrispondono a percentuali di schiusa e sopravvivenza che sono risultate maggiori nei nostri esperimenti. Questo risultato conferma, in modo indiretto, che i difetti sullo sviluppo da noi evidenziati sono stati determinati dal blocco della traduzione della forma *Esr2a* del recettore degli estrogeni.

La microiniezione di *esr2a*^{SPLIC}MO produce invece un fenotipo morfante paragonabile agli embrioni di controllo WT e iniettati con ^{Std}MO. Questo risultato potrebbe essere legato ad una limitata efficienza del morfolino, che deve entrare nel nucleo per raggiungere l'mRNA bersaglio. Quando si utilizza questo tipo di morfolino è necessario verificare la sua funzionalità prima di poter considerare specifici i risultati ottenuti.

Poiché il morfolino lavora sulla maturazione del trascritto interferendo con il processo di giuntura (splicing), la verifica della funzionalità consiste nell'analisi del trascritto codificante *Esr2a* negli embrioni WT e nei morfanti *esr2a*^{SPLIC}MO mediante RT-PCR con oligonucleotidi posti a cavallo dell'esone che si presume venga perso. L'analisi dovrebbe mostrare, nei morfanti, un prodotto di amplificazione di dimensioni ridotte, a causa della perdita dell'esone, rispetto a quello atteso nel WT.

Ho condotto la RT-PCR su cDNA retrotrascritto da RNA di embrioni WT e *esr2a*^{SPLIC}MO di 4, 6, 8 hpf. Il cDNA è stato prima normalizzato mediante RT-PCR (28 cicli di amplificazione) con una coppia di oligonucleotidi in grado di amplificare il gene codificante *efl α* (*elongation factor 1 α*), utilizzato come gene *housekeeping*. Il

trascritto codificante *Esr2a* è stato poi amplificato con la coppia di oligonucleotidi Z-ERB2-F e ERβ2-R. Il frammento atteso per il trascritto corretto è di 1350 pb.

I prodotti di PCR caricati su gel di agarosio hanno confermato la presenza di un amplificato di lunghezza corretta nel WT. Nei campioni trattati con *esr2a*^{SPLIC}MO abbiamo invece ottenuto 2 bande, una di lunghezza corretta e l'altra più corta di circa 150 pb (Fig. 21). La lunghezza della banda più bassa è compatibile con la perdita del terzo esone e questo è stato ulteriormente confermato mediante sequenziamento del frammento stesso. Come si può vedere nella Fig. 21, dall'esone 2 si passa direttamente all'esone 4 e questo comporta l'inserimento di un codone di stop con perdita di tutta la regione proteica a valle.

L'uso di *esr2a*^{SPLIC}MO abolisce quasi completamente la corretta maturazione del trascritto *esr2a* e questo è chiaramente indicato dalla prevalenza della forma mancante dell'esone 3 (banda più bassa) rispetto alla forma di messaggero corretta (banda più alta) alle 8 hpf.

Questa analisi, che non è quantitativa ma solo qualitativa visto che la PCR è stata condotta a 40 cicli, mette anche in evidenza come l'espressione embrionale cominci già alle 6 ore, ma a livelli molto bassi (vedi intensità della banda bassa alle 6 ore) e quindi la maggior parte del trascritto per *Esr2a* è ancora di tipo materno.

L'assenza di effetti dell'*esr2a*^{SPLIC}MO, dopo verifica della sua funzionalità, ci porta ad ipotizzare che le irregolarità e le deformità, osservabili nei morfanti ^{ATG}MO, siano dovute al blocco della traduzione proteica dell'mRNA di eredità materna più che al blocco della maturazione del trascritto embrionale.

Per escludere quindi che gli effetti aspecifici provocati da p53 siano alla base del fenotipo morfante osservato, ho coiniettato *esr2a*^{ATG}MO con un morfolino inattivante la traduzione di p53. La coiniezione non ha portato a una variazione del fenotipo *esr2a*^{ATG}MO (Fig. 22). Il fenotipo osservato nei morfanti è quindi specificamente legato all'inattivazione di Esr2a.



Fig. 22: Analisi fenotipica di embrioni e larve WT, iniettati con *esr2a*^{ATG}MO, coiniettati con *esr2a*^{ATG}MO e *p53*MO a 1-3-5 giorni dopo la fecondazione. *Scale bar* di 300 μ m.

Per ottenere un'ulteriore verifica della funzionalità e specificità dell'oligonucleotide morfolino utilizzato è stato allestito un esperimento di mRNA *rescue* (recupero del fenotipo mutante).

Questa metodica prevede di coiniettare con l'oligonucleotide morfolino l'mRNA codificante la proteina bersaglio del silenziamento. Il trascritto utilizzato può essere quello di una specie vicina filogeneticamente allo *zebrafish* ma che chiaramente presenta differenze nella sequenza nucleotidica ed in particolare nella regione riconosciuta dal morfolino. Una strategia alternativa consiste nel modificare il trascritto di interesse nella regione riconosciuta dal morfolino (Moulton e Moulton, 2008; Eisen e Smith, 2008). In entrambi i casi, l'mRNA non si può fisicamente appaiare alle molecole di morfolino che lo inattiverebbero. Mentre il morfolino iniettato impedisce la traduzione del trascritto presente nell'ovocita o prodotto dall'embrione, il trascritto sintetico esogeno può essere invece tradotto in proteina e

svolgere la sua normale funzione con il conseguente recupero (*rescue*) del fenotipo alterato tipico degli embrioni morfanti.

All'inizio di questo lavoro ho provato ad amplificare il trascritto completo corrispondente a questa forma di recettore nella trota iridea *Oncorhynchus mykiss*, ma a causa del basso livello di espressione di questa forma nei tessuti che avevamo a disposizione, non sono riuscito ad ottenere il trascritto completo. Ho quindi deciso di utilizzare il trascritto di *esr2a* dello *zebrafish* modificandolo nella regione riconosciuta dal morfolino.

Per modificare la regione di interesse, è stato progettato e utilizzato come primer senso il *primer* Mis-ERb2, che permette l'inserimento di otto mutazioni silenziose nella sequenza *target* del morfolino.

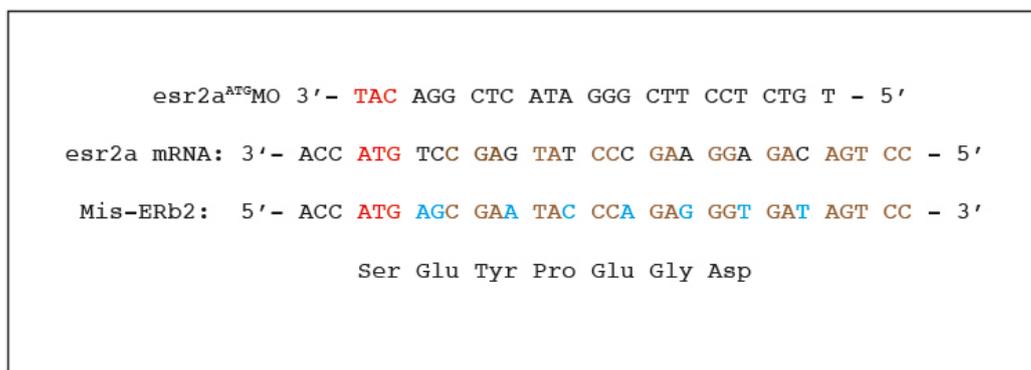


Fig. 23: Posizione di *esr2a*^{ATG}MO nella sequenza dell'mRNA del recettore degli estrogeni *esr2a* (AF516874) di *Danio rerio* e appaiamento dell'oligo senso Mis-ERb2 nella regione riconosciuta dal morfolino. I nucleotidi in marrone comuni tra la sequenza del recettore e il *primer*. Le basi evidenziate in azzurro sono quelle che vengono mutate dopo l'amplificazione con Mis-ERb2. La mutazione non comporta variazioni nella sequenza aminoacidica. Sotto sono scritti gli aminoacidi tradotti sia con il trascritto di *esr2a* sia con quello mutato grazie al primer.

L'*esr2a*^{ATG}MO non può più appaiarsi alla regione circostante il sito di inizio della traduzione, e il trascritto viene tradotto senza errori perché le sostituzioni silenziose non portano a variazioni aminoacidiche. La proteina viene quindi tradotta e può svolgere la sua funzione proteica.

Per ottenere l'intero trascritto codificante *Esr2a* di *zebrafish*, mutato nella regione di riconoscimento del morfolino, abbiamo inizialmente amplificato tutta la regione codificante di questa forma di recettore con la coppia di oligo Z-ERB2-F e Z-ERB2-R

a partire dal cDNA retrotrascritto da RNA di embrioni WT di 2 hpf. Ho precedentemente dimostrato che il trascritto di interesse è materno e quindi espresso nelle primissime ore di sviluppo.

L'enzima utilizzato nell'amplificazione è una *Taq* polimerasi ad alta fedeltà (*AccuPrimeTM PCR System*, Invitrogen).

Il frammento ottenuto corrispondeva alla lunghezza attesa di 1665 paia di basi ed è stato estratto da gel di agarosio, inserito nel vettore di clonaggio *pGEM[®]-T Easy* e trasformato in batteri competenti JM109. La PCR di controllo con la coppia di oligo T7 e SP6 ha dato dei cloni positivi la cui specificità è stata confermata mediante sequenziamento in entrambi i sensi in modo da coprire l'intera regione amplificata.

L'amplificato completo mutato nella regione di inizio traduzione è stato quindi ottenuto, a partire dal DNA plasmidico sequenziato, mediante PCR con l'oligonucleotide senso Mis-ERb2 accoppiato a Z-ERB2-R, primer che si appaia alla regione 3'-UTR, subito dopo il codone di stop. Anche in questo caso, essendo molto importante non introdurre variazioni di sequenza nella regione codificante è stata nuovamente utilizzata la *Taq* polimerasi *AccuPrimeTM PCR System*.

L'amplificato è stato inserito nel vettore *pGEM[®]-T Easy* e dopo trasformazione in batteri JM109, *screening* delle piastre e successiva PCR di controllo con i primer M13F e M13R, il clone di interesse è stato sequenziato in entrambi i sensi. La sequenza corrispondeva a quella di *esr2a* di *zebrafish*, ma mutata nella regione di appaiamento del morfolino.

La regione codificante è stata quindi inserita nel vettore di espressione *pCS2+*.

Questo è stato ottenuto digerendo sia il plasmide *pGEM[®]-T Easy* contenente l'inserito di interesse che il vettore di espressione *pCS2+* con gli enzimi *XbaI* ed *EcoRI*.

Il frammento di 1800 paia di basi corrispondente all'inserito e quello di 4100 corrispondente al vettore *pCS2+* sono stati estratti da banda e quantificati.

Con i prodotti delle digestioni è stato possibile eseguire il clonaggio direzionato della sequenza codificante *Esr2a* in *pCS2+*. Dopo PCR di controllo con la coppia di oligo Mis-ERb2 e T7, sequenziamento, inoculo e miniprep del clone risultato positivo, il *pCS2+* contenente la sequenza per *esr2a* è stato linearizzato con l'endonucleasi *NotI*, che taglia a valle del sito di poliadenilazione di SV40. Successivamente alla quantificazione e alla purificazione, ho utilizzato il prodotto della linearizzazione

come stampo per la sintesi dell'mRNA senso di *esr2a*, utilizzando il kit *mMESSAGE mMACHINE SP6* (Ambion).

L'iniezione di quantità non tossiche di mRNA mutato insieme al morfolino *esr2a^{ATG}MO* ha portato al recupero del fenotipo selvatico dimostrando che gli effetti evidenziati derivavano effettivamente dal blocco della traduzione del messaggero per *Esr2a*.

Anche per l'analisi di recupero del fenotipo è necessario iniettare, assieme al morfolino alla concentrazione ottimale di 10.3 ng per embrione, concentrazioni diverse di mRNA per determinare quella in grado di recuperare meglio il fenotipo (Eisen e Smith, 2008). L'analisi condotta con concentrazioni variabili di messaggero mutato (15, 30, 60, 90, 120 pg) ha messo in evidenza un recupero variabile del fenotipo. Come si può vedere nella Tabella 8, con l'iniezione di 15 pg di messaggero è ancora presente una mortalità del 35% e il 65% delle larve mostrano fenotipo alterato. Il recupero migliore si ottiene iniettando una quantità di messaggero pari a 30 pg per embrione. La mortalità in questo caso si riduce al 23% e il 65% delle larve sopravvissute presenta un fenotipo normale (Fig. 24 e Tab. 8), con vescica natatoria sviluppata e riduzione del tuorlo.

L'aumento del trascritto iniettato porta ad un aumento del fenotipo alterato e, con 120 pg per embrione, anche ad un aumento della mortalità.

<i>esr2a^{ATG}MO</i> + diverse concentrazioni di z- <i>esr2a</i> mRNA	Numero totale	Morti (%) Media ± DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media ± DS	Anormali (%) Media ± DS
+ 15 pg mRNA per embrione	261	35 ± 7	65 ± 7	40 ± 7	60 ± 7
+ 30 pg mRNA per embrione	288	23 ± 5	77 ± 5	65 ± 8	35 ± 8
+ 60 pg mRNA per embrione	320	20 ± 2	80 ± 2	51 ± 3	49 ± 3
+ 90 pg mRNA per embrione	313	20 ± 5	80 ± 5	56 ± 2	44 ± 2
+ 120 pg mRNA per embrione	205	45 ± 2	55 ± 2	41 ± 1	59 ± 1

Tab. 8: Risultati ottenuti degli embrioni iniettati con *esr2a^{ATG}MO* (10,3 ng per embrione) e con il trascritto per *Esr2a* che presenta mutazioni silenziose in modo da non essere riconosciuto dal morfolino. I dati sono tratti da tre esperimenti. Le percentuali di normali e anormali sono calcolate sugli embrioni sopravvissuti a 5 dpf.

