



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO
CICLO XX

CARATTERIZZAZIONE DELL'ESPRESSIONE E DELLA FUNZIONE DELLE EMILINE IN TOPO ED IN ZEBRAFISH

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore: Ch.mo Prof. Paolo Bonaldo

Dottoranda: Martina Milanetto

31 Gennaio 2008

Indice

Sommario	p. 1
Abstract	p. 3

PARTE PRIMA: Introduzione

1 LA SUPERFAMIGLIA EDEN	p. 5
1.1 La famiglia delle emiline/multimerine	p. 8
1.1.1 Emilina-1	
1.1.2 Emilina-2	
1.1.3 Multimerina-1	
1.1.4 Multimerina-2	
1.2 La famiglia emid: Emid-1 ed Emid-2	p. 14
1.3 La famiglia delle emiline tronche: Emilina-3	p. 14

PARTE SECONDA: Emiline in topo

2 INTRODUZIONE	p. 21
1.1 Il topo come organismo modello per studi di genomica funzionale	p. 21
1.2 Mutagenesi e transgenesi in topo	p. 22
1.3 La tecnologia del <i>gene targeting</i>	p. 26
1.4 Le cellule ES	p. 30
3 MATERIALI E METODI	p. 35
2.1 RT-PCR	p. 35
2.2 Ibridazione <i>in situ</i> (ISH)	p. 37
2.2.1 Preparazione dei campioni, inclusione e preparazione delle sezioni istologiche	
2.2.2 Preparazione della sonda	
2.2.3 ISH	
2.3 Inattivazione genica mirata in cellule ES	p. 38
2.3.1 Preparazione e coltura di fibroblasti embrionali murini (<i>feeder cells</i>)	
2.3.2 Coltura, propagazione e mantenimento di cellule ES	
2.3.3 Purificazione del costrutto di inattivazione genica	
2.3.4 Elettroporazione di cellule ES con il costrutto di inattivazione	
2.3.5 Doppia selezione, isolamento ed espansione di cloni di cellule ES	
2.4 Identificazione e caratterizzazione dei cloni ricombinanti omologhi	p. 43
2.4.1 Lisi delle cellule ES ed estrazione del DNA genomico	
2.4.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	
2.4.3 Southern blotting	
2.5 Produzione di topi chimera per l'allele <i>Emilin3</i> inattivato	p. 45
2.5.1 Isolamento di blastocisti	
2.5.2 Microiniezione di cellule ES in blastocisti	
2.5.3 Preparazione delle femmine pseudogravide	
2.5.4 Trasferimento delle blastocisti microiniettate in femmine pseudogravide	
2.5.5 Analisi cariotipica delle cellule ES <i>in vitro</i> e dei topi <i>knockout in vivo</i>	

2.6	Caratterizzazione dei topi <i>knockout</i>	p.	48
2.6.1	Genotipizzazione		
2.6.2	RT-PCR		
2.7	Rilevazione della pressione	p.	49
4	RISULTATI	p.	51
3.1	Analisi dell'espressione delle emiline/multimerine mediante RT-PCR	p.	51
3.2	Analisi dell'espressione di <i>Emilin3</i> durante lo sviluppo	p.	53
3.3	Elettroporazione delle cellule ES con il costrutto di inattivazione, selezione ed isolamento dei cloni ricombinanti	p.	57
3.4	Identificazione dei cloni ricombinanti omologhi	p.	60
3.4.1	Elaborazione del protocollo di <i>screening</i> dei cloni		
3.4.2	<i>Screening</i> su larga scala dei cloni di cellule ES ricombinanti		
3.5	Caratterizzazione genomica dei cloni ricombinanti omologhi	p.	67
3.6	Generazione di topi chimerici <i>Emilin3</i> ^{+/-} ed analisi del chimerismo	p.	70
3.7	Generazione di topi <i>knockout</i> per <i>Emilin3</i>	p.	73
3.8	Analisi cariotipica delle cellule ES, dei cloni <i>in vitro</i> e dei topi <i>knockout in vivo</i>	p.	74
3.9	Caratterizzazione dei topi <i>Emilin3</i> ^{-/-}	p.	80
3.10	Studio del fenotipo dei topi <i>Emilin3</i> ^{-/-}	p.	83

PARTE TERZA: Emiline in zebrafish

1	INTRODUZIONE	p.	87
1.1	<i>Danio rerio</i> come organismo modello	p.	87
1.2	Studi di genomica funzionale in zebrafish	p.	90
1.3	Iniezione di mRNA e di morfolino in ovociti fecondati	p.	94
2	MATERIALI E METODI	p.	99
2.1	Analisi bioinformatica	p.	99
2.2	Ibridazione <i>in situ whole-mount</i> (WISH)	p.	99
2.2.1	Preparazione delle sonde		
2.2.2	WISH		
2.2.3	Colorazione con alcian blue		
2.2.4	Osservazione al microscopio e acquisizione delle immagini		
2.2.5	Sezioni al vibratomo		
2.3	Trattamento di embrioni con farmaci	p.	104
2.4	Microiniezione di mRNA e morfolino in embrioni	p.	105
2.4.1	5'-RACE		
2.4.2	Design del morfolino		
2.4.3	Microiniezione di mRNA e di morfolino in ovociti fecondati		
2.4.4	Verifica dell'effetto del morfolino		
2.4.5	Studio del fenotipo di embrioni iniettati con mRNA o morfolino		
3	RISULTATI	p.	109
3.1	Distribuzione filogenetica dei geni EDEN	p.	109
3.2	Identificazione di otto geni codificanti per emiline in zebrafish	p.	111

3.3	Analisi dell'espressione delle emiline in zebrafish mediante WISH	p. 116
3.3.1	<i>emilin1a</i> ed <i>emilin1b</i>	
3.3.2	<i>emilin2a</i> ed <i>emilin2b</i>	
3.3.3	<i>mmrn2a</i> e <i>mmrn2b</i>	
3.3.4	<i>emilin3a</i> ed <i>emilin3b</i>	
3.4	Espressione di <i>emilin3a</i> e <i>3b</i> in embrioni trattati con farmaci ed in embrioni mutanti	p. 132
3.5	Studi di <i>gain-of-function</i> mediante iniezione di mRNA	p. 136
3.6	Studi di <i>loss-of-function</i> mediante iniezione di morfolino	p. 138

PARTE QUARTA: Discussione	p. 147
----------------------------------	---------------

Bibliografia	p. 171
Ringraziamenti	p. 191

Sommario

La famiglia delle emiline comprende nei mammiferi cinque glicoproteine della matrice extracellulare caratterizzate dalla presenza di un dominio N-terminale ricco in cisteine (dominio EMI). Durante il mio dottorato, ho studiato in topo ed in zebrafish l'espressione e la funzione dei geni corrispondenti, in particolare *Emilin3*, codificante per l'unico componente della famiglia privo del dominio C-terminale gC1q.

Per quanto riguarda lo zebrafish, ricerche effettuate in banca dati ci hanno permesso di identificare e clonare otto membri di questa famiglia genica. Il loro profilo di espressione durante lo sviluppo embrionale, analizzato mediante ibridazione *in situ*, si è rivelato caratteristico e parzialmente sovrapponibile all'espressione delle emiline in topo. Inoltre, mentre le altre emiline presentano un quadro di espressione mesenchimale o cardiovascolare, Emilina-3 è presente a stadi precoci nella notocorda e nella lamina del pavimento del tubo neurale, e a stadi successivi negli archi branchiali, confermando la possibilità che possa avere una funzione diversa da quella degli altri componenti della famiglia. Per comprendere maggiormente il suo ruolo *in vivo* durante lo sviluppo embrionale, ho intrapreso studi funzionali mediante sovraespressione, dopo iniezione in ovociti del mRNA intero, e mediante ablazione, dopo iniezione di oligonucleotidi morfolino antisenso.

Anche l'analisi funzionale in topo, a cui è stata dedicata una parte consistente del mio lavoro di Dottorato, si è incentrata su Emilina-3. L'inattivazione genica mirata intrapresa negli scorsi anni nel nostro laboratorio si era rivelata, a differenza dalle altre emiline, particolarmente difficile: la frequenza di ricombinazione omologa di questo gene nelle cellule staminali embrionali (ES) era risultata infatti estremamente bassa e non era stata ottenuta alcuna trasmissione dell'allele inattivato *in vivo*, probabilmente per instabilità cariotipica dei cloni ES ricombinanti. Abbiamo quindi avviato un ulteriore progetto di inattivazione, effettuando un esperimento di *knockout* su larga scala. Utilizzando un costrutto di inattivazione per *Emilin3*, ho trasfettato cellule ES della linea R1 con cariotipo euploide e, dopo la selezione positiva e negativa, effettuata su 1505 cloni selezionati, ho isolato 995 cloni resistenti. Dato il grande numero di cloni isolati, per individuare i rari ricombinanti omologhi, anziché utilizzare il Southern blot, una metodica standard in questi studi ma piuttosto lenta e costosa, ho messo a punto e condotto uno *screening* genotipico mediante PCR. Dopo ulteriori analisi dei sette cloni ES correttamente ricombinati così identificati, quattro di tali cloni sono stati espansi ed utilizzati per produrre topi chimerici mediante microiniezione in blastocisti ed impianto in femmine pseudogravide. Dall'incrocio di questi topi ho ottenuto per due cloni indipendenti topi eterozigoti ed infine topi omozigoti *knockout* per *Emilin3*, di cui ho avviato l'analisi del fenotipo. Inoltre, ho condotto un'analisi del cariotipo dei cloni di cellule ES introdotti *in vivo*, in confronto con la linea di cellule ES di partenza e con cloni di cellule ES

mutanti per altri geni, allo scopo di correlare l'assetto cromosomico delle cellule ES con la loro capacità di trasmettere l'allele inattivato alla linea germinale.

Abstract

Emilins are a family of glycoproteins of the extracellular matrix with common structural organization and containing a characteristic N-terminal cysteine-rich domain. During my PhD, I studied expression and function in zebrafish and in mice of the corresponding genes, and I focused my attention on *Emilin3*, coding for the only component of the family lacking the C-terminal gC1q domain.

As concerns my work on zebrafish, by database searching we identified and cloned eight members of this gene family. Their expression pattern during embryonic development, analyzed by whole-mount *in situ* hybridization, is characteristic and partially overlapping with expression of Emilins in mice. The most interesting pattern is the one of Emilin-3: while other Emilin genes reveal a mesenchymal or cardiovascular expression profile, the two zebrafish genes coding for Emilin-3 are abundantly expressed at early stages in the notochord and in the floor plate and at later stages in the branchial arches. This suggests that Emilin-3 may play a distinct role in the extracellular matrix, in comparison with other members of Emilin family. To gain insight into the function of these genes *in vivo*, we started functional studies by *in situ* hybridization of embryos in which relevant molecular pathways are blocked by treatment with specific drugs and by microinjection of mRNA and morfolino oligonucleotides in fertilized oocytes.

Concerning the studies in mice, these experiments represented a large part of my PhD work and they were concentrated on the gene coding for Emilin-3. In the past years, targeted *Emilin3* gene inactivation in murine embryonic stem (ES) cells was already undertaken in the laboratory where I performed my PhD work. However, generation of Emilin3 knockout mice was unsuccessful and these previous attempts revealed that, unlike other Emilins, targeted inactivation of the *Emilin3* gene is particularly difficult. The frequency of homologous recombination of this gene is extremely low and transmission of the inactivated allele to the F1 generation was not reached, probably also due to karyotypic instability of targeted ES cell clones. Therefore, I carried out a new *Emilin3* gene targeting approach, performed by means of a large scale experiment with a new ES cell line. I transfected euploid R1 ES cells with a *Emilin3* targeting construct and, after double positive-negative selection, 1505 clones were isolated; 995 of these individual cell clones were further expanded and investigated for identifying clones in which a correct homologous recombination event had occurred. With such large number of clones, molecular analysis by Southern blotting, a standard but time- and money-consuming procedure, was not an easily affordable screening method for detecting rare homologous recombinant clones. Therefore, I set up an optimal screening procedure by PCR. Six positive ES clones were identified, and after additional characterization four of them were used for generation of chimeric mice by microinjection of ES

cells into host blastocysts and implant in foster females. By crossing these chimeric mice, I obtained for two independent clones heterozygous and finally homozygous *Emilin3* knockout mice, and I started to undertake the phenotypic analysis of Emilin-3 null mice. Finally, I also performed a detailed karyotypic analysis of targeted *Emilin3* ES clones introduced *in vivo*, in comparison to the original ES cell line and other mutant ES cell clones, with the aim of correlating the karyotype of ES cells with their ability to transmit the inactivated allele to the germ-line.

1 La superfamiglia EDEN

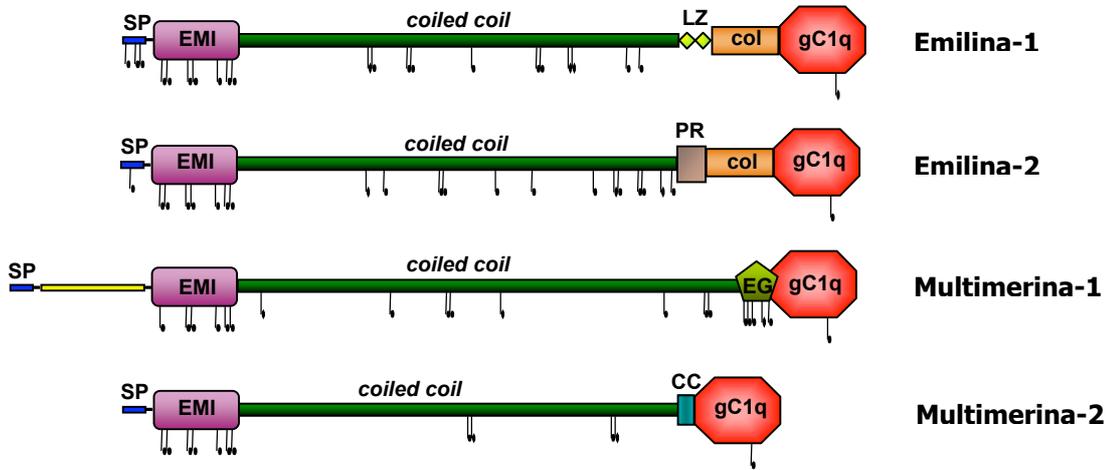
L'identificazione di diverse proteine caratterizzate dalla presenza di un peculiare dominio ricco in cisteine, il dominio EMI, ha portato alla definizione di una nuova superfamiglia di proteine della matrice extracellulare: la superfamiglia EDEN (*Emi Domain Endowed proteins*) (Braghetta et al., 2004) (Tabella **A.1**). L'analisi strutturale di diverse proteine associate alle fibre elastiche ha spesso rivelato la presenza di domini ricchi in cisteine; la Fibrillina-1, per esempio, come anche alcuni membri della superfamiglia EGF, contiene almeno cinque domini di questo tipo (Pereira et al., 1993), ma essi presentano un'organizzazione abbastanza diversa da quella del dominio EMI. La lunghezza del dominio EMI nelle diverse emiline, sia umane sia murine, varia dai 71 ai 79 residui aminoacidici; le analisi bioinformatiche di comparazione dei diversi domini EMI umani e murini hanno evidenziato come tra tali sequenze il livello di similarità sia mediamente intorno al 60% (Doliana et al., 2000a). Sono presenti in modo caratteristico sette residui di cisteina (C1-C7) in posizioni altamente conservate (Doliana et al., 1999). Fanno eccezione la Multimerina-1, priva del residuo C2, e la Multimerina-2, in cui questo stesso residuo è spostato di quattro posizioni a valle (Doliana et al., 2000b). Oltre ai residui cisteinici, anche altri aminoacidi, tra cui numerosi residui aromatici ed idrofobici, sono altamente conservati; ad esempio, il *pattern* WRCCPG(Y/F)xGxxC è stato riscontrato finora solamente nel dominio EMI.

Poco si conosce della funzione del dominio EMI, sebbene studi condotti *in vitro* suggeriscano che esso possa essere coinvolto nella formazione di multimeri (Doliana et al., 2000a). Recentemente è stato dimostrato che il dominio EMI di Emilina-1 è in grado di inibire la maturazione, e quindi l'attività, di TGF- β 1 (Zacchigna et al., 2006), ribadendo il ruolo di regolazione sui fattori di crescita esercitato dalle proteine strutturali della matrice extracellulare. Nei mammiferi la superfamiglia EDEN comprende sette proteine che sono state organizzate in tre famiglie in base alla loro struttura primaria (Figura **A.1**). La famiglia delle emiline/multimerine, comprendente Emilina-1, Emilina-2, Multimerina-1 e Multimerina-2, è caratterizzata da un dominio EMI N-terminale, seguito da una lunga regione centrale con elevata probabilità di formare strutture di tipo *coiled coil* e da una regione C-terminale omologa al dominio globulare della proteina C1q del complemento (dominio gC1q) (Doliana et al., 1999). La seconda famiglia comprende la sola Emilina-3, simile ai membri della prima famiglia ma priva del dominio gC1q. L'ultima famiglia comprende due proteine, Emid-1 ed Emid-2, che presentano a valle del dominio EMI dei lunghi segmenti collagenici e risultano quindi strutturalmente molto diverse dalle altre EDEN.

Nomenclatura dei geni umani e localizzazione	Altri nomi	Seq. genica umana	Ortologo murino e localizzazione	Seq. genica murina
<i>EMILIN1</i> (2p23.3-p23.2)	EMILIN, EMILIN-1, gp115	NM_007046	<i>Emilin1</i> (5B1)	NM_133918
<i>EMILIN2</i> (18p11.3)	Basilin	NM_032048	<i>Emilin2</i> (17 E1.3)	NM_145158
<i>EMILIN3</i> (20q12)	Emilin-5, Emilin-T	XM_029741	<i>Emilin3</i> (2H3)	NM_182840
<i>MMRN1</i> (4q22)	ECM, EMILIN4	NM_007351	<i>Mmrrn1</i> (6B3)	AK036724
<i>MMRN2</i> (10q23.31)	Emilin3, EndoGlyx-1	NM_024756	<i>Mmrrn2</i> (14B)	NM_153127
<i>EMID1</i> (22q12.2)	EMU1	NM_133455	<i>Emid1</i> (11A1)	NM_080595
<i>EMID2</i> (7q22.1)	EMU2, COL26 α 1	NM_133457	<i>Emid2</i> (5)	NM_024474

Tabella A.1: Nomenclatura e caratteristiche genomiche dei componenti della superfamiglia EDEN. Per la nomenclatura si veda anche il sito: www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/emilin.html.

A: Famiglia delle Emiline



B: Famiglia delle Emiline "tronche"



C: Famiglia delle Emid

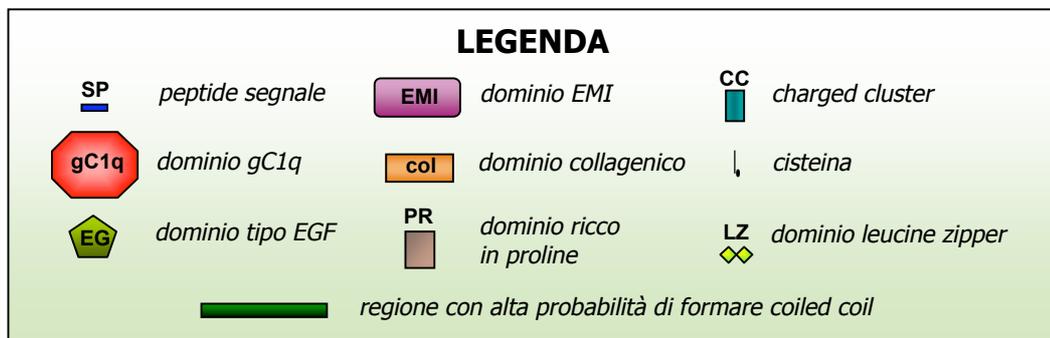
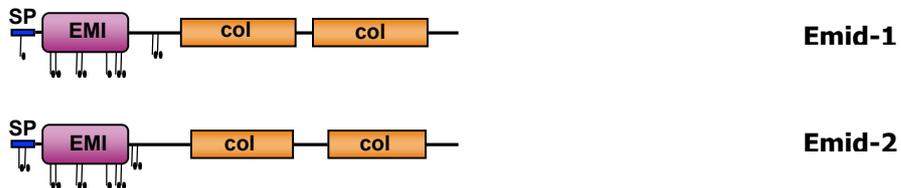


Figura A.1: La superfamiglia EDEN (*EMI-domain endowed proteins*)

1.1 La famiglia delle emiline/multimerine

La famiglia delle emiline/multimerine comprende quattro membri (Emilina-1, Emilina-2, Multimerina-1 e Multimerina-2), caratterizzati da un comune arrangiamento dei domini strutturali (Colombatti et al., 2000; Braghetta et al., 2004). In particolare, a partire dall'estremità N-terminale, sono presenti: *i*) un peptide segnale per la secrezione nell'ambiente extracellulare; *ii*) il dominio EMI; *iii*) una lunga regione (circa 700 amminoacidi) con elevata probabilità di formare strutture di tipo *coiled coil* e/o collageniche, compatibili con la formazione di multimeri; *iv*) un dominio gC1q nella regione C-terminale. Il dominio gC1q (*globular C1q-like domain*) è presente in numerose proteine secrete ed assume una conformazione compatta del tipo "jelly roll β -sandwich", simile a quella del dominio C-terminale THD (*TNF homology domain*) della famiglia dei ligandi TNF (Kishore et al., 2004). Esiste perciò tra le proteine TNF e quelle che contengono il dominio gC1q un collegamento evolutivo e strutturale, che permette di definire una superfamiglia C1q/TNF (Shapiro e Scherer, 1998), a cui appartengono anche le emiline/multimerine. I membri della superfamiglia C1q/TNF sono coinvolti in processi infiammatori, apoptotici, metabolici, di immunità adattativa, organogenesi, rigenerazione tissutale e differenziamento cellulare (Kishore et al., 2004).

La comparazione delle sequenze delle diverse emiline e multimerine ha permesso di evidenziare un grado di conservazione relativamente elevato a livello dei domini EMI e gC1q. Per il dominio EMI il grado di similarità varia dal 45% (Emilina-1 vs Multimerina-1) al 63% (Emilina-1 vs Emilina-2), mentre per il dominio gC1q varia dal 28% (Emilina-2 vs Multimerina-2) al 61% (Emilina-1 vs Emilina-2). La lunga regione centrale è invece poco conservata, tuttavia gli *heptad repeats*, necessari per la formazione della struttura *coiled coil*, sono comuni a tutti i componenti. I dati di comparazione di sequenza e le similarità strutturali permettono di ipotizzare che le emiline possano svolgere funzioni simili nell'ambito della matrice extracellulare (Colombatti et al., 2000; Leimster et al., 2002). Inoltre, il quadro di espressione parzialmente sovrapponibile suggerisce la possibilità di ridondanza genica e compensazione funzionale tra i membri della famiglia (Braghetta et al., 2004).

1.1.1 Emilina-1

Inizialmente isolata da estratti di aorta di pollo e denominata gp115 (Bressan et al., 1983), tale proteina fu rinominata Emilina (*Elastin Microfibril Interface Located proteIN*) grazie alla dimostrazione, mediante immunoelettromicroscopia, della sua localizzazione nelle fibre elastiche a livello dell'interfaccia tra il nucleo centrale di elastina e le microfibrille periferiche (Bressan et al., 1993). Successivamente venne riclassificata come Emilina-1 in seguito all'identificazione di altre proteine con struttura simile.

L'isolamento del cDNA per Emilina-1 in varie specie ha permesso di caratterizzare la struttura primaria della proteina. Le isoforme di Emilina-1 umana e murina sono molto simili, non solo per la dimensione totale, ma anche nelle regioni C- ed N-terminali, dove l'identità di sequenza si avvicina al 95% (Colombatti et al., 2000). Emilina-1 presenta una struttura multimodulare comprendente il dominio EMI N-terminale, una regione centrale in grado di formare strutture *coiled coil*, due domini *leucine zipper*, un breve segmento collagenico ed un dominio gC1q C-terminale (Doliana et al., 1999 e 2000b). La presenza di un segmento collagenico e di regioni *coiled coil* è in accordo con la capacità di Emilina-1 di formare trimeri mediante associazione tra diverse catene. La presenza di domini *leucine zipper* è invece inusuale per una proteina della matrice extracellulare. Studi di biosintesi hanno dimostrato che il dominio gC1q di Emilina-1 è coinvolto nella formazione di omotrimeri a livello extracellulare, indicando come il processo di formazione dei trimeri inizi nella regione C-terminale, promosso dal dominio gC1q, e prosegue in direzione N-terminale, attraverso la regione centrale formata dagli *heptad repeats* e in grado quindi di formare una struttura di tipo *coiled coil* (Mongiati et al., 2000). La breve regione collagenica, comprendente 17 triplette ininterrotte GXY adiacenti al dominio gC1q, può essere coinvolta nella stabilizzazione dei trimeri di Emilina-1. È stato dimostrato inoltre che il dominio gC1q è responsabile del legame di Emilina-1 alla superficie cellulare, attraverso l'interazione con il recettore integrinico $\alpha 4\beta 1$ (Spessotto et al., 2003). Dal momento che nei vasi sanguigni Emilina-1 è localizzata all'interfaccia tra le fibre elastiche e le cellule muscolari lisce, è probabile che essa promuova l'ancoraggio delle cellule muscolari lisce alle pareti arteriose (Daga-Gordini et al., 1987).

I primi studi di immunohistochimica su diversi organi di pollo dimostrarono la presenza di Emilina-1 nel tessuto connettivo in associazione con le fibre elastiche (Colombatti et al., 1985 e 1987). Successivamente è stata condotta un'analisi approfondita dell'espressione di Emilina-1 nel topo a partire dalle prime fasi embrionali. Mediante RT-PCR è stato possibile rilevare mRNA di Emilina-1 già in embrioni a 2.5 e 4.5 giorni di sviluppo (E2.5-4.5), corrispondenti rispettivamente allo stadio di morula e di blastocisti. Studi di ibridazione *in situ* hanno rivelato una forte espressione a livello di tessuti extraembrionali come il cono ectoplacentale (E6.5), l'allantoide e l'endoderma viscerale extraembrionale (E7.5) (Braghetta et al., 2002). Recentemente è stato dimostrato come Emilina-1 espressa a livello dei villi corionici e della decidua sia in grado di guidare la migrazione di particolari cellule del trofoblasto verso la parete uterina, grazie al legame di queste cellule ad Emilina-1 tramite l'Integrina $\alpha 4\beta 1$ (Spessotto et al., 2006). Allo stadio E9.5, l'espressione risulta marcata a livello di arco aortico, aorta dorsale, archi branchiali, abbozzi degli arti, mesenchima subepiteliale ed encefalico. Negli stadi di sviluppo successivi (E10.5-11.5), il gene si mantiene espresso negli archi branchiali, negli abbozzi degli arti, nel parenchima polmonare, nei cuscinetti cardiaci e nell'endotelio capillare. Allo stadio E13.5, l'espressione è evidente a livello di plesso

coroideo, vibrisse, cuscinetti cardiaci, pericardio, mesenchima polmonare, parenchima renale e tessuto cartilagineo delle vertebre. Infine, allo stadio E14.5, il gene risulta espresso a livello di trachea, esofago, valvole cardiache, pericondrio, testicoli e, in modo più marcato, nel polmone e nel muscolo liscio di diversi organi. L'espressione del gene per Emilina-1 si mantiene anche durante la vita postnatale e nei tessuti murini adulti, dove l'mRNA risulta abbondante in utero, polmoni, rene, cuore e milza (Braghetta et al., 2002).

Allo scopo di ottenere informazioni sulla funzione di Emilina-1 *in vivo*, il gene *Emilin1* è stato inattivato in topo mediante *gene targeting* (Zanetti et al., 2004). Nonostante la precoce espressione di Emilina-1 durante lo sviluppo embrionale, i topi omozigoti mutanti (*Emilin1^{-/-}*) sono fertili, raggiungono l'età adulta e non presentano difetti anatomici evidenti. Analisi istologiche ed ultrastrutturali hanno rivelato la presenza di alterazioni nella struttura fine delle fibre elastiche e nella morfologia delle arterie; in particolare nell'aorta è stato osservato un decorso irregolare delle lamine elastiche, con interruzioni e delaminazioni frequenti e deposizione irregolare di elastina tra le lamine. Inoltre i topi *Emilin1^{-/-}* presentano alterazioni nella morfologia e nell'ancoraggio delle cellule muscolari lisce ed endoteliali alle lamine elastiche (Zanetti et al., 2004). Considerando le funzioni adesive di Emilina-1 per le cellule ed i saggi di immunoprecipitazione che hanno dimostrato la sua interazione con Elastina e Fibulina-5, è stato proposto che essa abbia un ruolo nella regolazione dell'elastogenesi e nell'omeostasi delle cellule vascolari, stabilizzando le interazioni molecolari tra i componenti delle fibre elastiche e conferendo ad esse proprietà di adesione alle cellule (Zanetti et al., 2004). Dal momento che Emilina-1 è abbondantemente espressa a livello del sistema cardiovascolare durante lo sviluppo e nell'età adulta, è stata indagata la struttura e la funzionalità di questo sistema nei topi *knockout* per Emilina-1. Sorprendentemente, i topi *Emilin1^{-/-}* si sono rivelati ipertesi a tutte le età esaminate, con il 100% di penetranza. Inoltre, anche gli animali eterozigoti (*Emilin1^{+/-}*) presentano una pressione arteriosa moderatamente aumentata, indicando un effetto di aploinsufficienza del gene *Emilin1* per questo fenotipo. Analisi approfondite del sistema cardiovascolare di questi animali hanno individuato come uniche alterazioni morfo-funzionali rilevabili una riduzione globale del diametro del lume e dello spessore della tonaca media dei vasi di resistenza (Zacchigna et al., 2006). Considerando che il segnale dei fattori di crescita può essere regolato da molecole secrete contenenti domini ricchi di cisteine, è stato valutato se il dominio EMI, ricco appunto di cisteine e dalla funzione ignota, possa modulare in qualche modo la funzione di specifici fattori di crescita. Servendosi dell'embrione di *Xenopus* come modello sperimentale, è stato dimostrato che il dominio EMI, ma non un mutante di Emilina-1 privo di tale dominio, interagisce specificamente con il fattore di crescita TGF- β 1, inibendone la maturazione (Zacchigna et al., 2006). Il TGF- β 1 infatti è prodotto dalle cellule sotto forma di un grosso precursore inattivo che viene poi processato in passaggi successivi, al termine dei quali

viene liberata la molecola biologicamente attiva. Esperimenti di trasfezione di cellule in coltura hanno dimostrato che Emilina-1 inibisce la maturazione di TGF- β 1, sequestrando quest'ultimo dall'azione delle convertasi furiniche nell'ambiente extracellulare. Nei topi *Emilin1^{-/-}* è quindi assente un meccanismo di regolazione di TGF- β 1, che risulta perciò essere attivato in quantità maggiore rispetto agli animali *wild-type*. Per stabilire se l'aumentata attivazione di TGF- β 1 fosse effettivamente in relazione con il fenotipo iperteso, sono stati incrociati topi *Emilin1^{-/-}* con topi *Tgfb1^{+/-}*; la riduzione della quantità di TGF- β 1 nella progenie *Emilin1^{-/-};Tgfb1^{+/-}* si è rilevata sufficiente a riportare nella norma i valori pressori (Zacchigna et al. 2006). Con questo studio quindi, il fattore di crescita TGF- β 1, di importanza centrale nello sviluppo e nella fisiopatologia del sistema vascolare (Agrotis et al., 2005), è stato collegato al fenomeno dell'ipertensione arteriosa grazie alla sua interazione funzionale con una proteina delle fibre elastiche, Emilina-1.

1.1.2 Emilina-2

Il secondo membro della famiglia, Emilina-2, è stato originalmente isolato in un progetto volto all'identificazione di proteine che interagissero con Emilina-1. Utilizzando il dominio gC1q di Emilina-1 come esca, è stata saggiata una libreria di cDNA di rene umano ed è stata identificata una nuova proteina contenente un dominio EMI, in seguito denominata Emilina-2 (Doliana et al., 2001). Emilina-2 presenta un'organizzazione strutturale multimodulare molto simile a quella di Emilina-1: possiede un peptide segnale N-terminale seguito da un dominio EMI, una lunga regione centrale che forma ripiegamenti *coiled coil*, un dominio di 55 residui assente nelle altre proteine della famiglia ed in cui il contenuto di prolina supera il 41%, un breve segmento collagenico ed un dominio gC1q all'estremità C-terminale (Doliana et al., 2001). La presenza del dominio gC1q e del segmento collagenico suggeriscono che anche questa proteina possa assemblarsi in strutture trimeriche come Emilina-1. Le sequenze delle due proteine raggiungono un elevato livello di similarità solo a livello dei domini EMI e gC1q.

L'analisi con tecniche di RT-PCR ed ibridazione *in situ* hanno rivelato per Emilina-2 un profilo di espressione in parte specifico e in parte sovrapponibile a quello di Emilina-1, sia durante lo sviluppo embrionale sia nell'animale adulto (Braghetta et al., 2004). Come Emilina-1, anche Emilina-2 è espressa in diversi tessuti extraembrionali, tra i quali l'endoderma viscerale extraembrionale, il cono ectoplacentale e le cellule della decidua. Nell'embrione, l'mRNA di Emilina-2 è presente in diversi organi, ma l'espressione più elevata è a livello cardiaco, limitatamente al tessuto miocardico, a partire dallo stadio E8.5 e con un picco allo stadio E11.5. Diversamente dagli altri membri della famiglia delle emiline/multimerine, Emilina-2 è espressa anche nel sistema nervoso centrale, dove risulta presente fino a stadi avanzati di sviluppo (Braghetta et al., 2004). Nell'adulto, l'espressione di Emilina-2, come quella delle altre emiline/multimerine, decresce in

modo generalizzato e si mantiene evidente soprattutto nel sistema cardiovascolare ed in minor misura nella milza e nell'utero (Braghetta et al., 2004). Uno studio in cui è stata analizzata l'espressione di Emilina-2 a livello dell'orecchio ha rivelato che Emilina-2 è un componente abbondante della membrana basale cocleare, indicando un possibile ruolo funzionale della proteina in questo organo (Amma et al., 2003).

Un recente studio ha introdotto per Emilina-2 una funzione inattesa e sconosciuta in precedenza, dimostrando che la trasfezione del cDNA *full length* in diverse linee cellulari ne rallenta la crescita ed induce l'apoptosi mediante l'attivazione della via estrinseca, in seguito al legame diretto con i recettori DR4 e, in misura minore, DR5 (Mongiati et al., 2007). Dopo il legame, questi recettori della famiglia TRAIL si raggruppano e ridistribuiscono in *rafts* lipidici, inducendo l'assemblaggio del complesso DISC e l'attivazione delle caspasi iniziatrici ed effettrici. Il *knockdown* di *Emilin2* aumenta la sopravvivenza di cellule trasformate, mentre la sua sovraespressione riduce drasticamente, mediante una massiva apoptosi, la clonogenicità e la neoplasticità di cellule tumorali in modelli 3D *in vitro*. Questi dati dimostrano un'inaspettata interazione diretta tra un componente della matrice extracellulare e recettori coinvolti nell'apoptosi ed aggiungono ulteriore supporto al ruolo delle proteine della matrice nella regolazione della sopravvivenza cellulare e dell'omeostasi tissutale (Mongiati et al., 2007).