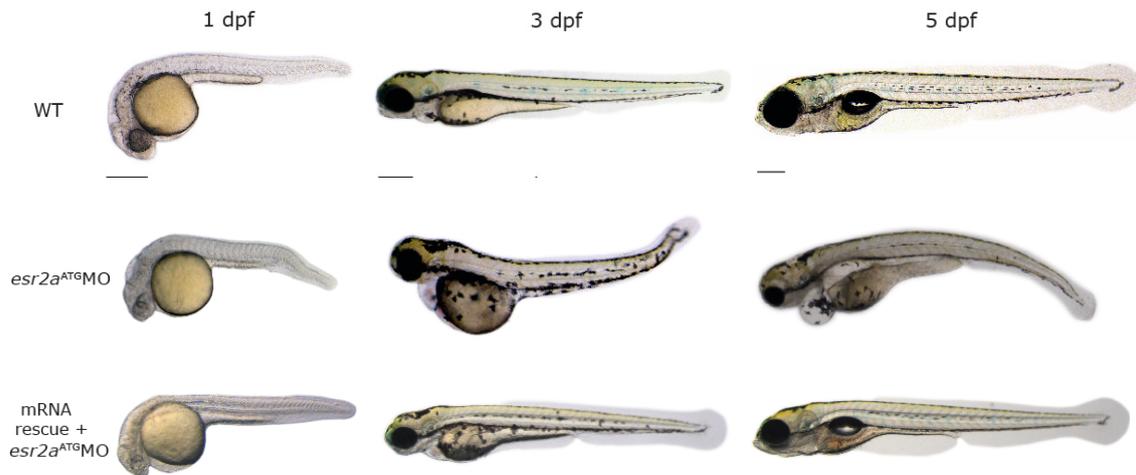


Fig. 24: Analisi fenotipica di embrioni e larve WT, iniettati con *esr2a*^{ATG}MO, coiniettati con *esr2a*^{ATG}MO e mRNA *rescue* (30 pg per embrione) a 1-3-5 giorni dopo la fecondazione. *Scale bar* di 300 μ m.

3.5. Saggio di morte cellulare

L'esperimento di TUNEL *whole-mount* (*terminal deoxynucleotidyl transferase mediated-dUTP-nick end labeling*) è stato utilizzato per evidenziare la presenza e l'eventuale variazione nella quantità e nella distribuzione di cellule apoptotiche negli embrioni morfanti rispetto agli embrioni WT. La colorazione è stata eseguita nei morfanti e nei controlli agli stadi di 10, 24 e 48 hpf. La tecnica è in grado di rilevare la morte cellulare sfruttando la caratteristica frammentazione del DNA nucleare nelle cellule apoptotiche, mediante la colorazione dell'estremità 3'-terminale dei frammenti di acidi nucleici che si vengono a formare.

La colorazione mediante TUNEL di embrioni WT e *esr2a*^{ATG}MO a 10 ore ha rivelato una minima evidenza di apoptosi. Il numero di cellule risultate positive al saggio nei morfanti aumenta però notevolmente e si concentra nell'area cerebrale a 24 e 48 ore (Fig. 25). Questo risultato suggerisce l'ipotesi che i difetti nello sviluppo degli *esr2a*^{ATG}MO siano causati, almeno parzialmente, da un aumento nell'apoptosi.

L'esperimento di *microarray* (vedi paragrafo 3.9) conferma questi risultati, in quanto evidenzia l'*up*-regolazione di alcuni geni coinvolti nel processo di apoptosi.

I fenotipi apoptotici non sono alterati dal *knockdown* dell'mRNA di p53 e sono quindi esclusi effetti *off-target*, cioè dovuti all'iniezione e non al morfolino stesso.

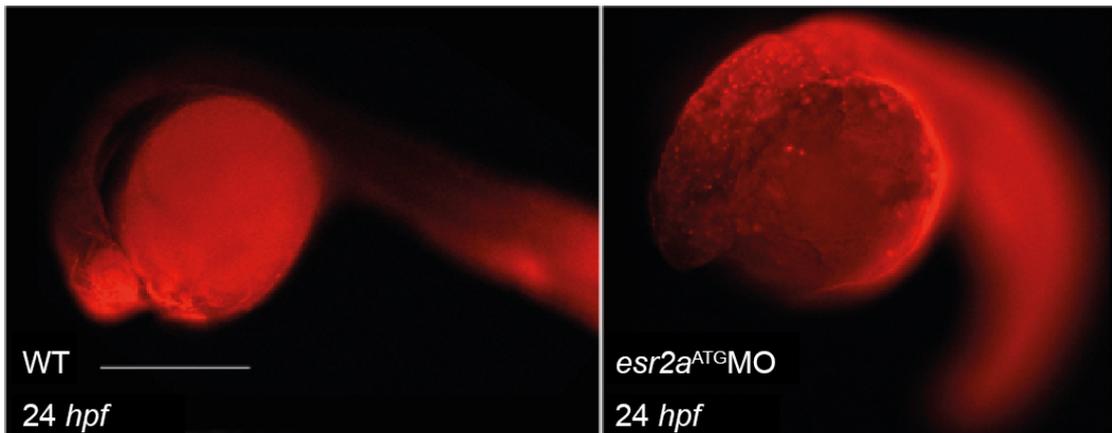


Fig. 25: Saggio di morte cellulare in embrioni WT e *esr2a*^{ATG}MO di 24 ore. *Scale bar* di 150 μm .

3.6. Colorazione dei vasi sanguigni

L'analisi al microscopio ha evidenziato come gli embrioni *esr2a*^{ATG}MO soffrano frequentemente di edema pericardico e di emorragie a livello del tuorlo. Ho quindi analizzato le eventuali differenze nello sviluppo dei vasi sanguigni subintestinali nei morfanti rispetto ai controlli.

I pesci teleostei e *Danio rerio* in particolare, forniscono una serie di vantaggi per l'analisi sperimentale e genetica dello sviluppo del sistema vascolare. La trasparenza, lo sviluppo embrionale esterno e la possibilità di produrre linee transgeniche che esprimono proteine fluorescenti in maniera tessuto-specifica fanno dello *zebrafish* un organismo ideale per la visualizzazione e lo studio della formazione dei vasi sanguigni. La vascolarizzazione è stata analizzata mediante incubazione degli embrioni con il colorante NBT/BCIP che è un substrato dell'enzima fosfatasi alcalina, presente anche

nel circolo sanguigno (Fig. 26). La reazione determina la formazione di un precipitato di colore blu.

Gli embrioni morfanti, analizzati a 3 giorni, presentano una rete di vene subintestinali costituita principalmente da un singolo strato di ripiegamenti, mentre 2-3 strati sono presenti nei WT. Nei controlli inoltre il *pattern* di vasi intersegmentali nel tronco e nella coda è più definito (Fig. 26).

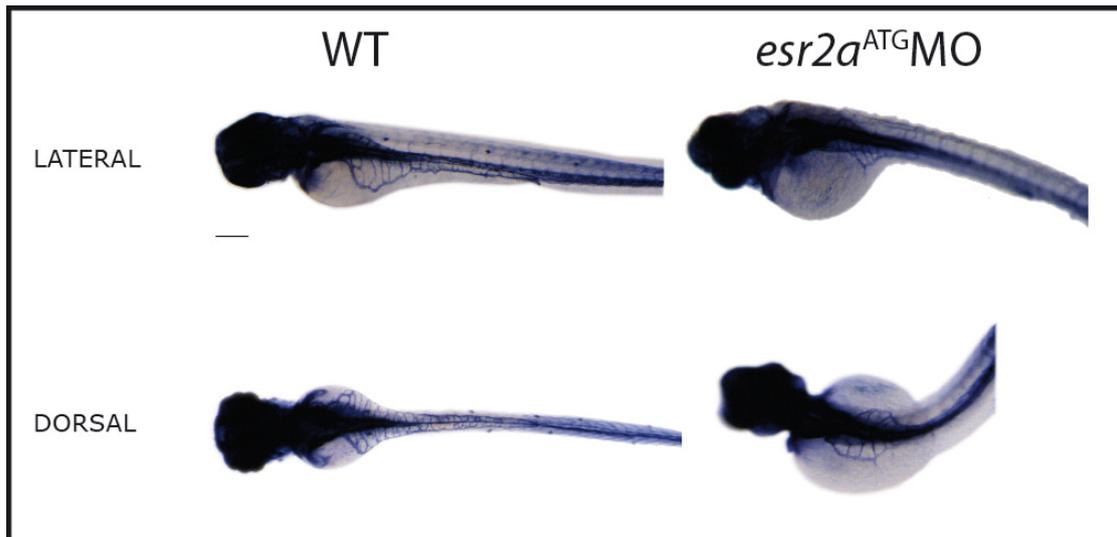


Fig. 26: Visualizzazione dei vasi sanguigni mediante attività della fosfatasi alcalina endogena in embrioni WT e *esr2a*^{ATG}MO di 3 giorni; visione laterale e dorsale. *Scale bar* di 300 μ m.

Ho inoltre visualizzato ed analizzato la vascolarizzazione embrionale dello *zebrafish* con l'utilizzo della linea transgenica Tg(*fli1a*:EGFP) che esprime la proteina fluorescente verde EGFP in tutti i vasi sanguigni sotto la guida del promotore di *fli1* (Lawson e Weinstein, 2002b). Gli embrioni sono stati microiniettati con *esr2a*^{ATG}MO e fotografati vivi allo stadio di 3 dpf assieme ai controlli (WT).

A 3 giorni di sviluppo, si nota, anche in questo caso, una netta diminuzione dell'espansione dei vasi subintestinali nei morfanti *esr2a*^{ATG}MO. Nel WT invece la vascolarizzazione è ampia e ben definita. A 6 giorni si osserva un profilo di vascolarizzazione nel morfante lungo il tronco e la coda disorganizzato e irregolare, rispetto ai controlli in cui è rispettata una simmetria ben definita (Fig. 27).

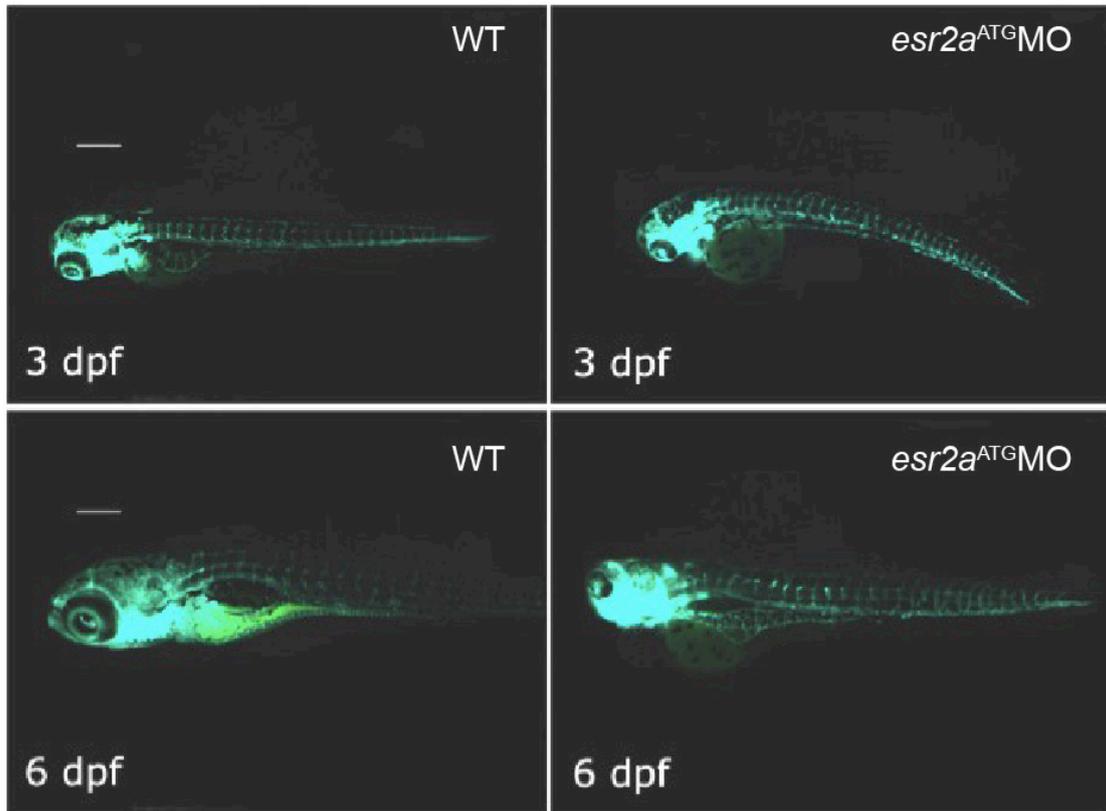


Fig. 27: Visualizzazione dei vasi sanguigni nella linea transgenica Tg(*fli1a*:EGFP) in embrioni e larve WT e *esr2a*^{ATG}MO di 3 e 6 dpf; visione laterale. *Scale bar* di 300 μ m.