1.1.3 Multimerina-1

Multimerina-1, precedentemente nota come Multimerina, è una proteina multimerica secreta dalle piastrine e dalle cellule endoteliali vascolari (Hayward et al., 1995a). All'interno delle cellule, essa è presente come trimero di 150 kDa, ma una volta secreta si assembla mediante legami disolfuro in omomultimeri di dimensioni variabili dai 450 kDa ai milioni di dalton (Hayward et al., 1991). Perciò Multimerina-1, insieme al fattore di von Willebrand, è una delle più grandi proteine secrete da piastrine e cellule endoteliali. I monomeri di Multimerina-1 derivano da un precursore intracellulare, chiamato pre-promultimerina-1 che, sia nelle piastrine sia nelle cellule endoteliali, va incontro ad un taglio proteolitico a livello della porzione N-terminale, con il quale viene rimosso un propeptide di 27 kDa; inoltre, per la generazione della proteina matura, sono necessari processi di glicosilazione e polimerizzazione (Hayward e Kelton, 1995). Come Emilina-1 e -2, anche Multimerina-1 contiene un dominio EMI N-terminale, una lunga regione centrale *coiled coil* ed un dominio gC1q C-terminale. Multimerina-1 è la meno conservata tra le proteine della famiglia delle emiline/multimerine; essa infatti è priva del dominio collagenico e possiede due regioni peculiari: il propeptide, collocato tra il peptide segnale e il dominio EMI, ed un dominio EGF-*like*. Inoltre il dominio EMI della Multimerina-1 è privo di uno dei residui di cisteina che sono altamente conservati in tutte le altre proteine della superfamiglia EDEN (Doliana et al., 2000a).

Studi di immunistochemica hanno dimostrato che nei tessuti adulti la distribuzione di Multimerina-1 è limitata ai megacariociti, alle piastrine ed alle cellule endoteliali, mentre la proteina è assente nel plasma (Hayward et al., 1991). A livello delle piastrine, Multimerina-1 si localizza negli α -granuli, dove forma con il fattore V della coagulazione un complesso che, in seguito all'attivazione piastrinica, si dissocia e viene liberato dai granuli. Agendo appunto come *carrier* proteico del fattore V, Multimerina-1 può avere un ruolo nell'accumulo e nella stabilizzazione di quest'ultimo e quindi nel processo della coagulazione (Hayward et al., 1995b). La somiglianza di Multimerina-1 a proteine adesive della matrice extracellulare, la sua localizzazione nell'endotelio vascolare e la sua associazione con le piastrine attivate, le cellule endoteliali e la matrice extracellulare suggeriscono che essa possa svolgere un ruolo nel supportare la funzione delle piastrine e dell'endotelio dei vasi nei siti di danno vascolare (Hayward et al., 1998).

1.1.4 Multimerina-2

Multimerina-2, diversamente da tutte le altre proteine della famiglia, è espressa solamente a livello endoteliale. Originariamente chiamata Endoglyx-1, è stata identificata per la prima volta in uno studio volto all'analisi di tessuti umani normali e neoplastici alla ricerca di antigeni endoteliali specifici (Sanz-Moncasi et al., 1994). Come le altre proteine della famiglia delle emiline/multimerine, Multimerina-2 contiene una sequenza segnale nella regione N-terminale seguita dal dominio EMI, una lunga regione centrale in grado di formare strutture *coiled coil* e un dominio gC1q C-terminale. Il dominio EMI di Multimerina-2 condivide il 38% di identità di sequenza con il dominio EMI di Emilina-1 e il 34% con quello di Multimerina-1, inoltre la cisteina C2 del dominio è spostata di quattro residui a valle rispetto agli altri domini EMI. La regione *coiled coil* è separata dal dominio gC1q da un gruppo di aminoacidi carichi positivamente che contiene sequenze consenso comuni a proteine che interagiscono con i glicosaminoglicani (Christian et al., 2001).

Studi immunistochemici su tessuti normali e neoplastici di feto ed adulto, hanno dimostrato che la proteina ha una distribuzione ristretta agli endoteli di vasi sanguigni, con un'interessante eccezione rappresentata dai sinusoidi epatici e splenici (Sanz-Moncasi et al., 1994). L'analisi immunistochemica ha anche rivelato che Multimerina-2 è presente sulla superficie luminale delle cellule endoteliali. In particolare, essa sembra particolarmente abbondante a livello di capillari tumorali e siti di neoangiogenesi (Belien et al., 1999). Esperimenti di RT-PCR in topo hanno rivelato la presenza dell'mRNA di Multimerina-2 in morula, in blastocisti e in cellule ES allo stadio indifferenziato (Braghetta et al., 2004). Studi di ibridazione *in situ* hanno evidenziato nei tessuti extraembrionali e materni una distribuzione complementare a quella di Emilina-2, con espressione nella piastra corionica e nell'allantoide e nei vasi sanguigni della decidua. Inoltre

l'mRNA è stato rilevato nello strato esterno di cellule delle isole sanguigne in stadi precoci dello sviluppo del sistema vascolare e, a stadi successivi, esclusivamente nelle cellule endoteliali di tutti i vasi sanguigni e nell'endocardio (Braghetta et al., 2004). Nello sviluppo postnatale, i livelli di espressione di Multimerina-2 si riducono e l'mRNA diviene scarsamente rilevabile negli organi adulti, ad eccezione del rene (Braghetta et al., 2004). Complessivamente, il profilo di espressione ristretto specificamente all'endotelio indica un possibile ruolo della Multimerina-2 nei processi di vasculogenesi, di angiogenesi o di emostasi (Christian et al., 2001).

1.2 La famiglia emid: Emid-1 ed Emid-2

Le glicoproteine Emid-1 ed Emid-2, in origine denominate rispettivamente Emu1 ed Emu2, furono isolate in uno studio mirato ad identificare geni espressi durante lo sviluppo del rene (Leimeister et al., 2002). Queste due proteine sono significativamente più piccole ed hanno una struttura molto diversa rispetto agli altri membri della superfamiglia EDEN. Infatti, esse presentano il caratteristico dominio EMI all'estremità N-terminale, ma sono prive sia della lunga regione *coiled coil* sia del dominio C-terminale gC1q, mentre possiedono due ampie regioni collageniche a valle del dominio EMI (Doliana et al., 2000a). Anche l'organizzazione genomica è differente rispetto alle altre proteine della superfamiglia. Il gene umano *EMID1*, localizzato nella regione cromosomica 22q21.1, ha 15 piccoli esoni, mentre il gene umano *EMID2*, localizzato nella regione cromosomica 7q22.1, ne contiene 13. Nonostante i cDNA di Emid-1 e di Emid-2 siano piuttosto piccoli, entrambi i geni sono relativamente grandi estendendosi rispettivamente per 54 e 196 kb (Leimeister et al., 2002). Emid-1 e -2 sono prodotte sotto forma di polipeptidi di circa 60 kDa e si assemblano a formare omo- ed eterodimeri di 120 kDa, trimeri di 180 kDa ed aggregati con peso molecolare più elevato (Leimeister et al., 2002). Le due proteine mostrano non solo una similarità strutturale, ma anche profili di espressione complementari all'interno di organi che si sviluppano attraverso interazioni epitelio-mesenchimali, come il rene. In questi organi, infatti, *Emid-1* è ristretto alle cellule di tipo epiteliale, mentre *Emid-2* viene espresso a livello delle cellule mesenchimali (Leimeister et al., 2002).

1.3 La famiglia delle emiline tronche: Emilina-3

Emilina-3, precedentemente denominata Emilina-T o Emilina-5, è stata inizialmente identificata mediante analisi bioinformatiche mirate alla ricerca di proteine contenenti il dominio EMI (Doliana et al., 2000a). Come per i membri della famiglia delle emiline/multimerine, anche la porzione N-terminale di Emilina-3 è occupata da un breve peptide segnale e dal dominio EMI, seguiti da una lunga regione in grado di formare ripiegamenti di tipo *coiled coil*. Tuttavia tutti i

domini a valle di questa regione sono assenti nell'Emilina-3, caratteristica che ha portato alla costituzione di una terza famiglia, quella delle 'Emiline tronche' (Braghetta et al., 2004). In particolare, la caratteristica più rilevante di Emilina-3 è l'assenza del dominio gC1q presente in tutte le altre emiline/multimerine (Figura **A.4**). Studi mediante trasfezione di cellule in coltura hanno dimostrato che Emilina-3 è prodotta inizialmente come un polipeptide di 89 kDa e successivamente sottoposta a N-glicosilazione estensiva con la formazione di un monomero maturo di 103 kDa. Questo monomero si assembla in dimeri e trimeri stabilizzati da ponti disolfuro, che vengono infine secreti nello spazio extracellulare (M. Zanetti e P. Bonaldo, dati non pubblicati). Considerate le funzioni adesive e di interazione del dominio gC1q ed il ruolo proposto per esso nel processo di assemblaggio delle emiline (Mongiat et al., 2000; Spessotto et al., 2003), la sua assenza potrebbe avere conseguenze non indifferenti sui meccanismi di assemblaggio di Emilina-3 e sulle sue funzioni. Pertanto è possibile che Emilina-3 non sia in grado di formare grandi multimeri e che abbia ridotte proprietà adesive.

Analisi comparative della sequenza del dominio EMI di Emilina-3 con quelle di Emilina-1 e Emilina-2 hanno rivelato un'elevata percentuale di similarità, rispettivamente del 69% e del 71%, mentre il grado di similarità con le due Multimerine e con le Emid è molto più basso. Considerate le dimensioni del cDNA (4036 bp), il gene murino per Emilina-3 ha una struttura molto compatta, estendendosi per sole 6.4 kb nel cromosoma 2 (2H2), ed è organizzato in 4 esoni separati da 3 piccoli introni (Figura **A.2**). Gli esoni e gli introni hanno una lunghezza media di 1000 bp e 780 bp rispettivamente, per una capacità codificante di circa il 60% (P. Bonaldo, dati non pubblicati). Questa percentuale, molto vicina a quella di *Emilin1*, è molto più molto più elevata della maggior parte dei geni codificanti per componenti delle fibre elastiche, come Elastina e MAGP-2 (10%) o Fibrillina-1 (5%). L'organizzazione genica di Emilina-3 è simile a quella delle altre emiline/multimerine: l'esone 1 contiene la regione non tradotta al 5' ed il peptide segnale, gli esoni 2 e 3 contengono la sequenza codificante per il dominio EMI (78 aa), mentre la lunga regione *coiled coil* (627 aa) e la sequenza non tradotta al 3' sono codificate dall'esone 4 (Figura **A.3**).

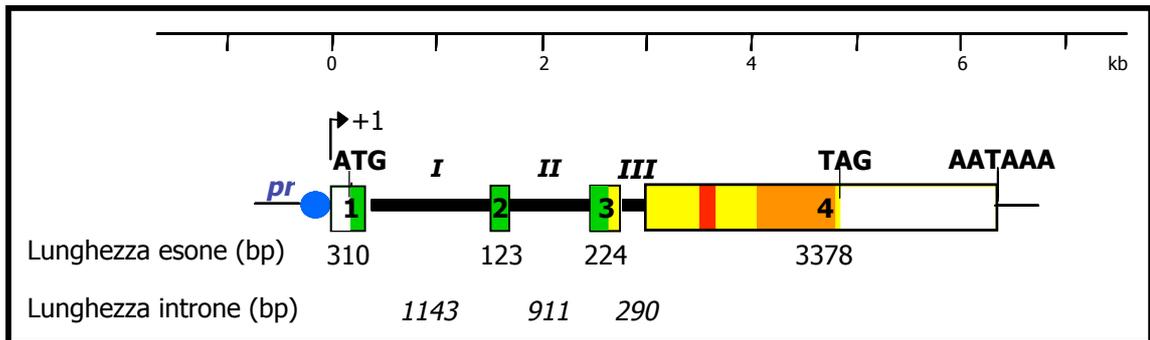
In uno studio mirato ad identificare geni coinvolti nella mineralizzazione della matrice extracellulare, è stato dimostrato che l'espressione di Emilina-3 viene fortemente indotta in cellule staminali mesenchimali umane trattate con un mezzo di coltura arricchito di fattori osteogenici (Doi et al., 2003). L'espressione del suo omologo murino, rilevata mediante analisi immunostochimiche su embrioni allo stadio E13.5, è risultata elevata nelle regioni del pericondrio circostanti la cartilagine primordiale degli arti e nei corpi vertebrali, mentre è quasi assente negli osteoblasti maturi. Queste caratteristiche di espressione suggeriscono che Emilina-3 possa svolgere una funzione importante nel processo di osteogenesi (Doi et al., 2003).

Figura A.2: Sequenza del cDNA *full length* di Emilina-3 murina. Le cinque frecce indicano i confini degli esoni. Le sequenze evidenziate in azzurro corrispondono alle regioni 5'-UTR e 3'-UTR. Le sequenze in verde indicano il codone di inizio, incluso il sito di legame del ribosoma (sottolineato); in rosso il codone di stop; in viola il segnale di poliadenilazione; in arancione la coda poli(A).

TGGG GGGAG	GCAGCG GCGG	CACAGCTCCA	GGCGGGGAA	CCAGCGCGCT	CCGGGGGTCCG	GTCGGGAGTG	70
GCCGC GGGAG	CCCGGAGGGC	GAGCGGAGGA	TCCCCCGGG	GAGGCACCCC	GAGGGACAGA	GTGACGACC	140
AGCGCGATGG	GCCGCC GTCT	GTCCTGT TGG	CTGTGCACCG	TCGGGGCGCT	GCTCTGGGG	GCGCAGGCCA	210
AGGGC ACGCC	TCCTCTCGCG	GGCCCGCAC	AGCCCACTGC	CTCCCGTTAC	AGCCTCTACA	CCACCGGATG	280
GCGTC CGCGG	CTGGCG CCGG	GGCCACA CAA	GTCCTCTGT	GCCATGTGG	TACACAGAAA	TGTGACCTGC	350
GTCTACAG	AGGGAG CAGA	GAGCTATATA	AAGGCTGAGT	ACCGGAACCTG	TGGGTGGGA	CCCACCTGCC	420
CTTCAACAGT	CAGGTA CCGC	ACAGTGT TCA	GACCCAGATA	CAAGATTGGC	TACAAGACCG	TGACAGACCT	490
GGCGTGGCG	TGCTGC CCTG	GTETTAC TGG	GGAAAGTGC	CCTAGAACCC	TCACAGACCA	TGGAGCC ACC	560
CCACC CCACC	AGGAGC CAGA	GGCTCAG ATT	CCCTTGGGGC	AGCTGGGCCC	AGGTCCCAAG	CCTTCTC CTT	630
ACAGCAGAGA	GGCCCC GCGC	CCCCGTG GAA	GAAAAGGCCA	AGGGCCGTTT	GGTGAGCGGC	TAGAACAGCG	700
CCTGT CCGAA	GCATATGGCA	CCCTGAG TGG	ATTGGTAGCC	AGCCACGAGA	ATCCC AATAG	GATCACTGGT	770
GACTC CAGGG	CCCCTG TCGT	ACCTATA GGC	TTTGGGGTCA	TCCCCGAGGG	TCTTGTGGCC	CCAGAGACA	840
GAGGC AGAGG	ACCACCTATC	CCTCCTC TGA	GTGAGATCCT	GAGCAAGGTC	ACAGAGGTGA	GCAACAC ATT	910
ACAGACCAG	GTGACG CTGT	TAGATGAGGT	GCGTGGGCTG	GCCCTGGGGC	ATGAGGCTCA	CCTGCAG CCG	980
CTCCG GGAAG	CCCCGC CATC	CCCGCTG ACC	TCCTTAGCGC	CCCTAGAGGA	ATACGTGGCA	CAGCGCC TGC	1050
AGCGA CTCTG	GGGGAG CCTG	CTGGATG GCT	TTGAGCAGAA	GCTGCAAGGT	GTCCAGAGCG	AGTGTGACCT	1120
TCGGG TGC AA	GAGGTG CCGC	AGCAATGTGA	GGAGGGCCAG	GCAGCCAGCC	AGCGCTTGCA	TCAGAGC CTC	1190
GATGG CCGAG	AGCTTG CCTT	GGTCCGG GAG	CTCTCCCAAGC	TGGGCAC TCA	GCTGCAGGCG	TTGACTC TGA	1260
CTGGTGGGG	CACCTG CTGC	AGCCAC TGG	CTTTGATCAG	TGCCCCGGTG	GACAGCCTTG	AGAGGAA CCT	1330
GCAGG CTGTG	ACTGAG ACCC	AAGGTGG CCC	GGGCACCTCG	GCCCGGGATG	AGCTTGGCG	CCTCTCT GCA	1400
GCTAT GCTTC	AGGGAG GTGT	GGACGGG CTG	CTTGAAAGCC	TTGAGACTAT	CAATGGGACA	GAGAAATG GAG	1470
CAAGG GGC TG	CTGTCT GAGA	ATGGAGG TGG	GGGGCTGGG	TGTCGGTGGC	TTCCGGGTC CA	CGCTGGAA CA	1540
GCGAG TGCAG	AGCCTA GAGG	AGCGGCT GGC	AACCTGACC	GGAGAGCTAA	GGCCCGAG AG	TGCCATA CCA	1610
GACAG ATCAG	CGCGGC CGCT	TGTTCA TCA	GAACTAGCAG	TACTGGAA CA	AAGGCTGG TG	TCCCTGG AGA	1680
CCTCG TGCAC	CCCAAG TACC	ACCACAG CCA	TCCTGGACA	CCTCGTGGCA	GAGGTGAA GG	CCTGGCA GAG	1750
CCGGA GCGAG	GCTCTC CTAC	ACCAGGT GGC	TCGTCAACT	GCCCTGCTCC	AACAGCTC AA	TGGCAGG GTA	1820
GCTGA AGTCC	AGGGGC AGCT	GGCAGAA GGG	ACAGGCAGCT	CACTGCAAGG	GGAGATCACT	CTCTTGA AAG	1890
TCAAC CTGAA	CTCAGT GAGC	AAGTCACTCA	CGGGCTCAG	CGACTCTGTC	AGCCAGTACT	CTGATGC CTT	1960
CTCGG CTGCC	ABCACA TCCC	TGGATGA ACG	AGAAAGCAAGA	GTGGAAGCCG	AGGTCCAC AC	CATCCAG GAA	2030
CAGAT CAGCA	GCCAGG GCTC	AGGGCTT CAG	GCTGGCC ACA	GGCAGGTCCCT	GAACTTCG GA	GGGGAGC TGG	2100
AGCAA CTCAA	GGCTGG CATG	GCCAATG TGG	CTAGAGGGTT	GAGCCGCTGC	CGGGACAC AG	CCCAGGA ACT	2170
CCAGC ATACA	GTGGGC CACT	TTGACCA GAG	GGTGGCCCAA	GTGGAAGGAG	CATGTGAG AG	GTTGGGC CTG	2240
TTGGC AACCC	ACCTGA ACAG	TCTGCCCT ACT	GAGCAGCTGA	GGTCCAGGGA	GGGCC TGT GG	GGCCACATAG	2310
ACAAG CTGAA	CCACAC ATTG	GGCCAGC ACT	CGCAGGATAT	CGCCCGGCTC	CGGGATGACC	TGTTGGA CTG	2380
CAGAG CTCAG	CTGGCT GAGG	TGAGGCC AGG	GCGAGCTGAC	TAGGATCGAT	GCACAG AAAG	CGAAGT GCA	2450
GATCC CACCA	ACCCTG GGA	TATCATE CCA	GAGATCAACT	CTACC TGGAA	ACACCTTC CA	GGCC TCC CTG	2520
ACTGT TTCAG	CCATCA AAAG	TCACCCT CAG	AGCTGCAGCC	TGGACAA TTC	AGGGTAA CAG	TCAGAGGT GAG	2590
CTACA CCGGA	TGCTGT CTCA	AGAGTCA AGG	CAAGGACGCC	ATGCCCGAAC	CCAAAGCT GG	GCTTCTG AGA	2660
TGGCA CGCTG	CATCGT CTGC	GGTCTCT CTT	ATTTGCAGAC	ACACTGGAGT	TAGCAACTGT	GCAGTTT CCT	2730
GACCA AGTCT	CAGACA AGCT	TGCCCAE TGT	TCCCTTTACT	AACCAAGGAC	CAGTCAAGCG	ACTCGGG GGG	2800
TGGGG AGGTG	GGGCAT CTCT	TCC TTTG TCC	CTGAGCTTCT	AGCCTTAGAT	ACTGGATG AG	GTTTCTA CAG	2870
GAAGA TGATG	CCC ACTGGAC	CTCTCTG GCA	GTTTCATAGG	TGCTATTTCT	GAACTAAA GA	CCAGAGG CCA	2940
CCTGA GGTTT	CCAGCT CCCC	ACACATE CTT	CAGAACAGAA	CAAAAGCCCA	GCGGCCAAGC	CAAGAGC GCT	3010
CCATA TTCCT	TTTGAT CTTG	CCTCGTG ATG	AGGGTGCAGG	CAGCTGTAGA	ATCCC AAA GA	AGGGATCCAA	3080
ACAAT GTTTG	ABGACC CCAC	CCC AATT TAT	CTTTTTCTT	TGATTTACA	AATACACC CA	CCCACAC GGT	3150
CCTCT CTCCA	GTTAGA GGAA	AATCTCT CCC	ACCACACTATG	GTCAGTACC	CTTGC CAA GG	GCAGCCT TAG	3220
AGTAT GCTGA	GGCAGA CCCC	AGGAAAG GGG	CTGGCACTGA	ATGAAAAGGA	AGCTAGC TT	TTAAAAG TCC	3290
ACGCA AAACC	CCAGCC TCGC	AAGGAA C TTC	ACA AACTGGA	GAGAAAGCTGG	GGTGG AAG CC	ATTGAGG AAA	3360
ACACA TGTGT	TTAGAG AGAG	ACTGACC ATT	TCTGCTGAGG	CTCCTGGCCT	CAGTTTCC CC	CAATGCA CCC	3430
TGGGC CTGCC	GTGCTG TTTG	TCTCTCC CAC	TGCCCTGCAT	TCAGTGT TTG	CCCTCCAC TC	TGATGTG GAT	3500
TGGAA AACAG	GCTAAG GATT	AAACCT TTTA	ACCGGTCTGA	AGGTGTTTTC	TTCACTAA TG	GCAATGG GAG	3570
GGGAA GCTAA	CTGCCA TCCT	GTGTCTCTGT	GTGCC TTTGGA	CGGTTGCTCT	CTCAGCCA GC	TGGCCAC AAG	3640
ACTGA GCTGC	AGAGGC CAGG	GCAGGGT GGT	CAGCAAA CAC	CATCTGTTGT	AGCTAGGATT	GGGCTAA GCC	3710
CCAGG AAAAG	GGTGAAGTCA	CCAGGGG CAG	GCAGGAA CCA	CACGCCATGA	GCCCTTGT AC	GACCTCC AAA	3780
TCATT TTCCT	TTTGGT CAGA	GGGGCTT TGG	CCTATTC AGG	CTTGGAGCTG	AGATTTCA AG	GTAGAGG AAG	3850
AAGTA ATGCT	TAGATC GAGA	CCTGCGG GCA	GAGAGACAGG	ATCACCTGGC	TTTGGAGG GT	AGCCTGG GCT	3920
CCCGA AAAGT	CGTCTT CCA	GATGATA CAT	CAAGGACCTG	GGTTCTCAAC	CTTCTTAA AG	TTGTGAT TCT	3990
TTAATACCT	TCCTCG TGTT	GT	TTATTTTCAT	TGCT			4044

Figura A.3: Struttura del gene *Emilin3*. Il gene si estende per 6.4 kb e contiene quattro esoni (310 - 3378 bp) e tre introni (I-III). In bianco è evidenziata la sequenza trascritta non codificante (5'- e 3'-UTR); in giallo, le sequenze codificanti per regioni non modulari; in verde le sequenze codificanti per il dominio EMI; in arancione le sequenze per le regioni *coiled coil*; in rosso le sequenze per i motivi *leucine zippers*; in blu la regione del probabile promotore. Il sito di inizio della trascrizione è indicato con una punta di freccia, mentre i siti di inizio e fine traduzione sono indicati dai corrispondenti codoni ATG e TAG.

Figura A.4: La sequenza aminoacidica di *Emilina3* murina. Il dominio EMI è racchiuso da un rettangolo azzurro. La regione *coiled coil* è segnata in giallo, e sono sottolineate due sequenze con una probabilità molto elevata di formare strutture *coiled coil*. I probabili domini *leucine zipper* sono racchiusi da un rettangolo arancione. I residui aminoacidici sono numerati a partire dal residuo di metionina iniziale. Il probabile sito di taglio del peptide segnale N-terminale è indicato con una punta di freccia. I residui di cisteina ed i cinque putativi siti di N-glicosilazione (NXS/T) sono marcati in rosso e in blu, rispettivamente. L'asterisco indica l'aminoacido C-terminale.



1 MGRRLSVWL **C** TVAALLSGAQ AKGTPLLARP AQPSASRYSL YTTGWRPRLR

51 PGPBKSL **CAY** VVHR **NVT** **C**VL QEGAESYIKA EYRN **CGWGN** **C**PSTVRYRTV

101 FRPRYKIGYK TVTDLAWR **CC** PGLTGES **C**PE HLTDHGATPP HQEPEPQIPL

151 GQLGPGPRPS PYSREAPRPR GRKGQGFGE RLEQRLSQAY GTLSGLVASH

201 ENPNRITGDS RAPVVPIGFG VIPEGLVAPE DRGRGPLIPP LSEILSKVTE

251 VSNTLQTKVQ LLDEVRLAL GHEAHLQRLR EAPPSPLTSL ALLEEYVDQR

301 LQRLWGSLLD GFEQKLQGVQ SE **CDLRVQEV** RQQ **CEEGQAA** SQRHLQSLDG

351 **RELALRRELS** **QLGTQLQGLT** LTGGGT **CC**SQ LALISARVDS LERNLQAVTE

401 TQGGPGLAA DELARLSAAM LQGGVDGLE GLETI **NGT**EN GARG **C**CLRME

451 VGGWVGGFG STLEQRVQSL EERLATLTGE LSPESAIPDR SARPLVHSEL

501 AVLEQRLVSL ETS **CTPSTTT** AILDNLVAEV **KAWQSRSEAL** **LHQVARHTAL**

551 **LQQL** **NGT**VAE **VQGQLAEGTG** SSLQGEITLL KVNLSNSVSKS LTGLSDSVSQ

601 YSDAFSAA **NT** **S**LDERERRVE AEVHTIQEQI SSQGSRLQAG HRQVLNLRGE

651 LEQLKAGMAN VARGLSR **CRD** TAQELQHTVG HFDQ RVAQVE GA **C**ERLGLLA

701 **THLNSLPTEQ** LRSREGLWGH **IDKL** **NHT**LAQ **HTQDIARLRD** DLLD **CRAQLA**

751 **EVRPGRAD***

1 INTRODUZIONE

1.1 Il topo come organismo modello per studi di genomica funzionale

L'identificazione di nuovi geni e di sequenze altamente conservate nei genomi umano e murino si è dimostrata molto più rapida della capacità di studiarne le funzioni; la genomica funzionale si pone come obiettivo quello di colmare il vuoto di conoscenze che si è aperto tra la determinazione della sequenza di un gene e la comprensione delle sue funzioni all'interno di un organismo vivente. Il topo si è rivelato un modello ideale per questo tipo di studi, avendo un genoma molto simile a quello umano, dal momento che tranne rare eccezioni ogni gene umano ha un omologo murino. Inoltre il topo condivide con l'uomo molte caratteristiche anatomiche, fisiologiche e riproduttive e il suo genoma può essere manipolato ed analizzato con relativa facilità. Sebbene altri organismi inferiori siano modelli eccellenti per lo studio del ciclo cellulare e di molti processi dello sviluppo, il topo è il modello migliore per indagare sistemi fisiologici complessi tipici dei mammiferi, come quello immunitario, endocrino, cardiovascolare o scheletrico. Analogamente all'uomo, il topo sviluppa naturalmente patologie che colpiscono questi sistemi, ed inoltre altre malattie che colpiscono normalmente l'uomo, ma non il topo, possono essere indotte in quest'ultimo manipolandone il genoma o l'ambiente di vita (Hogan et al., 1994).

L'utilizzo del topo come organismo modello ha diversi vantaggi rispetto ad altri mammiferi: i topi possono essere allevati con relativa semplicità ed economicità; sono di dimensioni ridotte e quindi pratici da maneggiare; il ciclo vitale (1.5-2.5 anni) e la capacità riproduttiva (6-8 nati per ogni gravidanza, fino a 5 cucciolate per anno) rendono questi animali particolarmente adatti a diversi tipi di studi; circa un secolo di studi di genetica classica e molecolare ha reso disponibile, oltre alla completa sequenza del genoma murino, un gran numero di marcatori polimorfi e numerosi ceppi di topo geneticamente caratterizzati; sono state sviluppate diverse tecniche di manipolazione del genoma murino, basate anche sull'utilizzo di cellule staminali embrionali (ES), che permettono di ottenere topi transgenici con vari tipi di modificazioni genetiche mirate o casuali (Altman e Katz, 1979; Heiniger e Dorey, 1980; Nagy et al., 2003).

Il metodo più efficace per stabilire le funzioni biologiche di un gene all'interno di un intero organismo è quello di analizzare *in vivo* gli effetti che una mutazione può provocare. Storicamente ciò è stato ottenuto analizzando l'effetto di mutazioni spontanee o indotte chimicamente o con radiazioni, ed in circa un secolo sono state identificate nel topo più di mille mutazioni (Doolittle et al., 1996). Molti di questi animali mutanti richiamano per fenotipo patologie presenti nell'uomo e, in

un ampio numero di casi, mutazioni in geni omologhi sono state identificate in entrambe le specie (Bedell et al., 1997). La disponibilità di più di 400 ceppi *inbred* di topo ha semplificato l'identificazione e lo studio di queste mutazioni (Festing, 1994). I ceppi *inbred*, inizialmente utilizzati per la ricerca sul cancro (Morse, 1981), sono quei ceppi prodotti da almeno venti generazioni successive di accoppiamenti tra fratelli e sorelle. Recenti progressi nelle tecniche di mappatura genetica e la conseguente disponibilità di numerose mappe su larga scala del genoma murino, lo sviluppo di marcatori genetici altamente polimorfici analizzabili con tecniche di PCR, come gli SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*) o i minisatelliti (Copeland et al., 1993), e la possibilità di comparazione con diversi genomi, primo fra tutti quello umano, hanno reso possibile la rapida localizzazione cromosomica di geni e di nuove mutazioni rilevanti per molte malattie di interesse medico.

Nelle ultime due decadi, la disponibilità di nuovi strumenti genetici, soprattutto la produzione di topi transgenici e *knockout*, ha reso possibile effettuare studi prima irrealizzabili, portando ad un aumento nel numero di animali mutanti di almeno un ordine di grandezza (Hardouin e Nagy, 2000). Con lo sviluppo della tecnologia del *gene targeting* e della capacità di manipolazione delle cellule ES infatti è diventato possibile modificare il genoma murino con l'introduzione, attraverso il meccanismo della ricombinazione omologa, di mutazioni geniche mirate, sia di tipo "*knock out*", con le quali un gene normale viene sostituito con una versione difettiva dello stesso, che "*knock in*", con le quali invece un gene viene modificato con alterazioni fini o inserito in una posizione anormale nel genoma (Ramirez-Solis et al., 1995; Thomas e Capecchi, 1987; Gao et al., 1999).

1.2 Mutagenesi e transgenesi in topo

Mutazioni nel genoma murino possono essere generate usando tecniche diverse, dall'induzione con agenti chimici e radiazioni ionizzanti, alla manipolazione del genoma per la produzione di animali transgenici e *knockout*. Concettualmente due sono gli approcci generali di genomica funzionale che si sono sviluppati parallelamente nel topo: uno è l'approccio fenotipo-guidato (*phenotype-driven*), l'altro è l'approccio genotipo-guidato (*genotype-driven*) (Brown e Nolan, 1998). Nel primo caso, il punto di partenza è lo studio dell'effetto fenotipico di mutazioni spontanee o indotte casualmente nel genoma, allo scopo di individuare fenotipi interessanti per la patologia umana, dai quali successivamente vengono identificati i geni e la natura delle mutazioni responsabili della patologia. L'approccio fenotipo-guidato non prevede quindi alcun presupposto sui geni coinvolti e fornisce una via molto potente per l'identificazione sistematica di vie genetiche rilevanti per la patologia umana; tuttavia, tale approccio richiede procedure adeguate e particolarmente complesse sia per individuare i fenotipi di interesse sia per l'identificazione dei geni

coinvolti. Nell'approccio genotipo-guidato, invece, il punto di partenza è la produzione di mutazioni definite nel genoma murino e solo successivamente viene analizzato il fenotipo che ne deriva. Tale approccio prevede in genere la generazione di mutazioni mirate a livello di geni noti (*gene targeting*) mediante ricombinazione omologa in cellule ES; tuttavia, le caratteristiche di tale approccio non lo rendono facilmente applicabile allo studio sistematico ed in grande scala dell'intero genoma. Un approccio più sistematico, in parte simile a questo ma che agisce in maniera più casuale, è il *gene trap* (Brown e Balling, 2001).

Agli esordi dell'impiego del topo come sistema modello, i ricercatori disponevano unicamente di mutanti generatisi spontaneamente, con un tasso di mutazione per *locus* genico molto basso, pari a circa 1 su 100.000 (Charles, 1950). Poiché l'analisi genetica funzionale richiede la disponibilità di mutazioni, vennero utilizzati dei sistemi per aumentarne la frequenza, con approcci di mutagenesi su larga scala. Dapprima vennero utilizzate le radiazioni ionizzanti e i raggi-X, i raggi γ ed i neutroni, che generano mutazioni a livello germinale (Russel, 1951; Green e Roderick, 1966); in seguito sono state indotte mutazioni mediante l'utilizzo di agenti chimici. Gli agenti inducenti sono raggruppati in tre gruppi principali, dei quali il primo include l'etilnitrosourea (ENU) e la metilnitrosourea (MNU), il secondo il clorambucile ed il melphalan e il terzo comprende sostanze come l'acrilamide e la ciclofosfamida (Russel, 1991 e 2000). Gli agenti del primo gruppo agiscono sulle cellule germinali staminali, gli spermatogoni, quelli del secondo sugli spermatidi precoci e quelli del terzo sugli spermatidi tardivi e sugli spermatozoi. Dal momento che ENU possiede un elevato potere mutageno, con una frequenza che può raggiungere le 6×10^{-3} mutazioni per *locus*, la maggioranza degli *screening* fenotipici su larga scala sono stati realizzati utilizzando questo agente alchilante che induce nel genoma mutazioni casuali (Balling et al., 2000). Se la mutazione indotta da ENU agisce con modalità dominante per un certo carattere, lo *screening* fenotipico può rilevare la mutazione già nella prima generazione (F1). Le strategie per svelare mutazioni recessive sono invece più complesse e dispendiose, dal momento che richiedono l'analisi di almeno tre generazioni di animali, limitando così l'efficienza di questo tipo di approccio.

L'introduzione e lo sviluppo di tecniche di trasferimento genico hanno reso possibile e sempre più comune l'uso di topi transgenici in campo biomedico, e quindi anche nel campo della genomica funzionale *in vivo*. Gli animali transgenici contengono un segmento di DNA esogeno, chiamato transgene, stabilmente integrato nel proprio genoma; se il transgene è presente nella linea germinale, allora esso verrà trasmesso anche alla progenie. Sono stati sviluppati numerosi approcci per la generazione di topi transgenici: l'infezione retrovirale, la microiniezione in pronuclei e più recentemente tecniche che utilizzano le cellule ES (Meisler, 1992; Gridley, 1991; Rijkers et al., 1994). Jaenisch e Mintz dimostrarono per la prima volta che del DNA estraneo, come il DNA virale di SV40, può essere introdotto in ovociti murini fecondati e rilevato poi nei tessuti degli

animali derivati da tali ovociti (Jaenisch and Mintz, 1974). Nella tecnica del trasferimento retrovirale, il transgene è inserito nel genoma di un retrovirus e racchiuso in particelle virali; queste particelle sono poi usate per infettare embrioni ad uno stadio precoce (da 8 a 16 cellule) mediante esposizione diretta o in co-coltura con linee cellulari producenti particelle virali (Van der Putten et al., 1985; Iannaccone et al., 1992; Kuehn e Stoye, 1992). Con questa tecnica di trasferimento si ottiene in genere l'infezione e quindi l'integrazione del DNA esogeno solo in una parte delle cellule dell'embrione, e si ha quindi la generazione di topi chimerici per il transgene; il transgene viene integrato come singola copia in siti multipli del genoma, con un processo di integrazione casuale. Questo può portare ad una espressione sregolata e causare effetti non desiderati. Oltre a questo, il principale svantaggio di questa tecnica è la necessità di generare e manipolare un grande numero di particelle retrovirali, così come la capacità limitata del genoma retrovirale, che limita la dimensione del transgene a circa 8 kb.