Nei morfanti è quindi evidente, con entrambe le tecniche, una disorganizzazione e riduzione nell'estensione delle vene sub-intestinali (SIV) rispetto ai controlli. Le vene SIV sono le uniche deputate all'assorbimento del tuorlo a partire dai 3 dpf (Isogai *et al.*, 2001). Questo può fornire una spiegazione del mancato o incompleto riassorbimento del tuorlo che si osserva in larve morfanti di 5-6 dpf.

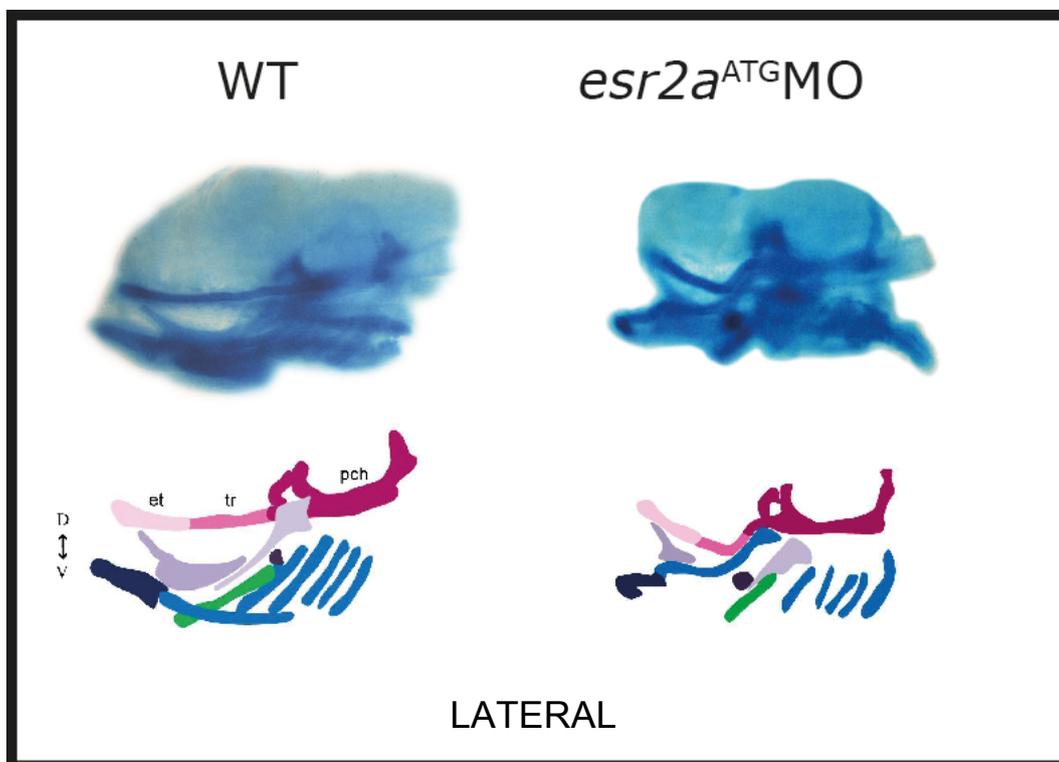
3.7. Colorazione delle cartilagini craniche con Blu di Alcian

Le cellule delle creste neurali sono una classe di cellule pluripotenti che, durante le varie fasi dello sviluppo embrionale, hanno la capacità di migrare e dare origine a popolazioni cellulari differenti. Questo tipo cellulare nella regione della testa dà origine a cartilagini ed ossa, tessuti che in altre sedi corporee hanno invece origine mesodermica. Negli embrioni di vertebrato le creste neurali craniche hanno origine nel

mesencefalo e nel romboencefalo in formazione e da qui migrano seguendo diverse vie. In particolare le cellule derivanti dal mesencefalo e dai primi due rombomeri migrano nell'arco mandibolare; quelle che derivano dal quarto rombomero vanno all'arco ioideo ed infine quelle provenienti dal sesto-ottavo rombomero migrano agli archi branchiali dove danno origine alle cartilagini branchiali (Piotrowski e Nüsslein-Volhard, 2000).

Dal momento che la testa e la coda presentavano notevoli difetti dopo il *knockdown* genico con *esr2a*^{ATG}MO, ho deciso di analizzare lo sviluppo delle cartilagini cranio-facciali dei morfanti. I risultati ottenuti dopo colorazione con Blu di Alcian hanno messo in evidenza strutture cartilaginee severamente alterate nelle larve *esr2a*^{ATG}MO rispetto ai *wild type* di controllo.

Le cartilagini ceratoiali (ch) non sono orientate obliquamente ma sono invece quasi perpendicolari alle basi-branchiali (bb). Le cartilagini palato-quadrate (pq) sono ricurve e originano insieme a quelle di Meckel (m) un muso più tozzo. Le cerato-branchiali (cb 1-5) appaiono più corte (Fig. 28). Le larve trattate con *esr2a*^{SPLIC}MO (morfolino in grado di bloccare la trascrizione del trascritto *esr2a* di origine embrionale) mostrano invece uno sviluppo normale delle cartilagini cranio-facciali.



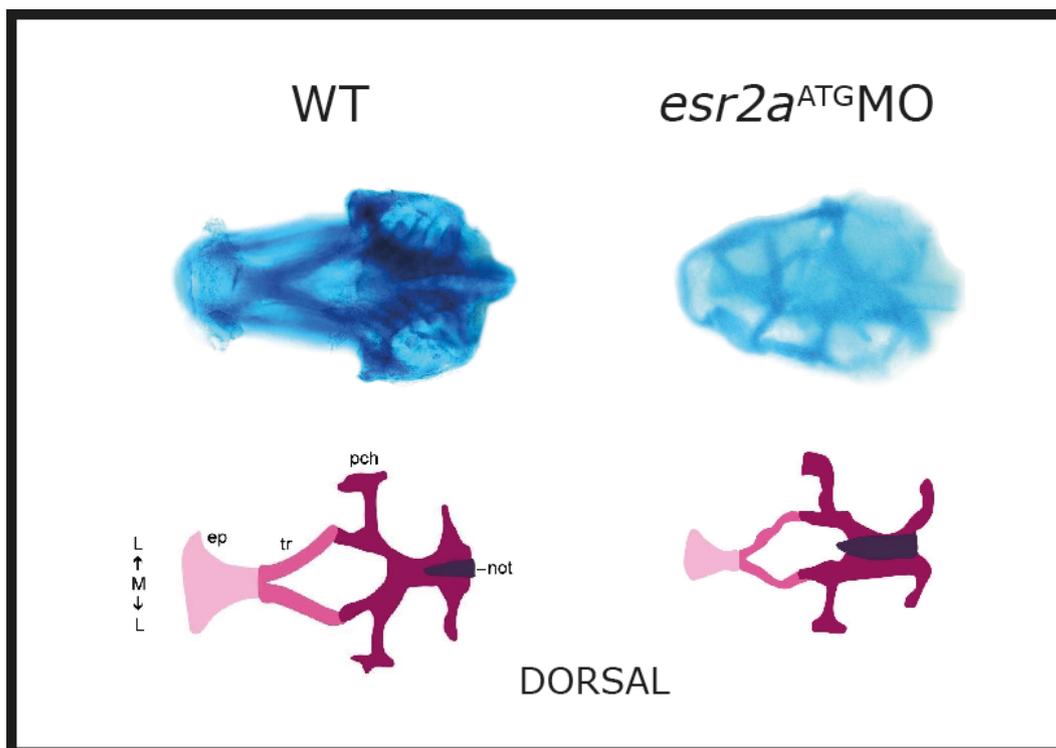
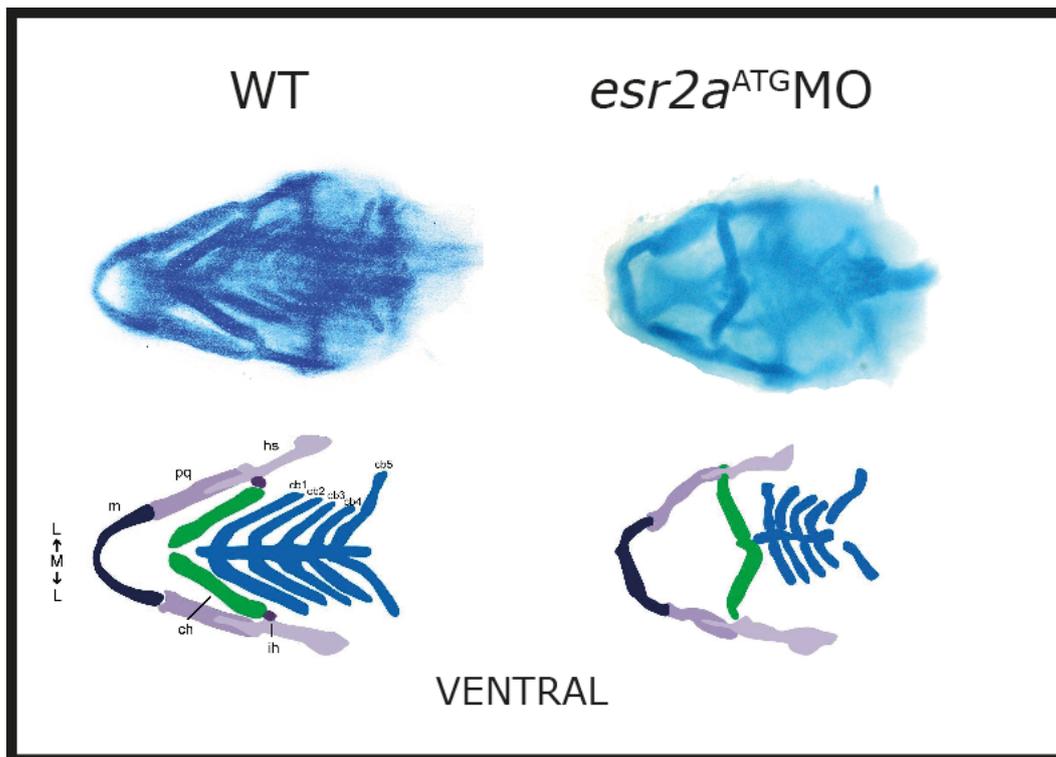


Fig. 28: Colorazione delle cartilagini cranio-facciali con Blu di Alcian di larve WT e *esr2a*^{ATG}MO di 6 dpf; visione laterale, ventrale e dorsale. **Cb1-5:** cartilagini ceratobranchiali 1-5; **ch:** cartilagine ceratoiale; **ep:** piastra etmoide; **hs:** cartilagine isosimplectica; **ih:** cartilagine interiale; **m:** cartilagine di Meckel; **not:** notocorda; **pch:** cartilagine paracordale; **pq:** palatoquadrato; **tr:** trabecola.

3.8. Ibridazione *in situ* con marcatori della regione cranica

I risultati della colorazione con Blu di Alcian delle cartilagini (vedi paragrafo 3.5), ci hanno spinto ad un'indagine più approfondita dello sviluppo della regione cranica. Per questo abbiamo utilizzato dei marcatori specifici delle cellule delle creste neurali: *distal-less homeobox gene 2a (dlx2a)*, *forkhead box D3 (foxd3)*, *neurogenic differentiation (neurod)*, *SRY-box containing gene 9a e 10 (sox9a e sox10)*. L'ibridazione *in situ* è stata condotta su un gruppo di embrioni ottenuto da tre esperimenti distinti di microiniezione; gli stadi scelti perché ritenuti rappresentativi sono le 24 e le 48 ore di sviluppo.

Il gene *dlx2a* è coinvolto nello sviluppo delle cartilagini ed è espresso a livello di telencefalo, diencefalo, ipotalamo, cellule delle creste neurali e mesenchima delle arcate faringee nell'arco mandibolare, nell'arco ioideo e nelle arcate branchiali.

Nei morfanti la colorazione nelle arcate branchiali appare meno intensa e non parallela come nei controlli: infatti sembra essere divergente verso l'esterno, nella regione posteriore, risultando asimmetrica (Fig. 29).

Il marcatore *foxd3* è espresso nelle cellule delle creste neurali ed è implicato nella differenziazione dei melanociti. I risultati dell'ibridazione *in situ* a 24 e 48 ore non mostrano differenze sostanziali tra morfanti e controlli (Fig. 29).

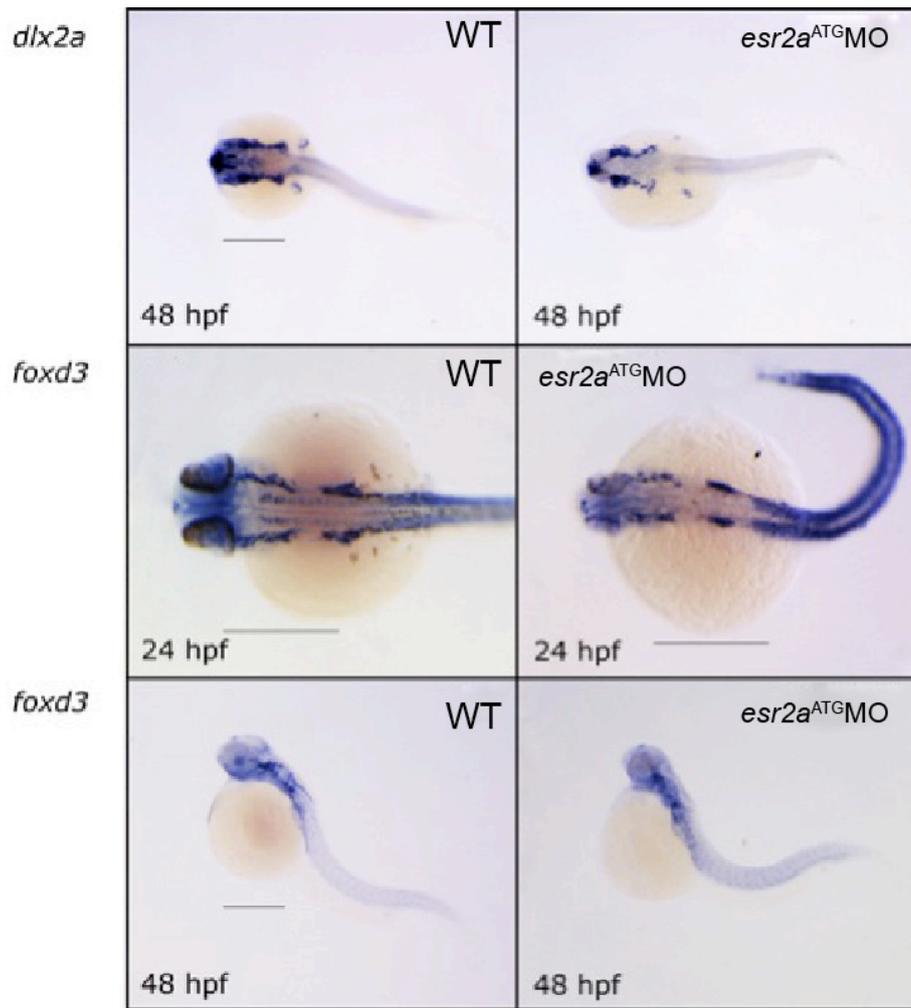


Fig. 29: Ibridazione *in situ* su embrioni WT e *esr2a*^{ATGMO} con *markers* della regione cranica *dlx2a* a 24 ore e *foxd3* a 24 e 48 hpf. Scale bar di 300 μ m.

Un altro marcatore utilizzato è *neurod*, implicato nel differenziamento del sistema nervoso ed espresso tra le 24 e le 48 ore a livello cerebrale, nel diencefalo, nel mesencefalo, nell'epifisi, nell'occhio, nel ganglio del nervo stato-acustico e nell'abbozzo pancreatico endocrino. Come si può vedere nell'immagine (Fig. 30), l'espressione del gene nel morfante è meno regolare. Ho utilizzato infine i geni *sox9a* e *sox10*. Entrambi non hanno mostrato differenze nella marcatura tra morfanti e controlli (Fig. 30). Il primo è implicato nello sviluppo dell'orecchio interno, ed è espresso nelle cartilagini del condrocranio, nella vescicola otica e nelle arcate faringee. Il secondo svolge un ruolo nella differenziazione delle cellule gliali e la sua espressione si concentra nelle cellule delle creste neurali e nella vescicola otica.

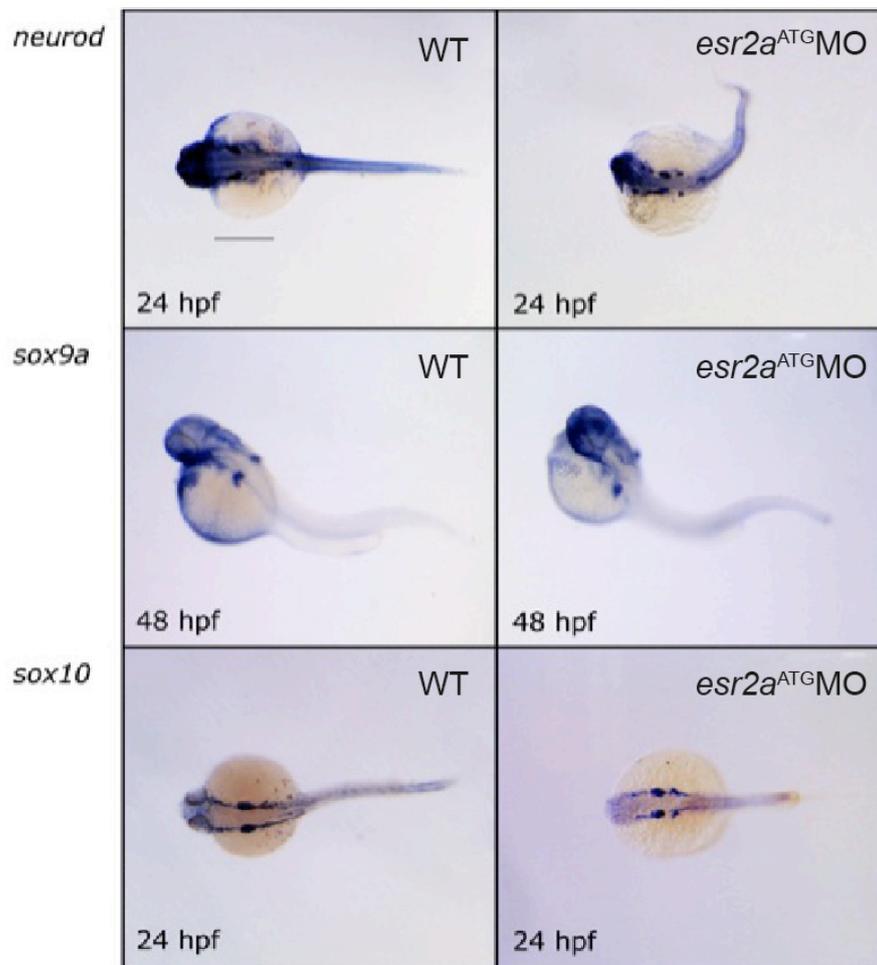


Fig. 30: Ibridazione *in situ* su embrioni WT e *esr2a*^{ATGMO} con marcatori della regione cranica *neurod* e *sox10* a 24 hpf e *sox9a* a 48 hpf. Scale bar di 300 μ m.

3.9. Ibridazione *in situ* con marcatori di sviluppo

Per caratterizzare ulteriormente il fenotipo morfante *esr2a*^{ATGMO}, ho studiato mediante ibridazione *in situ whole-mount* (WMISH) l'espressione di alcuni geni marcatori dello sviluppo, critici nella determinazione della dorso-ventralità, nello sviluppo neurale corretto e nella formazione della notocorda e dei somiti.

I marcatori sono stati utilizzati su differenti stadi di sviluppo, ritenuti significativi per quel determinato marcatore. L'ibridazione è stata effettuata su un *pool* di embrioni provenienti da tre esperimenti di microiniezione distinti.

I marcatori utilizzati sono: *empty spiracles homeobox 1 (emx1)*, *sine oculis homeobox*

homolog 3a (six3a), sonic hedgehog a (shha), myogenic differentiation 1 (myod1), chordin (chd), paired box gene 2a (pax2a) e early growth response 2b (egr2b).

Il marcatore *emx1* risulta, da questo tipo di analisi, che non è quantitativa, *up*-regolato nei morfanti di 24 e 48 ore rispetto ai controlli. Questo dato può far ipotizzare che il *knockdown* del recettore degli estrogeni *Esr2a* alteri il *pattern* di sviluppo cerebrale; il marcatore è infatti espresso nel cervello anteriore.

Il gene *six3a* codifica per una proteina omeodominio appartenente alla famiglia SIX, espressa nella piastra neurale più anteriore all'inizio della neurogenesi. L'intensità del segnale di questo marcatore sembra aumentare nei morfanti a 24 e 48 ore; l'espressione è concentrata a livello cerebrale (Fig. 31).

Shha codifica per un membro della famiglia Hedgehog, che include proteine con funzione di *signaling* intercellulare, a cui è riconosciuto un ruolo chiave nella definizione del *patterning* embrionale, nella morfogenesi e nello sviluppo di alcune regioni all'interno dell'organizzazione del piano corporeo di vertebrati e insetti (Ingham e McMahon, 2001). L'espressione non mostra differenze a 6, 12 e 24 ore. A 48 ore però il segnale risulta più intenso negli embrioni iniettati con morfolino *esr2a*^{ATG}MO (Fig. 31).

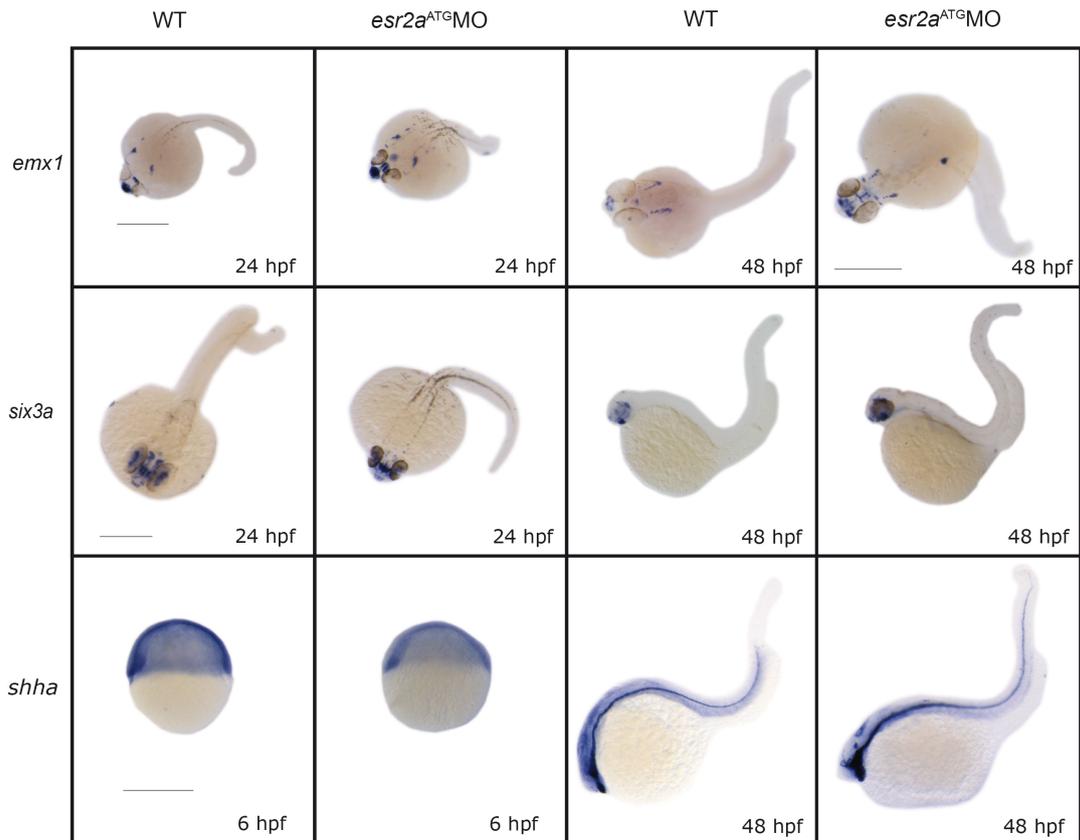


Fig. 31: Ibridazione *in situ* su embrioni WT e *esr2a*^{ATGMO} MO con *markers* di sviluppo *emx1* e *six3a* a 24 e 48 ore, *shha* a 6 e 48 ore. Scale bar di 300 μ m.

L'ibridazione *in situ* non ha rivelato differenze importanti negli altri 4 geni considerati. In particolare l'espressione di *myod1* rimane invariata negli stadi considerati di 10 e 24 ore (Fig. 32). Il gene è uno dei primi marcatori della miogenesi e regola il differenziamento della muscolatura scheletrica. È probabile quindi che il recettore degli estrogeni *Esr2a* non abbia influenze dirette sulla muscolatura.

Il gene *chd* è un componente essenziale dell'organizzatore primario, dove questo segnale è localizzato dallo stadio di *shield* (6 ore), per poi estendersi nei tessuti circostanti durante lo sviluppo (Schulte-Merker *et al.*, 1997). Gli esperimenti di ibridazione *in situ* non hanno evidenziato differenze tra morfanti e controlli a 6 e 10 ore (Fig. 32).