La microiniezione diretta di DNA purificato nel pronucleo di embrioni allo stadio di singola cellula è stata sviluppata come metodo alternativo per introdurre molecole di DNA di dimensioni maggiori rispetto a quelle permesse dalla tecnica dell'infezione con retrovirus ed è diventata perciò una tecnica standard per la produzione di topi transgenici (Hogan et al., 1994). Gli esperimenti pionieristici condotti da Lin nel 1966 dimostrarono che l'embrione di topo era in grado di sopravvivere alla manipolazione con un ago di vetro e che, dopo l'introduzione di macromolecole come albumina sierica bovina (BSA) in uno zigote, questo dava origine a neonati vitali dopo il trasferimento in una femmina resa pseudogravida. Nel 1980 Gordon ed i suoi collaboratori riportarono l'uso della microiniezione pronucleare come tecnica per la produzione di topi transgenici (Gordon et al., 1980). In seguito a questa scoperta, molti gruppi dimostrarono indipendentemente l'integrazione e l'espressione di DNA esogeno in tessuti di topi transgenici utilizzando questa tecnica (Brinster et al., 1981; Constantini e Lacy, 1981; Gordon e Ruddle, 1981; Harbers et al., 1981; Wagner E. et al., 1981; Wagner T. et al., 1981). Come per il trasferimento retrovirale di geni esogeni, il principale svantaggio di questa tecnica per la produzione di topi transgenici è la natura casuale dell'integrazione del transgene nel genoma. Se il transgene è integrato in giustapposizione con elementi regolatori di geni endogeni, possono insorgere effetti non voluti, definiti "effetti posizionali", che possono causare un'aumentata o ridotta espressione del transgene stesso (al Shani et al., 1990). Inoltre l'integrazione casuale del transgene può interrompere la sequenza di geni endogeni, con produzione di un ampio spettro di alterazioni, dalla letalità ad anomalie lievi o poco apprezzabili. D'altra parte questi effetti posizionali possono risultare utili nello studio di geni endogeni, come strumento per comprenderne la funzione, la regolazione e i profili di espressione tessuto-specifici necessari per un corretto sviluppo embrionale (Iannaccone et al., 1992; Zhon et al., 1993). La produzione di topi transgenici con la tecnica della microiniezione in pronuclei inoltre si è

rivelata utile per studiare gli effetti fenotipici conseguenti alla sovraespressione genica. Sono stati ad esempio studiati in questo modo geni codificanti per ormoni (Palmiter et al., 1982; Hammer et al., 1985), oncogeni (Brinster et al., 1984; Stewart et al., 1984), componenti del sistema immunitario (Storb et al., 1984), e geni coinvolti nel controllo dei processi di sviluppo embrionale (Wolgemuth et al., 1989; Kessel e Gruss, 1990).

Per superare il problema legato alla mancanza di specificità data dall'integrazione casuale, a partire dalla seconda metà degli anni '80 sono state sviluppate procedure in grado di trasferire una singola copia del gene di interesse in uno specifico *locus* bersaglio. Con tale scopo è stata sviluppata la tecnologia del *gene targeting*, inizialmente elaborata da Mario Capecchi ed altri gruppi pionieristici (Thomas et al., 1986), la quale sfrutta il fenomeno della ricombinazione omologa in cellule ES per la produzione di topi transgenici che manifestino un particolare fenotipo in seguito all'interruzione o mutazione di un gene endogeno. In questo caso, un gene endogeno viene sostituito con una copia difettiva che ne impedisce la corretta traduzione proteica, generando così un topo *knockout* (Capecchi et al., 2001).

Un altro approccio basato sull'uso di cellule ES e che consente, come nel caso del *gene targeting*, l'alterazione funzionale a livello genico, è la tecnica del *gene trap*. Similmente al *gene targeting*, il *gene trap* si basa sull'utilizzo di cellule ES; tuttavia, il *gene trap* agisce in maniera casuale e permette di caratterizzare la sequenza, l'espressione e la funzione di un gene qualsiasi all'interno del genoma (Zambrowicz et al., 1998; Cecconi e Meyer, 2000). Questa tecnica si basa sull'uso di differenti tipi di vettori per generare cellule ES con mutazioni inserzionali in un'ampia varietà di geni (Justice, 2000). Il vettore *enhancer-trap* consiste di un promotore minimale e di un gene reporter, il vettore *promoter-trap* contiene un gene reporter privo di promotore e un marcatore selezionabile, mentre il vettore *gene-trap*, oltre agli elementi del vettore *promoter-trap*, contiene un sito accettore per lo *splicing* a monte di un gene reporter *lacZ* privo di promotore: in questo caso, dopo l'integrazione casuale nel genoma delle cellule ES, il marcatore *lacZ* sarà attivato qualora si sia integrato all'interno di un gene trascritto (Stanford et al., 2001). I vantaggi principali di questa tecnica consistono nel fatto che i vettori si inseriscono in modo casuale all'interno del genoma e che i geni mutati possono essere facilmente clonati mediante semplici reazioni di PCR. Inoltre, il profilo di espressione dei geni coinvolti può essere agevolmente analizzato mediante saggi istochimici per il marcatore *lacZ* (Stoykova et al., 1998). La trasmissione di questi vettori alla linea germinale murina tramite le cellule ES ha permesso di generare e analizzare fenotipicamente *in vivo* diverse linee di topi mutanti, omozigoti per ciascuna mutazione prodotta dal *gene trapping*. Per evitare la necessità di generare una grande quantità di topi dalle cellule ES mutanti corrispondenti, possono essere applicate diverse strategie di pre-selezione *in vitro*. In questo modo si possono realizzare con efficienze elevate approcci di *gene trap* per geni con un ristretto e

specifico profilo di espressione *in vivo* (Bonaldo et al., 1998). Lo svantaggio principale della tecnica di *gene trap* è che l'inserzione dei vettori, avvenendo casualmente, non sempre dà luogo a fenotipi in topo; infatti il gene mutato può mantenere intatti diversi esoni a monte dell'inserzione, con produzione di una proteina parzialmente trunca ma ancora funzionale, mentre la generazione di *knockout* completi con questa procedura è relativamente rara (Stanford et al., 2001).

1.3 La tecnologia del *gene targeting*

Il *gene targeting* è una tecnologia molto potente ed ampiamente utilizzata che permette di introdurre alterazioni geniche in modo mirato all'interno di un intero genoma, mediante ricombinazione omologa tra un vettore di inattivazione genica e la sua controparte endogena, portando alla mutazione di uno dei due alleli (Müller, 1999; Babinet e Cohen-Tannoudji, 2001). Le alterazioni geniche realizzabili in questo modo sono molto varie e spaziano da semplici mutazioni puntiformi a estesi riarrangiamenti cromosomici (Thomas e Capecchi, 1987; Müller, 1999). L'origine di questa tecnica si può ricondurre agli studi di ricombinazione omologa degli anni '70 nei lieviti, organismi nei quali la maggior parte degli eventi di ricombinazione sono eventi di ricombinazione omologa, al contrario di quanto avviene nei mammiferi, in cui è di gran lunga più frequente la ricombinazione casuale. La ricombinazione omologa in cellule di mammifero fu ottenuta sperimentalmente per la prima volta solo nel 1985 per il *locus* della β -globina, sebbene con una frequenza molto bassa (Smithies et al., 1985). La frequenza di ricombinazione omologa è influenzata da diversi parametri, come l'utilizzo di DNA isogenico, ovvero isolato dallo stesso ceppo di topo da cui sono derivate le cellule ES (te Riele et al., 1992), e la lunghezza dei segmenti di omologia tra il *locus* bersaglio e il vettore utilizzato (Hasty et al., 1991; Deng e Capecchi, 1992). La frequenza di ricombinazione rimane comunque *locus*-dipendente, ed è dovuta a differenze nella struttura della cromatina e quindi all'accessibilità agli enzimi coinvolti nel processo di ricombinazione.

Negli anni '80 vennero anche isolate per la prima volta le cellule ES murine, cellule totipotenti indifferenziate derivate dalla massa cellulare interna di embrioni allo stadio di blastocisti (Evans e Kaufmann, 1981; Martin, 1981). Pochi anni dopo fu dimostrato che le cellule ES possono essere reintrodotte *in vivo*, colonizzando un embrione ospite e dando luogo allo sviluppo di un topo 'chimera' i cui organi presentano contributi variabili di cellule completamente differenziate e derivate dalle cellule ES. Inoltre, fu dimostrato che le cellule ES sono in grado di colonizzare tutti i tessuti dei topi chimera, inclusa la linea germinale, anche dopo periodi relativamente lunghi di mantenimento in coltura, purché coltivate in condizioni opportune (Bradley et al., 1984; Gossler et al., 1986). In questo modo è possibile trasmettere alla progenie il gene mutato, dando origine ad animali eterozigoti e successivamente ad animali omozigoti, nei quali è possibile studiare gli effetti

fenotipici della mutazione (McMahon e Bradley, 1990; Soriano et al., 1991). Da questi esperimenti, sulla ricombinazione omologa da un lato e sulle cellule ES dall'altro, derivò l'idea di poter modificare il genoma murino tramite ricombinazione omologa in cellule ES.

Per la prima volta nel 1987, fu inattivato un gene in cellule ES mediante la tecnologia del *gene targeting*, corrispondente al *locus* codificante per l'ipoxantina fosforibosil-transferasi (*Hprt*). La scelta di questo *locus*, situato nel cromosoma X, fu motivata dalla possibilità di selezionare le cellule ES ricombinanti omologhe aggiungendo al mezzo di coltura la 6-tioguanina, un farmaco a cui solo le cellule *Hprt*⁻ sono resistenti (Doetschman et al., 1987, Thomas e Capecchi, 1987). Successivamente, grazie all'introduzione di nuove procedure di selezione, diventò possibile utilizzare questa tecnica anche per geni non direttamente selezionabili (Mansour et al., 1988; Schwartzberg et al., 1989). In particolare, fu messo a punto un ingegnoso metodo di doppia selezione delle cellule ES in grado di rendere più rapida ed efficiente l'identificazione dei cloni ricombinanti, dato che gli eventi di ricombinazione omologa sono assai rari nei mammiferi (Mansour et al., 1988). Nella procedura di doppia selezione, vengono inserite all'interno del costrutto due cassette, una per la selezione positiva e una per la selezione negativa. La cassetta per la selezione positiva è inserita all'interno della regione di omologia con il gene di interesse ed è costituita da un gene, generalmente il gene batterico codificante per la neomicina fosfo-transferasi II (*neo*^R), l'enzima che inattiva l'antibiotico neomicina e i suoi derivati, come G418 (noto anche come geneticina), tossici per le cellule di mammifero. Oltre a *neo*^R, sono stati utilizzati per la selezione positiva altri geni, come l'igromicina B fosfo-transferasi (*hyg*^R) e la puromicina acetiltransferasi (*puro*^R) (Mortensen et al., 1991; von Melchner et al., 1992). La cassetta per la selezione negativa invece viene inserita ad una o ad entrambe le estremità del vettore linearizzato, all'esterno della regione di omologia con il gene di interesse. Consiste nel gene per la timidina-chinasi di *Herpes Simplex* (*HSV-tk*), codificante per un enzima in grado di fosforilare alcuni analoghi nucleosidici come il ganciclovir e FIAU [1-(2-deoxy-2-fluoro-_-D-arabino-furanosyl)-5-iodouracil]. I nucleotidi non funzionali che ne derivano vengono incorporati nel DNA endogeno durante la replicazione ad opera della polimerasi cellulare, portando così al blocco della replicazione ed a morte delle cellule esprimenti tale gene ed esposte al ganciclovir. Dato che la cassetta *HSV-tk* viene inserita alle estremità del costrutto ed esternamente alle regioni di omologia, essa non viene integrata nel genoma delle cellule che integrano il vettore mediante ricombinazione omologa, mentre rimane presente nei casi di integrazione casuale. Altri marcatori per la selezione negativa utilizzati in alcuni studi sono il frammento della tossina difterica A (DT-A) (Yagi et al., 1990) e, più recentemente, un sistema di tossicità immuno-mediato (Kobayashi et al., 1996). Con il sistema della doppia selezione, quindi, usando contemporaneamente un farmaco per la selezione positiva come l'antibiotico G418, per selezionare le cellule che contengono una cassetta *neo*^R funzionale, e

un farmaco per la selezione negativa, il ganciclovir, per eliminare cellule che contengono una cassetta HSV-*tk* funzionale, è possibile arricchire la coltura in cellule ES che sono andate incontro al raro fenomeno della ricombinazione omologa. Con il metodo della doppia selezione si ottiene mediamente un arricchimento di 3-10 volte maggiore rispetto all'uso della sola selezione positiva, ma sono stati riportati anche arricchimenti molto più elevati (Capecchi et al., 2001).

I vettori utilizzati per il *gene targeting* vengono classificati come *replacement vectors* (vettori di sostituzione) e *insertion vectors* (vettori di inserzione). Nel primo caso il vettore è linearizzato in modo tale da mantenere le sequenze di omologia colineari a quelle del gene endogeno. Le sequenze cromosomiche vengono rimpiazzate dai due bracci di omologia del vettore grazie ad un doppio evento di *crossing over*. I vettori di inserzione invece, vengono linearizzati all'interno della regione di omologia, cosicché l'evento di ricombinazione omologa genera una duplicazione del locus genomico interessato (Müller, 1999). I vettori di gran lunga più utilizzati negli esperimenti di *gene targeting* sono vettori di sostituzione. Infatti l'uso di vettori di tipo inserzionale, nonostante porti ad un aumento della frequenza di ricombinazione di circa 5-20 volte (Hasty et al., 1991), è limitato dal fatto che la parziale duplicazione del *locus* genico di interesse può causare alcuni problemi, fra cui il riarrangiamento intragenico delle sequenze duplicate o anomalie nella trascrizione; inoltre, per questo genere di vettori, non possono essere utilizzati metodi di selezione negativa (Müller, 1999). Gli elementi di base che costituiscono un vettore di tipo sostitutivo sono i bracci di omologia con il *locus* genomico, un *marker* per la selezione positiva, uno per la selezione negativa, un sito di linearizzazione esterno alla sequenza di omologia, il tutto inserito in un plasmide batterico. Per generare un mutante nullo, o *knockout* completo, è necessario creare una mutazione in grado di prevenire completamente la funzionalità della proteina codificata dal gene bersaglio. Una simile mutazione può essere prodotta inserendo la cassetta per la selezione positiva in un esone critico per la funzione del prodotto genico, oppure subito a valle del codone di inizio ATG; è anche possibile disegnare un costrutto che porti alla delezione di uno o più esoni nel gene di interesse, con perdita della sequenza aminoacidica corrispondente.

L'utilizzo e l'applicabilità del *gene targeting* ha avuto un notevole impulso dallo sviluppo di metodi sempre più elaborati, basati su sistemi di ricombinazione sito-specifica, che permettono vari tipi di modificazioni a livello genico. Due differenti sistemi di ricombinazione sito-specifica si sono dimostrati efficienti nelle cellule eucariotiche: il sistema Flp-FRT, derivato dal lievito, ed il sistema Cre-*loxP*, isolato del batteriofago P1 (Sauer e Henderson, 1988; Golic e Lindquist, 1989). Entrambi i sistemi sono composti da una ricombinasi, Flp o Cre, che riconosce e catalizza la ricombinazione tra due specifiche sequenze di DNA di 34 bp ciascuna, rispettivamente FRT e *loxP*. Il sistema Cre-*loxP* ha trovato un ampio utilizzo nella tecnologia del *gene targeting* sia per introdurre mutazioni

puntiformi in modo mirato, sia per la generazione di *knockout* condizionali in cui l'inattivazione di un gene può essere controllata spazialmente o temporalmente (Sauer, 1998).

La maggior parte delle patologie umane, genetiche e non, non è infatti dovuta alla completa assenza della funzione di un gene, ma piuttosto a una parziale perdita o ad alterazioni di funzione. Per creare modelli murini di queste patologie, è necessario introdurre nel genoma murino mutazioni più fini, cosa che richiede tecniche di *gene targeting* più sofisticate. Il metodo tradizionale di inserzione della cassetta *neo^R* provoca infatti grossolane alterazioni del gene bersaglio e non permette quindi la creazione di specifiche mutazioni. La ricombinazione sito-specifica offre invece la possibilità di eliminare la cassetta per la selezione positiva dopo l'identificazione delle cellule ES ricombinanti. Perciò, una soluzione per la creazione di specifiche mutazioni geniche è quella di inserire tali mutazioni all'interno delle regioni di omologia del vettore e di affiancare due siti *loxP* alla cassetta di selezione *neo^R*. In questo modo, dopo l'evento di ricombinazione omologa e la escissione della cassetta di selezione mediante trasfezione delle cellule ES con un plasmide che esprime la Cre ricombinasi, nel *locus* bersaglio resteranno solo la mutazione specifica e un sito *loxP*. La cassetta per la selezione deve perciò essere inserita in una regione, come un introne, tale per cui dopo gli eventi di ricombinazione il sito *loxP* residuo non incida in aree funzionali (Nagy et al., 1998). Oltre a mutazioni geniche fini, con il sistema Cre-*loxP* possono essere ottenute in cellule ES vari tipi di modificazioni genetiche, come delezioni cromosomiche, inversioni e duplicazioni fino a 3-4 centi-morgan (Ramirez-Solis et al., 1995).

Le procedure classiche di *gene targeting* modificano o inattivano i geni di interesse a livello dell'intero organismo. Tuttavia una patologia si può sviluppare anche se uno o più geni di una singola cellula si inattivano nell'adulto. Sono stati perciò sviluppati recentemente approcci di *gene targeting* condizionale, con i quali l'inattivazione genica può essere controllata in modo tempo- o tessuto-specifico. Questa tecnica è estremamente utile quando la strategia classica di *gene targeting* provoca un fenotipo letale o multisistemico, impedendo un'analisi dettagliata del fenotipo nella vita postnatale o nell'organo specifico di interesse. L'inattivazione genica tessuto-specifica può essere ottenuta ancora una volta con il sistema di ricombinazione Cre-*loxP*: un esone critico per la funzione di un gene di interesse viene modificato opportunamente attraverso una procedura di *gene targeting* in cellule ES, in modo che risulti fiancheggiato da due siti *loxP*, lasciando per il resto invariata la struttura del gene. Dalle cellule ES ricombinanti vengono derivati topi omozigoti *floxed*, in cui entrambi gli alleli del gene di interesse funzionano correttamente ma risultano ingegnerizzati con i siti *loxP*. Parallelamente, viene prodotta una seconda linea di topi transgenici che contiene il gene per la Cre ricombinasi sotto il controllo di un promotore tessuto-specifico. Dall'incrocio delle due linee di topi si ottiene una progenie in cui l'evento di ricombinazione Cre-mediata, e perciò l'inattivazione genica, avviene con un profilo tessuto-specifico (Babinet e Cohen-Tannoudji, 2001;

Lewandoski, 2001). La produzione di *knockout* tessuto-specifici trova un'utilizzo sempre più ampio, ed è stata sviluppata un'ampia varietà di topi transgenici per Cre con diversa specificità tessutale (*CreX mice database*: <http://www.mshri.on.ca/nagy/default.htm>). Il sistema Cre-*loxP* può essere utilizzato anche per realizzare esperimenti di *gene targeting* inducibili, in cui un gene può essere inattivato in modo tempo-dipendente, in base alla somministrazione di una sostanza induttrice (Kühn et al., 1995). In questo caso viene effettuato l'incrocio dei topi *floxed* con topi che esprimono Cre sotto il controllo di un promotore inducibile con sostanze quali tetraciclina o tamoxifen (Shockett e Schatz, 1996; Danielian et al., 1998).

1.4 Le cellule ES

Le cellule staminali vengono definite come cellule in grado di replicarsi indefinitamente e di differenziare verso linee cellulari specializzate. Comunemente vengono individuati due gruppi principali di cellule staminali, in base alla loro origine: embrionale o adulta. Solo l'embrione nelle sue fasi più precoci possiede cellule staminali totipotenti, cioè in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari propri dell'embrione stesso e dell'organismo adulto. Le cellule staminali dell'adulto hanno invece normalmente solo la capacità di differenziare in senso organo- o tessuto-specifico; tuttavia è stato osservato come queste cellule siano caratterizzate da una certa plasticità, potendo andare incontro in determinate circostanze a transdifferenziazione. Sono state infatti descritte cellule staminali adulte di origine nervosa in grado di differenziare in cellule sanguigne (Bjornson et al., 1999) ed in cellule muscolari (Galli et al., 2000); cellule staminali emopoietiche capaci di generare neuroni (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000), miociti (Goodell et al., 2001) ed epatociti (Peterson et al., 1999; Alison et al., 2000; Lagasse et al., 2000); cellule staminali di provenienza muscolare in grado di differenziare in cellule ematiche (Jackson et al., 1999; Seale et al., 2001); ed ancora cellule staminali mesenchimali di provenienza ossea differenziarsi in cellule di diversi tessuti (Pittenger et al., 1999). Il risultato forse più sorprendente è stata l'osservazione che cellule staminali nervose trasferite in blastocisti possono contribuire alla formazione di tessuti derivanti da tutti e tre i foglietti germinativi (Clarke et al., 2000). Tuttavia, una reale evidenza scientifica che una singola cellula chiaramente identificabile possa dare origine a distinti tipi cellulari tramite differenziamento e che possa essere mantenuta ed espansa *in vitro* per un tempo virtualmente indefinito, mantenendo la propria capacità replicativa e la propria stabilità cromosomica, esiste soltanto per le cellule staminali di origine embrionale (Amit et al., 2000).

Le cellule staminali embrionali (ES) murine vennero isolate e cresciute *in vitro* per la prima volta nel 1981 (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Questo risultato fu ottenuto sulla base di precedenti studi su cellule di carcinoma embrionale (EC) derivate dal teratocarcinoma murino, un tumore delle cellule germinali. Cellule EC introdotte in blastocisti successivamente impiantate

nell'utero di topi femmina resi pseudogravidati apparvero in grado di mantenersi dapprima in uno stato indifferenziato e di contribuire in seguito allo sviluppo embrionale dando origine a tessuti normali nell'animale chimerico così ottenuto (Brinster et al., 1974; Mintz e Illmensee, 1975). Tuttavia, la tendenza a generare tumori non era completamente inibita dall'ambiente della blastocisti e durante lo sviluppo di questi animali venne riportata l'insorgenza di teratocarcinomi; inoltre le cellule di carcinoma embrionale non erano in grado di differenziare in senso germinale. Sulla base di queste informazioni riguardanti le cellule EC, nel 1981 due gruppi indipendenti di ricercatori isolarono e coltivarono *in vitro* cellule ES ottenute dalla massa cellulare interna di blastocisti pre-impianto, considerandole come la controparte normale e non patologica delle cellule EC (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Le cellule ES sono presenti nell'embrione solo in modo transiente e la loro capacità di rinnovamento è limitata nel tempo, diversamente da quanto si verifica per le cellule staminali adulte. Fino allo stadio embrionale E5.5, infatti, le singole cellule dell'epiblasto mantengono la loro totipotenza, dimostrando capacità rigenerativa se impiantate nella massa cellulare interna di blastocisti allo stadio E3.5; inoltre, esse esprimono alcuni antigeni, come la Fosfatasi alcalina, la Caderina-E, SSEA1 e Oct-4, comuni proprio alle cellule indifferenziate della massa cellulare interna (Gardner et al., 1997). Le cellule dell'epiblasto perdono gradualmente la propria totipotenza e allo stadio E6.5–E7.5, quando si verifica una massiva metilazione di regioni genomiche ricche in CpG, non sono più in grado di colonizzare blastocisti ospiti (Jaenish, 1997).

Le due proprietà basilari delle cellule staminali, capacità di rinnovamento e di differenziazione, sono state ampiamente studiate nelle cellule ES. Per mantenere le cellule ES in uno stato indifferenziato, veniva inizialmente ritenuta strettamente necessaria la presenza di un *feeder layer*, ovvero un monostrato di fibroblasti murini inattivati mitoticamente, il cui ruolo è quello di inviare segnali trofici per le cellule ES e di prevenirne la differenziazione. Due sono le linee di fibroblasti più comunemente utilizzate: fibroblasti embrionali primari e fibroblasti della linea STO. In seguito, venne riconosciuta l'esistenza di un fattore umorale chiamato DIA (*Differentiation Inhibitory Activity*) prodotto da diversi tipi cellulari che si dimostrava in grado di sostituire lo strato di fibroblasti inattivati nel prevenire il differenziamento di cellule ES (Smith and Hooper, 1987). Successivamente, la purificazione del DIA dimostrò un'analogia strutturale con un fattore di regolazione dell'ematopoiesi, ovvero il LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) e venne dimostrato che quest'ultimo era in grado di prevenire la differenziazione spontanea di cellule ES (Smith et al, 1988; Williams et al., 1988). Dopo iniezione in blastocisti, cellule ES precedentemente coltivate in presenza di LIF sono in grado di ricolonizzare ad alta efficienza tutti i tessuti, compresa la linea germinale (Nichols et al., 1990). Numerosi fattori di trascrizione sono attivi nelle cellule ES e nelle fasi più precoci dello sviluppo embrionale per garantirne la capacità di rigenerazione e bloccarne la differenziazione. In generale, i fattori in grado di mantenere la totipotenza delle cellule ES *in vivo*

sono espressi quando le cellule della morula si compattano fino a formare la massa cellulare interna della blastocisti e vengono silenziati con la gastrulazione. Per il mantenimento della capacità di rigenerazione è necessaria l'attivazione del fattore STAT3, mediata dal legame di LIF con il suo recettore gp130 (Smith, 2001). La presenza di LIF d'altra parte, nonostante sia necessaria per mantenere le cellule ES in uno stato indifferenziato, non è sufficiente per mantenere vitali le cellule in assenza di siero fetale, suggerendo che siano indispensabili anche altri fattori. Diversi geni codificanti per fattori di trascrizione contenenti un dominio homeobox sono espressi nell'embrione e nelle cellule ES, con una regolazione spazio- e tempo-dipendente (McGinnis et al., 1992). Inoltre, il fattore secreto BMP4 è in grado di mantenere le cellule ES in stato indifferenziato in presenza di LIF anche senza siero fetale, inducendo l'espressione di geni codificanti per fattori di trascrizione detti Id (*Inhibitors of differentiation*) (Ying, 2003). Il gene di staminalità meglio conosciuto e caratterizzato è *Pou5f1* che codifica per il fattore di trascrizione Oct-4 (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000). Un altro gene omeotico codificante per un fattore di trascrizione implicato nel mantenimento della totipotenza è stato recentemente isolato e denominato *Nanog* (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). L'mRNA di *Nanog* è presente nelle cellule ES umane e murine, mentre è assente nelle cellule somatiche. Se espresso ad alti livelli, *Nanog* è in grado di prevenire la differenziazione in modo indipendente dalla via LIF/STAT3 (Chambers et al., 2003).

Se cresciute *in vitro* in particolari condizioni, ovvero in sospensione ed in assenza di LIF, le cellule ES formano dei piccoli aggregati di cellule circondate da uno strato esterno di endoderma viscerale (Keller, 1995). Questi aggregati sono simili per dimensioni, capacità differenziativa e profilo di espressione genica ad un embrione precoce in fase preimpianto e sono stati per questo denominati "corpi embrioidi". Studi di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che le cellule della massa centrale dei corpi embrioidi si differenziano in linee cellulari appartenenti a tutti tre i foglietti germinativi embrionali (Abe et al., 1996; Leahy et al., 1999). Tra gli 8 e i 10 giorni di coltura, circa la metà dei corpi embrioidi derivati da cellule ES formano strutture cistiche analoghe al sacco vitellino che si forma normalmente nell'embrione dopo l'impianto; un terzo circa di queste strutture cistiche differenzia in cardiomiociti o in isole sanguigne in seguito all'aggiunta di siero fetale umano (Doetschmann et al., 1985). Le singole cellule che compongono i corpi embrioidi possono essere dissociate, piastrate e differenziate *in vitro* in modo controllato in presenza di fattori di crescita specifici per ogni linea cellulare. Con questa tecnica sono stati ottenuti a partire dalle cellule ES diversi tipi cellulari, come cardiomiociti, condrociti, adipociti, neuroni, cellule gliali e cellule endoteliali (Dani et al., 1997; Kramer et al., 2000; Yamashita et al., 2000); in opportune condizioni è stata osservata anche la formazione di una vascolatura primordiale, indicando che le cellule ES sono in grado di fornire un importante modello per lo studio della vasculogenesi (Wang et al., 1992).

L'efficienza dell'isolamento e del mantenimento in coltura delle cellule ES è influenzata dal ceppo murino dal quale derivano. I ceppi più usati sono i ceppi *inbred* 129Sv e C57BL/6, tuttavia cellule ES ottenute da embrioni C57BL/6 non sono altrettanto efficienti di quelle prelevate da topi 129Sv (Brook e Gardner, 1997). Dal 1981, anno del loro primo isolamento, le cellule ES di topo hanno consentito di acquisire nuove informazioni in diversi ambiti di ricerca, dalla ricombinazione omologa allo studio del ciclo cellulare, dalla possibilità di indagare le tappe più precoci dello sviluppo embrionale fino allo studio dei meccanismi di differenziamento cellulare. Tuttavia il maggiore impatto delle cellule ES in ambito biomedico si è avuto nella seconda metà degli anni Ottanta, con la dimostrazione della possibilità di usare le cellule ES come vettori cellulari per procedure di mutagenesi mirata o casuale, quali il *gene targeting* e il *gene trap*, e per produrre topi con mutazioni specifiche.

2 MATERIALI E METODI

2.1 RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto da diversi tessuti di topi adulti del ceppo C57BL/6 mediante omogeneizzazione in TRIzol Reagent (Gibco) e purificazione secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. L'RNA isolato, quantificato allo spettrofotometro, è stato utilizzato per produrre il cDNA corrispondente, in una reazione di sintesi condotta in una soluzione del volume finale di 20 μ l con la seguente composizione: 1 μ g di RNA, tampone di reazione 1x, oligonucleotidi esamerici *random* pd[N]₆ 100 μ M, miscela di desossinucleotidi 5 mM, ditiotreitolo 0.1 M, 20 μ g di BSA, 1 U di inibitore delle RNasi (RNAGuard, Gibco) e 1U di trascrittasi inversa MMLV (Gibco). La reazione di retrotrascrizione è stata condotta a 37°C per 1 ora. La reazione di PCR è stata effettuata in un volume finale di 50 μ l, utilizzando un'aliquota del cDNA retrotrascritto corrispondente a circa 300 ng dell'RNA di partenza. La composizione della miscela di reazione consisteva in: tampone PCR 1x (Finnzymes), miscela di deossinucleotidi 10 mM (Invitrogen), 10 pmol di ciascun primer (senso ed antisenso) (MWG), MgCl₂ 1.5 mM (Finnzymes) e 2 U di *Taq* DNA polimerasi (Finnzymes). Aliquote delle reazioni sono state prelevate a 25, 30 e 35 cicli ed analizzate in gel di agarosio all'1%.

Le tabelle seguenti riportano la descrizione degli oligonucleotidi utilizzati nella miscela di reazione e la descrizione delle condizioni alle quali quest'ultima si è svolta.

<i>Emilin1</i>	
E1-for (senso)	5'- CCA GCA CCC TCC ACA CCA CTT C -3'
E1-rev (antisenso)	5'- AGC TGC TGC AAC TTC TCT TGA CTC -3'
Temperatura di <i>annealing</i>	65°C
Regione amplificata	128 bp del cDNA per Emilina-1, comprese tra l'esone 3 e l'esone 4 (GenBank: NM_133918)

<i>Emilin2</i>	
E2-for (senso)	5'- GCC CAG TGC CAG GAA CAA AAA CT -3'
E2-rev (antisenso)	5'- GGA CAA CGT TTT CTT AGG CTG AG -3'
Temperatura di <i>annealing</i>	62°C
Regione amplificata	360 bp del cDNA per Emilina-2, comprese tra l'esone 1 e l'esone 4 (GenBank: NM_145158)

<i>Mmrn1</i>	
M1-for (senso)	5'- GCT GTT GAC CAA GGA AG AGC -3'
M1-rev (antisenso)	5'- ATT GCC TGC TGT TGT CCT CT -3'
Temperatura di <i>annealing</i>	62°C
Regione amplificata	208 bp del cDNA per Multimerina-1, comprese tra l'esone 4 e l'esone 5 (GenBank: XM_284198)

<i>Mmrn2</i>	
M2-for (senso)	5'- CTC ACC CTG ATC CCG ACA CT -3'
M2-rev (antisenso)	5'- GTC TGA TGG GGT CTC TGC TG-3'
Temperatura di <i>annealing</i>	64°C
Regione amplificata	168 bp del cDNA per Multimerina-2, all'interno dell'esone 1 (GenBank: NM_153127)

<i>Emilin3</i>	
E3-for (senso)	5'- CCC GTT ACA GCC TCT ACA CC -3'
E3-rev (antisenso)	5'- TGA CTG TTG AAG GGC AGT TG -3'
Temperatura di <i>annealing</i>	56°C
Regione amplificata	180 bp, comprese tra l'esone 1 e l'esone 2 (GenBank: NM_182840)

<i>GAPDH</i> (controllo)	
GAPDH-for (senso)	5'- CAA GAG CAA CTC CCA CTC TTC C -3'
GAPDH-rev (antisenso)	5'- GGT GGT CCA GGG TTT CTT ACT C -3'
Temperatura di <i>annealing</i>	55°C
Regione amplificata	169 bp, comprese tra l'esone 6 e l'esone 7 (GenBank: NM_008084)

Reazione di amplificazione

1. 94°C per 1 min
2. 94°C per 1 min (denaturazione)
3. Tann°C per 1 min (*annealing*)
4. 72°C per 2 min (estensione)
5. ripetuto i punti da 2. a 4. per 24/34 volte
10. 72°C per 10 min

2.2 Ibridazione *in situ* (ISH)

2.2.1 Preparazione dei campioni, inclusione e preparazione delle sezioni istologiche

Embrioni di topi *wild-type* dai 9.5 ai 16.5 giorni di sviluppo sono stati prelevati, lavati in PBS e fissati per una notte a 4°C con paraformaldeide 4% in PBS. Dopo la fissazione, gli embrioni sono stati lavati per due volte con PBS e quindi disidratati con gradazioni crescenti di metanolo in PBS (25%, 50%, 75%, 100%), incubando in ciascuna soluzione per 10-30 min a 4°C. I campioni disidratati sono stati quindi conservati a -20°C in metanolo assoluto fino all'inclusione.

Per l'inclusione in paraffina, gli embrioni disidratati sono stati prelevati dalla soluzione in metanolo e incubati per 2 ore in cloroformio. Gli embrioni sono quindi stati incubati per 30 min a 65°C in una miscela di cloroformio e paraffina isovolume. La soluzione è poi sostituita con paraffina pura, eseguendo tre incubazioni a 65°C, due da 1 ora e la terza da 30 min. La soluzione di paraffina contenente gli embrioni è stata infine versata in apposite vaschette di metallo per inclusione, incubando per una notte a temperatura ambiente, e poi conservata a 4°C. Utilizzando gli embrioni inclusi in paraffina, sono state allestite sezioni di 17 µm al microtomo. Le sezioni sono state adagiate su vetrini (BDH Superfrost) pre-trattati con una soluzione di poli-L-lisina 0.1% p/v (Sigma) per 5 min e riscaldati a 40°C. I vetrini contenenti le sezioni sono stati incubati a 40°C per 2 giorni.