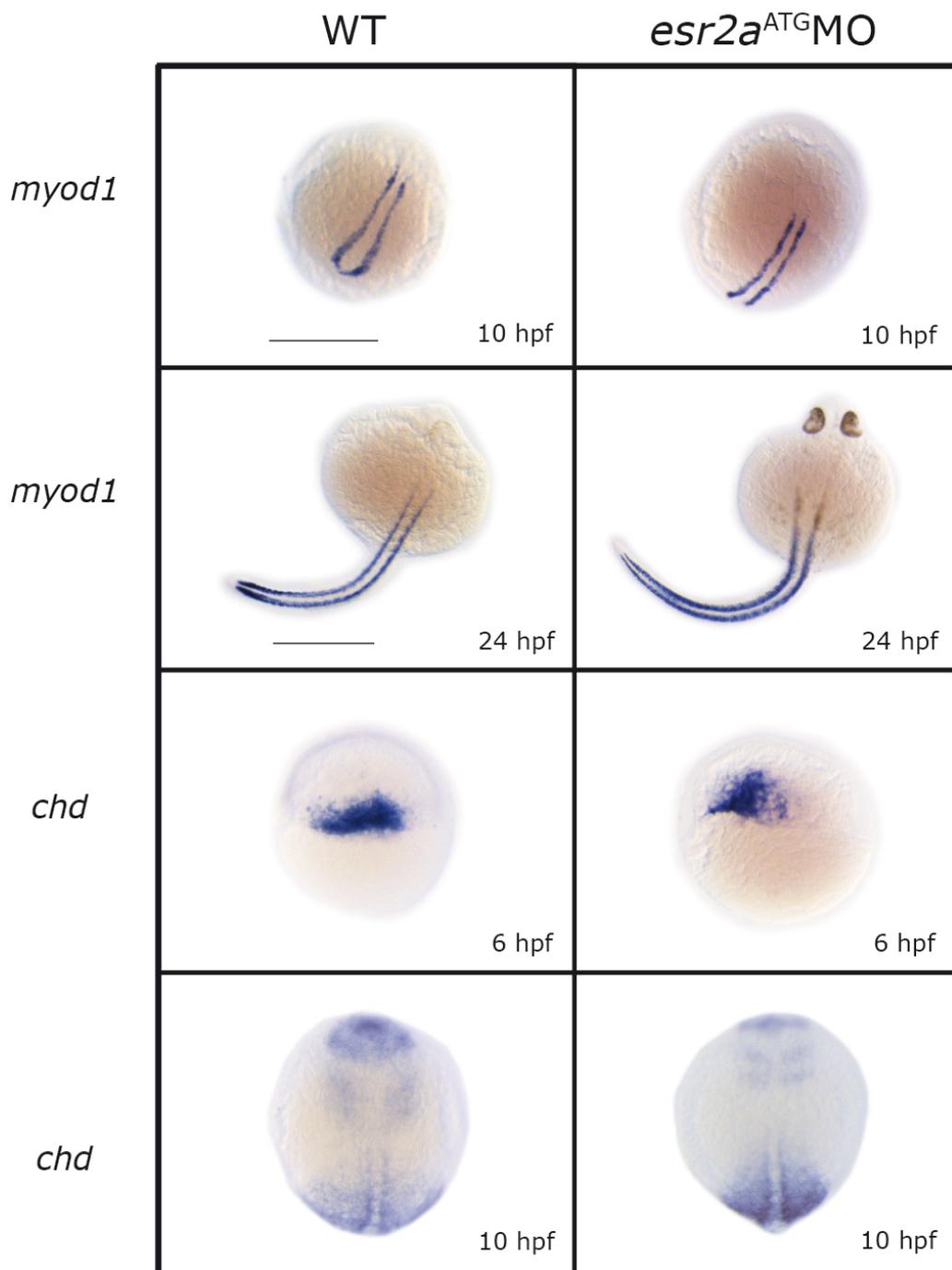


Fig. 32: Ibridazione *in situ* su embrioni WT e *esr2a*^{ATG}MO con *markers* di sviluppo *myod1* a 10 e 24 ore e *chd* a 6 e 10 ore. Scale bar di 300 μ m.

Sono infine stati utilizzati altri due marcatori della corretta regionalizzazione cerebrale: *pax2a* e *egr2b*. Entrambi non hanno evidenziato differenze negli stadi considerati (Fig. 33). L'espressione di *pax2a* si ritrova nell'abbozzo della vescicola

otica, nel confine tra mesencefalo e encefalo posteriore, nell'encefalo posteriore. La marcatura del gene *egr2b* si concentra nel terzo e nel quinto rombomero.

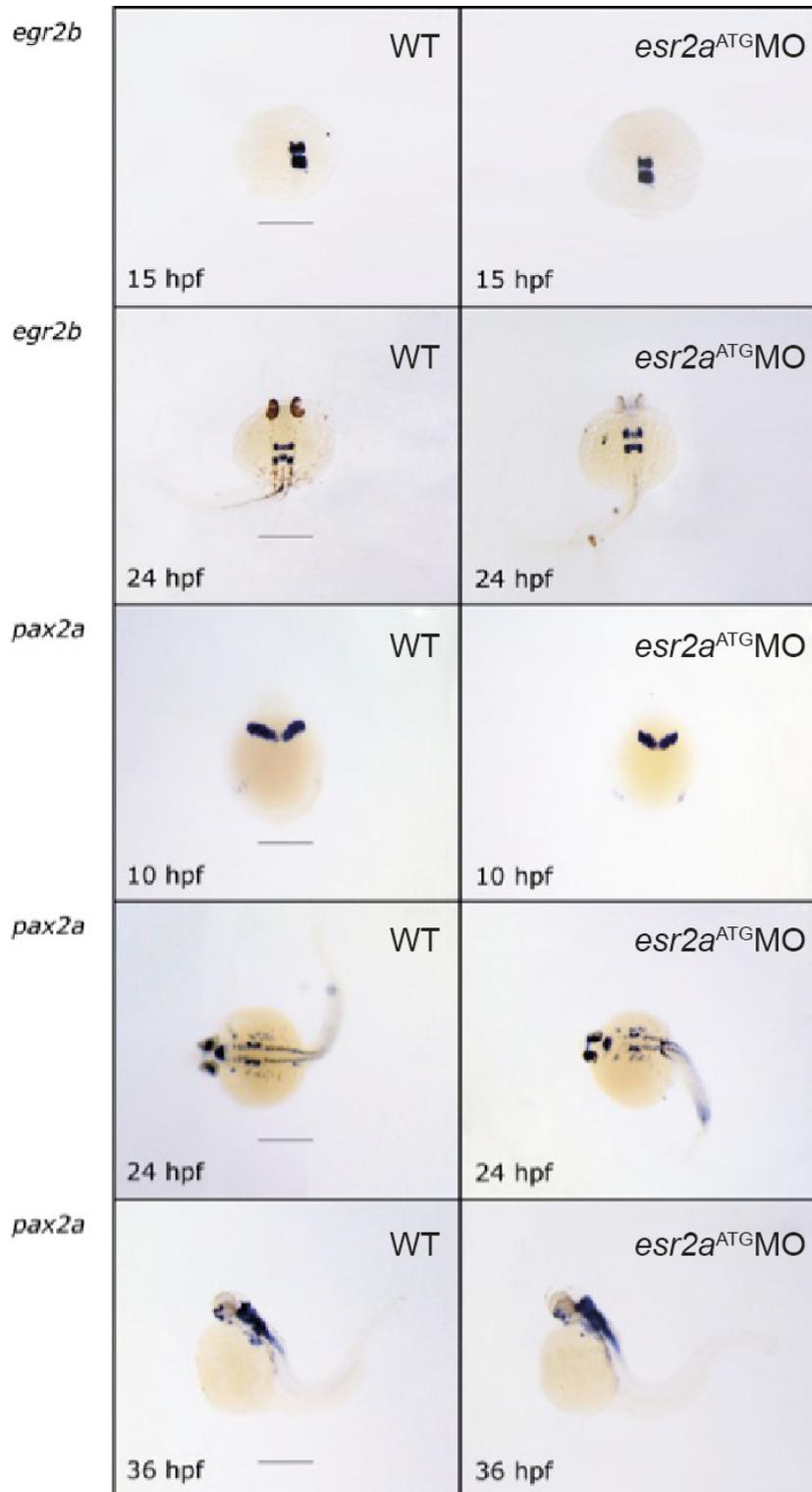


Fig. 33: Ibridazione *in situ* su embrioni WT e *esr2a*^{ATGMO} con *markers* di sviluppo *egr2b* a 15 e 24 ore e *pax2a* a 10, 24 e 36 ore. *Scale bar* di 300 μ m

3.10. Analisi di *microarray*

Il *microarray* è una tecnica che permette di analizzare contemporaneamente l'espressione di decine di migliaia di geni in tessuti e cellule. Per esaminare quali geni siano influenzati dall'inattivazione del recettore degli estrogeni Esr2a nelle fasi iniziali dello sviluppo embrionale di *zebrafish*, è stato scelto di effettuare un'analisi di *microarray* (Agilent) utilizzando embrioni di 8 ore e 48 ore micro-iniettati con *esr2a*^{ATG}MO e il rispettivo controllo negativo costituito da embrioni iniettati con morfolino di controllo ^{Std}MO.

La scelta degli stadi analizzati si è basata sui dati riguardanti l'espressione degli mRNA dei recettori degli ormoni steroidei durante l'embriogenesi di *zebrafish* ottenuti mediante qRT-PCR (Pikulkaew *et al.*, 2010). Il trascritto codificante Esr2a è presente, come trascritto di origine materna, in concentrazioni elevate durante le primissime ore di sviluppo e decresce in seguito, fino a raggiungere un minimo allo stadio di gastrula.

La sua concentrazione riprende a crescere con l'inizio della trascrizione embrionale.

Lo scopo del trattamento con il morfolino *esr2a*^{ATG}MO è quello di inattivare i trascritti di origine materna e, attraverso l'analisi *microarray* a 8 hpf, di delineare le variazioni nell'espressione dovute principalmente al *knockdown* del recettore materno. Come è già stato evidenziato nel paragrafo 3.2, la trascrizione zigotica inizia già dopo 6-8 ore dalla fecondazione ma numerosi studi mostrano come il livello di espressione del recettore Esr2a a questo stadio di sviluppo sia ancora molto basso (Pikulkaew *et al.*, 2010; Tingaud-Sequeira *et al.*, 2004; Bardet *et al.*, 2002). Questi dati ci inducono a ritenere che le proteine corrispondenti al recettore Esr2a presenti a 8 ore di sviluppo nell'embrione siano di origine materna e che l'eventuale traduzione dei messaggeri zigotici non incida pesantemente sulla quantità di recettori degli estrogeni β 2 disponibili e funzionanti nell'embrione.

Le eventuali variazioni di espressione genica rilevate dall'analisi di *microarray* sono quindi principalmente legate al ruolo sullo sviluppo del trascritto *esr2a* di eredità materna.

L'analisi dell'espressione dei trascritti a 48 ore dalla fecondazione ci ha permesso inoltre di analizzare eventuali effetti del morfolino dovuti invece all'inattivazione dei primi trascritti embrionali.

Ho eseguito quindi l'analisi di *microarray two-color* sul genoma totale di *zebrafish* per studiare l'espressione genica a 8 e 48 ore degli embrioni trattati con *esr2a*^{ATG}MO rispetto ai controlli iniettati con ^{Std}MO.

Sono stati selezionati solo i trascritti con una consistente *up* o *down* regolazione nei morfanti rispetto ai controlli (almeno 2 volte) e con segnali processati verdi (controlli) o rossi (trattati con *esr2a*^{ATG}MO) uguali o superiori a 1000. Utilizzando questi parametri stringenti, l'analisi pangenomica di *microarray* ha dato come risultato, a 8 ore, 237 trascritti *up*-regolati e 219 *down*-regolati a causa dell'assenza del recettore *Esr2a* negli embrioni iniettati con il morfolino *esr2a*^{ATG}MO.

A 48 ore, 165 e 124 trascritti, presumibilmente zigotici, erano rispettivamente *up*- e *down*-regolati. Tra questi 8 erano in comune con quelli *up*-regolati a 8 ore e 17 con quelli *down*-regolati.

I trascritti scelti sono stati assegnati, basandoci su programmi di *gene ontology*, a 17 diverse classi funzionali. Ogni gene è stato anche analizzato singolarmente presso il sito "Entrez gene" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) per individuare in modo preciso la sua funzione.

I trascritti sono stati suddivisi nelle classi funzionali mostrate in tabella:

Gene ontology	8 hpf		48 hpf		In comune	
	Up	Down	Up	Down	Up	Down
Sviluppo embrionale	9	11	9	11	-	1
Processi metabolici	30	30	27	25	2	2
Via di segnalazione intra- ed inter-cellulare	3	23	4	7	-	3
Trascrizione	11	6	18	8	-	2
Processamento dell'RNA	1	1	1	-	-	-
Traduzione	9	4	12	2	-	-
Processi biologici	16	24	12	6	1	1
Rimodellamento della cromatina	2	2	4	-	-	-
Struttura della cellula ed organizzazione citoscheletrica	11	6	2	3	-	-
Trasporto intra- ed inter-cellulare	10	9	5	5	1	-
Regolazione negativa della proliferazione cellulare	4	1	3	2	-	1
Regolazione positiva della proliferazione cellulare	1	1	2	1	-	1
Adesione cellulare	2	2	1	2	-	-
Ciclo cellulare	1	2	4	2	-	-
Meiosi	-	1	-	-	-	-
Risposta Immunitaria	3	2	-	-	-	-
Riparazione del DNA	4	-	-	-	-	-
Sconosciuti	120	94	61	50	4	6
Totale	237	219	165	124	8	17

Tab. 9: Divisione in classi funzionali dei geni con un'espressione significativamente variata nell'esperimento di *microarray*.

Si può notare dalla tabella riassuntiva che molti dei geni regolati (45,7%), sono ancora sconosciuti, il 15,7% sono coinvolti nei processi metabolici, l'8,2% nei processi biologici, il 5,4% nella fase di sviluppo embrionale, il 5,1% nella comunicazione intra ed intercellulare, il 6,5% nella trascrizione e il 3,4% nella traduzione.

Si può osservare come ci sia un *up*-regolazione dei trascritti implicati nella regolazione negativa della proliferazione cellulare. Questo significa che l'assenza di *Esr2a* può provocare una diminuzione della proliferazione cellulare, forse dovuta a un aumento dell'apoptosi. Questa ipotesi confermerebbe i risultati del saggio di morte cellulare che avevano messo in evidenza un aumento di questo processo (vedi 3.4).

Si nota inoltre una marcata *up*-regolazione dei geni coinvolti nella trascrizione sia a 8 ore che a 48. Questa osservazione ci induce ad ipotizzare che il recettore degli estrogeni eserciti una regolazione inibitoria su questi geni.

3.11. Validazione dei dati di espressione genica

Per confermare i dati dell'analisi del microarray, tre geni, la cui espressione è risultata modificata dopo l'iniezione di *esr2a*^{ATG}MO, sono stati studiati, in embrioni a 8 e 48 hpf, mediante qRT-PCR relativa.

I risultati sono stati normalizzati utilizzando come gene *housekeeping* l'espressione del gene *efl α* . Il valore di espressione nei geni in esame è stato posto uguale ad 1 nei campioni di controllo e si presenta quindi nei morfanti come valore relativo rispetto a questi.

In particolare, ho analizzato l'espressione del gene per *annessina a2a* (*anxa2a*), espresso durante la gastrulazione nella notocorda e poi nel periderma (Farber *et al.*, 2003) ma di funzione ancora sconosciuta. Nell'analisi *microarray*, questo messaggero risultava *up*-regolato sia a 8 che a 48 hpf, mentre l'analisi di qRT-PCR ha mostrato un aumento significativo solo a 48 hpf (Fig. 34)

Il gene *ciclina G1* (*ccng1*), che codifica per una proteina con intrinseca attività inibitoria della crescita (Zhao *et al.*, 2003), è risultato *up*-regolato a 48 hpf con l'analisi *microarray*. L'analisi di qRT-PCR mostra invece un'*up*-regolazione sia a 8 che a 48 hpf, con un incremento maggiore nel secondo stadio (Fig. 34).

Il terzo trascritto studiato è quello per la proteina eme ossigenasi (*decycling*) 1 (*Hmox1*), che, nei mammiferi, catalizza la trasformazione del gruppo eme a biliverdina ed è coinvolta nell'omeostasi del ferro.

In *zebrafish*, questo gene è espresso nello strato sinciziale vitellino extraembrionale, nella lente e in una piccola popolazione di cellule del sangue, come dimostrato da

Thisse e collaboratori. La *down*-regolazione di questo trascritto è stata confermata con la tecnica qRT-PCR in entrambi gli stadi di sviluppo analizzati (Fig. 34).

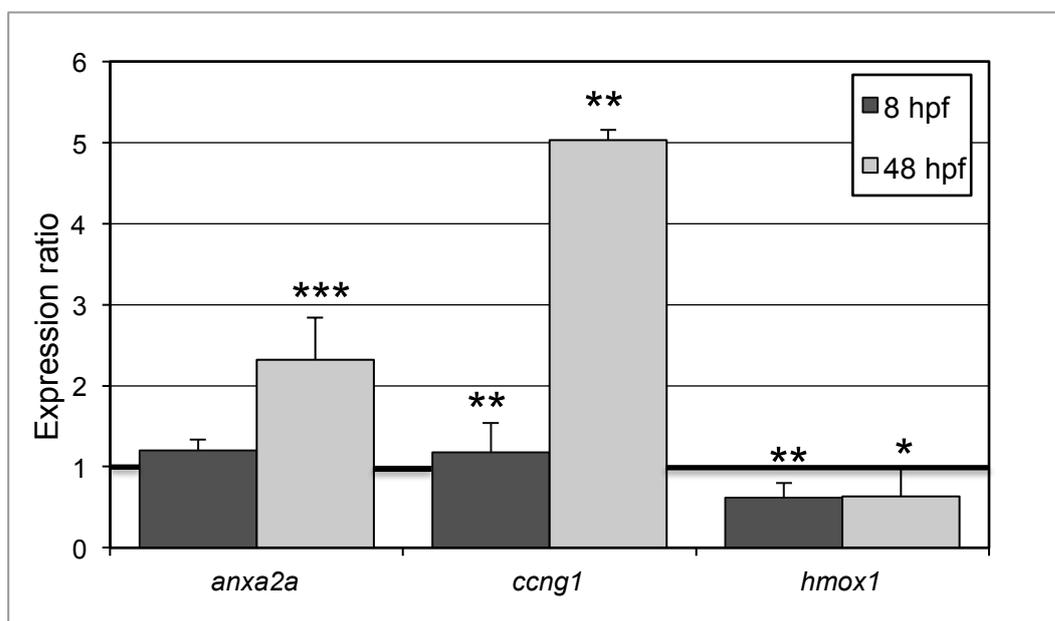


Fig. 34: Differenze nell'espressione genica di *anxa2a*, *ccng1* e *hmox1* in embrioni iniettati con *esr2a*^{ATG}MO rispetto ai WT (fissata a 1). I valori rappresentano la media \pm S.D. (n = 3). * indica che la differenza nei livelli di espressione è significativamente differente (P < 0,05); ** (P < 0,01); *** (P < 0,001).

3.12. Gain of function e trattamento con 17 β -estradiolo

Al fine di valutare in modo più fine la funzione del gene in esame è necessario affiancare al *knockdown* genico indotto nei pesci uno studio di *Gain of Function* (GoF). Con questo approccio sperimentale il gene non viene silenziato ma, al contrario, viene aumentata la sua espressione microiniettando nell'embrione, un costrutto sintetico corrispondente all'intera regione codificante. In questo esperimento ho adoperato l'mRNA sintetizzato per l'analisi del recupero del fenotipo precedentemente descritta. Le mutazioni inserite nella regione attorno al codone di inizio non modificano infatti la struttura primaria della proteina.

Ho microiniettato, in embrioni a una cellula, il solo mRNA codificante la proteina Esr2a a diverse concentrazioni che vanno dai 0,05 ng a 1 ng per ogni embrione. Ho utilizzato il microscopio e il microiniettore utilizzati per gli esperimenti di *knockdown*.

La *working solution* è composta da *Phenol Red* 10x, *Danieau* 10x, Acqua mQ e mRNA per *esr2a* in modo da ottenere la concentrazione desiderata. All'aumentare della concentrazione del messaggero aumenta la mortalità. I pesci che presentano modificazioni fenotipiche non superano però il 10% con nessuna delle concentrazioni utilizzate. I fenotipi anormali presentano cavità pericardica abnorme, ritardo nella schiusa, apigmentazione, coda storta, anomalie nello sviluppo di cranio e cervello ed emorragie intestinali. Queste modificazioni non sono la totalità dei difetti osservati ma sono le più frequenti tra quelle presenti.

In seguito ho condotto un'altra prova, il cui disegno sperimentale comporta la contemporanea microiniezione del messaggero per *Esr2a* (0,5 ng per embrione) e un trattamento con 17 β -estradiolo (E_2) (concentrazione finale: 0,1 mg/L).

Gli embrioni sono stati divisi in 6 gruppi sperimentali:

- *wild type*
- *wild type* trattati con etanolo (Et-OH) assoluto in 1 L di *fish water* (1)
- *wild type* trattati con E_2 0,1 mg/L di *fish water* (2)
- *Embryo - GoF* *
- *Embryo - GoF* * e trattati con EtOH assoluto in 1 L di *fish water* (1)
- *Embryo - GoF* * e trattati con E_2 0,1 mg/L di *fish water* (2)

*: embrioni iniettati con mRNA per *Esr2a*, 0,5 ng per embrione

Le uova (2) sono state poste durante le prime 2 ore di sviluppo in una soluzione contenente 17 β -estradiolo. Ho utilizzato due gruppi di pesci di controllo: WT e pesci trattati con il controllo (1), collocati, durante le prime due ore dello sviluppo, in una soluzione contenente la stessa quantità di etanolo dei pesci trattati con l'estrogeno, per avere la sicurezza che le anomalie osservate fossero conseguenze specifiche del trattamento con l'estrogeno.

Le irregolarità osservate fino ai 5 dpf sul totale dei pesci anormali trattati con mRNA per *Esr2a* e 17 β -estradiolo sono state apigmentazione (7%), cavità pericardica abnorme (11%), ritardo nella schiusa (18%), anomalie nello sviluppo craniale e cerebrale (16%), coda storta (24%) e emorragie intestinali (35%) (Fig. 35). Tali anomalie sono le stesse osservate nel primo esperimento di sola iniezione di mRNA

per *Esr2a* ma si presentano in modo più accentuato, con l'aggiunta di E_2 in un gruppo di pesci che presenta dimensioni ridotte nella lunghezza totale del corpo.

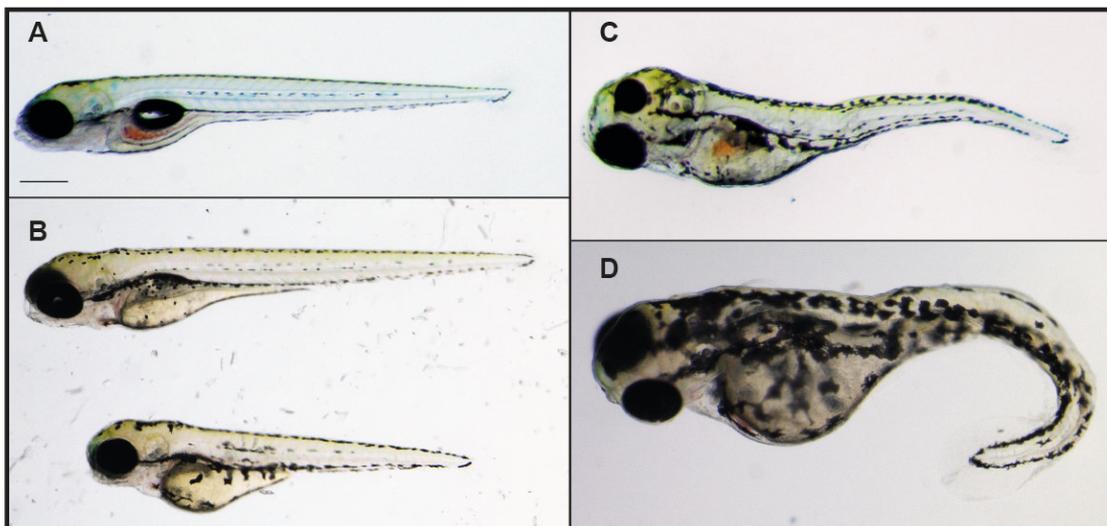


Fig. 35: Nella figura è rappresentato il fenotipo dei pesci di 5 dpf iniettati con il trascritto per *Esr2a* mutato e trattati con E_2 . **A:** emorragia intrstinale; **B:** larva che presenta una lunghezza del corpo diminuita (sotto) rispetto al WT di controllo (sopra); **C:** coda storta e anomalità a livello cranio-cerebrale; **D:** coda storta e cavità pericardica anormale. *Scale bar* di 300 μm .

Nei due gruppi di controllo la percentuale di pesci anormali rimane sempre molto bassa come pure la mortalità.

Le larve sono state osservate al microscopio fino a 5 giorni di sviluppo e i dati ricavati sono mostrati nella tabella sottostante:

WT	Numero totale	Morti (%) Media \pm DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media \pm DS	Anormali (%) Media \pm DS
-	310	9 \pm 2	91 \pm 2	98 \pm 1	2 \pm 1
WT + EtOH	Numero totale	Morti (%) Media \pm DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media \pm DS	Anormali (%) Media \pm DS
-	224	12 \pm 8	88 \pm 8	97 \pm 1	3 \pm 1
WT + E_2	Numero totale	Morti (%) Media \pm DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media \pm DS	Anormali (%) Media \pm DS
-	327	28 \pm 8	72 \pm 8	90 \pm 3	10 \pm 3

GoF ng per embrione	Numero totale	Morti (%) Media \pm DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media \pm DS	Anormali (%) Media \pm DS
0,5	318	19 \pm 6	81 \pm 6	92 \pm 3	8 \pm 3

GoF + EtOH ng per embrione	Numero totale	Morti (%) Media \pm DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media \pm DS	Anormali (%) Media \pm DS
0,5	253	17 \pm 5	83 \pm 5	90 \pm 2	10 \pm 2

GoF + E₂ ng per embrione	Numero totale	Morti (%) Media \pm DS	N. (%) dei Sopravvissuti	Normali (%) Media \pm DS	Anormali (%) Media \pm DS
0,5	320	35 \pm 6	65 \pm 6	76 \pm 2	24 \pm 2

Tab. 10: Risultati ottenuti nell'esperimento di GoF e trattamento con E₂ e derivanti dal conteggio dei pesci morti, normali e anormali

4. DISCUSSIONE

La presente tesi dimostra come i trascritti materni per la forma *Esr2a* del recettore degli estrogeni, presenti nelle uova di *zebrafish*, siano necessari per la corretta embriogenesi e lo sviluppo larvale. La mancanza del recettore degli estrogeni, indotta dal morfolino, provoca, infatti, un sostanziale cambiamento nel trascrittoma sia a 8 che a 48 hpf, determinando l'*up*- o la *down*-regolazione di centinaia di geni, come è chiaramente risultato dall'esperimento di *microarray*, l'insorgenza di malformazioni gravi e la compromissione della sopravvivenza. I risultati ottenuti e le implicazioni della forma *Esr2a* del recettore degli estrogeni sullo sviluppo dello *zebrafish* sono supportati dalle quattro diverse verifiche previste nella progettazione sperimentale.

Abbiamo potuto escludere l'insorgenza di effetti citotossici aspecifici dovuti all'iniezione del morfolino visto lo sviluppo di un basso numero di embrioni morti e di larve anormali a 5 dpf dopo il trattamento con ^{Std}MO iniettato allo stesso dosaggio.