2.2.2 Preparazione della sonda

Il cDNA di Emilina3 *full-length* in pCS2-Chd-FLAG presente nel nostro laboratorio è stato utilizzato per la produzione della sonda antisenso e della sonda senso di controllo, utilizzando per la linearizzazione nel primo caso l'enzima *ClaI* e nel secondo caso *NsiI*. Dopo la linearizzazione, il DNA plasmidico è stato purificato in condizioni *RNase-free* e risospeso in dH₂O alla concentrazione finale di 1 mg/ml. È stata quindi trascritta una sonda di RNA marcato con digossigenina a partire dai promotori T3 (per la sonda antisenso) e SP6 (per la sonda senso) presenti nel plasmide utilizzando il kit DIG RNA labeling (Roche) ed incubando per 2 ore a 37°C. In seguito i campioni sono stati trattati con 1 U di DNasi I, che è stata bloccata aggiungendo EDTA. La sonda marcata è stata precipitata e purificata dai nucleotidi marcati non incorporati con l'utilizzo delle colonnine Quick Spin™ Column (Roche), quantificata in gel e conservata a -80°C.

2.2.3 ISH

La paraffina è stata eliminata dalle sezioni istologiche mediante due lavaggi con cloroformio ed i campioni sono stati reidratati gradualmente in PBS. Le sezioni sono state quindi

trattate con soluzione di proteinasi K 20 µg/ml, incubando a 37°C per 15 min. La reazione è stata bloccata ponendo le sezioni per 5 min in soluzione di glicina 0.2% in PBS. Le sezioni sono state quindi trattate per due volte con PBS per 5 min, poi con soluzione di fissazione (paraformaldeide 4% + glutaraldeide 0.2% in PBS) per 20 min e nuovamente per due volte con PBS per 5 min. I vetrini così trattati sono stati asciugati e le sezioni bagnate con una goccia di soluzione di preibridazione (Boehringer Block 10 mg/ml; formammide 50%; SSC 5x; tRNA di lievito 1 mg/ml; eparina 0.1 mg/ml; Tween-20 0.1%; CHAPS 0.1%; EDTA 5 mM). I vetrini sono quindi stati incubati a 74°C per almeno 2 ore in soluzione di formammide 50% in SSC 5x. Le sezioni sono state poi trattate con una soluzione di ibridazione, costituita da 200 µl di soluzione di preibridazione e 1 ng/µl di sonda senso o antisense per vetrino (diluizione 1:100) precedentemente scaldata a 85°C per 5 min, e incubate a 74°C per una notte.

Il mattino seguente, le sezioni sono state trattate per 5 min a 74°C con SSC 2x (pH 4.5). Successivamente sono stati eseguiti tre lavaggi di 30 min a 74°C con soluzione SSC 2x (pH 4.5) + formammide 50x, seguiti da due lavaggi di 10 min con MABT (0.8gr acido malico; 0.4gr NaCl). Dopo aver trattato le sezioni con una goccia di soluzione Ab (0.2 gr Bohringer Block; 2 ml siero di capra al 20%; 8ml MABT) per 2 ore a 4°C, sono stati preparati 5ml di soluzione Ab contenente 2.5µl di anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina (frammento Fab 150 unità/µl; Bohringer). La soluzione contenente l'anticorpo è stata quindi posta a gocce sulle sezioni ed incubata per una notte a 4°C. Il mattino seguente, le sezioni sono trattate per tre volte, di 10 min ciascuna, con soluzione PBS contenente siero di capra allo 0.5%. Dopo aver eseguito tre lavaggi successivi da 15 min con NTMT-levamisol (Tris-Cl 100 mM, pH 9.5; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0.1%; levamisol 1 mM), le sezioni sono state incubate per una notte a 4°C con una soluzione contenente il substrato per la reazione enzimatica della fosfatasi alcalina (BM Purple; Roche). Le sezioni sono state quindi trattate con NTMT (Tris-Cl 100 mM, pH 9.5; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0.1%), nuovamente lavate in PBS e, dopo fissazione in paraformaldeide al 4% per 2 ore a temperatura ambiente, sono stati eseguiti i seguenti lavaggi: dH₂O per 5 min, metanolo 50% per 2 min, metanolo 70% per 2 min, metanolo 100% per 3 min, xilene 100% per 2 min. Il vetrino è stato infine montato fissando il coprioggetto con collante Vecta Mount (Vector Laboratories).

2.3 Inattivazione genica mirata in cellule ES

2.3.1 Preparazione e coltura di fibroblasti embrionali murini (*feeder cells*)

Materiali:

- Terreno per fibroblasti: DMEM (4,5 g/l di glucosio, Gibco); 10% siero bovino fetale (FBS, Gibco), liberato dalla frazione del complemento mediante trattamento a 56°C per 30 min; 2mM L-Glutammina (Gibco)

- Terreno per il congelamento dei fibroblasti: terreno per fibroblasti completo addizionato del 10% di FBS e del 10% di dimetil solfossido (Sigma)

Procedura:

I fibroblasti embrionali sono stati isolati da embrioni allo stadio E13.5 derivati da topi knockout per il gene *Emilin1* e recanti quindi la cassetta *neo^R* per la resistenza all'antibiotico G418. L'avvenuta fecondazione e l'età gestazionale sono state accertate osservando la formazione del *plug* vaginale il giorno dopo l'accoppiamento. Femmine di topo gravide a 13.5 giorni di gestazione sono quindi state sacrificate mediante dislocazione cervicale e gli uteri sono stati rimossi e lavati più volte con tampone PBS in condizioni di sterilità. Gli embrioni sono stati dissociati dai tessuti materni utilizzando pinze e forbici sterili, sono stati liberati con attenzione dai tessuti extraembrionali e dopo la rimozione della testa e degli organi interni sono stati lavati con PBS e finemente dissezionati. La dissociazione degli embrioni è stata condotta mediante incubazione con una soluzione di tripsina/EDTA (Gibco) per 20 min a 37°C in una beuta sterile contenente sfere di vetro di diametro di 3 mm (Sigma) utilizzando un agitatore magnetico a bassa velocità. La soluzione contenente i tessuti digeriti è stata trasferita in un tubo sterile e le cellule sono state sedimentate mediante centrifugazione a 1500 rpm per 20 min. Le cellule sono state risospese in 30 ml di mezzo per fibroblasti, piastrate in piastre da 15 cm e cresciute in incubatore per 2-3 giorni, fino al raggiungimento della confluenza. Per la conservazione a lungo termine, i fibroblasti sono stati tripsinizzati, centrifugati, risospesi in mezzo per congelamento e infine conservati in aliquote a -80°C o in azoto liquido.

Per la produzione di fibroblasti embrionali inattivati mitoticamente e quindi non più in grado di proliferare (IEF), le cellule, scongelate e portate a confluenza, sono state addizionate di mitomicina C (Sigma) a una concentrazione finale di 10 µg/ml e incubate per 3 ore a 37°C. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate con PBS, tripsinizzate, raccolte, contate in camera di Burker ed infine risospese ad una densità di 2×10^6 cellule/ml. I fibroblasti inattivati sono stati utilizzati immediatamente o congelati come descritto in precedenza. In ogni caso, i fibroblasti embrionali utilizzati per la coltura di cellule ES non sono stati mantenuti in coltura per più di 8 giorni, allo scopo di evitarne la senescenza. Per la coltura di cellule ES, i fibroblasti embrionali inattivati sono stati utilizzati a concentrazioni variabili in base alle dimensioni della piastra utilizzata:

numero di IEF/piastra: 1.5×10^4 /pozzetto di piastra da 96 pozzetti;

1.5×10^5 /pozzetto di piastra da 24 pozzetti;

5x10⁵/piastra da 3.5 cm;
3x10⁶/piastra da 10 cm;
1x10⁷/piastra da 15 cm.

2.3.2 Coltura, propagazione e mantenimento di cellule ES

Materiali:

- Terreno per ES: DMEM (4,5 g/l di glucosio, Gibco); 20% FBS garantito per cellule ES (Gibco); β -mercaptoetanololo 0,1 mM (Sigma); aminoacidi non essenziali (10 mM ciascuno, Gibco); sodio piruvato 1 mM (Gibco); L-glutammina 2 mM (Gibco); 2x10³ U/l LIF (Leukemia Inhibitory Factor ricombinante, Chemicon)

- Terreno per il congelamento delle cellule ES: terreno per ES completo addizionato del 10% di FBS e del 10% di dimetil solfossido (Sigma)

Procedura:

Le cellule ES della linea R1 (Nagy et al., 1993; Bonaldo et al., 1998) sono state cresciute su piastre di coltura in plastica (Falcon) e mantenute a 37°C in un incubatore al 5% di CO₂ e il 95% di umidità. Prima dell'aggiunta delle cellule ES, le piastre sono state trattate con gelatina (0.1% in PBS) per almeno 30 min a 37°C e, dopo la rimozione della soluzione di gelatina, sono state rivestite da un monostrato di IEF resistenti a G418 alle concentrazioni riportate nel paragrafo precedente. Le colonie di cellule ES devono essere mantenute ad una certa dimensione, per prevenire il loro differenziamento spontaneo, che può portare a perdita della totipotenza. Quindi le cellule ES sono state monitorate quotidianamente al microscopio e, quando necessario, sono state tripsinizzate e dissociate meccanicamente con l'aiuto di una pipetta pasteur sterile cotonata, in modo da ottenere una sospensione a cellule singole. Le cellule sono state quindi coltivate in nuove piastre all'opportuna diluizione. Inoltre, dato che anche la permanenza in coltura per tempi prolungati può indurre la differenziazione o portare alla generazione di cloni aneuploidi, le cellule sono state fatte espandere mantenendole in coltura il minor tempo possibile.

Per il congelamento le cellule ES sono state dissociate in tripsina e risospese in un appropriato volume di terreno per il congelamento. Le cellule sono state aliquotate in provette apposite, incubate per 2 ore a -20°C, poi trasferite per una notte a -80°C ed infine conservate in azoto liquido. Quando necessario, le cellule sono state rapidamente scongelate, lavate in terreno per ES ed infine piastrate in piastre trattate con gelatina e ricoperte da un monostrato di IEF.

2.3.3 Purificazione del costrutto di inattivazione genica

Il costrutto di inattivazione del gene *Emilin3* (pKS-5.9-NTK) presente nel nostro laboratorio è stato ottenuto a partire da un clone Lambda-FIX II di 11 kb contenente la sequenza completa di

Emilin3, isolato da una libreria genomica murina del ceppo 129Sv. Il costrutto comprende il plasmide pKS (3.0 kb), la cassetta HSV-*tk* (1.8 kb), un braccio sinistro di omologia con il gene *Emilin3* (1.6 kb), la cassetta *neo*^R (1.9 kb), ed infine un braccio destro di omologia con il gene *Emilin3* (3.9 kb). Per l'elettroporazione il costrutto è stato estratto utilizzando il kit per la preparazione plasmidica su larga scala JETSTAR Plasmid Kit (Genomed), seguendo le indicazioni della ditta produttrice, a partire da batteri del ceppo *Epicurian coli* XL-10 Gold che erano stati trasformati con esso e conservati a -80°C. Digestioni enzimatiche di controllo sono state effettuate utilizzando gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *HindIII* (Promega). Una quantità pari a 1500 µg di costrutto di inattivazione è stata quindi linearizzata con l'endonucleasi di restrizione *XhoI* (Promega) e purificata con fenolo/cloroformio e successiva precipitazione con sodio acetato ed etanolo assoluto; il sedimento di DNA è stato infine risospeso in PBS sterile alla concentrazione di 125 mg/ml immediatamente prima della trasfezione.

2.3.4 Elettroporazione di cellule ES con il costrutto di inattivazione

Le cellule ES sono state coltivate fino ad ottenere sei piastre da 10 cm di diametro portate quasi alla confluenza. Le cellule sono state quindi tripsinizzate e dissociate meccanicamente con una pipetta Pasteur sterile cotonata per ottenere una sospensione a singole cellule. Dopo l'inattivazione della tripsina mediante addizione di terreno per ES, le cellule sono state contate con l'utilizzo della cameretta di Burkner e risospese in PBS in modo da avere una concentrazione finale di 2×10^7 cellule/ml. Dopo 5 min di incubazione a temperatura ambiente, le cellule sono state trasferite in cuvette da elettroporazione (BioRad) ed elettroporate con un'unità Gene Pulser (BioRad) applicando un pulse di 500 µF e 250 V. In ogni cuvetta è stata caricata una sospensione di cellule ES in PBS, corrispondente a circa 1×10^7 cellule, in presenza od in assenza del costrutto linearizzato. Sono state allestite complessivamente dieci cuvette di elettroporazione, con un volume finale di 1 ml ciascuna, variando le condizioni secondo lo schema seguente:

- A. 5 cuvette: 0,5 ml di sospensione cellulare (1×10^7 cellule ES)
+ 0,5 ml di DNA in PBS (60 µg costrutto linearizzato);
- B. 4 cuvette: 0,5 ml di sospensione cellulare (1×10^7 cellule ES)
+ 0,3 ml di DNA (37 µg costrutto linearizzato) + 0,2 ml di PBS;
- C. 1 cuvetta: 0,5 ml di sospensione cellulare (1×10^7 cellule ES)
+ 0,5 ml di PBS (piastra di controllo, senza costrutto).

Le cellule elettroporate sono state infine trasferite in piastre da coltura di 15 cm di diametro precedentemente allestite per la coltura delle cellule ES (trattamento con gelatina e coltura in monostrato di fibroblasti embrionali inattivati *neo*^R). Sono state complessivamente

ottenute 10 piastre che sono state lasciate in incubatore a 37°C fino al giorno successivo per permettere alle cellule ES di aderire al substrato.

2.3.5 Doppia selezione, isolamento ed espansione di cloni di cellule ES

Circa 24 ore dopo l'elettroporazione, quando nelle piastre da 15 cm contenenti le cellule ES elettroporate erano diventate visibili al microscopio le prime colonie, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno ES fresco addizionato dei due composti per la selezione positiva/negativa: l'antibiotico G418 (Gibco) alla concentrazione finale di 300 µg/ml e ganciclovir (Syntex) alla concentrazione di 2 µM. Le cellule sono state mantenute in condizione di doppia selezione per 4 giorni, e di sola selezione positiva con G418 per i giorni successivi, cambiando il terreno di coltura ogni giorno. A 6 giorni dall'elettroporazione, quando nella piastra di controllo (cellule ES elettroporate senza costruito) tutte le colonie erano ormai morte, si è iniziato ad isolare i cloni cellulari cresciuti come piccole colonie singole nelle piastre contenenti le cellule ES trasformate con il costruito per l'inattivazione del gene *Emilin3*.

Il *picking* è stato realizzato sotto una cappa a flusso laminare, osservando le colonie con un microscopio stereoscopico (Olympus SZX12) ed utilizzando un micropipettatore (Pipetman, Gilson) per staccare ciascuna colonia dal monostrato di fibroblasti sottostante. Nell'isolamento dei cloni, sono state scelte solo le colonie di dimensioni adeguate, con forma e margini regolari e senza segni di differenziamento cellulare. Ciascuna colonia è stata trasferita in un pozzetto di micropiastre da 96 pozzetti, tripsinizzata, ridotta a sospensione a singola cellula e trasferita in una nuova micropiastra da 96 pozzetti opportunamente preparata per la coltura di cellule ES (trattamento con gelatina e coltura in monostrato di fibroblasti embrionali inattivati *neo^R*). Le cellule sono state quindi mantenute in coltura nelle micropiastre, utilizzando terreno ES addizionato con G418 alla concentrazione finale di 300 µg/ml, in modo da permettere la crescita dei diversi cloni. Le cellule sono state quotidianamente controllate al microscopio, annotando per ogni clone l'attività di crescita e l'eventuale presenza di cellule differenziate. Colonie troppo grandi, per le quali quindi la differenziazione può avvenire con maggiore probabilità, sono state trattate con tripsina/EDTA ed adeguatamente risospese in modo da ridurre la concentrazione. Una volta raggiunta una crescita adeguata, i diversi cloni sono stati singolarmente tripsinizzati e disgregati meccanicamente.

Metà sospensione cellulare di ciascun pozzetto è stata congelata, come descritto nel paragrafo 2.3.2, a -80°C in nuove micropiastre, che sono state avvolte in diversi strati di carta e poste all'interno di una scatola di polistirolo precedentemente raffreddata, in modo da permettere un raffreddamento graduale delle cellule fino al raggiungimento della temperatura ottimale di -80°C. Le restanti cellule sono state invece mantenute nelle piastre originarie e fatte crescere fino a formare colonie di dimensioni adeguate; quindi sono state trasferite in nuove piastre da 24

pozzetti e lasciate crescere fino a confluenza, in modo da ottenere un numero elevato di cellule per ciascun clone e perciò una quantità di DNA sufficiente per la successiva analisi genotipica. Al raggiungimento della confluenza, le cellule sono state avviate al processo di lisi e successiva estrazione del DNA genomico.

2.4 Identificazione e caratterizzazione dei cloni ricombinanti omologhi

2.4.1 Lisi delle cellule ES ed estrazione del DNA genomico

Dopo aver eliminato il terreno di coltura dalle piastre da 24 pozzetti contenenti i cloni di cellule ES (paragrafo 2.3.5), i pozzetti sono stati lavati per due volte con PBS per rimuovere eventuali cellule morte e sono stati aggiunti 500 μ l/pozzetto di tampone di lisi (Na acetato 0.3 M; Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH8; 200 μ g/ml Proteinasi K; 1% SDS). Le piastre sono poi state lasciate in incubatore a 37°C per 12 ore, agitandole di tanto in tanto per favorire la digestione delle cellule. Il giorno successivo, il lisato cellulare è stato trasferito in provette che sono state congelate a -20°C dopo una breve agitazione. Il lisato cellulare è stato centrifugato ed il DNA genomico è stato estratto con l'utilizzo di soluzioni di fenolo-cloroformio e cloroformio. Infine, il DNA è stato precipitato con l'aggiunta di sodio acetato 3 M ed isopropanolo ed il sedimento di DNA ottenuto dopo la centrifugazione è stato lavato con etanolo al 70% e risospeso in un appropriato volume di tampone TE a bassa concentrazione di EDTA (Tris-HCl 10 mM, pH8; EDTA 0.1 mM, pH8).

2.4.2 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

2.4.2.1 Identificazione dei cloni ricombinanti omologhi

Per l'identificazione dei cloni ricombinanti omologhi sono state messe a punto reazioni *nested*, in cui è stata effettuata una prima reazione con i *primer* Emi3_KO_E ed Emi3_KO_D ed una seconda amplificazione effettuata su un'aliquota pari a 1/20 dell'amplificato ottenuto nella prima reazione ed utilizzando i *primer* Emi3_KO_C ed Emi3_KO_I. Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 20 μ l, in presenza di 1x Phusion Buffer (MgCl₂ 7.5 mM, Finnzymes), dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0.5 pmol di *primer* oligonucleotidici senso ed antisenso (MWG), circa 20 μ g di DNA genomico e 0.2 U DNA polimerasi ad alta efficienza (Phusion, Finnzymes). Le reazioni sono state effettuate in un termociclatore MJ Mini Personal Thermal Cycler, alle condizioni riportate nelle tabelle sottostanti, e l'analisi degli amplificati, dell'ampiezza di 2400 bp, è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Sequenza dei primer oligonucleotidici

Emi3_Ko_E (senso)	5'- ATC TCT CCA GCC CCA TAA AT -3'
Emi3_Ko_D (antisenso)	5'- TGA GCC CAG AAA GCG AAG GA -3'
Emi3_Ko_C (senso)	5'- AAG AAC CAG AAA GCA CCA TC -3'
Emi3_Ko_I (antisenso)	5'- GCT ACC GGT GGA TGT GGA AT -3'

Reazione di amplificazione

1. 98°C per 3 min
2. 98°C per 10 sec (denaturazione)
3. 63°C per 30 sec (*annealing*)
4. 72°C per 1 min e 30 sec (estensione)
5. ripetuto i punti da 2. a 4. per 30 volte
6. 72°C per 10 min

2.4.2.2 Rilevazione della presenza della cassetta HSV-tk

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 50 µl, in presenza di PCR Mg-free buffer 1x (Finnzymes), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0.5 pmol di *primer* oligonucleotidici senso ed antisenso (MWG), circa 20 µg di DNA genomico e 1U di DNA polimerasi DyNAzyme (Finnzymes). Le reazioni sono state effettuate in un termociclatore MJ Mini Personal Thermal Cycler, alle condizioni riportate nelle tabelle sottostanti, e l'analisi degli amplificati, di dimensioni pari a 658 bp, è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Sequenza dei primer oligonucleotidici

TK1 (senso)	5'-CCC CAA CGG CGA CCT GTA-3'
TK2 (antisenso)	5'-CCA CGC AAC GCC CAA AAT-3'

Reazione di amplificazione

1. 94°C per 3 min
2. 94°C per 1 min (denaturazione)
3. 63°C per 1 min (*annealing*)
4. 72°C per 1 min (estensione)
5. ripetuto i punti da 2. a 4. per 29 volte
6. 72°C per 10 min

2.4.3 Southern blotting

Circa 10 µg di DNA genomico estratto da cloni di cellule ES sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *SphI*, separati mediante elettroforesi su gel di agarosio allo 0.8% e trasferiti per capillarità su membrana GeneScreen Plus (DuPont), utilizzando NaOH 0.4N come soluzione denaturante per il trasferimento. Dopo una notte, la membrana è stata recuperata e lavata in SSC 2x per due minuti ed il DNA è stato fissato tramite luce UV (Stratalinker 1800, Stratagene).

A questo punto il filtro è stato sottoposto ad incubazione a 68°C per 7 ore in soluzione di pre-ibridazione (SSC 6x; soluzione di Denhardt 50x; SDS 1%; 15 µg DNA di sperma di salmone denaturato a 95°C per 5 min e trasferito immediatamente in ghiaccio per altri 10 min) e la successiva ibridazione è stata fatta procedere per una notte, ponendo il filtro in 15 ml di soluzione di preibridazione contenente la sonda a 5×10^6 cpm/ml, ottenuta a partire da un costrutto presente nel nostro laboratorio mediante estrazione di DNA su larga scala, radiomarcata con [³²P]-dCTP (Amersham) tramite il metodo *random primer* (Feinberg e Vogelstein, 1983) e purificata con l'uso di Mini Quick Spin DNA Columns (Roche).

La membrana è stata poi sottoposta ad una serie di lavaggi a stringenza crescente: *i*) SSC 2x + SDS 0.5% per 10 min a temperatura ambiente; *ii*) SSC 1x + SDS 0.5% per 10 min a temperatura ambiente; SSC 0.2x + SDS 0.1% per 10 min a 65°C. La membrana è stata infine risciacquata in SSC 6x e sottoposta ad autoradiografia con lastre fotografiche Biomax (Kodak) a -80°C. La lastra è poi stata processata tramite immersione in apposita soluzione di sviluppo per 5 minuti (Kodak) e successivamente in soluzione di fissaggio (Kodak) per 15 min.

2.5 Produzione di topi chimera per l'allele *Emilin3* inattivato

2.5.1 Isolamento di blastocisti

Materiali:

- Terreno KSOM-HEPES: NaCl 95 mM; KCl 2.5 mM; KH₂PO₄ 0.35 mM; MgSO 0.2 mM; lattato (sale di Na) 10 mM; piruvato (sale di Na) 0.2 mM; glucosio 5.56 mM; NaHCO₃ 5 mM; CaCl₂ 1.71 mM; L-glutamina 1 mM; EDTA 0.01 mM; HEPES 20 mM; BSA 4 mg/ml; penicillina 0.06 g/l; streptomycina solfato 0.05 g/l; rosso fenolo 0.01 g/l; pH7.

Procedura:

Per realizzare l'accoppiamento, femmine C57BL/6J (Charles River) di 6 settimane di età sono state messe insieme a maschi fertili C57BL/6J. Il giorno dopo, le femmine sono state controllate per la presenza del *plug* vaginale, una membrana formata da proteine dello sperma coagulate, visibile dopo l'accoppiamento per circa 12 ore. Le femmine che presentavano il *plug*

sono state separate e sacrificate per dislocazione cervicale al giorno 3.5 *post coitum*. Dopo incisione addominale mediana, scollamento del peritoneo ed isolamento dell'utero, le blastocisti sono state ottenute lavando le corna uterine con 0.5 ml di terreno K-SOM in una piastra da coltura. Successivamente, le singole blastocisti sono state trasferite in una nuova piastra contenente terreno K-SOM e incubate a 37°C per qualche ora, fino al momento della microiniezione.

2.5.2 Microiniezione di cellule ES in blastocisti

Prima della microiniezione, sono state opportunamente preparate le cellule ES: una piastra da coltura, contenente il clone di cellule ES di interesse ad un passaggio precoce (passaggi 3-5 dal *picking* iniziale) e con colonie adeguatamente cresciute, è stata lavata con PBS, tripsinizzata e risospesa a singole cellule in terreno K-SOM. In media, 10-20 cellule ES così preparate sono state iniettate nel blastocele di ciascuna blastocisti, posizionata all'interno di una goccia di terreno K-SOM ricoperta di olio minerale. Le microiniezioni sono state realizzate utilizzando un micromanipolatore combinato con un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 35M) e posizionato su un tavolo pneumatico anti-vibrazioni. Dopo l'iniezione, le blastocisti sono state trasferite in una goccia di terreno K-SOM ed incubate a 37°C fino all'impianto nelle femmine pseudogravide.

2.5.3 Preparazione delle femmine pseudogravide

Il trasferimento *in vivo* delle blastocisti microiniettate è stato realizzato mediante impianto in topi femmine CD1 di circa 6 settimane di età, ottenute dall'accoppiamento con maschi CD1 vasectomizzati di almeno due mesi. A tale scopo, 2 o 3 femmine CD1 sono state messe in accoppiamento con i maschi vasectomizzati e controllate ogni giorno per la presenza del *plug* vaginale. L'accoppiamento provoca nelle femmine l'instaurarsi di un normale ciclo ormonale e le rende perciò adatte per l'impianto delle blastocisti microiniettate. Una colonia di 20 maschi sterili è stata utilizzata per generare 4-8 femmine pseudogravide ogni giorno.

2.5.4 Trasferimento delle blastocisti microiniettate in femmine pseudogravide

Le blastocisti microiniettate sono state trasferite nell'utero di femmine pseudogravide al giorno 2.5 *post coitum*. Queste ultime sono state anestetizzate con 2,2,2-tribromoetano (*Avertin*, Sigma), mediante iniezione intraperitoneale. Utilizzando un microscopio stereoscopico, le corna uterine sono state raggiunte attraverso una piccola incisione dorsale, trasferite all'esterno della cavità addominale e mantenute in posizione grazie ad un Serrefine *clamp*. Dalle 8 alle 10 blastocisti sono state delicatamente iniettate in ogni utero con un volume minimo di terreno K-SOM, mediante

apposita pipetta a bocca. Infine gli organi interni sono stati riposizionati e l'incisione suturata con apposite *clip*.

2.5.5 Analisi cariotipica delle cellule ES *in vitro* e dei topi *knockout in vivo*

Materiali:

- Terreno per linfociti: DMEM (Hepes 25 mM; Gibco); L-glutammina 2 mM (Gibco); FBS 10% (Gibco); β -mercaptoetanol 0.05 mM (Sigma)

Procedura:

Per l'analisi del cariotipo sui cloni di cellule ES, le cellule sono state cresciute fino a raggiungere il 70% di confluenza su piastre da 10 cm. Per l'esame del cariotipo su linfociti, un topo è stato sacrificato mediante dislocazione cervicale e, dopo incisione addominale, è stata prelevata la milza in condizioni di sterilità; la milza è stata finemente dissezionata e le cellule ottenute in seguito al passaggio attraverso un setaccio in nylon con pori da 100 μ m (Falcon) sono state trasferite in una fiasca da 75 cm² (Falcon) e cresciute per 65 ore in sospensione in terreno specifico addizionato di Concanavalina-A (Pharmacia) alla concentrazione finale di 6.25 μ g/ml, per l'attivazione dei linfociti.

Al momento dell'analisi cariotipica, sia le cellule ES sia i linfociti in sospensione sono stati trattati con colchicina (Sigma) alla concentrazione finale di 4 μ g/ml per 5 ore in incubatore. Quindi sono state raccolte le cellule in mitosi: per le cellule ES, che crescono adese al substrato, esse sono state staccate pipettando alcune volte il terreno sulla superficie della piastra, mentre per i linfociti estratti da milza, che crescono in sospensione, sono state raccolte tutte le cellule; in entrambi i casi le cellule sono state trasferite in un tubo a fondo sferico (Sarstedt). Da questo momento, sia per le cellule ES sia per i linfociti, è stata seguita la stessa procedura. Innanzitutto le cellule sono state centrifugate ed il sedimento è stato poi risospeso in soluzione ipotonica (sodio citrato 1%), incubato a 37°C per 10 min e nuovamente centrifugato. Il precipitato è stato risospeso in fissativo di Carnoy (etanolo-acido acetico 3:1) e centrifugato; l'operazione è stata ripetuta per 2 volte ed infine una goccia di sospensione cellulare è stata fatta cadere su un vetrino. Le metafasi sono state quindi colorate per 5 min con soluzione Giemsa al 5% (Sigma) ed osservate al microscopio ottico. Per ogni campione è stato esaminato un centinaio di metafasi. Le metafasi sono state considerate anomale quando il loro numero di cromosomi superava il 40; metafasi poliploidi o ipoploidi sono state considerate solo quando erano rilevate per più di 5 volte nello stesso campione.

Per effettuare il bandeggio G, i vetrini preparati secondo la procedura descritta in precedenza sono stati incubati per una notte a 55°C e successivamente per 2 min a temperatura ambiente in Tripsina 0.25% in PBS. Quindi sono stati risciacquati in PBS e trattati per 7 min con Giemsa 3% in una soluzione acquosa addizionata del 10% di fosfato di sodio dibasico e del 10% di

fosfato di potassio monobasico. Quindi i vetrini sono stati risciacquati in acqua ed osservati al microscopio ottico. Per la disposizione dei cromosomi nell'ordine convenzionale, è stato utilizzato un programma di cariotipizzazione semiautomatica (Zeiss).

2.6 Caratterizzazione dei topi *knockout*

2.6.1 Genotipizzazione

La genotipizzazione dei topi è avvenuta mediante PCR su DNA estratto da biopsie di coda di topo dell'età di 4 settimane. I campioni sono stati sottoposti a incubazione a 37°C per una notte in agitazione in soluzione di digestione (Tris-Cl 10 mM, pH 7.9; EDTA 1 mM, pH 8; sodio acetato 0.3 M; SDS 1% e proteinasi K 200 µg/ml), in seguito congelati per 30 minuti a -80°C e centrifugati. Il surnatante è stato estratto con fenolo/cloroformio e cloroformio isovolume. Il DNA è stato quindi precipitato con 0.1 volumi di sodio acetato 3M ed 1 volume di isopropanolo, risospeso in TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7.9; EDTA 1 mM, pH 8) e quantificato allo spettrofotometro.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 50 µl, in presenza di PCR Mg-free buffer 1x (Finnzymes), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0.5 pmol di *primer* senso ed antisenso (MWG), circa 50 µg di DNA genomico e 1 U di DNA polimerasi DyNAzyme (Finnzymes) ed in un termociclatore MJ Mini Personal Thermal Cycler alle condizioni riportate nelle tabelle sottostanti.

Sequenza dei primer oligonucleotidici	
WT1 (senso)	5'- TTC CCC CGA CAC GAT TCT TT -3'
WT2 (antisenso)	5'- TCA GCT TCT CCC TCA ACC AC -3'
KO1 (senso)	5'- ATC TCC GGG CCT TTC GAC -3'
KO2 (antisenso)	5'- GAC TTA CAG CGG ATC CCT CA -3'

Reazione di amplificazione
1. 94°C per 3 min
2. 94°C per 1 min (denaturazione)
3. 58°C per 1 min (<i>annealing</i>)
4. 72°C per 2 min (estensione)
5. ripetuto i punti da 2. a 4. per 34 volte
6. 72°C per 7 min

2.6.2 RT-PCR

La reazione è stata condotta su biopsie di coda ottenute da topi *wild-type*, eterozigoti o omozigoti per l'allele inattivato derivati da un incrocio tra topi eterozigoti, con le stesse modalità, *primer* e condizioni di reazione descritti al paragrafo 2.1. La reazione è stata bloccata a 35 cicli.

2.7 Rilevazione della pressione

La rilevazione della pressione sistolica e diastolica è stata condotta per 5 giorni consecutivi in modo non invasivo, mediante pletismografia *tail-cuff* su 4 topi *wild-type* e 4 *knockout* derivati da incroci tra eterozigoti, dal gruppo del Prof. Giuseppe Lembo del Dipartimento di Angio-cardio-neurologia dell'Istituto Neurologico Mediterraneo (NEUROMED) I.R.C.C.S. di Pozzilli (IS).

3 RISULTATI

3.1 Analisi dell'espressione delle emiline/multimerine mediante RT-PCR

Per avere informazioni sulla possibile funzione di Emilina-3, ho innanzitutto intrapreso uno studio della sua espressione, effettuando anche un confronto con l'espressione degli altri geni della famiglia delle emiline/multimerine. Un'analisi accurata è stata quindi condotta su diversi organi di topo *wild-type* adulto mediante RT-PCR con *primer* specifici per ciascuna emilina/multimerina. In Figura **B.1** è presentata l'amplificazione ottenuta a 30 cicli. *Emilin1* è espresso in tutti gli organi considerati, con l'eccezione dei linfonodi, e con un'abbondante espressione a livello di sistema cardiocircolatorio, gastrointestinale e riproduttivo. *Emilin2* presenta un quadro piuttosto simile, anche se rispetto ad *Emilin1* ha un'espressione ridotta in rene, polmone, utero, pelle, cervello, fegato e intestino ed un'espressione nettamente superiore nell'orecchio. *Multimerin1* è presente in tutti gli organi considerati, ad eccezione di timo, polmone, cervello e orecchio, e presenta una forte espressione soprattutto a livello di sistema cardiocircolatorio e diaframma. Di tutti i componenti della famiglia delle emiline/multimerine, *Multimerin2* sembra essere il gene più ampiamente espresso: è presente in tutti gli organi esaminati ad elevati livelli, ad eccezione del timo, dove è stata rilevata una banda molto lieve. Considerato il quadro generale di espressione dei geni della famiglia delle emiline/multimerine, *Emilin3* appare espressa in modo decisamente più ristretto. E' per esempio l'unico gene della famiglia che non è espresso a livello di sistema cardiocircolatorio, anche se è presente nella milza; inoltre è stato rilevato nei bronchi, ma non nel polmone, in muscoli scheletrici, come il quadricipite ed il diaframma, e poi a livello di coste, pelle e cervello, e nel sistema gastrointestinale, con l'eccezione del fegato, a differenza dalle altre emiline. Una fortissima espressione è stata rilevata anche a livello di occhio ed orecchio ed *Emilin3* è espressa decisamente in quantità rilevante nell'apparato riproduttivo, soprattutto quello maschile (testicolo), ma anche in quello femminile (ovaio, utero).

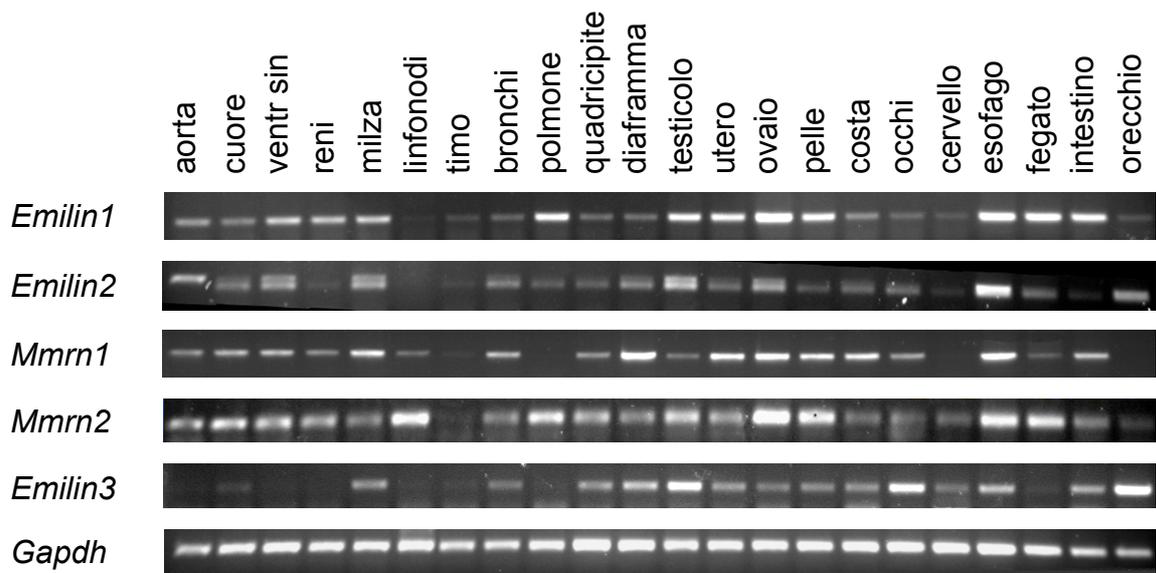


Figura B.1: Analisi dell'espressione delle emiline/multimerine mediante RT-PCR. Sono riportati gli amplificati per ciascuna emilina e del controllo GAPDH, relativamente a diversi organi isolati da topi *wild-type* del ceppo C57BL/6 dell'età di tre mesi.

3.2 Analisi dell'espressione di *Emilin3* durante lo sviluppo

Il quadro di espressione del gene *Emilin3* è stato studiato più dettagliatamente durante lo sviluppo embrionale mediante esperimenti di RT-PCR e di ibridazione *in situ* su embrioni del ceppo C57BL/6 a diversi stadi di sviluppo, dallo stadio E9.5 a quello E14.5. L'analisi semi-quantitativa, ottenuta mediante RT-PCR su RNA provenienti da embrioni a diverse età indica che l'espressione di *Emilin3* risulta rilevabile già a partire dallo stadio E9.5. L'espressione aumenta negli stadi successivi di sviluppo, raggiungendo un picco in corrispondenza di E13.5, per poi attenuarsi negli stadi più tardivi (dato non mostrato). Tale quadro di espressione è stato successivamente confermato da analisi di ibridazione *in situ* su sezioni di embrioni di topo. A tale scopo, a partire da un plasmide contenente il cDNA *full-length* di Emilina-3 murina è stata trascritta e marcata con digossigenina una sonda antisenso; ibridazioni di controllo sono state effettuate con una sonda senso, e non hanno dato luogo ad alcuna colorazione (dato non mostrato), dimostrando la specificità della sonda antisenso ottenuta.

La prima espressione di *Emilin3* è rilevabile a livello del tessuto epiteliale dell'intestino posteriore e, in minor misura, nel mesenchima circostante a E9.5. Questa positività va scemando rapidamente negli stadi embrionali successivi, divenendo invece più marcata nelle cellule mesenchimali. In embrioni agli stadi E10.5-11.5, l'espressione diventa evidente in corrispondenza del mesenchima della regione faringea, da cui si origineranno le tonache che rivestono la prima parte dell'apparato digerente e dell'apparato tracheo-bronchiale: appaiono infatti fortemente positivi il palato, la lingua, l'esofago e la trachea. Una forte espressione è stata rilevata anche a livello della lamina del pavimento del mesencefalo; questa particolare espressione a livello del sistema nervoso centrale è presente ora ai suoi massimi livelli, poi comincerà a ridursi, fino a risultare assente allo stadio E13.5. Sono invece negativi per *Emilin3* il cuore ed il fegato, mentre sono fortemente marcati i dischi intervertebrali, in particolare quelli posteriori. Allo stadio E12.5 questo *pattern* viene mantenuto, ma l'espressione che risalta maggiormente è sicuramente quella riscontrata a livello della cresta genitale, che appare fortemente positiva, ed in cui risultano esprimere *Emilin3* anche tutte le cellule germinali (Figura **B.2a**).

Allo stadio E13.5, è ancora rilevante l'espressione a livello dei connettivi della trachea e dei bronchi, dove appare localizzata nel tessuto mesenchimale subito al di sotto dell'epitelio tracheale e bronchiale, risparmiando la parte terminale delle ramificazioni bronchiali. Allo stadio E13.5 vi è una diffusa espressione di *Emilin3* a carico dei connettivi e di altri tessuti di origine mesenchimale in diversi organi, quali: meato acustico esterno, palpebre, vibrisse, lingua, palato, muscolatura connettivale degli arti, dischi intervertebrali, pericondrio, mesenchima mesonefrico e subepidermico. A tale stadio, inoltre, l'espressione è presente a livello della muscolatura liscia di organi cavi quali l'esofago, lo stomaco e l'intestino. Allo stadio E14.5 l'espressione diminuisce

notevolmente d'intensità, mantenendosi però nella maggior parte dei precedenti territori (Figura **B.2b**).

L'analisi mediante RT-PCR effettuata su cuccioli neonati mostra come ad un giorno dalla nascita l'mRNA di Emilina-3 sia rilevabile nella maggior parte degli organi analizzati, risultando più evidente a livello di intestino, polmoni, reni, pelle ed utero. Dal punto di vista quantitativo, l'espressione di *Emilin3* diminuisce notevolmente durante lo sviluppo postnatale, come evidenziato dal confronto tra i livelli di mRNA in organi di topi di tre mesi di età presentata al paragrafo precedente ed i corrispondenti organi di topi neonati. Pur avendo un andamento che si attenua nella maggior parte delle localizzazioni, nei topi adulti l'mRNA codificante per Emilina-3 risulta comunque ancora ben rilevabile in determinati organi, quali l'occhio, gli organi riproduttivi e la cartilagine.

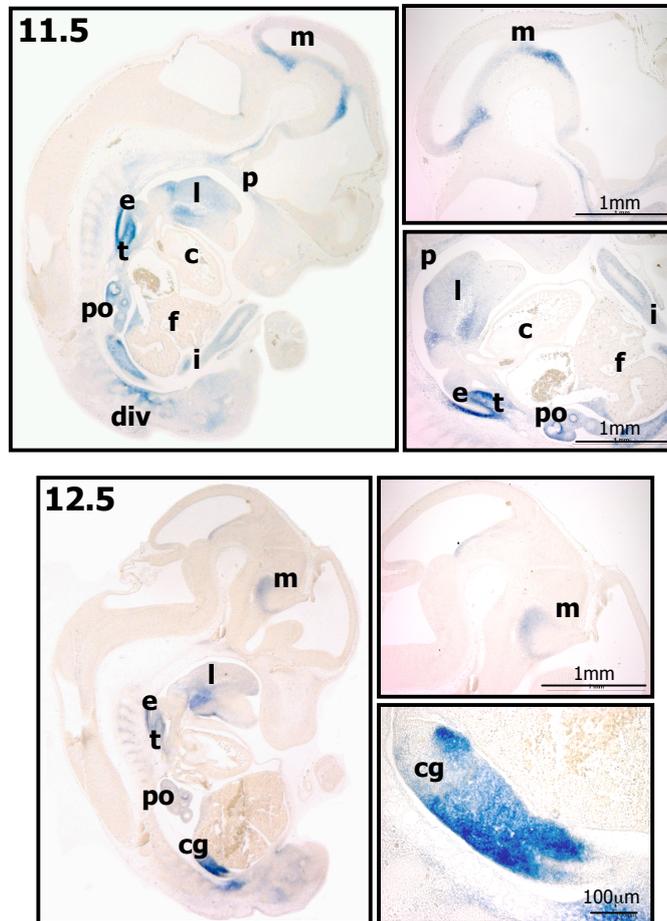


Figura B.2a: Analisi dell'espressione di *Emilin3* mediante ibridazione *in situ* su sezioni.

Le sezioni sono state effettuate su topi del ceppo C57BL/6 a 11.5 e 12.5 giorni di sviluppo embrionale. Sono presentate a sinistra delle sezioni sagittali, mentre a destra sono riportati ingrandimenti delle stesse sezioni. C: cuore, cg: cresta genitale, div: dischi intervertebrali, e: esofago, f: fegato, i: intestino, l: lingua, m: mesencefalo, p: palato, po: polmone, t: trachea.

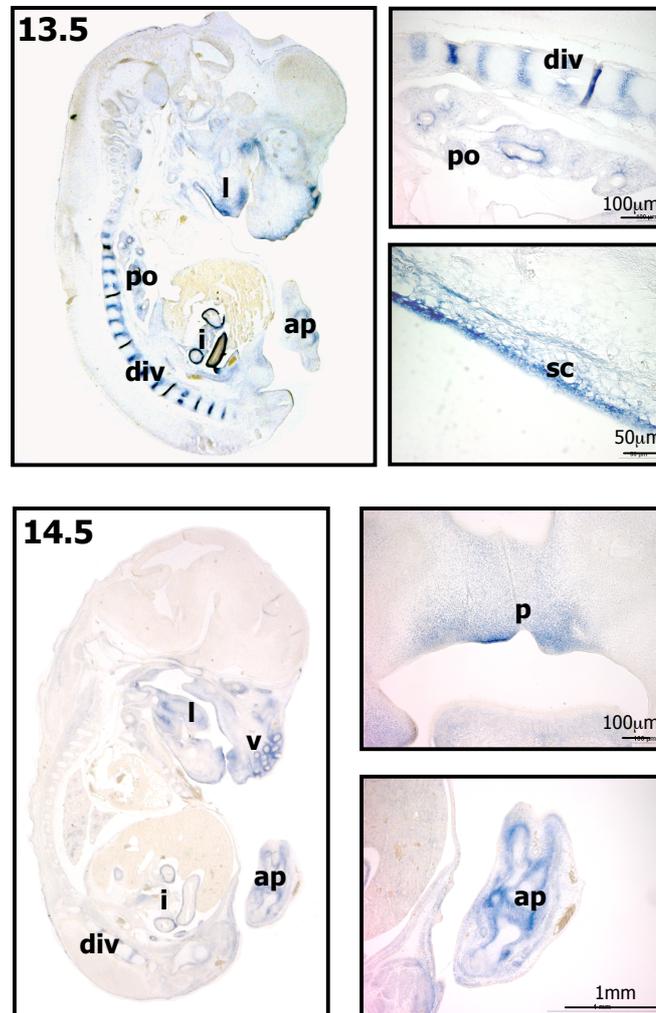


Figura B.2b: Analisi dell'espressione di *Emilin3* mediante ibridazione *in situ* su sezioni.

Le sezioni sono state effettuate su topi del ceppo C57BL/6 a 13.5 e 14.5 giorni di sviluppo embrionale. Sono presentate a sinistra delle sezioni sagittali, mentre a destra sono riportati ingrandimenti delle stesse sezioni; a 14.5 giorni di sviluppo è raffigurata anche una sezione frontale, in cui appare positivo il palato. Ap: arto posteriore, div: dischi intervertebrali, i: intestino, l: lingua, p: palato, po: polmone, sc: sottocute, v: vibrisse.

3.3 Elettroporazione delle cellule ES con il costrutto di inattivazione, selezione ed isolamento dei cloni ricombinanti

Il costrutto utilizzato per l'elettroporazione (pKS-5.9.NTK) presente nel nostro laboratorio è stato ottenuto a partire da un clone Lambda-FIX II di 11 kb contenente la sequenza completa di *Emilin3*, isolato da una libreria genomica murina del ceppo 129Sv. Il costrutto di inattivazione ha una dimensione complessiva di 12.1 kb e comprende il plasmide pKS (3.0 kb), la cassetta HSV-*tk* (1.8 kb), un braccio sinistro di omologia con il gene *Emilin3* (1.6 kb), la cassetta *neo*^R (1.9 kb), ed infine un braccio destro di omologia con il gene *Emilin3* (3.9 kb). Con un vettore così disegnato, in seguito a un evento di ricombinazione omologa in cellule ES, nessun prodotto funzionale di *Emilin3* dovrebbe essere generato dall'allele mutato. Per verificare che il costrutto fosse stato realizzato correttamente e che gli inserti *neo*^R e HSV-*tk* fossero stati inseriti con il giusto orientamento rispetto alla porzione del gene *Emilin3*, sono stati eseguiti dei saggi di restrizione con gli enzimi *EcoRI* e *HindIII*. In entrambi i casi sono stati prodotti i frammenti della lunghezza attesa, confermando la corretta realizzazione del costrutto (Figura **B.3**). Per aumentare la frequenza dell'evento di ricombinazione omologa, le cellule ES vengono trasfettate con il costrutto di inattivazione linearizzato. Nel nostro caso, nel costrutto è presente un sito unico di linearizzazione per l'endonucleasi *XhoI*; l'analisi in gel di agarosio del costrutto pKS-5.9.NTK dopo digestione con *XhoI* è presentata in Figura **B.3**, dove è evidente un'unica banda di 12kb.

Un totale di 1.7×10^8 cellule ES della linea R1 (Nagy et al., 1993) al passaggio 14 è stato elettroporato con il costrutto di inattivazione purificato e linearizzato con l'endonucleasi *XhoI*. La decisione di elettroporare un numero di cellule così elevato è stata motivata dai precedenti tentativi di inattivare il gene di Emilina-3 nel laboratorio del Prof. Bonaldo, tentativi che hanno evidenziato una frequenza di ricombinazione particolarmente bassa per questo *locus*. Sono stati elettroporati dieci campioni indipendenti secondo lo schema seguente:

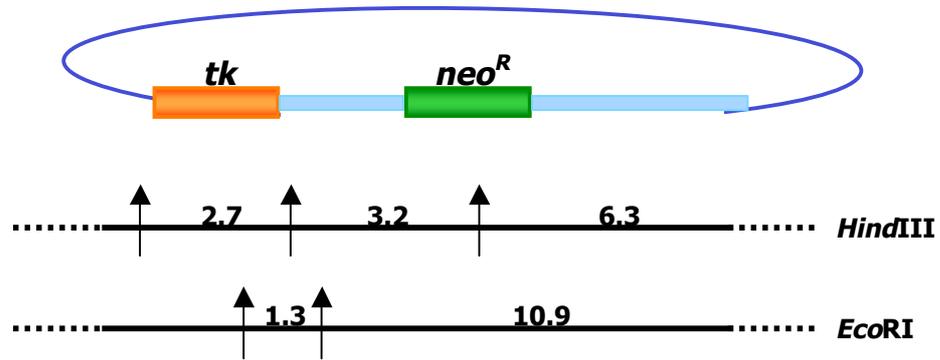
- A. 5 cuvette: 1×10^7 cellule + 60 μg costrutto per cuvetta
- B. 4 cuvette: 1×10^7 cellule + 30 μg costrutto per cuvetta
- C. 1 cuvetta: 1×10^7 cellule senza costrutto (campione di controllo).

Dopo l'elettroporazione, ciascun campione di cellule ES è stato trasferito in una piastra Petri da 15 cm contenente un monostrato di fibroblasti inattivati *neo*^R, per un totale di 15 piastre mantenute in coltura in presenza di terreno per ES. Dopo circa 36 ore, nonostante la presenza di numerosi detriti e frammenti cellulari in sospensione, normale conseguenza della procedura di trasfezione mediante elettroporazione, l'osservazione al microscopio a contrasto di fase ha

dimostrato la presenza di un gran numero di piccole colonie, formate da gruppi di 2-4 cellule ES, adese al monostrato di fibroblasti inattivati. È stata perciò iniziata la selezione con G418 e ganciclovir, per isolare i cloni nei quali si fosse verificata l'integrazione del costrutto; a tale scopo, il mezzo di coltura delle cellule è stato addizionato di G418 300 $\mu\text{g/ml}$ e ganciclovir 2 μM . Il regime di doppia selezione è stato mantenuto per 4 giorni; a partire dal terzo giorno di selezione, l'osservazione delle piastre al microscopio ha evidenziato la presenza di numerose cellule morte in sospensione, mentre le colonie sottostanti, inizialmente in gran numero ed in attiva crescita durante i primi giorni di coltura, mostravano una frazione di colonie poco compatte e con cellule sofferenti ed in via di distacco, indice di colonie non resistenti alla selezione, ma anche una frazione di colonie ben compatte ed in continua crescita. A partire dal quarto giorno si è continuato con la sola selezione positiva con G418 alla concentrazione di 300 $\mu\text{g/ml}$, ed al sesto giorno dall'inizio della selezione la totalità delle cellule ES nella piastra di controllo senza costrutto erano morte, mentre le piastre di entrambi i gruppi A e B trasfettati con il costrutto presentavano numerose colonie in attiva crescita, per lo più compatte e con margini regolari, indice di colonie di cellule ES non differenziate.

È stato perciò eseguito l'isolamento (*picking*) dei cloni ricombinanti, raccogliendo solo i cloni che presentavano colonie con aspetto più compatto e non differenziato. Il *picking* è stato suddiviso in tre giorni, con la raccolta di 888 cloni il primo giorno (7° giorno dalla trasfezione), di 385 il secondo (8° giorno dalla trasfezione) e di 232 il terzo (9° giorno dalla trasfezione), per un totale di 1505 cloni isolati. Questi cloni isolati sono stati espansi in piastre da 96 pozzetti in presenza di terreno per ES contenente 300 $\mu\text{g/ml}$ di G418. Le piastre sono state analizzate al microscopio quotidianamente, e la crescita e morfologia delle colonie di ciascun clone attentamente seguita e trascritta. Dei 1505 cloni inizialmente isolati, 996 hanno ripreso la crescita; a parte una piccola frazione di cloni, che presentavano colonie di aspetto piatto o morfologia parzialmente differenziata, la maggior parte dei cloni ricresciuti nelle piastre ha confermato la presenza di colonie di aspetto chiaramente indifferenziato. Tutti i cloni ricresciuti sono stati successivamente trasferiti in piastre da 24 pozzetti per la raccolta del DNA necessario alla genotipizzazione e per il congelamento delle cellule.

A



B

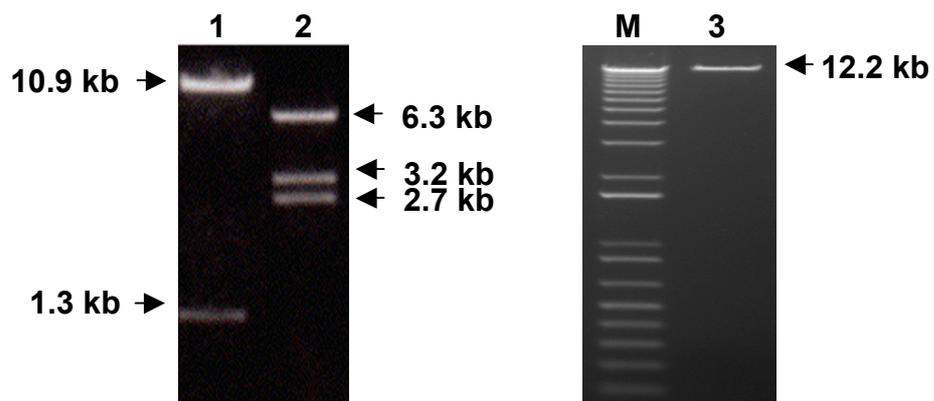


Figura B.3: Preparazione del costrutto pKS-5.9.NTK per l'inattivazione mirata di Emilin3. (A) Rappresentazione schematica del costrutto con l'indicazione dei siti di taglio da parte di *Hind*III ed *Eco*RI e della lunghezza dei frammenti generati dalla digestione con i due enzimi. (B) Analisi dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio dei frammenti ottenuti dalla digestione del costrutto con gli enzimi *Hind*III (1) ed *Eco*RI (2) e dalla linearizzazione, necessaria per la trasfezione delle cellule ES, con l'endonucleasi di restrizione *Xho*I (3). M: marcatore di peso molecolare.

3.4 Identificazione dei cloni ricombinanti omologhi

3.4.1 Elaborazione del protocollo di *screening* dei cloni

Precedenti tentativi di inattivazione mirata del gene *Emilin3* compiuti nel nostro laboratorio avevano dimostrato che la ricombinazione omologa per questo *locus* genico avviene con una frequenza piuttosto bassa (inferiore all'1%). Questa osservazione ci ha spinti quindi ad intraprendere un progetto di *gene targeting* su larga scala, con la conseguente necessità di un'analisi genotipica su un numero molto elevato di cloni cellulari, 996 nel nostro caso.

Il metodo di *screening* di elezione per l'identificazione dei cloni ES ricombinanti omologhi negli esperimenti di *gene targeting* è quello del Southern blotting; questa tecnica, infatti, seppur laboriosa e costosa, risulta molto accurata e sensibile, minimizzando la possibilità di falsi positivi e soprattutto di falsi negativi. Tuttavia, in questo particolare esperimento, essa non era realisticamente applicabile, dato il numero molto elevato di cloni di cellule ES da sottoporre all'analisi. La PCR è invece un metodo semplice e rapido che permette di analizzare un ampio numero di campioni in tempi relativamente ridotti, nonostante presenti un maggior rischio di falsi positivi e negativi, problema particolarmente critico nel caso dello *screening* di cloni di cellule ES sottoposte a *gene targeting*, dove un raro clone correttamente ricombinato potrebbe sfuggire all'identificazione. Sulla base di queste considerazioni, abbiamo deciso di elaborare una strategia di *screening* per i cloni ricombinanti omologhi mediante reazioni di PCR, per una reazione altamente specifica per gli alleli ricombinanti, ma soprattutto altamente sensibile. Tenendo conto della struttura dell'allele *wild-type* e dell'allele ricombinante, l'unico modo per ottenere mediante PCR un frammento specifico per quest'ultimo allele è quello di disegnare un *primer* senso a livello della sequenza genomica esternamente alla regione di omologia al 5' del vettore e un *primer* antisenso all'interno della cassetta *neo^R*, non presente nel genoma murino selvatico. Per lo *screening* con PCR ho quindi disegnato due coppie di oligonucleotidi *forward* e *reverse*, una in posizione più interna rispetto all'altra, così da poter realizzare reazioni di tipo *nested*, nelle quali cioè un'aliquota del prodotto di amplificazione della prima reazione venga utilizzato come stampo per una seconda amplificazione, utilizzando *primer* interni al primo amplificato. In questo modo sono state notevolmente incrementate la sensibilità e l'efficienza delle reazioni a catena della polimerasi (Figura B.4).

Considerando la dimensione della cassetta *neo^R* e la lunghezza del braccio di omologia al 5' del costrutto, l'amplificato finale prodotto utilizzando dei *primer* così posizionati raggiunge una lunghezza di circa 2400 bp. Tali dimensioni rendono difficile ottenere amplificati con le normali reazioni di PCR, richiedendo l'utilizzo di DNA polimerasi ad alta efficienza e l'elaborazione di un protocollo *ad hoc*. Poiché le normali metodiche di PCR basate su DNA polimerasi standard non sono grado di produrre agevolmente amplificati superiori alle 1000-1500 bp, per il nostro studio

abbiamo dovuto fare affidamento a procedure di PCR ad alta efficienza. In effetti, in alcuni esperimenti iniziali di controllo, dedicati a verificare se la reazione di PCR con l'usuale *Taq* DNA polimerasi fosse comunque in grado di produrre amplificati in maniera consistente e riproducibile con oligonucleotidi disegnati per amplificare frammenti di queste dimensioni, non ho ottenuto alcun risultato riproducibile (Figura **B.5**). Abbiamo perciò deciso di utilizzare il sistema Phusion, basato su una DNA polimerasi ad alta fedeltà in grado di produrre amplificati di grandi dimensioni. Inoltre, l'alta efficienza di questo enzima comporta anche una drastica riduzione dei tempi di reazione, che nel nostro caso si sono ridotti da 300 minuti, necessari per una PCR con una normale *Taq* polimerasi, a 90 minuti circa per il sistema Phusion. Ho quindi eseguito una serie di esperimenti al fine di ottimizzare il protocollo di *screening* con il sistema Phusion, avvalendomi dell'utilizzo di un controllo positivo, costituito da un clone di cellule ES ricombinanti omologhe ottenute nel precedente esperimento di *gene targeting* di *Emilin3* effettuato nel nostro laboratorio. Queste cellule infatti si erano rivelate incapaci di dare origine a topi chimera e a trasmissione germinale della mutazione *in vivo* ma presentavano l'allele di *Emilin3* correttamente inattivato (P. Bonaldo e coll., dati non pubblicati). Nelle prime reazioni di *screening* allestite per la messa a punto del protocollo con il sistema Phusion, è risultato evidente che un fattore particolarmente critico era la concentrazione del DNA genomico da utilizzare come stampo. Infatti, dopo numerosi tentativi di amplificazione a diverse condizioni, ho dimostrato come questa polimerasi abbia un intervallo ottimale di concentrazione dello stampo piuttosto ristretto, almeno per quanto riguarda questo specifico *locus*. E' stato quindi necessario definire precisamente a quale concentrazione utilizzare il DNA estratto dai 996 cloni di cellule ES da genotipizzare, allo scopo di ottenere una reazione il più efficiente e riproducibile possibile. La reazione finale, ottimizzata nella concentrazione del DNA stampo, nella concentrazione dei componenti della miscela di reazione e nella temperatura di *annealing*, è risultata altamente riproducibile sia nella prima che nella seconda amplificazione e, grazie alla PCR *nested*, ci ha permesso di ottenere l'amplificato specifico con un'elevata sensibilità.

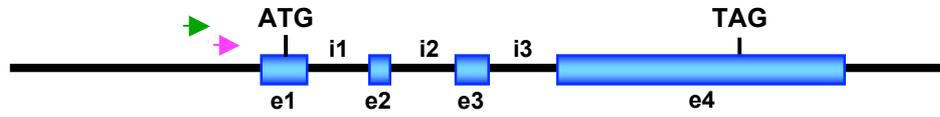
Figura B.4: Rappresentazione schematica dell'allele *wild-type* di *Emilin3* e del medesimo allele dopo l'evento di ricombinazione omologa con il vettore pKS-5.9.NTK.

Nella figura sono rappresentati gli esoni (e1-e4), gli introni (i1-i3) ed anche l'esone e l'introne parzialmente deleti dall'inserzione della cassetta *neo^R* ($\Delta e1$ e $\Delta i1$). I siti di inizio e di fine della trascrizione dell'allele *wild-type* sono indicati rispettivamente dai codoni ATG e TAG. Le frecce verdi e viola identificano la posizione degli oligonucleotidi utilizzati come *primer* esterni ed interni per le reazioni di PCR. Risulta evidente che può essere prodotto un amplificato esclusivamente nei cloni contenenti un allele ricombinante.

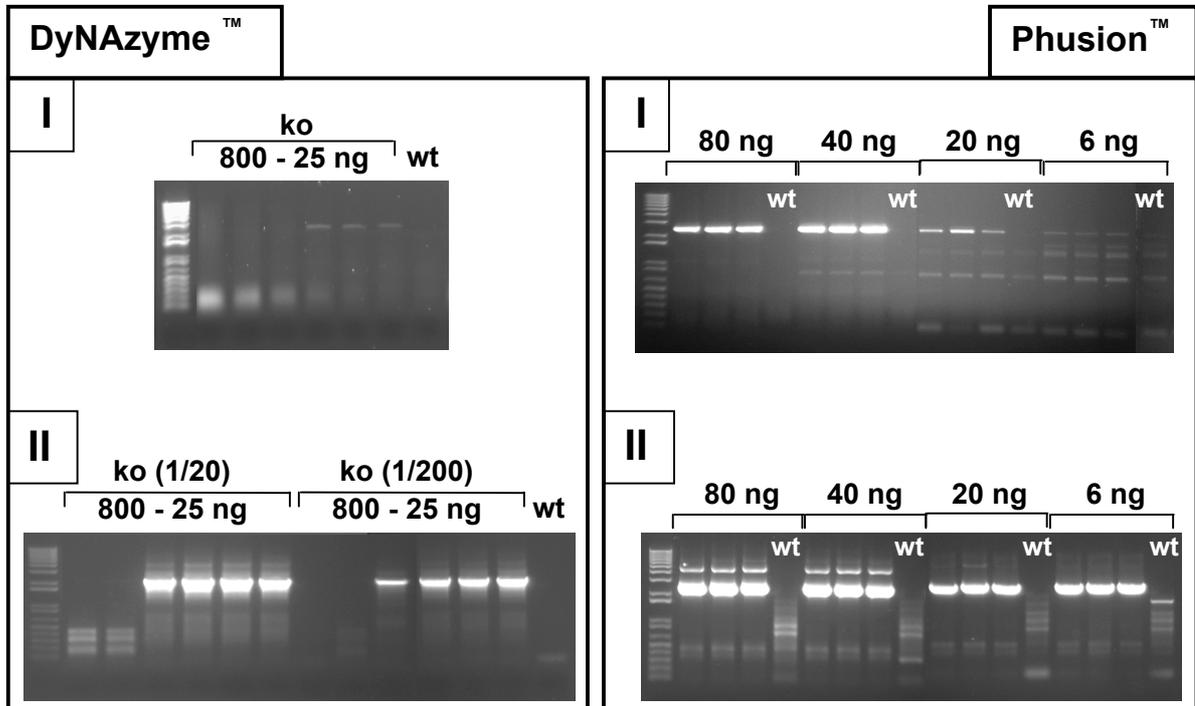
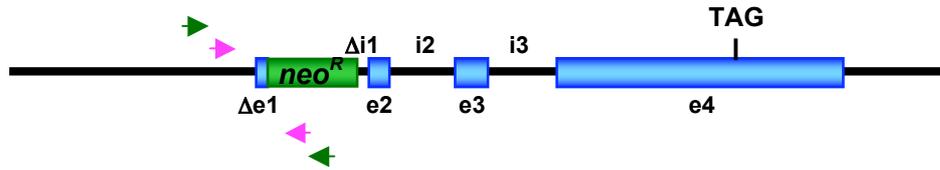
Figura B.5: Confronto tra l'amplificazione con la DNA polimerasi DyNAzyme™ (Finnzymes) e la DNA polimerasi Phusion™ (Finnzymes).

DNA genomico estratto da un campione di cellule ES ricombinante per *Emilin3*, usato come stampo, è stato caricato a diluizioni decrescenti in una serie di reazioni di amplificazione con il sistema DyNAzyme (a sinistra) e con quello Phusion (a destra), alla temperatura di *annealing* costante di 61°C. In alto (I) è rappresentata la prima reazione di amplificazione, utilizzando gli oligonucleotidi più esterni (EMI3_Ko_E ed EMI3_Ko_D). In basso (II) è invece riportata la reazione *nested*, per la quale sono stati utilizzati come stampo un'aliquota dell'amplificato della prima reazione e come *primer* gli oligonucleotidi più interni (EMI3_Ko_C ed EMI3_Ko_I). È indicata per ogni amplificato la quantità di DNA stampo utilizzato per ogni reazione. Come si vede, l'amplificato specifico da 2500 bp, compare con maggiore efficienza all'aumentare della diluizione, evidenziando come la concentrazione del DNA stampo sia un fattore critico per la riuscita della reazione. È anche interessante notare che, quando la concentrazione del DNA stampo è eccessivamente ridotta, compaiono anche bande aspecifiche. È evidente che la reazione di amplificazione con la polimerasi Phusion ha una specificità e sensibilità nettamente superiori alla polimerasi DyNAzyme nella produzione di amplificati lunghi. Wt indica il campione di DNA genomico di cellule ES *wild-type*, usato come controllo negativo.

Allele wild-type



Allele ricombinante



3.4.2 **Screening su larga scala dei cloni di cellule ES ricombinanti**

Sulla base degli esperimenti precedenti, ho quindi potuto elaborare un protocollo ottimale per l'analisi genotipica di tutti i cloni ES ottenuti dall'esperimento di *gene targeting* per *Emilin3*, mediante PCR con il sistema Phusion sul DNA estratto dalle piastre da 24 pozzetti. L'analisi genotipica dei 996 cloni di cellule ES tramite PCR con il sistema Phusion ha portato complessivamente all'identificazione di sette cloni ricombinanti omologhi; nella figura **B.6** è riportato un esempio dei risultati ottenuti in questo *screening* iniziale. I sette cloni risultati positivi in questa prima analisi (identificati con i numeri 2, 27, 698, 706, 822, 1147 e 1238) sono stati quindi scongelati ed espansi in una piastra da 3.5 cm ciascuno. Per ciascun clone un'aliquota della piastra è stata quindi ricongelata, mentre il rimanente è stato nuovamente espanso fino ad ottenere due piastre da 10 cm di diametro per ciascun clone. Tali piastre sono state quindi sottoposte a lisi ed estrazione del DNA genomico, allo scopo di poter confermare che tali cloni fossero effettivamente ricombinanti omologhi per *Emilin3* e di poter eseguire ulteriori analisi a livello genomico. Infatti, oltre a fornire l'importante conferma che le procedure di manipolazione, lisi ed analisi del migliaio di cloni non avessero dato luogo ad eventuali risultati impropri per qualche clone nello *screening* iniziale, la grande disponibilità di DNA genomico dai cloni scongelati ed espansi ha reso possibile ulteriori analisi anche mediante Southern blot. L'analisi dei sette cloni riespansi, mediante PCR con il sistema Phusion in una reazione *nested*, ha confermato per tutti i cloni la presenza dell'allele correttamente inattivato (Figura **B.7**).

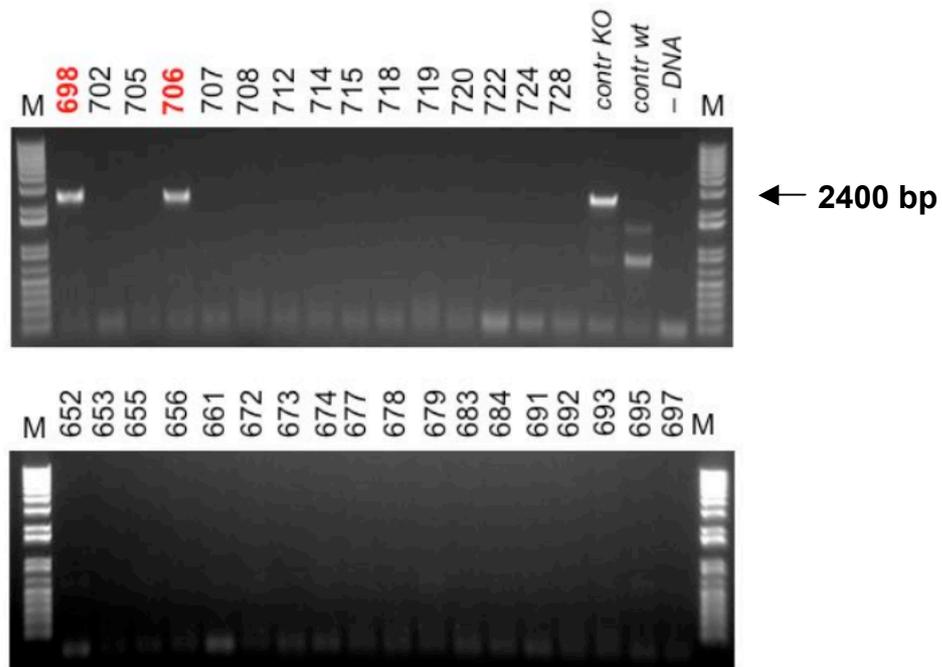


Figura B.6: Esempio di reazione per lo *screening* dei cloni mediante PCR con il sistema *Phusion*. Sono riportati 33 cloni analizzati mediante PCR e successiva corsa elettroforetica. 31 cloni sono negativi e non danno origine ad alcun amplificato, mentre per due cloni (698 e 706) è presente la banda corrispondente all'amplificato specifico di 2400 bp. KO indica il campione di DNA genomico estratto dal campione ricombinante per *Emilin3*, utilizzato come controllo positivo. Wt indica il campione di DNA genomico di cellule ES *wild-type* usato come controllo negativo. – DNA indica una reazione effettuata in assenza di DNA genomico, utilizzata come controllo per escludere la presenza di contaminazioni.