La specificità è stata poi verificata dalla coiniezione, con l'*esr2a*^{ATG}MO, di un morfolino inattivante la proteina p53. Il fenotipo ottenuto corrisponde a quello morfante e questo dimostra che gli effetti osservati non sono aspecifici e collegati solo all'iperattivazione di p53 causata dall'iniezione. La possibilità di effetti *off-target* indotti dall'apoptosi attivata dalla proteina soppressore di tumori p53 è stata quindi confutata.

È stato possibile inoltre riottenere il fenotipo di controllo mediante la coiniezione con *esr2a*^{ATG}MO, di un'adeguata quantità di mRNA per *Esr2a* mutato nella regione complementare al morfolino. Questo dimostra che il legame dell'oligonucleotide al *target* è specifico.

E' possibile inoltre affermare che le alterazioni osservate sullo sviluppo degli embrioni iniettati con *esr2a*^{ATG}MO possono essere attribuite al *knockdown* della traduzione degli mRNA materni piuttosto che a quelli di origine zigotica. Ho, infatti, ottenuto un fenotipo normale nei pesci trattati con *esr2a*^{SPLIC}MO, nonostante la sua elevata efficacia nel bloccare la corretta maturazione del messaggero zigotico. La proteina che eventualmente viene tradotta risulta mancante dei moduli fondamentali per l'attività trascrizionale. Questa conclusione è anche convalidata dall'analisi *microarray* che dimostra come un maggior numero di trascritti siano *up* o *down* regolati a 8 hpf

piuttosto che a 48 hpf.

E' possibile ritenere che questi cambiamenti nel trascrittoma derivino dal *knockdown* del recettore materno perché la quantità di mRNA materno per *Esr2a* durante le prime divisioni cellulari è di diversi ordini di grandezza superiore rispetto a quella presente fra le 8 hpf e le 48 hpf (Lassiter *et al.*, 2002; Mouriec *et al.*, 2009; Pikulkaew *et al.*, 2010). Questi trascritti sono inoltre facili bersagli per il morfolino, ancora presente in concentrazioni apprezzabili dopo le prime divisioni cellulari.

L'mRNA embrionale per *Esr2a* è invece rilevabile solo a partire dalle 6 hpf, come riportato da Lassiter e collaboratori (2002), ma anche evidenziato dall'analisi di RT-PCR da me condotta. A questo stadio si possono osservare due bande negli embrioni iniettati con *esr2a*^{SPLIC}MO: la banda più bassa rappresenta il messaggero privo dell'esone 3, mentre quella più alta indica che vi è ancora un residuo di mRNA materno. In terzo luogo, sono disponibili più estrogeni materni per la transattivazione di *Esr2a* all'inizio dello sviluppo rispetto alle 8 hpf, quando la trascrizione zigotica di mRNA per *Esr2a* sta avvenendo a bassi livelli.

Le prove di specificità che abbiamo utilizzato dimostrano chiaramente che i cambiamenti fenotipici messi in evidenza sono una conseguenza del silenziamento dei trascritti materni ma rimane da stabilire se questi cambiamenti derivano da un'alterata degradazione dei trascritti materni o da una trascrizione modificata dei geni zigotici.

È noto che, nell'ovocita di *zebrafish*, circa la metà dell'intero genoma è attivamente trascritto durante la prima fase di crescita (Pelegri *et al.*, 2003) e che centinaia di questi trascritti sono protetti da processi di degradazione. Mentre una piccola parte di loro è in seguito tradotta e degradata prima del termine della fase di blastula (circa 5 hpf), diversi messaggeri persistono per tutto il periodo della gastrulazione (fino a 10 hpf) (Mathavan *et al.*, 2005). La trascrizione embrionale inizia allo stadio di mid-blastula, in parallelo con l'allungamento della durata dell'interfase e diventa preminente dalle 5 ore dopo la fecondazione in poi (Kane e Kimmel, 1993; Tadros e Lipshitz, 2009).

E' chiaro quindi che durante la gastrulazione entrambi i trascritti materni e zigotici, anche derivati dallo stesso gene, possono coesistere nel tempo in proporzioni inverse.

A 8 hpf, si può supporre che i trascritti, rilevati come modificati dall'analisi di *microarray*, siano di origine zigotica e che i cambiamenti indotti dalla mancanza di *Esr2a* siano stati mediati attraverso meccanismi di controllo della trascrizione. Non è

però possibile escludere che alterazioni nei processi di degradazione abbiano portato alle variazioni del trascrittoma.

A 48 hpf i trascritti zigotici alterati sono per lo più derivati da geni diversi da quelli a 8 hpf, anche se la maggior parte appartiene alle stesse classi funzionali. È noto che l'espressione di diversi trascritti presenta un picco durante gli stadi di gastrulazione, segmentazione e faringula in *zebrafish* (Mathavan *et al.*, 2005), seguita dal periodo di schiusa a circa 48 hpf. Questo ci induce a ipotizzare che Esr2a, derivante o dalla traduzione degli alti livelli di trascritti materni o dai bassi livelli di trascritti zigotici, potrebbe essere necessario per un controllo trascrizionale di altri set di geni, che si esprimono in stadi più tardivi. Questo è evidente, per fare un esempio, dalla marcata *up*-regolazione di *ccng1* misurata con qRT-PCR e *microarray* a 48 hpf, ma non a 8 hpf. In alternativa l'aumento della trascrizione di questo gene a 48 hpf potrebbe derivare, attraverso una cascata di relazioni intergeniche, dalle modificazioni trascrizionali già evidenti a 8 hpf.

Deve però essere sottolineato che gli effetti dovuti al silenziamento di Esr2a non sono compensati dall'aumento dei trascritti zigotici per le altre due forme di recettore per gli estrogeni: *esr2b* e *esr1*. Questo suggerisce l'acquisizione di funzioni specifiche nei geni paraloghi, derivati da processi di duplicazione genica, per il recettore degli estrogeni,

I miei risultati non indicano solo che Esr2a è richiesto per un normale sviluppo, ma anche che la sua quantità deve essere regolata all'interno di un intervallo preciso. Questo è suggerito dai dati ottenuti dall'esperimento di mRNA *rescue* in cui ho microiniettato diverse concentrazioni di mRNA. L'evidenza che diminuite mortalità ed anomalie si siano osservate incrementando la concentrazione da 15 a 30 pg/embrione, può essere spiegata con la necessità di utilizzare una specifica concentrazione per ristabilire il fenotipo. Le anomalie e la mortalità aumentano incrementando la dose oltre i 30 pg/embrione. Iniettando il solo mRNA per l'esperimento di *Gain of Function*, non ho osservato alcuna modificazione fenotipica comune a tutti i pesci considerati anormali. Questo risultato riconferma i dati degli esperimenti di *rescue* e cioè concentrazioni diverse da quella specifica, che la madre colloca nell'ovocità, non alterano la normale fisiologia di sviluppo dello *zebrafish*. Aumentando la concentrazione si ottiene solo una maggiore percentuale di morti, dato probabilmente legato alla tossicità dell'mRNA piuttosto che alla presenza del trascritto

esogeno per *Esr2a*. Parallelamente trattando le uova con E_2 senza aver iniettato il trascritto per il recettore si ottiene un lieve aumento della mortalità e delle anomalie. Questo suggerisce che l'aumento del recettore non provoca alterazioni significative a causa della mancanza dell'estrogeno specifico che lo attiva; il solo aumento di 17β -estradiolo invece agisce in qualche modo causando lievi alterazioni.

Al contrario, l'iniezione di mRNA del gene *esr2a* in combinazione con il trattamento delle uova per 2 ore con 17β -estradiolo ha presentato una mortalità più alta rispetto ai gruppi di controllo e una percentuale di pesci anormali del 24% sul totale. Queste irregolarità non sono comuni a tutti i pesci considerati anormali; ciò indica che non ci sia un bersaglio specifico di questo trattamento. In futuro si dovrà approfondire il meccanismo che altera lo sviluppo di questi pesci e si dovrà osservare se si presentano anomalie a lungo termine in questa generazione o nella prole dopo trattamento con 17β -estradiolo e iniezione di mRNA per *Esr2a*.

È possibile inoltre che la degradazione dell'mRNA iniettato non corrisponda esattamente al processo che avviene a carico dei trascritti naturali materni a causa di differenze tra le code di *poly-A* ricreate *in vitro* e la naturale poliadenilazione al finale 3'. Comunque, la percentuale di degradazione del messaggero potrebbe differire nelle cellule dell'embrione. Questo non ci deve sorprendere considerando tutti i meccanismi molecolari, dell'ovocita prima e dell'embrione dopo, dei processi di inattivazione e riattivazione, e la degradazione finale del trascritto *esr2a* materno.

Il silenziamento di *esr2a* che influenza più di 700 trascritti è correlato ad un'aumentata percentuale di apoptosi larvale ed embrionale e a malformazioni anatomiche. Tre difetti riportati in questo lavoro, cioè il ritardo nella schiusa, una coda curva e il nuoto circolare, sono anche descritti nello studio di Froehlicher e collaboratori (2009) che focalizzano il loro lavoro sullo sviluppo anomalo dei neuromasti lungo la linea laterale in larve trattate con morfolino per *esr2a*. Questi effetti sono attribuiti al *knockdown* dei messaggeri per *Esr2a* zigotico che è co-espresso, a bassi livelli, con *Esr1*, nelle cellule sensoriali e di supporto di questo sistema mecano-recettore, dalle 60 alle 72 hpf e culmina a 6 dpf (Tingaud-Sequeira *et al.*, 2004). È stato scoperto che *Esr1* regola la migrazione iniziale lungo la linea laterale posteriore (Gamba *et al.*, 2010), mentre *Esr2a* promuove la differenziazione delle cellule di supporto in cellule cappellute. Questo ultimo tipo cellulare risulta assente nei neuromasti dei morfanti, come conseguenza di un'attivazione irregolare della via di segnale di *Notch* (Froehlicher *et*

al., 2009). *her12* e *notchless homolog 1*, geni correlati a questa via di segnale, sono up-regolati a 8 e 48, rispettivamente, e l'attivazione anomala di *Notch* potrebbe anche essersi verificata nelle mie larve morfanti a 5 dpf del presente studio.

Le larve morfanti nuotano in modo circolare ma questo potrebbe essere dovuto alla forma ricurva del corpo e alla pinna caudale ridotta piuttosto che ad anomalie dei neuromasti. Questi servono ad evitare gli ostacoli e i predatori o ad individuare le prede rilevando variazioni di pressione nelle acque circostanti, piuttosto che per nuotare in linea retta. La mancanza di una vescica natatoria insufflata può essere interpretata come una conseguenza secondaria del nuoto anomalo, il quale impedisce l'immissione di bolle d'aria dalla superficie dell'acqua per la dilatazione della vescica natatoria.

Lo scarso sviluppo dei vasi sub-intestinali nelle larve morfanti a 3 dpf potrebbe provocare un ritardo nell'utilizzo delle riserve di tuorlo e un rallentamento della crescita. Ciò in parte può spiegare l'incompleta crescita del cervello, degli organi sensoriali, come gli occhi e le vescicole dell'orecchio, come pure le anomalie delle cartilagini splanocraniali e branchiali. Queste ultime sono per lo più derivate dalla migrazione delle cellule delle creste neurali, ma i meccanismi coinvolti in questo processo restano da chiarire, anche se l'utilizzo di marcatori specifici per queste cellule ha chiaramente messo in evidenza anomalie nel loro *pattern* di espressione.

È da osservare che gli mRNA che sostengono le tappe iniziali dell'embriogenesi rappresentano un'eredità del trascrittoma che non è né propriamente materna, in quanto affetta dalla ricombinazione allelica durante la meiosi, né zigotica. Questi trascritti possono essere più propriamente descritti come prezigotici, perché precedono la trascrizione zigotica.

Esclusivamente materna è invece l'eredità ormonale costituita da un complesso di ormoni lipofili, come steroidi, secosteroidi, ormoni della tiroide e retinoidi reclutati dalla circolazione materna o dall'involucro follicolare e accumulati nel tuorlo (Lubzens *et al.*, 2010). Il 17 β -estradiolo che viene depositato nel tuorlo è sintetizzato nelle cellule della granulosa che sono in contatto con l'ovocita. Inoltre questo estrogeno è abbondante durante la vitellogenesi ed ha un'alta permeabilità per le membrane cellulari. La concentrazione e il destino del 17 β -estradiolo materno in ovociti ovulati ed embrioni precoci di *zebrafish* rimangono ancora da indagare, ma la presenza di questo estrogeno nelle uova ovulate è stata segnalata in altri pesci, come in

uova di salmone (*Oncorhynchus keta*) (de Jesus *et al.*, 1992), tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Hines *et al.*, 1999) e medaka (Iwamatsu *et al.*, 2005).

I tre i recettori di *zebrafish* per gli estrogeni sono transattivati dal 17 β -estradiolo con alta affinità e specificità maggiore rispetto alla loro controparte nei mammiferi (Bardet *et al.*, 2002). Pertanto è probabile che *Esr2a*, tradotto dal trascritto materno *esr2a*, possa essere transattivato dal 17 β -estradiolo materno e che le alterazioni dei trascritti negli embrioni a 8 hpf e la morfologia anormale degli embrioni di 24 hpf siano stati causati dal *shutdown* della via di trasduzione degli estrogeni prezigotici indotto da trattamento con *esr2a*^{ATG}MO. In che misura l'*Esr2a* zigotico dalle 24 hpf alla schiusa dipenda dagli estrogeni materni o dalla aromatizzazione degli androgeni materni a seguito della trascrizione del gene *cyp19a1b* dalle 25 hpf in poi (Mouriec *et al.*, 2009) è ancora invece una questione aperta.