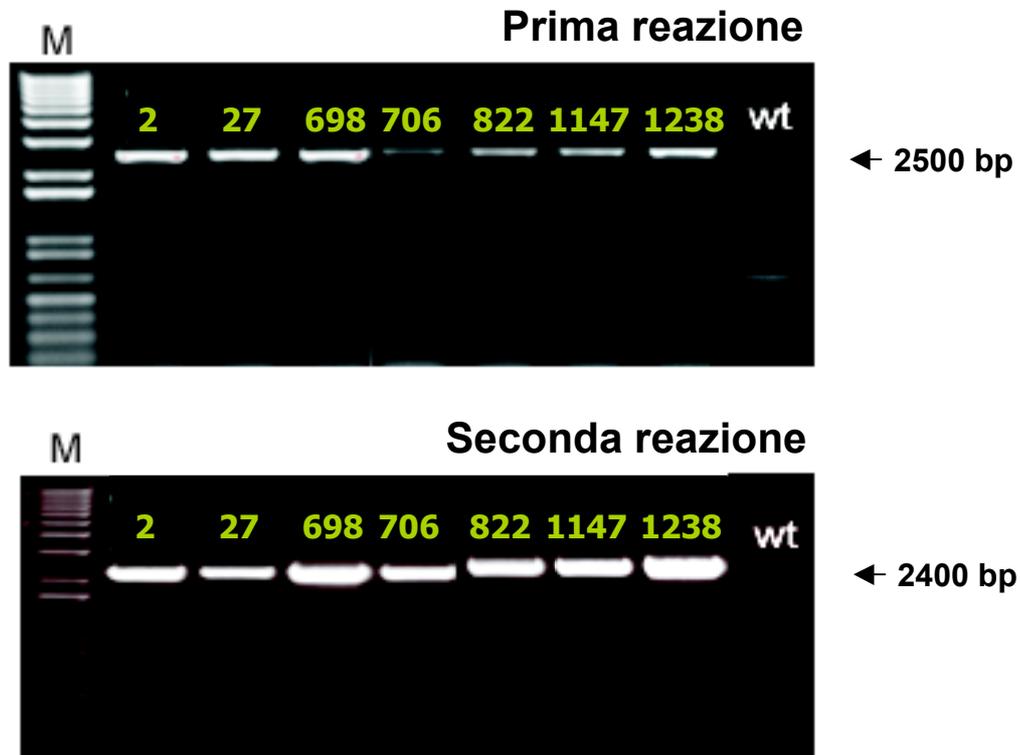


Figura B.7: Reazioni di PCR con il sistema Phusion a partire dal DNA genomico estratto dai sette cloni risultati positivi nello *screening* iniziale. In alto è riportata la reazione di amplificazione con gli oligonucleotidi più esterni EMI3_Ko_E e EMI3_Ko_D. E' evidente la banda specifica di 2500 bp per i sette cloni ricombinanti omologhi, identificati dal numero corrispondente. In basso è invece riportata la reazione di PCR *nested* per l'allele ricombinante di *Emilin3*, effettuata con gli oligonucleotidi più interni EMI3_Ko_C e EMI3_Ko_I. Come DNA stampo per questa reazione è stato utilizzato un'aliquota pari a 1/20 della prima reazione. La reazione *nested* conferma la presenza di una banda specifica di 2400 bp in tutti i sette cloni identificati durante lo *screening*. Wt indica il campione di DNA genomico da cellule ES *wild-type* usato come controllo negativo. M, marcatore di peso molecolare.

3.5 Caratterizzazione genomica dei cloni ricombinanti omologhi

Abbiamo deciso di proseguire nella fase successiva, quella della microiniezione in cellule ES, con quattro dei sette cloni ricombinanti omologhi identificati: i cloni 2, 27, 698 e 706. Essi sono stati ulteriormente caratterizzati mediante Southern blotting utilizzando una sonda specifica per il gene *Emilin3*. Il DNA estratto dai cloni da analizzare è stato digerito con l'enzima di restrizione *SphI* e sono quindi stati generati per l'allele *wild-type* e per l'allele ricombinante di *Emilin3* frammenti di dimensione diversa (Figura **B.8**). L'ibridazione con la sonda specifica per *Emilin3*, che avviene a livello dell'esone 4, produce nei cloni *wild-type* un'unica banda di 8.4 kb, mentre nei cloni in cui si è verificato l'evento di ricombinazione omologa, e perciò eterozigoti per la mutazione di *Emilin3*, si produce oltre alla banda di 8.4 kb una banda addizionale di 7.2 kb. Come appare evidente in Figura **B.8**, per ciascuno dei quattro cloni ricombinanti omologhi analizzati sono presenti entrambe le bande, corrispondenti all'allele *wild-type* e ricombinante, confermando così il risultato ottenuto con lo *screening* primario mediante PCR. Al contrario, nei tre cloni non ricombinanti analizzati, utilizzati come controllo negativo, è visibile una sola banda di 8.4 kb, corrispondente all'allele *wild-type*.

Per escludere la possibile presenza nei cloni ricombinanti omologhi anche di eventuali integrazioni casuali del costrutto nel genoma, ho messo a punto una reazione di PCR per l'amplificazione della cassetta HSV-*tk*. Infatti, durante l'evento di ricombinazione omologa, la cassetta HSV-*tk* viene normalmente persa e non risulta perciò integrata nel genoma delle cellule ES. Nel caso di integrazioni casuali, invece, la cassetta viene incorporata nel genoma e può quindi essere rilevata mediante amplificazione con *primer* disegnati all'interno della cassetta stessa. Per tutti i quattro i cloni ricombinanti omologhi, tale analisi non ha portato ad alcun prodotto di amplificazione (Figura **B.9**), escludendo la presenza di integrazioni casuali. Una reazione di amplificazione effettuata in parallelo per alcuni cloni risultati negativi nello *screening* primario ha prodotto un amplificato di 658 bp, corrispondente a una porzione del gene HSV-*tk*, confermando la specificità della reazione.

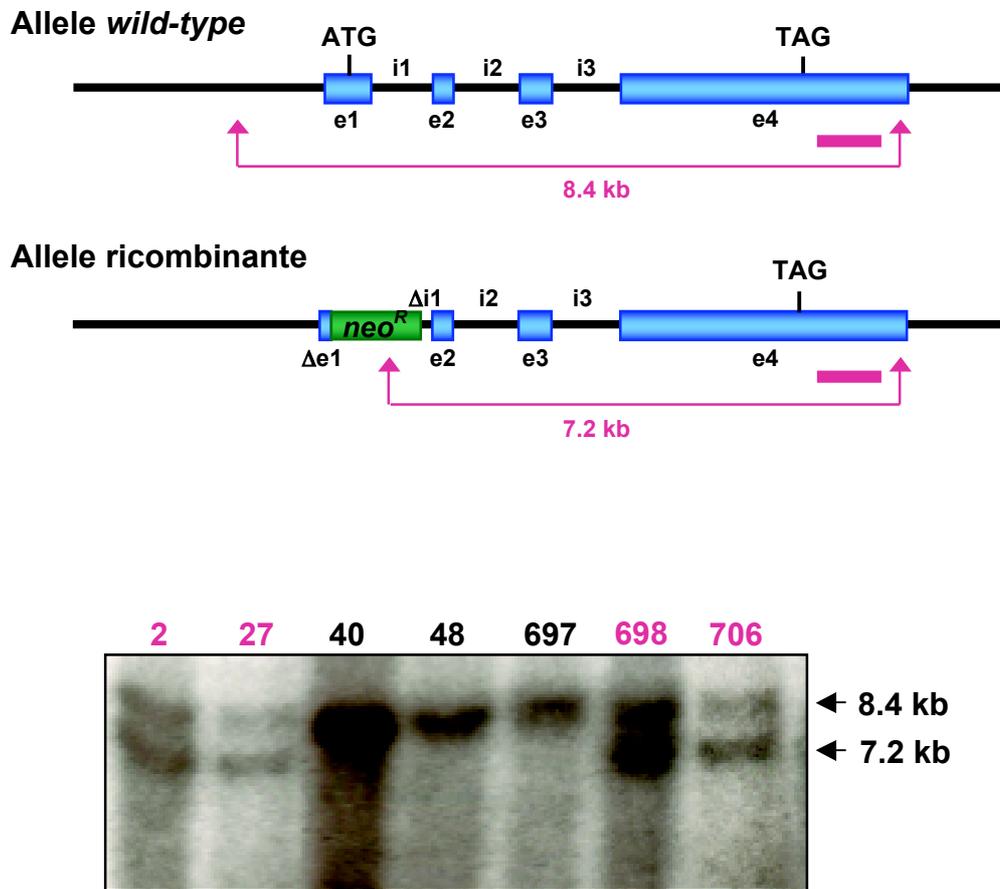
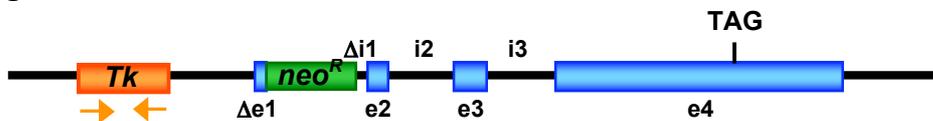


Figura B.8: Analisi mediante Southern blotting dei cloni ES ricombinanti omologhi ottenuti nell'esperimento di inattivazione mirata di *Emilin3*. In alto sono rappresentati l'allele *wild-type* e l'allele ricombinante. Sono indicate la posizione della sonda specifica per *Emilin3* e la dimensione dei frammenti generati dopo digestione con *SphI*. Nel caso di cellule ES *wild-type* per *Emilin3*, l'ibridazione della sonda genera un'unica banda di 8.4 kb, mentre nei cloni eterozigoti per la mutazione dovrebbe essere presente, oltre alla banda di 8.4 kb, una banda di 7.2 kb, corrispondente all'allele inattivato. In basso è riportata l'analisi mediante Southern blotting di cloni di cellule ES ottenuti dall'esperimento di inattivazione di *Emilin3*. In viola sono indicati i quattro cloni ricombinanti successivamente trasferiti *in vivo*: essi presentano due bande, corrispondenti ai due diversi alleli per il locus *Emilin3*. In nero sono rappresentati tre cloni non ricombinanti omologhi, utilizzati come controllo negativo, per cui è rilevata esclusivamente la banda dell'allele *wild-type*.

Integrazione casuale



Ricombinazione omologa

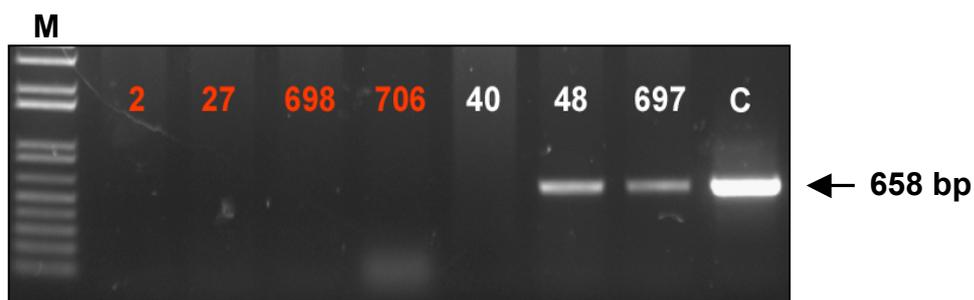
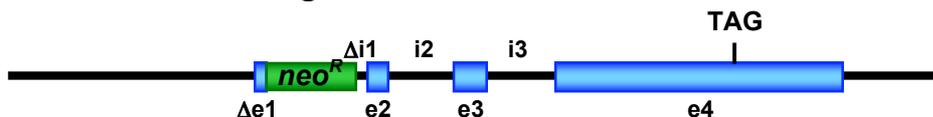


Figura B.9: Reazione di PCR per l'amplificazione della cassetta HSV-tk. I quattro cloni ricombinanti omologhi sono indicati in rosso, mentre tre cloni non ricombinanti, utilizzati come controllo negativo, sono indicati con numeri bianchi. Con la lettera C è indicato il costrutto di inattivazione, che contiene la cassetta HSV-tk ed è stato utilizzato come controllo positivo. Nessuno dei cloni ricombinanti omologhi presenta un amplificato, confermando che questi cloni hanno perso la cassetta HSV-tk mediante ricombinazione omologa e che non sono avvenute integrazioni casuali. Dei tre cloni non ricombinanti invece, due presentano l'amplificato specifico per il gene HSV-tk, pari a 658 bp. M: marcatore di peso molecolare.

3.6 Generazione di topi chimerici *Emilin3*^{+/-} ed analisi del chimerismo

Quattro cloni di cellule ES identificati mediante PCR e confermati mediante Southern blot e PCR come ricombinanti omologhi (2, 27, 698, 706) sono stati microiniettati in blastocisti *wild-type* di ceppo C57BL/6J che sono state successivamente impiantate in femmine CD1 pseudogravide. I cloni ES sono stati scongelati e mantenuti in coltura per il minor tempo possibile in modo da evitare eventuali fenomeni di differenziamento; tutti e quattro i cloni, al momento della microiniezione, non presentavano alcun segno di differenziamento, presentandosi con piccole colonie dai margini ben definiti. Subito prima della microiniezione, i cloni sono stati trattati con tripsina e separati meccanicamente con una pasteur cotonata fino ad ottenere una sospensione di singole cellule ES. Per ogni clone sono state effettuate diverse sedute di microiniezione, ed i risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella **B.1**. Nella Figura **B.10** sono riportate, nei due pannelli inferiori, due delle chimere ottenute. I topi chimerici sono caratterizzati dal colore non uniforme del mantello, che è una conseguenza del fatto che questi animali derivano in parte dalla blastocisti ospite C57/BL6 (mantello nero) ed in parte dalle cellule ES 129/Sv (agouti) microiniettate. Nel pannello superiore è riportato come confronto un topo non chimerico, ottenuto negli stessi esperimenti, il cui pelo è infatti completamente nero, derivando unicamente dalle cellule della blastocisti ospite senza la colonizzazione da parte delle cellule ES. La chimera E3-706-6 presenta un grado di chimerismo del 80%, stimato in base alla percentuale del mantello di colore agouti, mentre la chimera E3-706-2 è completamente agouti e possiede quindi un grado di chimerismo del 100%.

I dati relativi al numero di chimere generate e al grado di chimerismo ottenuto sono molto incoraggianti. Sono state infatti prodotte numerose chimere da diversi cloni di cellule ES e per molte di esse il chimerismo raggiunge valori elevati. In particolare, solo il clone 698 ha dato origine a chimere con basso grado di chimerismo (10-15%), mentre per gli altri cloni sono stati generati quattro topi con un grado di chimerismo di circa 90-100%, un risultato decisamente di rilievo, specialmente se confrontato con quello dei precedenti tentativi di inattivazione di *Emilin3*, con i quali non erano state ottenute chimere con grado di chimerismo superiore al 20%.

Clone	Numero di blastocisti iniettate	Numero chimere/nati	Gabbia	Caratteristiche chimere		
2	71	6 / 22	B78 (2/7)	E3-2-1	90%	M
				E3-2-2	90%	F
			B81 (3/7)	E3-2-3	80%	F
				E3-2-4	50%	M
				E3-2-5	10%	M
			B82 (1/8)	E3-2-6	90%	M
27	66	9 / 21	B79 bis (4/5)	E3-27-1	70%	M
				E3-27-2	70%	M
				E3-27-3	50%	F
				E3-27-4	20%	F
			B80 (1/4)	E3-27-5	85%	M
			E3-27-6	70%	M	
			B80 bis (4/9)	E3-27-7	70%	M
				E3-27-8	70%	M
			E3-27-9	70%	M	
698	87	12 / 17	B75 (5/7)	E3-698-1	15%	M
				E3-698-2	15%	M
				E3-698-3	15%	M
				E3-698-4	15%	M
				E3-698-5	15%	F
			B84 (7/8)	E3-698-6	10%	F
				E3-698-7	10%	M
				E3-698-8	10%	M
				E3-698-9	10%	M
				E3-698-10	10%	M
				E3-698-11	10%	M
				E3-698-12	10%	M
706	66	11 / 27	B73 (2/3)	E3-706-1	100%	M
				E3-706-2	20%	F
			B74 (3/9)	E3-706-3	40%	M
				E3-706-4	5%	M
				E3-706-5	1%	F
			B74 bis (5/8)	E3-706-6	70%	M
				E3-706-7	10%	F
				E3-706-8	5%	F
				E3-706-9	5%	F
				E3-706-10	5%	F
B83 (1/2)	E3-706-11	10%	M			

Tabella B.1: Risultati degli esperimenti di microiniezione. Per ogni clone sono indicati il numero di blastocisti iniettate ed il numero di chimere ottenute in rapporto al numero di cuccioli nati. Per ogni chimera, sono indicate il nome dell'animale, la percentuale di chimerismo ed il sesso.

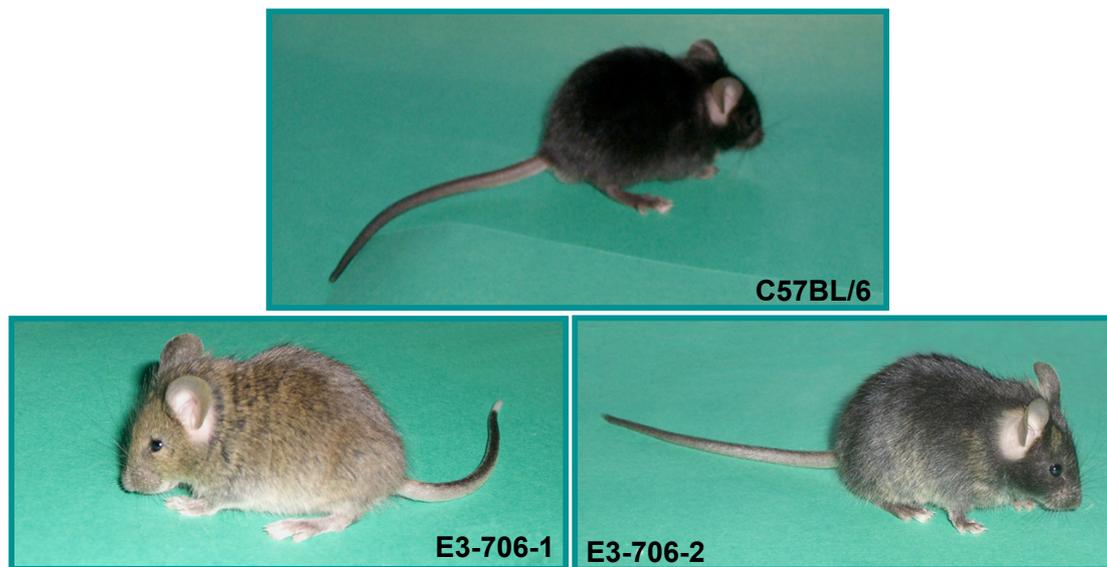


Figura B.10: Due esempi di topi chimera ottenuti dalla microiniezione in blastocisti dei cloni ricombinanti omologhi *Emilin3*^{+/-}. Nel pannello superiore è rappresentato un topo con il colore del pelo completamente nero, nel quale quindi le cellule ES non hanno colonizzato i tessuti dell'embrione. Nei due pannelli inferiori sono riportate due esempi di chimere ottenute: il topo E3-706-1, con un grado di chimerismo del 100%, ed il topo E3-706-2, con un grado di chimerismo di circa 20%.

3.7 Generazione di topi *knockout* per *Emilin3*

Allo scopo di comprendere se gli animali chimerici della generazione G_0 fossero in grado di trasmettere l'allele inattivato alla loro progenie, le chimere sono state incrociate con topi *wild-type* del ceppo C57BL/6J. Due dei quattro cloni, precisamente il clone 2 ed il clone 706, hanno determinato la trasmissione della mutazione del gene *Emilin3* alla linea germinale, consentendo la generazione di topi F_1 con genotipo eterozigote (*Emilin3*^{+/−}) per la mutazione stessa. Per i cloni 27 e 698, invece, nonostante parte delle chimere ottenute presentassero un buon grado di chimerismo, non abbiamo osservato trasmissione dell'allele mutante alla linea germinale. Infatti, in un totale di più di cento cuccioli generati per ogni clone, le chimere derivate dai cloni 27 e 698 non hanno dato origine a cuccioli agouti eterozigoti per l'allele inattivato. Nonostante fossero state ottenute dalle chimere con un grado di chimerismo decisamente elevato, per i cloni 2 e 706 sono stati ottenuti però pochi cuccioli agouti, precisamente 2/113 per il clone 2 e 4/166 per il clone 706. I topi eterozigoti ottenuti per il clone 2 ed il 706 non presentavano alterazioni fenotipiche evidenti e si sono rivelati, sia i maschi sia le femmine, fertili. Infatti, effettuando incroci di maschi eterozigoti con femmine *wild-type* e di femmine eterozigoti con maschi *wild-type*, sono stati ottenuti cuccioli vitali. I topi eterozigoti per l'allele inattivato sono stati successivamente incrociati tra loro. Nella progenie ottenuta (generazione F_2), il cui genotipo è stato analizzato mediante PCR, sono stati identificati fino ad ora 6 topi omozigoti *knockout* per il clone 2 e 14 per il clone 706. I topi omozigoti mutanti ottenuti (*Emilin3*^{−/−}) sono risultati presenti alla nascita e appaiono tuttora, a circa sei mesi di età, fenotipicamente normali. I topi *Emilin3*^{−/−} appaiono presenti nei rapporti mendeliani corretti, almeno per quanto riguarda il clone 706. Per il clone 2 le tre classi genotipiche mostrano alcune deviazioni dai normali rapporti mendeliani, ma probabilmente ciò è dovuto al fatto che al momento il numero dei topi generati dall'incrocio tra eterozigoti per questo clone non è statisticamente rilevante. Il risultato delle genotipizzazioni effettuate è riassunto in Tabella **B.2**.

	Clone 2	Clone 706
Topi +/+	2F; 3M (28%)	8F; 3M (19%)
Topi +/-	4F; 3M (39%)	17F; 15M (56%)
Topi -/-	4F; 2M (33%)	9F; 5M (25%)

Tabella B.2. Schema riassuntivo dei topi ottenuti da incroci tra topi eterozigoti. È riportato per il clone 2 e per il clone 706 il numero di topi *wild-type* (+/+), eterozigoti (+/-) ed omozigoti *knockout* (-/-), distinti in femmine (F) e maschi (M), ottenuto fino ad ora da incroci tra topi eterozigoti. È presentato anche, in percentuale, il rapporto tra le tre classi genotipiche.

3.8 Analisi cariotipica delle cellule ES, dei cloni *in vitro* e dei topi *knockout in vivo*

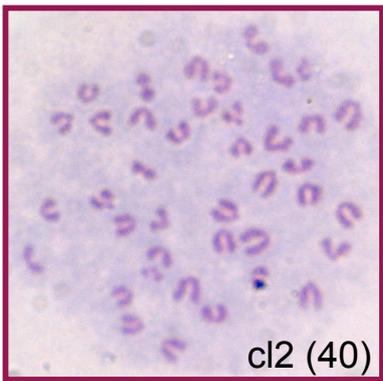
Data la scarsa frequenza di trasmissione dell'allele inattivato alla linea germinale, e dal momento che i precedenti tentativi del laboratorio di inattivazione genica mirata del gene *Emilin3* non avevano ottenuto alcuna trasmissione dell'allele inattivato alla linea germinale e quindi non avevano prodotto alcun topo omozigote mutante probabilmente a causa di instabilità cromosomica dei cloni ES utilizzati, ho intrapreso un'analisi del cariotipo delle cellule ES di tutti i quattro cloni che sono stati iniettati in blastocisti. Per ogni campione è stato esaminato un centinaio di metafasi. Le metafasi sono state considerate anomale quando il loro numero di cromosomi superava il 40, che è il numero cromosomico diploide del topo; metafasi poliploidi o ipoploidi sono state considerate tali solo quando erano rilevate per più di 5 volte nello stesso campione.

I risultati sono presentati nella Figura **B.11** e riassunti nella Tabella **B.3**. Il clone 27 ed il clone 698 presentano la più bassa percentuale di cellule euploidi, con il 34.5% di metafasi euploidi per il clone 27 ed il 28% per il clone 698. Il clone 2 presenta invece una percentuale di euploidia pari al 73%, solo lievemente inferiore a quella delle cellule ES della linea R1 prima dell'elettroporazione, per le quali la percentuale riscontrata è pari all'85%. Il clone 706 è invece un caso piuttosto particolare: esso infatti presenta una percentuale di piastre metafasiche euploidi pari al solo 3%, e la quasi totalità delle cellule possiedono 41 cromosomi, con fusione centrica di due delle tre copie del cromosoma presente in numero anomalo di copie. Questo cromosoma, in seguito a bandeggio G, è stato identificato come il cromosoma 4 (Figura **B.11**). La correlazione tra cariotipo e trasmissione alla linea germinale è parsa subito evidente: per i cloni 27 e 698, con maggioranza di cellule ES aneuploidi, non sono stati ottenuti infatti topi agouti nella generazione F₁, mentre il clone 2, con la quasi totalità di cellule euploidi, ha trasmesso l'allele mutante alla progenie. Sorprendentemente, proprio il clone 706, che presenta una caratteristica trisomia a carico del cromosoma 4, è stato quello che ci ha offerto i risultati più positivi per quanto riguarda la generazione di topi eterozigoti nella generazione F₁. Ho quindi effettuato un'analisi del cariotipo su linfociti estratti da milza di topi *wild-type* e *knockout* ottenuti da incroci di topi eterozigoti per l'allele inattivato e derivati da cellule ES del clone 706. Nei topi ottenuti dal clone 706 non ho rilevato alcuna anomalia: tutte le metafasi osservate presentavano 40 cromosomi e non c'era più traccia della fusione cromosomica a carico del cromosoma 4 (Figura **B.12**).

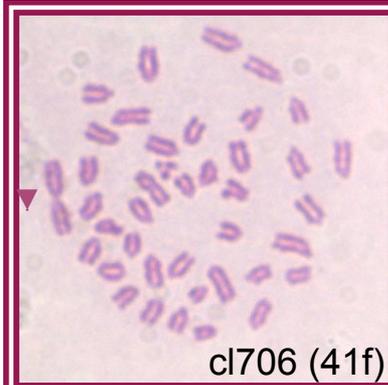
Oltre alle cellule ES della linea R1, che sono state quelle utilizzate nell'esperimento di inattivazione mirata del gene *Emilin3*, per avere ulteriori controlli, ho effettuato l'analisi cariotipica di diversi cloni di cellule ES presenti nel nostro laboratorio e ottenuti in esperimenti di *gene targeting* per altri geni (Figura **B.11**). In particolare ho analizzato il cariotipo di due cloni ottenuti nel *knockout* di *Emilin2*, uno dei quali aveva dato origine a buone chimere, mentre l'altro aveva

originato dopo molto tempo una sola chimera, nonostante dagli accoppiamenti tra topi femmina impiantati e topi *wild-type* fossero stati ottenuti più di 100 cuccioli (P. Bonaldo e coll., dati non pubblicati). Coerentemente con quanto atteso, mentre per il primo clone (E2-14) l'81% delle cellule si è presentato euploide, per il secondo (E2-13) la percentuale di metafasi euploidi è scesa al 64%. Come ulteriore controllo ho analizzato il clone 70 del *knockout* di *Mmrn2*, derivato da cellule ES della stessa linea di quelle elettroporate con il costrutto di inattivazione per *Emilin3*. Questo clone ha evidenziato la quasi totalità di metafasi euploidi (93.5%).

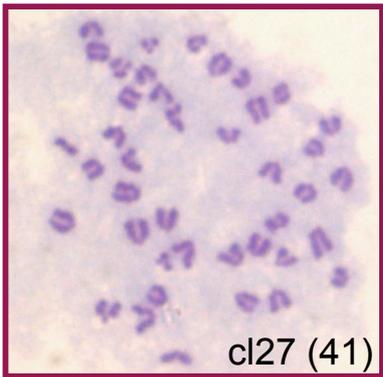
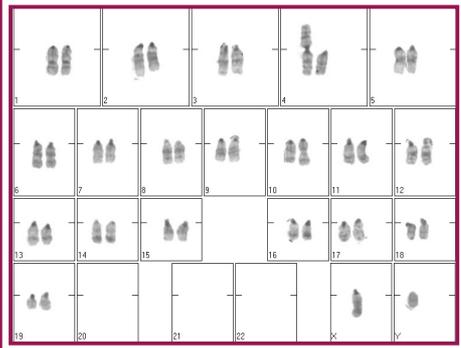
Figura B.11: Piastre metafasiche relative a diversi cloni di cellule ES analizzati. Per ogni campione analizzato è presentata l'immagine di una piastra metafasica rappresentativa. Sono rappresentati i quattro cloni ricombinanti omologhi 2, 27, 698 e 706, le cellule ES della linea R1 utilizzate per l'elettroporazione del costrutto di inattivazione e tre cloni isolati in altri esperimenti di inattivazione genica mirata effettuati nel nostro laboratorio (E2: *Emilin2*; M2: *Mmrn2*). Per il clone 706 è indicata con una punta di freccia la fusione cromosomica e a lato è riportata l'immagine ottenuta posizionando i cromosomi nell'ordine convenzionale in seguito a bandeggio G: è possibile notare che sono presenti tre copie del cromosoma 4. Tra parentesi è indicato il numero di cromosomi presenti nelle immagini riportate. F: fusione; p: poliploide.



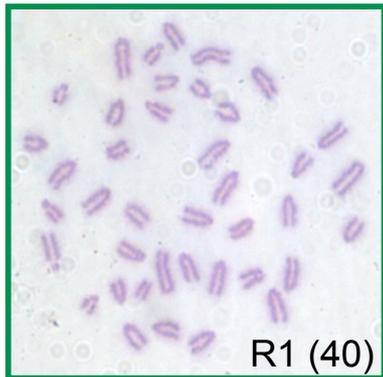
cl2 (40)



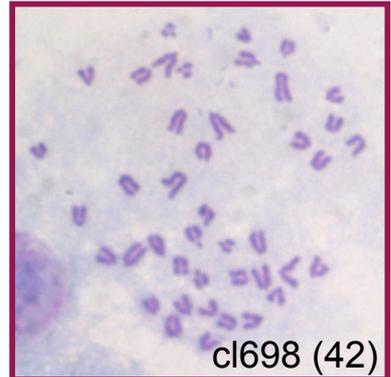
cl706 (41f)



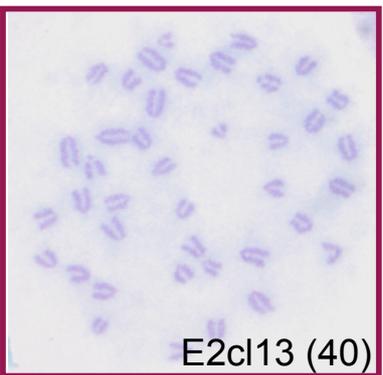
cl27 (41)



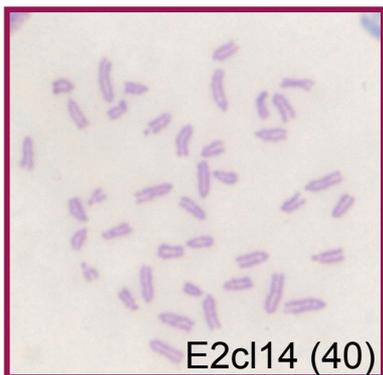
R1 (40)



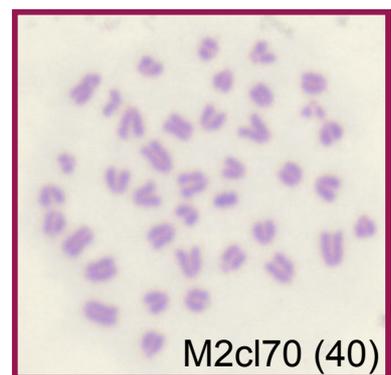
cl698 (42)



E2cl13 (40)



E2cl14 (40)

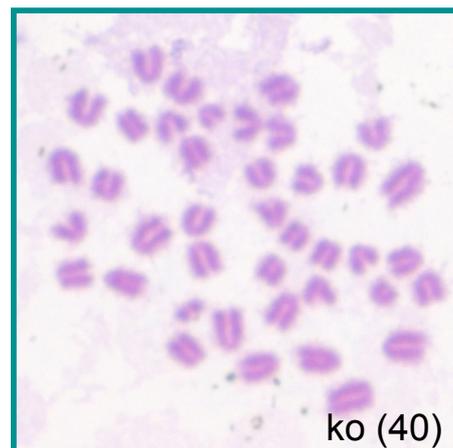
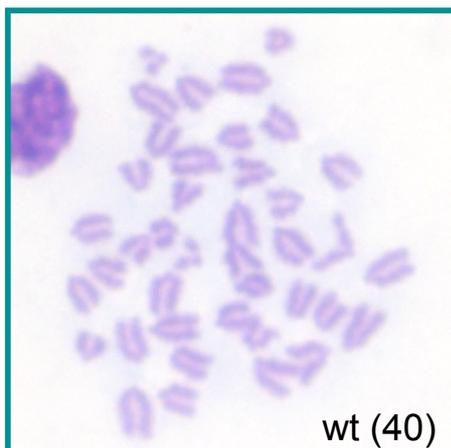


M2cl70 (40)

Tabella B.3: Schema dei risultati ottenuti con l'analisi del cariotipo delle cellule ES. Sono riportate la percentuale di euploidia ed eventuali particolarità presentate dai diversi cloni. Le metafasi sono state considerate anomale quando il loro numero di cromosomi superava il 40; metafasi poliploidi o ipoploidi sono state considerate tali solo quando erano rilevate per più di 5 volte nello stesso campione.

Figura B.12: Confronto tra una piastra metafasica ottenuta da linfociti di topo *wild-type* ed una ottenuta da linfociti di topo *knockout* per il clone 706. Per escludere che i topi knockout ottenuti da cellule ES del clone 706 presentassero la trisomia del cromosoma 4 riscontrata *in vitro*, è stata effettuata per un topo *wild-type* (wt) ed uno *knockout* (ko), generati da un incrocio tra topi eterozigoti, l'analisi del cariotipo su linfociti isolati dalla milza. Tra parentesi è riportato il numero di cromosomi individuabili nell'immagine presentata. Come si può notare, in entrambi i casi le cellule sono euploidi.

Clone	Metafasi euploidi
R1	85%
2	73%
27	34.5
698	28%
706	3%
E2 clone 13	64%
E2 clone 14	81%
M2 clone 70	93.5%



3.9 Caratterizzazione dei topi *Emilin3*^{-/-}

I topi omozigoti mutanti (*Emilin3*^{-/-}) ottenuti fino ad ora sono 9 derivati da cellule ES del clone 2 e 14 derivati dal clone 706. Essi sono stati identificati mediante reazioni di PCR su DNA estratto da biopsie di coda effettuate all'età di 4 settimane. Per l'allele *wild-type* sono stati disegnati il *primer* senso all'interno della regione di omologia e quello antisenso nella regione deleta dell'esone 1, assente nell'allele inattivato; per l'allele *knockout*, invece, il *primer* antisenso è posizionato all'interno della cassetta *neo*^R, presente esclusivamente nell'allele inattivato. Il risultato dell'amplificazione è un amplificato di circa 760 bp per l'allele *wild-type* e di circa 850 bp per l'allele *knockout*. Nella figura **B.13** è riportato un esempio di genotipizzazione, per topi derivati da cellule ES del clone 2 e dal clone 706. Sono presenti amplificati ottenuti da DNA di topi *wild-type* (+/+), eterozigoti (+/-) e omozigoti *knockout* (-/-).

Per i topi ottenuti da entrambi i cloni è stata effettuata un'analisi a livello di mRNA, effettuando reazioni di RT-PCR a partire da RNA estratto da biopsie di coda di topi *wild-type* (+/+), eterozigoti (+/-) e omozigoti *knockout* (-/-), con *primer* localizzati a livello del primo e del secondo esone. In particolare, il *primer* senso è posizionato nel primo esone in corrispondenza della regione che è deleta nell'allele inattivato; perciò con *primer* così disegnati è impossibile ottenere un amplificato per i campioni isolati da topi *knockout*. Come atteso, per entrambi i cloni esaminati è presente una banda di 180 bp più intensa per l'RNA estratto da topi *wild-type* e più lieve per gli eterozigoti, mentre non è visibile alcuna banda, nemmeno a 35 cicli di amplificazione, per i topi omozigoti *knockout* (Figura **B.14**). Questo conferma il fatto che nei topi *Emilin3*^{-/-} l'mRNA normale non viene prodotto. L'effetto finale dell'inattivazione genica mirata è la produzione di una proteina non funzionale; nel nostro caso, Emilina-3 non potrà essere secreta e quindi svolgere la propria funzione nell'ambito della matrice extracellulare, perché è stata effettuata una delezione, con inserzione della cassetta *neo*^R, nel primo introne codificante per il peptide segnale e per parte del dominio EMI. Al momento non sono disponibili anticorpi specifici contro Emilina-3 murina e quindi non ci è possibile confermare mediante western blotting ed immunostochimica l'assenza di produzione e secrezione di Emilina-3, ma la loro produzione sarà un passo essenziale per la conferma della riuscita dell'esperimento di inattivazione genica mirata, che avviene proprio a livello proteico, e soprattutto per effettuare le successive analisi fenotipiche sui topi *Emilin3*^{-/-}.

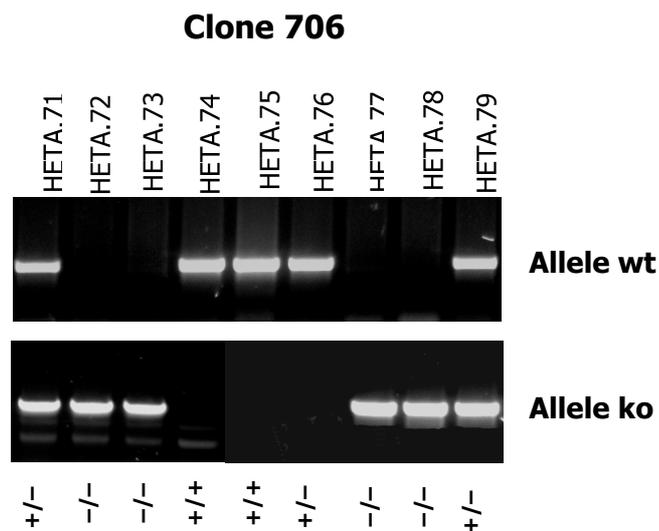
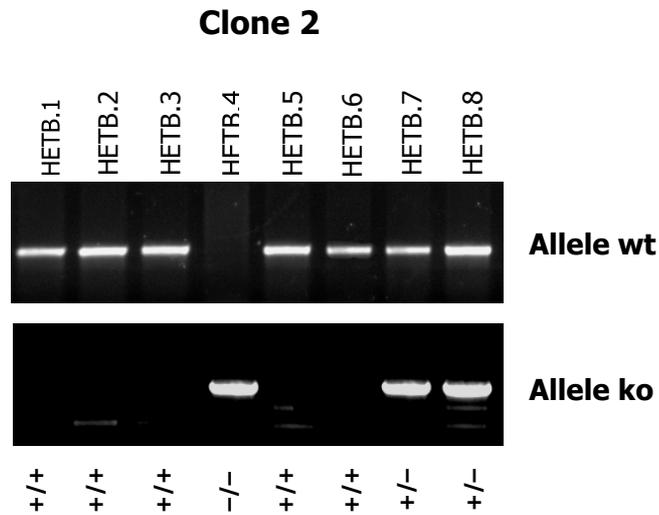


Figura B.13: PCR di genotipizzazione di topi ottenuti da chimere per il clone 2 ed per il clone 706. E' riportato un esempio degli amplificati ottenuti con reazioni di PCR effettuate su DNA genomico estratto da biopsie di code di topi derivati da incroci tra eterozigoti. In corrispondenza di ogni amplificato sono riportati in alto il codice identificativo del topo ed in basso il genotipo ricavato dalle reazioni di PCR. L'amplificato ottenuto con i *primer* per l'allele *wild-type* si estende per 760 bp, mentre quello ottenuto con i *primer* per l'allele *knockout* corrisponde ad una banda di 850 bp.

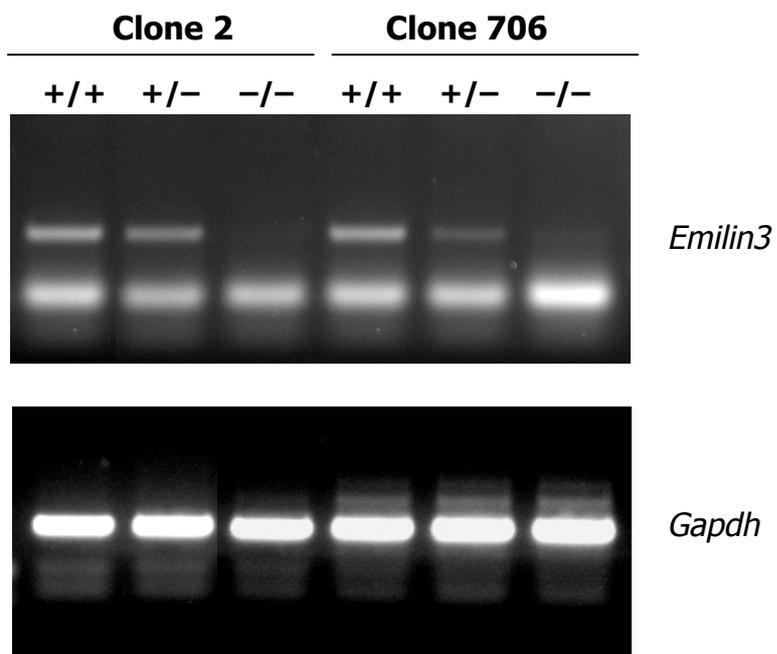


Figura B.14: RT-PCR per il clone 2 e per il clone 706. Sono riportati gli amplificati ottenuti in seguito a RT-PCR effettuata su cDNA retrotrascritto da RNA estratto da biopsie di code di topi *wild-type*, eterozigoti e *knockout* derivati dal clone 2 e dal clone 706. In alto sono presentati gli amplificati ottenuti con i *primer* per *Emilin3*, pari a 180 bp, mentre in basso quelli ottenuti con i *primer* per il gene di controllo *Gapdh*, che si estendono per 170 bp.

3.10 Studio del fenotipo dei topi *Emilin3^{-/-}*

In seguito all'inattivazione genica mirata del gene *Emilin3* sono stati ottenuti topi omozigoti per l'allele mutante (*Emilin3^{-/-}*) derivanti da due cloni indipendenti di cellule ES, il clone 2 ed il clone 706. In entrambi i casi i topi si sono presentati, almeno ad una prima analisi, del tutto simili. I topi sono vitali, raggiungono l'età adulta e si dimostrano fertili: sia maschi *knockout* accoppiati con femmine *wild-type* sia femmine *knockout* accoppiate con maschi *wild-type* hanno dato origine a cuccioli. Come è possibile comprendere dalle immagini presentate in Figura **B.15**, per quanto riguarda l'aspetto esteriore i topi *wild-type* ed i topi *knockout*, maschi e femmine, si dimostrano identici. I topi omozigoti mutanti inoltre non presentano difetti evidenti a livello sensoriale e rispondono a stimoli visivi e uditivi. Essi si nutrono in quantità e con modalità paragonabili ai topi *wild-type* e le loro capacità motorie non appaiono ridotte, anzi i topi *knockout* sembrano essere più vivaci ed attivi dei topi *wild-type*.

Poiché Emilina-1 risulta coinvolta, mediante regolazione del TGF- β , nella regolazione della pressione arteriosa (Zacchigna et al., 2006), e poiché anche i topi *knockout* per altri componenti della famiglia delle emiline/multimerine si presentano ipertesi (G. Bressan e coll., dati non pubblicati), la prima analisi condotta nei topi *Emilin3^{-/-}* è stata la rilevazione della pressione sistolica e diastolica. Tale analisi è stata condotta dal Prof. Giuseppe Lembo (Dipartimento di Angio-cardio-neurologia, NEUROMED-IRCCS, Pozzilli) in modo non invasivo mediante pletismografia *tail-cuff* su 4 topi *wild-type* e 4 omozigoti *knockout* derivati da incroci tra eterozigoti. Come è evidente in Figura **B.16**, i topi *knockout* *Emilin3^{-/-}* presentano valori pressori medi più elevati rispetto ai topi *wild-type*: la pressione media è infatti superiore di circa 15 mmHg rispetto a quella dei topi di controllo. E' riportato anche l'andamento dei valori pressori nell'intervallo di tempo esaminato: la pressione è stata rilevata infatti quotidianamente per 5 giorni consecutivi. La riduzione della pressione misurata al terzo giorno nei topi *knockout*, a cui corrisponde un aumento pressorio nei topi *wild-type*, è probabilmente da ricondurre a fluttuazioni pressorie giornaliere. Sebbene per il momento sia stato esaminato un numero esiguo di topi, che presentano inoltre un *background* genetico misto, i valori della pressione dei topi *knockout* appaiono sempre superiori a quelli dei topi *wild-type* e la differenza tra le medie dei valori pressori è significativa ($p=0.008$).

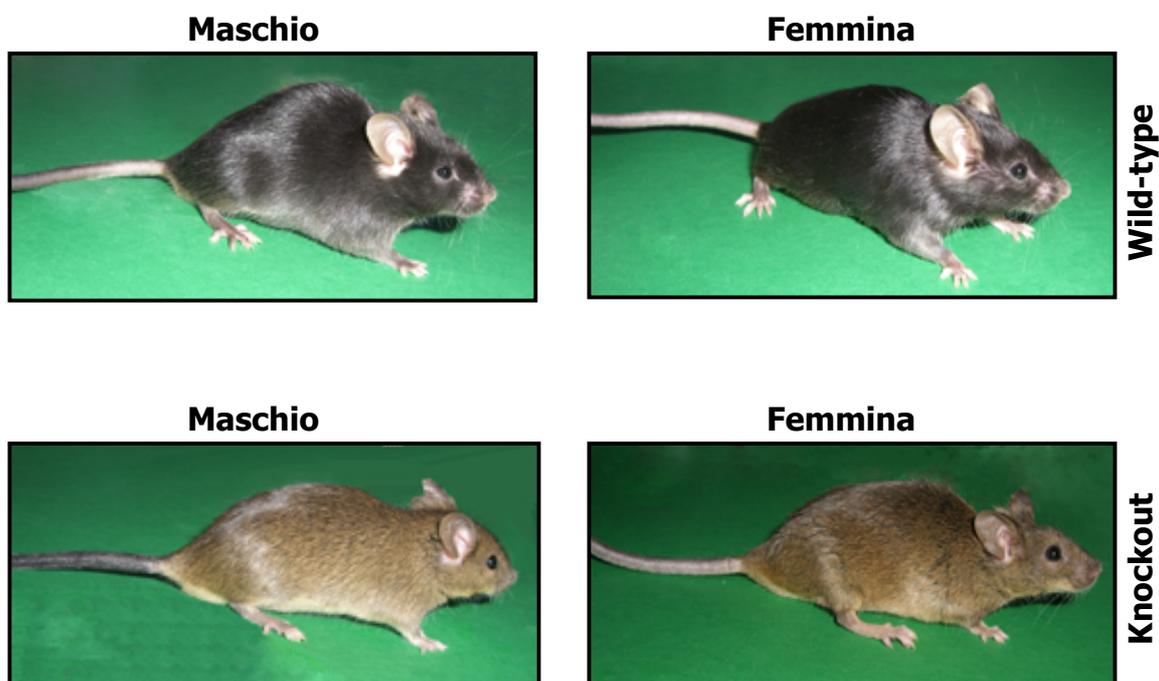


Figura B.15: Foto di topi *wild-type* e *knockout* per l'allele *Emilin3* inattivato. Nei pannelli superiori sono rappresentati un topo maschio ed un topo femmina *wild-type*, mentre in basso sono riportati due esempi di topi, maschio e femmina, omozigoti *knockout*. Per entrambi i sessi non sono riscontrabili anomalie fisiche evidenti. Per semplicità, sono stati presentati topi *knockout* derivati da cellule ES del clone 706, ma quelli derivati dal clone 2 sono paragonabili.

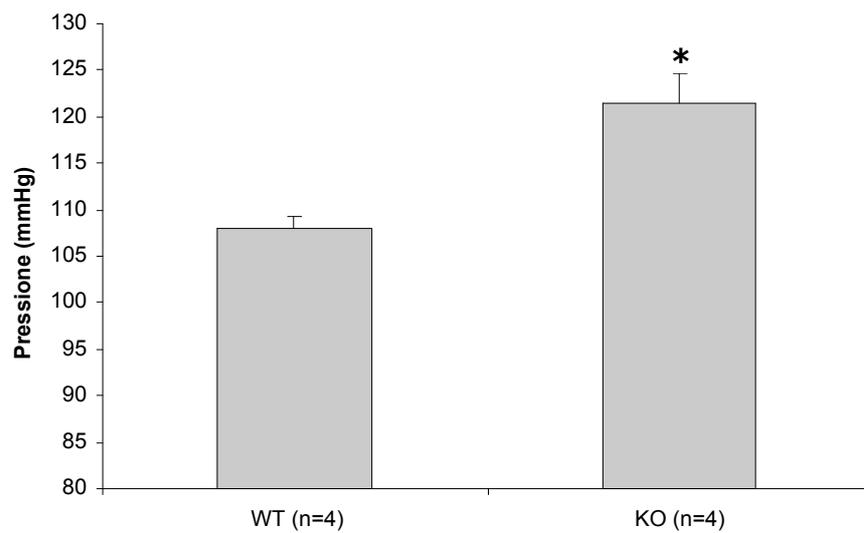
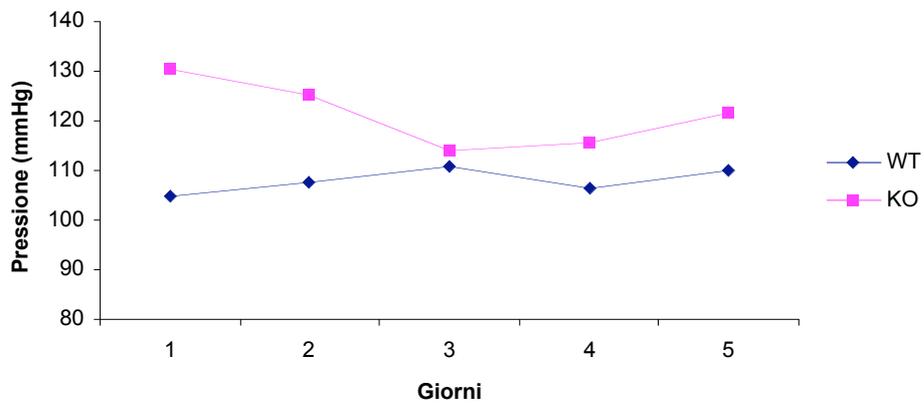


Figura B.16: Grafici riportanti i valori pressori rilevati in topi *wild-type* (WT) e *knockout* (KO). Nel grafico superiore sono presentati i valori della pressione media rilevata per topi *wild-type* e *knockout* in misurazioni giornaliere effettuate per 5 giorni consecutivi. In basso è riportata in grafico la media dei valori pressori. I topi *knockout* presentano valori pressori superiori a quelli rilevati nei topi *wild-type*. *: $p=0.008$ vs WT.

1. INTRODUZIONE

1.1 *Danio rerio* come organismo modello

La ricerca biomedica si serve di modelli animali per comprendere la patogenesi delle malattie umane a livello cellulare e molecolare e per ottenere sistemi per sviluppare e testare nuove terapie. Mammiferi come il topo rappresentano animali modello predominanti nel riprodurre malattie umane, principalmente per la forte omologia tra i genomi e per molte similarità in aspetti che vanno dall'anatomia alla biologia cellulare e alla fisiologia. D'altra parte, il sorprendente grado di conservazione funzionale tra mammiferi e invertebrati per quanto riguarda i processi biologici di base suggerisce che malattie dovute ad alterazione di questi conservati processi cellulari possano essere accuratamente replicate a livello genetico e molecolare negli invertebrati, che sono più semplici da mantenere e manipolare. Nonostante questi aspetti positivi, gli invertebrati mancano di molte strutture ed organi coinvolti nella patogenesi delle malattie umane, per questo il loro ruolo come organismi modello è abbastanza limitato. Al contrario, *screening* di mutagenesi casuale sono effettuabili nel topo ma richiedono un considerevole bagaglio di conoscenze e un cospicuo apporto di infrastrutture.

In questo contesto si inserisce il pesce zebrafish, che permette di applicare con facilità strategie di *forward genetics* tipiche degli invertebrati per la soluzione di problemi specifici dei vertebrati. Negli ultimi dieci anni questo piccolo pesce d'acqua dolce, dapprima famoso più nei negozi di animali che nei laboratori di ricerca, è salito alla ribalta come uno dei sistemi modello più rilevanti nella biologia dello sviluppo e sta assumendo un ruolo sempre più importante in ambito scientifico, non solo nella ricerca di base, ma anche nell'analisi comportamentale, nello studio della patogenesi di alcune malattie infettive (Neely et al., 2002; Prouty et al., 2003), neurodegenerative (Taylor et al., 2004; Tomasiewicz et al., 2002), neoplastiche (Berghmans et al., 2005), ereditarie e congenite (Ernest et al., 2000; Bassett e Currie, 2003; Wang et al., 1998), così come nella ricerca farmaceutica (Zon e Peterson, 2005) ed in tossicologia (Hill et al., 2005).

Lo zebrafish (*Danio rerio*), un teleosteo ciprinide che ha origine nei fiumi dell'India e del Sud-Est asiatico, è un pesce robusto e semplice da mantenere in acquario, e può essere trovato in qualsiasi negozio di animali. Lo zebrafish utilizzato per il primo *screening* classico ha origine proprio da un negozio di animali di Tuebingen (Haffter et al., 1996). La sua emergenza come organismo modello per la moderna ricerca biologica ha avuto inizio con il lavoro pionieristico di George Steisinger e collaboratori, che hanno saputo riconoscere molti dei suoi vantaggi (Steisinger et al., 1981). Gli zebrafish infatti sono piccoli (gli adulti crescono fino ad un massimo di 5 cm di

lunghezza) e possono quindi essere mantenuti in vasche a densità relativamente elevate, ma presentano comunque dimensioni che li rendono semplici da maneggiare. La loro durata di vita è di circa tre anni, raggiungono la maturità sessuale a tre mesi e sono in grado di riprodursi per circa un anno e mezzo.

Nonostante la durata del periodo fertile sia simile a quella del topo, gli embrioni di zebrafish si sviluppano rapidamente, progredendo da uova a larve in meno di tre giorni. Ciascuna femmina può deporre ogni settimana fino a 200 uova, che sono fecondate esternamente e si sviluppano in modo sincrono. Subito dopo la deposizione, avvengono dei movimenti nel citoplasma che generano un'area di citoplasma privo di tuorlo, denominata blastodisco, al polo superiore (o polo animale) dell'embrione. La prima divisione cellulare avviene dopo circa 45 minuti e successive segmentazioni avvengono ogni quarto d'ora. Queste divisioni segmentano il blastodisco ma non il tuorlo, generando un gruppo di cellule sempre più denso sulla sommità del tuorlo, e in comunicazione citoplasmatica con esso. Nel decimo ciclo cellulare l'embrione, ora allo stadio di blastula, va incontro alla caratteristica transizione di medio-blastula: il ciclo cellulare rallenta e diventa asincrono, le cellule diventano mobili ed inizia la trascrizione a partire dal genoma dello zigote. Nella blastula tardiva il blastodisco si assottiglia e forma un blastoderma che si estende gradualmente sopra il tuorlo, fino ad avvolgerlo completamente. Questo movimento di espansione, definito epibolia, fornisce un utile parametro per definire lo stadio di sviluppo, che può essere misurato come percentuale di tuorlo avvolto dal blastoderma, o percentuale di epibolia. Raggiunto il 50% di epibolia, il margine prominente del blastoderma si ispessisce generando l'anello germinale e le cellule in migrazione cominciano a convergere sul futuro lato dorsale dell'embrione generando lo *shield* embrionale. Questi ispessimenti sono il primo segno dei movimenti della gastrulazione che ora cominciano a costruire il piano corporeo. Dopo circa 24 ore l'embrione mostra caratteristiche morfologiche ben distinte. La semplice osservazione al microscopio permette di riconoscere gli occhi, gli otoliti, i somiti, i dotti pronefrici, i precursori delle cellule del sangue, un sistema vascolare, i placodi olfattivi e l'epifisi. Inoltre, utilizzando anticorpi o *marker* genetici, è possibile evidenziare un sistema nervoso ben organizzato e definito, seppur più semplice rispetto a quello dei mammiferi. Nel giro di altre 24 ore si può osservare una pompa cardiaca e la dinamica delle cellule del sangue. Utilizzando marcatori molecolari opportuni si iniziano poi a distinguere diversi tipi di neuroni ed un apparato intestinale in formazione, che potrà essere osservato morfologicamente al quinto giorno. L'embrione sguscia dal corion tra il secondo ed il terzo giorno ed entro il quarto giorno la larva è già in grado di nuotare e nutrirsi in modo autonomo (Kimmel et al., 1995).

La maggiore applicazione dello zebrafish nella ricerca scientifica è senza dubbio la biologia dello sviluppo. Ciò è dovuto non solo alla facilità con cui gli embrioni sono ottenuti, ma anche al

fatto che essi si sviluppano esternamente al corpo della madre, all'interno di un corion trasparente, e che sono essi stessi trasparenti per buona parte dello sviluppo. Tutte queste caratteristiche facilitano la loro manipolazione e l'osservazione dei processi di sviluppo. Cellule singole e persino organelli intracellulari possono essere direttamente osservati senza necessità di colorazione e con l'unico ausilio di un buon microscopio. Con l'uso di tecniche di sezionamento ottico, in genere a contrasto di interferenza differenziale o Nomarski, è possibile inoltre visualizzare con eccezionale chiarezza molte strutture. Ibridazioni *in situ* su embrioni interi forniscono immagini dell'intero embrione durante i primi tre giorni e dopo questo stadio l'espressione genica può ancora essere ben delineata nelle strutture superficiali, mentre le strutture interne, come il pronefro in via di sviluppo, sono caratterizzate in modo migliore su materiale sezionato (Drummond et al., 1998). La visualizzazione dei profili di espressione del marcatore GFP sotto controllo di promotori cellula- o tessuto-specifici si è per esempio dimostrata di grande valore, sia per tracciare i movimenti del prodotto genico di interesse sia per identificare e potenzialmente isolare specifiche popolazioni cellulari (Amsterdam et al., 1996; Long et al., 1997).

Un ulteriore aspetto positivo di zebrafish è la disponibilità di un gran numero di informazioni molecolari e di reagenti, in continuo aggiornamento. Sono disponibili *database* pubblici, ma anche siti di laboratori privati che facilitano l'accesso a informazioni addizionali ed è presente *on-line* una banca dati di genetica, di genomica e di informazioni sullo sviluppo di *Danio rerio* (<http://www.zfin.org>). NCBI sta fornendo informazioni accurate sui geni di zebrafish mediante l'inclusione di questo organismo in LocusLink, Unigene e HomoloGene. Questi dati facilitano l'identificazione di prodotti genici omologhi in altre specie e l'identificazione di geni candidati all'interno di regioni di interesse del genoma. È disponibile inoltre una grande varietà di strumenti per la mappatura per facilitare il clonaggio posizionale di difetti genici, incluse mappe genetiche ad alta densità e mappe di pannelli ibridi di radiazione. Con 1.7 Gb, il genoma di zebrafish, ormai interamente sequenziato (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio;www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html), è circa la metà di quello umano, ma presenta complessivamente un numero di geni simile a quello presente nel genoma umano. Nonostante evolutivamente le due specie siano separate da circa 420 milioni di anni, ci sono senza dubbio estesi tratti di sintenia conservata tra uomo e zebrafish. Inoltre, geni responsabili di difetti congeniti nell'uomo se mutati nello zebrafish conferiscono alterazioni paragonabili, e talora del tutto simili, a quelle dovute alle mutazioni che avvengono nell'uomo. Durante le fasi precoci della loro evoluzione i teleostei sono andati incontro ad un evento di duplicazione dell'intero genoma, per questo gli zebrafish sono tetraploidi (Taylor et al., 2001). È avvenuta in seguito qualche perdita secondaria di geni duplicati, probabilmente a causa di ridondanza funzionale. Ciononostante circa il 20% dei geni è stato mantenuto sotto forma di due isoforme distinte, in alcuni casi con funzioni

ancestrali divise tra le due copie (subfunzionalizzazione) ed in altri casi con l'acquisizione di nuove funzioni (neofunzionalizzazione) (Wagner, 1998). Quindi lo zebrafish è un utile modello per studiare non solo la funzione genica, ma anche l'acquisizione di nuove funzioni mediante cambiamenti di sequenza.

Oltre a quanto menzionato in precedenza, il fatto che siano state sviluppate in zebrafish numerose metodologie sperimentali, che includono tecniche per effettuare *screening* di mutagenesi, per ottenere pesci aploidi ed omozigoti, per isolare colture cellulari primarie e per effettuare esperimenti di transgenesi transiente e stabile, ha permesso l'utilizzo di zebrafish in uno spettro di applicazioni scientifiche sempre più ampio (Detrich et al., 1998a e b; Guille, 1999; Westerfield, 1994).

1.2 Studi di genomica funzionale in zebrafish

Per lo studio della funzione genica sono necessarie mutazioni, spontanee o indotte, mirate o casuali. *Screening* di mutagenesi su larga scala sono stati impiegati per decifrare la funzione genica in diversi modelli di invertebrati, come *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, con risultati impressionanti. L'applicazione di tali *screening* nei vertebrati è stata frenata dal grande numero di animali necessari per raggiungere la saturazione, dalla necessità di molto spazio per il loro mantenimento e dal lungo tempo richiesto per la generazione di mutanti recessivi. Gli zebrafish sono l'organismo modello ideale fra i vertebrati in cui intraprendere tali studi a causa delle loro dimensioni relativamente ridotte, della possibilità di mantenerli ad alta densità e del loro breve tempo di generazione, che permettono l'analisi di diverse generazioni di animali mutagenizzati in un breve periodo di tempo (Mullins e Nusslein-Volhard, 1993). Per più di un decennio sono stati applicati con successo metodi di mutagenesi casuale in zebrafish (Grumwald et al., 1988; Grumwald e Streisinger, 1992a e b). *Screening* di mutagenesi su larga scala furono dapprima intrapresi da due gruppi, uno a Tuebingen (Haffter et al., 1996) e l'altro al Massachusetts General Hospital (Driever et al., 1996; Stainier et al., 1996), e si focalizzarono su eventi dello sviluppo precoce, portando all'identificazione di circa 1800 mutanti, che furono riportati in un numero speciale di *Development* (Haffter et al., 1996) ed ampiamente trattati in *Science* come "un risultato di proporzioni storiche" (Grumwald, 1996). Il primo importante *screening* di mutagenesi consisteva nell'applicazione in zebrafish del lavoro effettuato da Nusslein-Volhard e colleghi in *Drosophila* (Nusslein-Volhard e Wieschaus, 1980) e prevedeva il trattamento di pesci maschi con ENU, che induce mutazioni puntiformi con un tasso di circa una o due per genoma aploide. In seguito all'accoppiamento con femmine *wild-type* si ottiene una generazione di maschi fondatori F1, che vengono incrociati con femmine *wild-type*, in modo che la progenie F2 includa pesci normali e pesci eterozigoti per le mutazioni indotte. Accoppiamenti fratello-sorella nella

generazione F2 danno infine origine ad una progenie di cui un quarto è costituito da animali omozigoti per la mutazione (Haffter et al., 1996). Nonostante l'importante contributo di questi primi studi, è risultato evidente che il tipo di *screening* utilizzato trascurava molti geni d'interesse, perché era basato solo su stadi di sviluppo precoci e si concentrava su difetti morfologici più che funzionali. Inoltre la grande maggioranza dei mutanti era recessiva nel fenotipo, allungando l'analisi, e un esiguo numero di mutazioni era compatibile con la sopravvivenza nell'età adulta. Per esempio, solo 79 dei 4264 mutanti ottenuti nello *screening* di Tuebingen erano vitali come omozigoti, mentre 19 sono stati descritti come semi-vitali (Haffter et al., 1996).

Un nuovo sviluppo è la mutagenesi inserzionale, tecnica con cui è stato condotto un recente *screening* su larga scala, che prevedeva l'inserzione casuale di un vettore retrovirale nel genoma di zebrafish, mediante iniezione nell'embrione poco dopo la fecondazione, permettendo la retrotrascrizione della sequenza virale e la sua integrazione nel genoma. Con incroci successivi dei mutanti, con una strategia simile a quella prevista dalla mutagenesi con ENU, possono essere prodotti nella generazione F3 mutanti recessivi. L'efficienza di mutazione non è elevata come quella dei mutageni chimici, ma il vantaggio di questo metodo è che i geni mutati possono essere facilmente identificati mediante RT-PCR con *primer* disegnati sulla sequenza virale (Amsterdam et al., 1999; Amsterdam, 2004). Questo metodo è stato impiegato per esempio nell'identificazione di geni coinvolti nella malattia del rene cistico (Sun et al., 2004) e nelle patologie epatiche (Sadler et al., 2005).

Un approccio alternativo che fa uso della mutagenesi inserzionale con retrovirus è stato recentemente sviluppato dalla Znomics Inc. (<http://www.znomics.com>), che sta creando una libreria di campioni criopreservati di sperma contenente inserzioni multiple, in parallelo con una libreria di campioni di DNA genomico, per cui è possibile identificare i geni alterati in ciascun campione di sperma. I pesci recanti la mutazione desiderata possono quindi essere recuperati mediante fecondazione *in vitro*. In questo modo la Znomics prevede di localizzare in tempi brevi i siti di inserzione per circa mezzo milione di inserzioni, includendo quindi almeno una inserzione in ogni gene.

Il sequenziamento del genoma di zebrafish ha spostato l'attenzione dalla genetica *forward* a quella *reverse*. Lo zebrafish è in prima linea nella ricerca della funzione dei numerosi geni di cui è ora disponibile la sequenza, e sono disponibili molte semplici tecniche per l'analisi della funzione genica. L'inattivazione genica mirata non è ancora possibile in zebrafish ed ha acquisito ormai lo status di Santo Graal. Cellule staminali embrionali pluripotenti e linee *feeder* per supportare il loro mantenimento nello stato indifferenziato sono state isolate in una specie fortemente correlata a zebrafish, il medaka (Sun et al., 1995). Recentemente i ricercatori hanno dimostrato che cellule di zebrafish, ottenute da colture cellulari a breve termine da embrioni allo stadio di gastrula, sono in

grado di dare luogo a trasmissione alla linea germinale se introdotte in embrioni ospiti con una strategia simile a quella utilizzata nel topo per l'inattivazione genica mirata: la gastrula donatrice deriva da una linea difettiva nella pigmentazione e l'embrione ospite da un pesce pigmentato (Ma et al., 2001; Fan et al., 2004). Sono necessari però ulteriori studi prima che la tecnologia dell'inattivazione genica mirata diventi possibile nello zebrafish ed il passo più critico sarà la definizione di tecniche per mantenere le cellule isolate da embrioni allo stadio di gastrula in uno stato indifferenziato abbastanza a lungo da permettere la selezione dei cloni ricombinati omologhi.

In assenza di tecniche di *knockout* risultano predominanti in zebrafish strategie di *knockdown*, cioè di riduzione dell'attività di un prodotto genico. La più utilizzata, che verrà descritta ampiamente nel paragrafo successivo, prevede l'utilizzo di oligonucleotidi antisense morfolino, in cui il deossiribosio è sostituito con un anello N-morfolino, che conferisce grande stabilità e consente di ottenere meno effetti aspecifici rispetto ad altri analoghi antisense del DNA (Summerton e Weller 1997; Corey e Abrams 2001). Gli oligonucleotidi antisense morfolino si legano all'mRNA e prevengono la traduzione se disegnati in corrispondenza del codone di inizio, o interferiscono con lo *splicing* se sono diretti contro un sito di *splicing*. Furono inizialmente disegnati come strumenti clinici (Summerton e Weller 1997), ma sono rapidamente diventati uno strumento comune in studi di genomica funzionale ed in embriologia, non solo nello zebrafish, ma anche in *Xenopus* e nel riccio di mare. Per esempio, l'iniezione in zebrafish di morfolino specifici per il gene *pit1* ha dato origine a mutanti che si sono rivelati fenocopie dei mutanti *pit1* isolati precedentemente in uno *screening* di mutagenesi in zebrafish (Nica et al., 2004), dei mutanti Pit1 murini (Li et al., 1990) e dei pazienti affetti da deficienze ormonali pituitarie combinate (Tatsumi et al., 1992), indicando il potenziale di questo approccio nello studio dello sviluppo e della funzione del sistema endocrino. Recentemente, l'iniezione di *small interfering RNA* (siRNA) è stata effettuata con successo per il silenziamento genico transiente in embrioni di zebrafish (Dodd et al., 2004; Liu et al., 2005), sebbene molti ricercatori abbiano avuto meno risultati con i siRNA che con i morfolino.

La sovraespressione di geni è un altro modo per definire la funzione genica. Come per gli studi di *knockdown* genico, sono necessarie conoscenze pregresse sul gene candidato, ma con questa tecnica è possibile la produzione di singole subunità proteiche o di proteine mutate per decifrare le relazioni struttura-funzione. Il metodo più comune per la sovraespressione di geni in zebrafish è l'iniezione di mRNA sintetico e provvisto di *cap* nell'embrione in via di sviluppo. Per esempio con questa tecnica è stato assegnato un ruolo al recettore per l'ormone tiroideo $\alpha 1$ nello sviluppo neuronale precoce (Essner et al, 1999) e a *sonic hedgehog* nello sviluppo dell'adenoipofisi (Herzog et al., 2003). Spesso è desiderato un controllo temporale della sovraespressione, dal momento che la maggior parte dei geni importanti nello sviluppo svolge molteplici funzioni a diversi

stadi di sviluppo (Malicki et al., 2002). Questo è ora reso possibile grazie alla disponibilità di vettori inducibili mediante shock termico o fotoattivazione ed iniettabili nell'embrione; un potenziale problema è il fatto che può essere difficile ottenere una sovraespressione uniforme, dal momento che questi vettori presentano una distribuzione a mosaico dopo l'introduzione nell'embrione (Riley et al., 2004).