In conclusione gli importanti aggiustamenti nella regolazione dell'espressione genica, legati all'esperienza di vita della madre in termini di risposta degli estrogeni, possono essere direttamente trasferiti nei discendenti prima dell'effettiva rilevazione degli stimoli ambientali circostanti.

Come contributo materno al valore adattativo della prole, l'ovocita, carico di estrogeni e trascritti del gene *esr2a*, potrebbe conferire una plasticità epigenetica nello sviluppo di *zebrafish*.

5. BIBLIOGRAFIA

- Aleström, P., Holter, J.L. e Nourizadeh-Lillabadi, R. (2006). Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *TRENDS in Biotechnology*, 24 (1), 15-21.
- Auperin, B. e Geslin, M. (2008). Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *General and Comparative Endocrinology*, 158, 234-239.
- Bardet, P.L., Horard, B., Robinson-Rechavi, M., Laudet, V. e Vanacker, J.M. (2002). Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 28 (3), 153-63.
- Belvedere, P., Vianello, S., Dalla Valle, L., Ramina, A., Manzalini, A., Salvato, B. e Colombo, L. (1999). Long-term effects on body growth induced by oocyte exposure to exogenous cortisol and estradiol-17- β in rainbow trout, in: Roubous, W., Wendelaar Bonga, S.E., Vaudry, H., De Loot, A. (Eds.). *Recent Developments in Comparative Endocrinology and Neurobiology*, Shaker Publishing, Maastricht, The Netherlands, 258–260.
- Bonnet, E., Fostier, A. e Bobe, J. (2007). Microarray-based analysis of fish egg quality after natural or controlled ovulation. *BMC genomics*, 8 (55).
- Brooks, S., Tyler, C.R. e Sumpter, J.P. (1997). Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7, 387-416.
- Carere, C. e Balthazart, J. (2007). Sexual versus individual differentiation: the controversial role of avian maternal hormones. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*: 18 (2), 73-80.
- Cohen, J.S., Crooke, S.T. e Lebleu, B. (1993). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Antisense Research and Application*, 205-19.
- Collins, P. e Webb, C. (1999). Estrogen hits the surface. *Nature Medicine*, 5 (10), 1130-1.
- Corey, D.R. e Abrams, J.M. (2001). Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biology*, 2 (5), 1015.1-.3.

- Dahm, R. e Geisler, R. (2006). Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*, 8 (4), 329-45.
- Darnaudéry, M. e Maccari, S. (2007) Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Reviews*, 57, 571-585.
- De Jesus, E.G. e Hirano, T. (1992). Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *General and Comparative Endocrinology*, 85, 55-61.
- Draper, B.W., Morkos, P.A. e Kimmel, C.B. (2001). Inhibition of zebrafish *fgf 8* pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genesis*, 30 (3), 154–56.
- Eisen, J.S. e Smith, J.C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development*, 135 (10), 1735-43.
- Ekker, S.C. (2000). Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast*, 17 (4), 302-6.
- Engeszer, R.E., Patterson, L.B., Rao, A.A. e Parichy, D.M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4 (1), 21-40.
- Enmark, E. e Gustafsson, J.A. (1999). Oestrogen receptors-an overview. *Journal of Internal Medicine*, 246 (2), 133-8.
- Feist, G., Schreck, C.B., Fitzpatrick, M.S. e Redding, J.M. (1990). Sex steroid profiles of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during early development and sexual differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 80, 299-313.
- Farber, S.A., De Rose, R.A., Olson, E.S. e Halpern, M.E. (2003). The zebrafish annexin gene family. *Genome Research*, 13, 1082-1096.
- Fjose, A., Njølstad, P.R., Nornes, S., Molven, A. e Krauss, S. (1992). Structure and early embryonic expression of the zebrafish engrailed-2 gene. *Mechanisms of Development*, 39, 51-62.
- Froehlicher, M. Liedtke, A., Groh, K., Lòpez-Schier, H., Neuhauss, S.C., Segner, H. e Eggen, R.I. (2009). Estrogen receptor subtype $\beta 2$ is involved in neuromast

- development in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Developmental Biology*, 330 (1), 32-43.
- Fushimi, S., Wadab, N., Nohnob, T., Tomitac, M., Saijohd, K., Sunamie, S. e Katsuyamaa, H. (2009) 17 β -Estradiol inhibits chondrogenesis in the skull development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 95, 292-298.
- Gamba, L., Cubedo, N., Ghysen, A., Lutfalla, G., Dambly-Chaudière, C. (2010). Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U S A*, 107, 6358-6363.
- Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K., Enright, A.J. e Schier, A.F. (2006). Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312 (5770), 75-9.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C. e Huber, J.C. (2002). Production and action of estrogens. *The New England Journal of Medicine*, 346 (5), 340-52.
- Hall, J. M., Couse, J.F. e Korach, K.S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (40), 36869-72.
- Hamad, A., Kluk, M., Fox, J., Park, M. e Turner, J.E. (2007). The effects of aromatase inhibitors and selective estrogen receptor modulators on eye development in the zebrafish (*Danio rerio*). *Current Eye Research*, 32 (10), 819-27.
- Hanna, R.N., Zhu, Y. (2011). Controls of meiotic signaling by membrane or nuclear progestin receptor in zebrafish follicle-enclosed oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 337, 80-88.
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A. e Thomas, P. (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *PNAS*, 97 (20), 10751-6.
- Hines, G.A., Boots, L.R., Wibbels, T. e Watts, S.A. (1999) Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei: cyprinoidei). *General and Comparative Endocrinology*, 114, 235-248
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. e Peterson R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences*, 86(1), 6-19

- Hsu, H.J., Liang, M.R., Chen, C.T. e Chung, B.C. (2006). Pregnenolone stabilizes microtubules and promotes zebrafish embryonic cell movement. *Nature*, 439 (7075), 480-3.
- Ingham, P.W. e McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Development*, 15 (23), 3059-87.
- Irie, T. e Seki, T. (2002). Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 131, 209-19.
- Isogai, S., Horiguchi, M. e Weinstein, B.M. (2001). The Vascular Anatomy of the Developing Zebrafish: An Atlas of Embryonic and Early Larval Development. *Developmental Biology* 230, 278-301.
- Iversen, P.L. (2007). Antisense drug technology principles, strategies, and application. *Ed. Crooke* (20), 565-6, 569.
- Iwamatsu, T., Kobayashi, H., Sagegami, R. e Shuo, T. (2006). Testosterone content of developing eggs and sex reversal in the medaka (*Oryzias latipes*). *General and Comparative Endocrinology*, 145, 67-74.
- Kajiwarra, M., Kuraku, S., Kurokawa, T., Kato, K., Toda, S., Hirose, H., Takahashi, S., Shibata, Y., Iguchi, T., Matsumoto, T., Miyata, T., Miura, T. e Takahashi, Y. (2006). Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. *General and Comparative Endocrinology*, 148 (3), 315-26.
- Kane, D.A. e Kimmel, C.B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development*, 119, 447-456.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. e Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203 (3), 253-310.
- Klinge, C.M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*, 65 (5), 227-51.
- Krieg, A.M. e Stein, C.A. (1995). Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: antisense or anti-protein? *Antisense Research and Development*, 5 (4), 241.

- Kumar, R. e Thompson, E.B., (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94. 383-394.
- Langheinrich, U., Hennen, E., Stott, G., Vacun, G. (2002). Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. *Current Biology*, 12 (23), 2023-8.
- Lassiter, C.S., Kelley, B. e Linney, E. (2002). Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta a (ER α) in zebrafish (*Danio rerio*), *Gene* 299, 141–151.
- Lassiter, C.S. e Linney, E. (2007). Embryonic expression and steroid regulation of brain aromatase *cyp19a1b* in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 4 (1), 49-57.
- Lawson, N.D. e Weinstein, B.M. (2002b). *In Vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Developmental Biology*, 248 (2), 307-318.
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. e Cerdà, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 367–389.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83 (6), 835-9.
- Mathavan, S., Lee, S.G.P., Mak, A., Miller, L.D., Murthy, K.R.K., Govindarajan, K.R., Tong, Y., Wu, Y.L., Lam, S.H., Yang, H., Ruan, Y., Korzh, V., Gong, Z., Liu e E.T., Lufkin. (2005). Transcriptome analysis of zebrafish embryogenesis using microarrays. *Plos Genetics*, 1, 260-276.
- McCormick, M.I. (1999). Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of a coral reef fish. *Oecologia*, 118 (4), 412-22.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O. e Pakdel, F. (2002). Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of Reproduction*, 66, 1881-92.
- Moulton, H.M. e Moulton, J.D. (2008) Antisense morpholino oligomers and their peptide conjugates. *Therapeutic oligonucleotides. Ed. Kurreck*, 43-79.
- Moulton, J.D. e Yan, Y.L. (2008). Using Morpholinos to control gene expression. *Current Protocols in Molecular Biology*, (26.8), 1-29.

- Mouriec, K., Gueguen, M.M., Manuel, C., Percevault, F., Thieulant, M.L., Pakdel, F. e Kah, O. (2009). Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. *Biology of Reproduction*, 80 (5), 889-96.
- Mullins M. (2005). Microinjection techniques: injecting through the chorion. A disposizione: <http://courses.mbl.edu/zebrafish/faculty/mullins/pdf/Mullins-Morpholino2.pdf>.
- Nasevicius, A. e Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature Genetics*, 26 (2), 216-20.
- Nelson, B.P., Henriot, R.P., Holt, A.W., Bopp, K.C., Houser, A.P., Allgood, O.E. e Turner, J.E. (2008). The role of estrogen in the developmental appearance of sensory-motor behaviors in the zebrafish (*Danio rerio*): the characterization of the "listless" model. *Brain Research*, 1222, 118-28.
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M. e Gustaffsson, J.A. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81 (4), 1536-54.
- Pelegri, F. (2003). Maternal factors in zebrafish development. *Developmental Dynamics*. 228, 535-554.
- Pikulkaew, S., De Nadai, A., Belvedere, P., Colombo, L. e Dalla Valle, L. (2010). Expression analysis of steroid hormone receptor mRNAs during zebrafish embryogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165 (2), 215-220.
- Piotrowski T. and Nüsslein-Volhard, C. (2000). The endoderm plays an important role in patterning the segmented pharyngeal region in zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology*. 225, 339-56.
- Schaaf, M.J., Chatzopoulou A. e Spink H.P. (2009). The zebrafish as a model system for glucocorticoid receptor research. *Comparative Physiology and Biochemistry*, 253, 75-82.
- Schreihöfer, D.A., Resnick, E.M., Lin, V.Y. e Shupnik, M.A. (2001). Ligand-independent activation of pituitary ER: dependence on PKA-stimulated pathways. *Endocrinology*, 142 (8), 3361-8.
- Schulte-Merker, S., Lee, K.J., McMahon, A.P. e Hammerschmidt, M. (1997). The zebrafish organizer requires *chordino*. *Nature*, 387 (6636), 862-3.

- Shiraishi, K., Matsuda, M., Mori, T. e Hirano, T. (1999). Changes in expression of prolactin- and cortisol-receptor genes during early-life stages of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater. *Zoological Science*, 16, 139-146.
- Spitsbergen, J. e Kent, M. (2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research-Advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology*, 31 (Suppl.), 62-87.
- Sumanas, S. e Lin, S. (2004). Zebrafish as a model system for drug target screening and validation. *Drug Discovery Today: TARGETS*, 3 (3), 89-96.
- Summerton, J.E. (2007). Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7 (7), 651-60.
- Summerton, J.E. e Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7, 187-95.
- Tadros, W. e Lipshitz, H.D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, 136 3033–3042.
- Tay, H.C., Yong, A.N., Goh, J., Lim, H.S., Chao, T.M., Chou, R. e Lam, T.J. (1997). Effects of treatment of eggs with triiodothyronine and cortisol on larval morphometry and survival in the greasy grouper. *Aquaculture*, 5, 189-195.
- Thisse, B. e C. Thisse, C. (2004) Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. ZFIN Direct Data Submission 2, 2004 (<http://zfin.org>).
- Thornton, J.W., Need, E. e Crews, D. (2003). Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling. *Science*, 301 (5640), 1714-7.
- Tingaud-Sequeira, A., André, M., Forgue, J., Barthe, C. e Babin, P.J. (2004). Expression patterns of three estrogen receptor genes during zebrafish (*Danio rerio*) development: evidence for high expression in neuromasts. *Gene Expression Patterns*, 4 (5), 561-8.
- Walpita, C.N., Crawford, A.D. e Darras, V.M. (2010). Combined antisense knockdown of type 1 and type 2 iodothyronine deiodinases disrupts embryonic development in zebrafish (*Danio rerio*). *General and Comparative*

Endocrinology, 166, 134-141.

Woo, K., Shih, J. e Fraser, S.E. (1995). Fate maps of the zebrafish embryo. *Current Opinion in Genetics and Development*, 5 (4), 439-43.

Wilson, S.W., Ross, L.S., Parrett, T. e Easter, S.S. (1990). The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Development*, 108, 121-145.

Zamore, P.D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Structural Biology*, 8 (9), 746-50.

Zhao, L., Samuels, T., Winckler, S., Korgaonkar, C., Tompkins, V., Horne, M.C.e Quelle, D.E. (2003). Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. *Molecular Cancer Research*, 1, 195-206.