Le tecniche di genetica *forward* e *reverse* descritte in precedenza hanno contribuito in modo significativo alla comprensione della funzione genica nello sviluppo e nelle patologie. Però entrambe presentano distinti svantaggi: gli *screening* mutazionali sono altamente efficienti e non richiedono nessuna conoscenza sul gene di interesse, ma il clonaggio può essere laborioso e la linea mutante deve essere mantenuta per tutta la durata dello studio; tecniche di genetica *reverse*, come l'iniezione di morfolino, invece sono rapide e semplici ma richiedono un gene candidato e non producono né mutazioni nella linea germinale, né alterazioni stabili per lunghi periodi di tempo. Questo, unito alla difficoltà nella generazione di zebrafish *knockout*, potrebbe ridurre questo teleosteo a sistema genetico poco attraente. Una combinazione di genetica diretta e inversa sembra però avere superato questi ostacoli: la tecnologia TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genome*) (McCallum et al., 2000). Essa, inizialmente sviluppata nelle piante (Henikoff et al., 2004), combina un classico *screening* ad alta saturazione ENU con uno *screening high throughput* per mutazioni puntiformi nel genoma. Dopo mutagenesi con ENU il DNA genomico è estratto e sottoposto ad un rapido *screening* mediante RT-PCR con un *range* di *primer* disegnati contro geni noti. Questa strategia può rilevare singole mutazioni nel DNA, alcune delle quali saranno mutazioni *null* (Wienholds et al., 2002). Invece di sequenziare tutti i campioni per rilevare le mutazioni, gli amplificati sono denaturati e riallineati in modo da formare eteroduplex che sono poi tagliati dall'enzima CEL-1 ed analizzati in gel denaturanti di poliacrilammide per la selezione, ed il successivo sequenziamento, dei soli potenziali mutanti *null*. Questo metodo è rapido, permette lo *screening* simultaneo di molti campioni e dà come risultato la produzione di un pesce fondatore di una linea *knockout* per un gene candidato. Come ulteriore vantaggio il TILLING permette la produzione di "librerie" viventi ed amplificabili mediante accoppiamento di zebrafish mutanti, evitando la perdita di alleli associata alla criopreservazione (Wienholds et al., 2003).

La disponibilità di mutanti indotti chimicamente o con ablazioni funzionali ha reso lo zebrafish un buon modello per diverse malattie umane. In particolare la ricerca in ambito cardiovascolare ha fornito informazioni importanti sullo sviluppo del cuore nei vertebrati, grazie al fatto che la sopravvivenza dell'embrione di zebrafish non dipende, nelle prime fasi dello sviluppo, dalla circolazione sanguigna (Stainier et al., 1996; Xu et al., 2002). Lo zebrafish è stato utilizzato anche nello studio dell'angiogenesi (Lawson e Weinstein, 2002), delle malattie renali (Drummond et al., 1998), dell'apparato ottico (Goldsmith ed Harris, 2003) e come modello per la sordità

genetica umana (Whitfield, 2002). Lo zebrafish è inoltre un modello emergente per lo studio di malattie neurodegenerative e neuromuscolari come il morbo di Alzheimer (Tomasiewicz et al., 2002), la distrofia muscolare di Duchenne e diverse miopatie (Bassett e Currie, 2003).

1.3 Iniezione di mRNA e di morfolino in ovociti fecondati

Numerosi esperimenti di mutagenesi casuale in zebrafish hanno fornito diverse centinaia di mutanti per l'analisi della funzione genica, ma si sono rivelati inefficienti nello studio geni specifici. Per analizzare questo tipo di geni sono disponibili diversi approcci di genetica *reverse*. Un metodo particolarmente efficace si basa sull'uso di oligonucleotidi antisenso morfolino per bloccare la funzione genica. Questi composti sono analoghi del DNA che presentano un anello morfolino (idro-1,4-oxazina) in sostituzione del deossiribosio e che bloccano in modo specifico l'espressione di geni bersaglio creando un ingombro sterico per prevenire l'accesso dei fattori di traduzione o di *splicing* allo stampo di RNA. Diversi criteri devono essere presi in considerazione nel disegnare un morfolino specifico per un particolare gene bersaglio. Come i *primer* per le PCR, i morfolino devono presentare una auto-complementarietà scarsa o nulla, dal momento che la formazione di strutture secondarie riduce la loro capacità di legarsi all'mRNA bersaglio. Morfolino che contengono più del 36% di guanine o segmenti contenenti più di tre guanine in successione, inoltre, dimostrano ridotta solubilità in acqua e quindi sono meno efficaci. Anche la lunghezza dei morfolino influisce sulla loro attività: l'efficacia aumenta all'aumentare della lunghezza, ed i più lunghi morfolino commerciali disponibili sono di 25 bp (GeneTools, LLC).

I morfolino per il blocco della traduzione devono essere disegnati sulle sequenze di trascritto localizzate tra il *cap* al 5' e non più di 25 basi a valle del codone di inizio della traduzione. È stato dimostrato infatti che morfolino diretti contro sequenze più a valle sono significativamente meno efficaci, e proprio questa assenza di inibizione al di fuori di siti specifici è uno dei fattori chiave alla base della grande specificità dei morfolino: morfolino che legano in modo aspecifico altri trascritti non ridurranno la traduzione a meno che non interagiscano con siti molto specifici (Summerton e Weller, 1997). Un altro fattore che contribuisce alla loro specificità è certamente il fatto che, a differenza dei tipici oligonucleotidi antisenso, la loro attività non è dipendente da RNasi-H (Summerton e Weller, 1997). Un vantaggio dell'uso di morfolino rispetto ad altre strategie che si servono di oligonucleotidi antisenso è la loro scarsa tossicità, che rende possibile l'iniezione di alte concentrazioni di morfolino senza che vengano prodotti effetti tossici non specifici. Per molti morfolino, comunque, un elevato dosaggio può produrre effetti non specifici, come morte cellulare (Lele et al., 2001; Braat et al., 2001), difetti nell'epibolia (Imai e Talbot, 2001), degenerazione neurale (Nasevicius ed Ekker, 2000) e troncamento dell'asse antero-posteriore (Ekker e Larson,

2001). La dose adeguata di morfolino che deve essere iniettata deve essere quindi determinata empiricamente volta per volta.

Sono stati recentemente ideati dei morfolino in grado di bloccare in modo molto efficiente la funzione genica mediante interazione con i siti di *splicing* (Draper et al., 2001). Questo tipo di morfolino è disegnato in modo che la sequenza comprenda un sito di donazione o accettazione di *splicing* e sia di impedimento sterico per l'evento di *splicing* creando alterazioni nello *splicing* del solo mRNA zigotico e non di quello materno. Dal momento che gli eventi di maturazione nucleare avvengono rapidamente dopo la trascrizione, questi morfolino esercitano la loro azione in una stretta finestra temporale, per cui la loro concentrazione per la microiniezione in embrioni deve essere considerevolmente più elevata di quella richiesta per sopprimere la traduzione (Kang et al., 1998). Poiché l'interferenza dei morfolino con lo *splicing* dà luogo ad un'alterazione nelle dimensioni del trascritto, l'efficacia del *knockdown* può essere quantificata con amplificazione del prodotto di *splicing* mediante RT-PCR; in questo modo è possibile verificare l'efficacia dei morfolino qualora non si sia in possesso di anticorpi specifici per la proteina di interesse (Draper et al., 2001). Un'utile strategia nel *knockdown* con morfolino è l'uso simultaneo di due morfolino diretti verso due sequenze non sovrapposte: l'uso di due morfolino contro un singolo gene presenta un effetto sinergico nell'aumento dell'attività inibitoria (Draper et al., 2001; Cui et al., 2001). Ad esempio nel caso di due morfolino disegnati contro *sonic hedgehog* è stata osservata, per quanto riguarda le alterazioni a livello dei somiti, un'incidenza otto volte superiore rispetto all'iniezione di un singolo morfolino (Ekker e Larson, 2001).

L'interferenza mediata da morfolino può risultare inefficiente per diverse ragioni. La concentrazione intracellulare di morfolino può ridursi durante lo sviluppo per diluizione o degradazione, riducendo di conseguenza la sua efficacia. Osservazioni sperimentali suggeriscono che i morfolino perdano la loro efficienza dopo lo stadio di 50 hpf, quindi un tentativo di bloccare l'attività di un gene la cui funzione è biologicamente rilevante a questo stadio di sviluppo o successivamente può essere difficile nello zebrafish. Questo limita l'uso dei morfolino allo studio di processi che avvengono in tempi relativamente precoci durante lo sviluppo. Un altro fattore che può limitare l'efficacia di un morfolino è la ridondanza funzionale di molti *loci*, dovuta alla presenza in zebrafish di due ortologhi per molti geni umani o murini (Postlethwait et al., 1999). Questa è ovviamente una limitazione generale per qualsiasi forma di analisi del tipo *loss-of-function*. Un esempio di ridondanza funzionale è l'assenza di difetti nelle strutture mediane anteriori in embrioni di zebrafish iniettati con morfolino specifici per *sonic hedgehog* o *tiggy winkle hedgehog* (Nasevicius ed Ekker, 2000). È possibile superare il problema della ridondanza dei *loci hedgehog* in zebrafish iniettando simultaneamente morfolino diretti contro entrambi i geni. Questo approccio produce infatti grave ciclopia (Nasevicius ed Ekker, 2000). I morfolino possono essere facilmente

utilizzati per interferire con la funzione di due o anche tre geni potenzialmente ridondanti se è nota la loro struttura molecolare. A differenza dalle mutazioni indotte chimicamente, questo è chiaramente un punto di forza dei morfolino, perchè la generazione di *carrier* omozigoti di mutazioni multiple indotte chimicamente richiede molto tempo. Anche il *background* genetico dei ceppi di zebrafish è noto per influenzare l'attività dei morfolino. Un notevole esempio è il locus *one-eyed pinhead (oep)*: in un ceppo *wild-type*, il 43% degli embrioni mostrava il fenotipo mutante dopo trattamento con un morfolino, mentre in un altro ceppo nessun embrione presentava questo difetto (Nasevicius ed Ekker, 2000). Queste differenze nel ceppo possono essere imputate a polimorfismi ceppo-specifici del DNA o alla presenza di *loci* modificatori sconosciuti, che presentano diversi livelli di attività in ceppi geneticamente diversi. È quindi consigliabile testare ciascun morfolino su almeno due ceppi di animali *wild-type*. La più consistente evidenza sperimentale della specificità ed efficienza dei morfolino è comunque data dalla comparazione tra gli effetti fenotipici prodotti da mutazioni indotte chimicamente e quelli dovuti a *knockdown* con morfolino. Per numerosi *loci*, i fenotipi di alleli *null* possono essere esattamente riprodotti con l'utilizzo di oligonucleotidi morfolino antisenso (Imai e Talbot, 2001; Karlen e Rebagliati, 2001; Lele et al., 2001; Wei e Malicki, 2002).

Oltre a studi di *loss-of-function*, come l'approccio di *knockdown* genico basato sui morfolino, un elemento rilevante negli studi di genetica *reverse* è l'analisi *gain-of-function*. Esaminando i fenotipi di zebrafish che sovraesprimono geni di interesse, è possibile comprenderne la funzione. Questo approccio, a differenza dei morfolino, permette anche l'analisi del rapporto struttura-funzione dei prodotti genici. Per esempio, esprimendo una serie di varianti proteiche che mancano di alcuni domini funzionali o li presentano in forma mutata, è possibile identificare la funzione di questi domini nel contesto dei processi biologici di interesse. In zebrafish, l'analisi *gain-of-function* può essere effettuata mediante iniezione in embrioni a stadi precoci di costrutti di espressione del DNA o di mRNA sintetizzato in vitro (Hammerschmidt et al., 1999). Generalmente l'iniezione di mRNA sintetico porta a una espressione rapida ed uniforme, mentre i costrutti di DNA danno luogo a un profilo di espressione a mosaico. A causa di queste differenze intrinseche nel profilo e nel *time course* dell'espressione, ciascuno di questi metodi può essere vantaggioso, in base al tipo di analisi fenotipica. Un profilo di espressione a mosaico può infatti presentare un vantaggio se si desidera analizzare il fenotipo a livello di singole cellule. Confrontando un gruppo di cellule che sovraesprime il gene di interesse con cellule iniettate con un costrutto di controllo all'interno dello stesso tessuto, è possibile determinare il ruolo di un prodotto genico nella morfologia o nella migrazione cellulare. In alcune situazioni, entrambi i metodi possono essere utilizzati insieme per comprendere appieno la funzione genica.

Due importanti considerazioni devono essere ricordate in esperimenti di sovraespressione. Innanzitutto, l'espressione ubiquitaria di un prodotto genico a uno stadio precoce di sviluppo embrionale può causare alterazioni che precludono l'analisi fenotipica di stadi tardivi. In secondo luogo, dal momento che l'mRNA iniettato è gradualmente degradato, prodotti genici con una breve emivita possono non durare abbastanza a lungo da produrre un fenotipo. Quando un prodotto genico ha diverse funzioni a diversi stadi di sviluppo, il controllo temporale della sovraespressione può diventare una necessità. Sono stati quindi progettati dei costrutti di espressione a DNA che presentano un gene di interesse sotto controllo di un promotore inducibile e che permettono di modulare l'attività genica in maniera tempo- e spazio-specifica. Il recente isolamento di promotore del gene *hsp70-4* inducibile con shock termico fornisce uno strumento molto utile per questo tipo di analisi (Halloran et al., 2000). Il recupero dei mutanti zebrafish *sauternes* mediante sovraespressione dell'enzima δ -aminolevulinato sintasi, coinvolto nella biosintesi del gruppo eme, è stato presentato come primo esempio di terapia genica dell'analoga malattia umana, l'anemia sideroblastica congenita (Brownlie et al, 1998).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Analisi bioinformatica

La ricerca delle sequenze nella banca dati GenBank è stata condotta con il programma BLAST (Altschul et al. 1997), utilizzando l'intera sequenza aminoacidica degli ortologi umani di Emilina-1, Emilina-2, Emilina-3, Multimerina-1, Multimerina-2, Emid1 ed Emid2 come *queries*. Le sequenze di zebrafish che mostravano una similarità significativa con emiline/multimerine umane sono state utilizzate per un'ulteriore analisi di sequenza del genoma di zebrafish (assembly version Zv6) nei siti NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ed Ensembl (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/). L'allineamento globale delle sequenze di zebrafish ed umane è stato condotto con il programma Needle (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/needle.html>), basato sull'algoritmo di Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970). La comparazione multipla di sequenze e la costruzione dell'albero filogenetico sono state condotte con i programmi ClustalW e Treeview (Thompson et al., 1994; <http://workbench.sdsc.edu>). La nomenclatura dei geni di zebrafish è basata sulla nomenclatura approvata dei geni contenenti il dominio EMI (<http://www.genenames.org/genefamily/emid.php>). La localizzazione cromosomica ed i geni fiancheggianti sono stati derivati dalle annotazioni di NCBI ed Ensembl. Le sequenze dei geni per emiline/multimerine di zebrafish sono disponibili in GenBank all'interno dei seguenti assemblies genomici di *Danio rerio*: NW_001512129 (*emilin1a*), NW_001511521 (*emilin1b*), NW_001513713 (*emilin2a*), NW_001512941 (*emilin2b*), NW_001510914 (*mmer2a*), NW_001510771 (*mmer2b*), NW_001514037 (*emilin3a*), NW_001512501 (*emilin3b*).

2.2 Ibridazione *in situ whole-mount* (WISH)

2.2.1 Preparazione delle sonde

Per ottenere sonde a RNA altamente specifiche è stato clonato l'esone più lungo di ciascun gene delle emiline, codificante per la regione *coiled coil*, che è la regione meno conservata tra le varie emiline. Il DNA genomico è stato estratto da zebrafish adulti effettuando una estrazione di 3 ore a 56°C in agitazione con 50 µl di tampone di estrazione (Triton X-100 0.2%; Tris-HCl 10 mM, pH8; proteinasi K 200 µg/ml; EDTA 2 mM); quindi i campioni sono stati bolliti per 10 min per inattivare la proteinasi K e centrifugati per 1 min a 13200 rpm. Il DNA genomico presente nel sovrantante è stato utilizzato come stampo per una reazione di PCR *nested*. L'amplificazione è stata condotta in un volume finale di 50 µl, come descritto in precedenza (Parte Prima, paragrafo 2.4.2.2), utilizzando circa 1 µg di DNA genomico e 1 U di Taq DNA polimerase DyNAzyme (Finnzymes). Una seconda reazione di amplificazione è stata effettuata a partire da un'aliquota

dell'amplificato ottenuto con la prima reazione, mediante utilizzo di *primer* disegnati all'interno del segmento amplificato nella reazione precedente. Le reazioni sono state condotte in un termociclatore (PT-100 Thermal Controller, MJ Research) e l'analisi degli amplificati è stata effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio. Le tabelle che seguono riportano la descrizione degli oligonucleotidi utilizzati, disegnati secondo le sequenze presenti in GenBank, e delle condizioni alle quali l'amplificazione si è svolta.

<i>emilin1a</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- ACC ATT CAC AGC ATC CAG ACC AA -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- GAA TGC GGC TAA TGG TCT CAC TG -3'
Oligonucl. senso interno	5'- CCC TCA CAA ACA TCA ACA ACC AC -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- TAA CAC AAG TCC AAA GCC CAG AG -3'
Regione amplificata	1629 bp (GenBank Acc. No. NW_001512129)

<i>emilin1b</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- ACA AGA TGA GAC AAC TGG AGG AC -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- TTC TGG AAC TCC TTG AGG ATG TG -3'
Oligonucl. senso interno	5'- CAA AGA CCT ACA TGA CCT GCA GT -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- GAG GAT GTG GAT CAT AGA GGA GT -3'
Regione amplificata	2059 bp (GenBank Acc. No. NW_001511521)

<i>emilin2a</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- AAA GGC CAT CGA AAC AAT CAA CC -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- GAA CGC AAG TCC ACA AGC CAT TA -3'
Oligonucl. senso interno	5'- CGT TAG AAG AAG AAG TGG AGC GT -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- TTC CAG CCA CAC GTC CAT CAA G -3'
Regione amplificata	1032 bp (GenBank Acc. No. NW_001513713)

<i>emilin2b</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- GGA CAG ACA TAC AAG AGG ACA CC -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- AGA GCC TTC ACC CTG TCA TCC AC -3'
Oligonucl. senso interno	5'- TTG AGG AAT TGC GGG GAA CAG TG -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- AAT CTG GTT GTG GCT TGG TCT GC -3'
Regione amplificata	1217 bp (GenBank Acc. No. NW_001512941)

<i>mrrn2a</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- TGC TTG CAG ACT GGG CTT CGA C -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- ACT CCA GTG ATG CAT CCC TCT TG -3'
Oligonucl. senso interno	5'- GGA ACC AAA AGG AAA CGT GAG GA -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- ATC CAC TCC TTC CCC TGT CTG A -3'
Regione amplificata	408 bp (GenBank Acc. No. NW_001510914)

<i>mrrn2b</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- GTC AAA CAA CGC ACT CAA GTC CA -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- AGT CAG GCT CCG ATC ATG TGT TT -3'
Oligonucl. senso interno	5'- CAT TTT GCG GAG ACA GGT TTG GA -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- GCT TTG CGA CCA GTG TGT GAA TT -3'
Regione amplificata	568 bp (GenBank Acc. No. NW_001510771)

<i>emilin3a</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- TAT CGC TGC TCC TTC CCT GTC TA -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- TCG GAC AGT TGG TGA GAA TGG TT -3'
Oligonucl. senso interno	5'- GAG ACT CTA CTG TGG GCT TTG GA -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- GGG TGC TAT TTA CGT GAG ACA GA -3'
Regione amplificata	1560 bp (GenBank Acc. No. NW_001514037)

<i>emilin3b</i>	
Oligonucl. senso esterno	5'- GCA GCA GCA GTG TCA TAA CGA AC -3'
Oligonucl. antisenso esterno	5'- CTC ATG CAG TCT CTC AGG CCG T -3'
Oligonucl. senso interno	5'- GCG ACC AGA TAA ACA GCC ATA GC -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- GAA GCT GTC CGA ATG TCT CTC CA -3'
Regione amplificata	1025 bp (GenBank Acc. No. NW_001512501)

Reazione di amplificazione

1. 94°C per 3 min
2. 94°C per 1 min (denaturazione)
3. 65°C/63°C per 1 min (*annealing*)
4. 72°C per 2 min (estensione)
5. ripetuto i punti da 2. a 4. per 34 volte
6. 72°C per 7 min

Gli amplificati finali così ottenuti sono stati clonati nel vettore pGEM-T Easy (Promega) e, dopo la trasformazione mediante elettroporazione di cellule DH5 α , il DNA plasmidico è stato purificato con l'utilizzo del kit SV Miniprep DNA Purification System (Promega) e quindi sequenziato (Cribi, Università di Padova).

Il DNA clonato in pGEM-T Easy è stato linearizzato (10 μ g) mediante digestione con 30 U dell'enzima di restrizione *SphI* e, dopo la purificazione in condizioni RNase-free, è stata trascritta una sonda di RNA marcato per 2 ore a 37°C con digossigenina, a partire dal promotore SP6 presente nel plasmide, utilizzando il kit DIG RNA Labeling (Roche), e in seguito trattato con 2 μ l di DNasi I. La DNasi I è stata bloccata aggiungendo EDTA e quindi la sonda marcata è stata precipitata e separata dai nucleotidi marcati non incorporati con l'utilizzo delle colonnine Quick SpinTM Column (Roche), quantificata in gel e conservata a -80°C. Negli esperimenti di ibridazione *in situ* sono state utilizzate anche sonde di controllo, che sono state prodotte mediante linearizzazione e trascrizione come descritto in precedenza a partire da costrutti gentilmente concessi dal laboratorio del Prof. Francesco Argenton (Dipartimento di Biologia, Università di Padova). In particolare sono state marcate con fluoresceina utilizzando il kit Fluorescein Labeling (Roche) le sonde *egr2b* (Oxtoby *et al.*, 1993), *fgf8a* (Reifers *et al.*, 1998), *insulin* (Argenton *et al.*, 1999) e *myh6* (Berdougo *et al.*, 2003).

2.2.2 WISH

Embrioni di zebrafish *wild-type* sono stati cresciuti in *fish water* (NaH₂PO₄ 0.5 mM, Na₂HPO₄ 0.5 mM, 1.5 g Instant Ocean in acqua deionizzata) ad una temperatura costante di 28.5°C con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 di buio. Essi sono stati bloccati con paraformaldeide al 4% allo stadio desiderato (5s, 15s, 24 hpf, 40 hpf, 48 hpf, 3 dpf e 4 dpf), determinato secondo criteri morfologici (Kimmel *et al.*, 1995). Per facilitare la visualizzazione dell'mRNA durante l'ibridazione, gli embrioni a stadi successivi a 24 hpf sono stati trattati con feniltiourea 0.003% (Sigma) per bloccare la pigmentazione. I campioni sono quindi stati disidratati con metanolo e conservati a -20°C in metanolo 100%. Per effettuare l'ibridazione *in situ*, gli embrioni sono stati reidratati con concentrazioni decrescenti di metanolo in PBT (PBS, 0.1% Tween-20), fino a raggiungere una concentrazione di PBT del 100%. In seguito, sono stati resi permeabili alla sonda mediante incubazione con proteinasi K a 10 μ g/ml in PBT per un tempo crescente a seconda dello stadio dell'embrione e in seguito rifissati in paraformaldeide al 4% per 20 min. Dopo 5 lavaggi in PBT, gli embrioni sono stati incubati per 2 ore a 65°C nella soluzione di ibridazione (formammide 50-60%, SSC 5x, Tween-20 0.01%, eparina 50 μ g/ml e tRNA 500 μ g/ml, portando a pH 6.0 con acido citrico). Quindi la soluzione di ibridazione è stata sostituita da nuova

soluzione di ibridazione contenente 100-200 ng di sonda antisense marcata e gli embrioni sono stati incubati durante la notte a 65°C.

Il giorno successivo gli embrioni sono stati sottoposti ai seguenti lavaggi a stringenza crescente: *i*) soluzione di lavaggio (formammide 50-60%, SSC 5x, Tween-20 0.01%, portando a pH 6.0 con acido citrico) 1 min a 65°C; *ii*) 75% soluzione di lavaggio e 25% SSC 2x per 15 min a 65°C; *iii*) 50% soluzione di lavaggio e 50% SSC 2x per 15 min a 65°C; *iv*) 25% soluzione di lavaggio e 75% SSC 2x per 15 min a 65°C; *v*) SSC 2x per 15 min a 65°C; *vi*) 0.2 SSC 2x per 15 min a 65°C *vii*) 75% SSC 0.2x e 25% PBT 10 min a temperatura ambiente; *viii*) 50% SSC 0.2x e 50% PBT 10 min a temperatura ambiente; *ix*) 25% SSC 0.2x e 75% PBT 10 min a temperatura ambiente, *x*) PBT 10 min a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente in una soluzione di PBT contenente siero di pecora al 2% e BSA 2 mg/ml. Infine, i campioni sono stati incubati durante la notte in soluzione di anticorpi anti-digossigenina (Roche; diluizione 1:5000 in PBT) in agitazione a 4°C.

Il terzo giorno la soluzione con gli anticorpi è stata rimossa e gli embrioni sono stati sottoposti a 6 lavaggi in PBT e sono stati trattati per tre volte con tampone di colorazione (Tris-HCl 100 mM, pH 9.5; MgCl₂ 50 mM; NaCl 100 mM; Tween-20 0.1%). In seguito sono stati immersi in soluzione di colorazione costituita da NBT (Roche; 225 µg) e BCIP (Roche; 175 µg) in 1 ml di tampone di colorazione, a temperatura ambiente ed in agitazione. Al raggiungimento dell'intensità di colorazione desiderata, gli embrioni colorati sono stati lavati con PBT, post-fissati in paraformaldeide al 4% e trasferiti gradualmente in metanolo per la conservazione a -20°C.

Nel caso di ibridazioni con due sonde marcate, il primo giorno gli embrioni sono stati incubati durante la notte con soluzione di ibridazione contenente 200 ng di entrambe le sonde antisense (una marcata con digossigenina e l'altra con fluoresceina); dopo l'incubazione con anticorpi anti-digossigenina, gli embrioni sono stati sottoposti a 3 lavaggi in PBT e trattati con soluzione di *stripping* per 3 volte; quindi, dopo 3 ulteriori lavaggi con PBT, sono stati incubati in PBT, siero di pecora e BSA per 2 ore e con anticorpi anti-fluoresceina (Roche) per tutta la notte a 4°C in agitazione. Le sonde marcate con digossigenina sono state rivelate con NBT/BCIP, mentre quelle marcate con fluoresceina sono state rivelate con FAST RED (Roche).

Per indagare sul possibile ruolo di *emilin3a* ed *emilin3b* in vie di segnale implicate nello sviluppo, sono state effettuate, con le sonde specifiche per *emilin3a* ed *emilin3b* ibridazioni *in situ whole-mount* su embrioni trattati con farmaci specifici, come descritto al paragrafo 2.3, e su embrioni mutanti *dino* (mutazione nel gene *chd* codificante per chordin) e *swirl* (mutazione nel gene *bmp2b* codificante per la proteina BMP2-4) forniti dal laboratorio del Prof. Francesco Argenton (Dipartimento di Biologia, Università di Padova).

Nell'analisi del fenotipo di embrioni di zebrafish iniettati con mRNA di Emilina-3 murina, sono state effettuate ibridazioni *in situ* con la sonda specifica per il gene *myoD* (Weinberg et al., 1996) marcata con digossigenina.

2.2.3 Colorazione con alcian blue

Embrioni allo stadio di 4 dpf fissati in paraformaldeide al 4% e conservati in metanolo a -20°C sono stati gradualmente reidratati in PBT. Sono stati quindi sottoposti a 3 lavaggi di 5 min in PBT e quindi colorati con soluzione alcian blue (1% acido cloridrico, 70% etanolo, 0.1% alcian blue) a 4°C per tutta la notte. Per aumentare la loro trasparenza, sono stati immersi in una soluzione di 3% H₂O₂ e 1% KOH. Infine, gli embrioni sono stati disidratati in metanolo e analizzati come per l'ibridazione *in situ*.

2.2.4 Osservazione al microscopio e acquisizione delle immagini

Gli embrioni, se necessario privati del tuorlo con delle pinzette, sono stati montati in glicerolo 87% in PBS e osservati al microscopio composto Leica DMR/Nomarski fornito di fotocamera digitale Leica DC500. Nei casi in cui era presente una parziale colorazione di fondo, la trasparenza degli embrioni è stata migliorata mediante disidratazione degli embrioni in metanolo e trattamento per 15 minuti con una soluzione di benzil alcol e benzil benzoato 3:1.

2.2.5 Sezioni al vibratomo

Le sezioni sono state ottenute dopo inclusione degli embrioni trattati per WISH in una soluzione contenente 0.5% gelatina, 30% BSA, 20% saccarosio e 0.25% glutaraldeide. Sono state quindi ottenute sezioni di 30 µm utilizzando un vibratomo Leica VT1000S. Gli embrioni sono stati montati in glicerolo-gelatina (Sigma) e processati come per le ibridazioni *in situ*.

2.3 Trattamento di embrioni con farmaci

Per i trattamenti con ciclopamina, embrioni provvisti di corion sono stati cresciuti a partire dallo stadio di 2 hpf al buio a 28.5°C in *fish water* addizionata di 4 µg/ml di ciclopamina (Calbiochem; stock in etanolo 95%). Embrioni di controllo sono stati trattati in *fish water* con un pari volume di etanolo 95%.

I trattamenti con SU5402 sono stati effettuati come descritto in letteratura (Raible e Brand, 2001). In breve, i corion di embrioni di zebrafish *wild-type* allo stadio di una cellula sono stati perforati e gli embrioni sono stati incubati al buio a 28.5°C con SU5402 100 µM (Calbiochem, sciolto in DMSO) o con una quantità equivalente di DMSO (campioni di controllo negativo) fino allo stadio di 24 hpf, a cui sono stati fissati.

Il trattamento con DAPT è stato effettuato come descritto in Geling et al., 2002: gli embrioni sono stati privati del corion e trattati allo stadio di blastula tardiva con 50 μ M DAPT in DMSO fino allo stadio 20s, a cui sono stati bloccati. Come controllo sono stati utilizzati embrioni *wild-type* allo stadio 20s.

2.4 Microiniezione di mRNA e morfolino in embrioni

2.4.1 5'-RACE

Per determinare la sequenza completa della regione al 5' del cDNA di *emilin3a* ed *emilin3b*, necessaria per disegnare i morfolino, ho effettuato reazioni di 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) a partire da RNA totale di embrioni allo stadio di 24 hpf estratto con TRIzol Reagent (Gibco), trattato con 1 U di DNasi I per ogni μ g di RNA a 37°C 30 min ed ulteriormente purificato utilizzando il kit RNeasy (Quiagen).

L'amplificazione dell'estremità al 5' è stata condotta utilizzando il kit First Choice® RLM-RACE (Ambion). Brevemente, l'RNA totale purificato è stato trattato con fosfatasi alcalina intestinale di vitello per rimuovere i fosfati liberi al 5' da molecole indesiderate quali rRNA, mRNA frammentato, tRNA e DNA genomico contaminante. Poi il campione è stato trattato con pirofosfatasi acida del tabacco per rimuovere la struttura del *cap* dall'mRNA *full-length*, lasciando un monofosfato libero al 5'. Un oligonucleotide adattatore di 45bp è stato legato alla popolazione di mRNA mediante T4 RNA ligasi. L'adattatore non può legare l'RNA defosforilato, perchè queste molecole mancano del fosfato 5' necessario per la reazione di *ligation*. Durante la *ligation* la maggior parte dell'mRNA *full-length* privo di *cap* acquisisce la sequenza adattatore all'estremità 5'. E' stata quindi effettuata una reazione di retrotrascrizione con un *primer* specifico per *emilin3a* o *emilin3b*, seguita da una PCR *nested* effettuata con la DNA polimerasi Phusion (Finnzymes) allo scopo di amplificare il 5' del trascritto. In entrambe le reazioni della PCR *nested*, la temperatura di annealing è stata di 63°C. Nella seconda reazione, è stata amplificata un'aliquota pari a 1/1000 dell'amplificato ottenuto nella prima reazione. Nelle tabelle seguenti sono riportate le sequenze dei *primer* senso, forniti dalla ditta Ambion e disegnati sull'adattatore, e dei *primer* antisenso interno ed esterno per amplificare la regione in 5' di *emilin3a* ed *emilin3b*.

Primer antisenso per retrotrascrizione	
<i>emilin3a</i>	5'- GGG TGC TAT TTA CGT GAG ACA GA -3'
<i>emilin3b</i>	5'- CTC ATG CAG TCT CTC AGG CCG T -3'

Primer senso disegnati sull'adattatore	
5' RACE outer primer	5'- GCT GAT GGC GAT GAA TGA ACA CTG -3'
5' RACE inner primer	5'- CGC GGA TCC GAA CAC TGC GTT TGC TGG CTT TGA TG -3'

<i>emilin3a</i>	
Oligonucl. antisenso esterno	5'- GTC CAA CCG CTC ATC TTC AAT A -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- CTT TGA AGG GTG GTG TTT TGA C -3'

<i>emilin3b</i>	
Oligonucl. antisenso esterno	5'- CGG CTA TGG CTG TTT ATC TGG -3'
Oligonucl. antisenso interno	5'- GTG GCT CTT TTC CCT CAG TTC -3'

Reazione di amplificazione
1. 98°C per 3 min
2. 98°C per 10 sec (denaturazione)
3. 63°C per 30 sec (<i>annealing</i>)
4. 72°C per 1 min 20 sec (estensione)
5. ripetuto i punti da 2. a 4. per 29 volte
6. 72°C per 7 min

Gli amplificati sono stati clonati in pGEM-T Easy (Promega) e sequenziati (Cribi, Università di Padova).

2.4.2 Design del morfolino

Utilizzando l'intera sequenza del cDNA di *emilin3a* ed *emilin3b*, ottenuta da GenBank e completata grazie alla 5'-RACE, sono stati disegnati degli oligonucleotidi morfolino antisenso sul sito di *splicing* del primo introne. I morfolino sono stati prodotti dalla ditta Gene Tools, LLC e le sequenze sono quelle riportate qui di seguito. Sono stati prodotti anche dei morfolino di controllo, in cui 5 citosine sono stati mutate in guanine o viceversa (5-mis).

<i>emilin3a</i>	
Morfolino	5'- TTA CTC ATG GAT ACT TAC TTG TGC C -3'
5-mis	5'- TTA gTC ATG cAT AgT TA _g TTG TcC C -3'

<i>emilin3b</i>	
Morfolino	5'- TAG CGT TTA CTT ACT TAT GAT GCC C -3'
5-mis	5'- TAc CGT TTA gTT AgT TAT cAT GgC C -3'

2.4.3 Microiniezione di mRNA e di morfolino in ovociti fecondati

Embrioni di zebrafish *wild-type* sono stati cresciuti in *fish water* ad una temperatura costante di 28.5°C con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 di buio. Gli embrioni sono stati messi in accoppiamento durante la notte ed il mattino seguente sono state raccolte le uova e microiniettate allo stadio di una o due cellule, utilizzando un microiniettore Word Precision Instruments.

Il cDNA *full-length* di Emilina-3 murina in pCS2-Chd-FLAG è stato linearizzato con l'enzima di restrizione *NsiI* e trascritto con il kit mMESSAGE mMACHINE® SP6 (Ambion). L'mRNA purificato è stato iniettato in embrioni allo stadio di una o due cellule in quantità di 500 pg per embrione, utilizzando una soluzione di rosso fenolo come tracciante per verificare l'avvenuta iniezione ed l'mRNA di GFP (Amsterdam et al., 1995), per selezionare gli embrioni effettivamente iniettati. I morfolino sono stati sciolti in acqua alla concentrazione di 1 mM ed addizionati di soluzione di Danieu (NaCl 50 mM, KCl 0.7 mM, MgSO₄ 0.4 mM, Ca(NO₃)₂ 0.6 mM, HEPES 5 mM pH7.6) e di rodamina destrano, colorante fluorescente per individuare gli embrioni effettivamente iniettati. I morfolino sono stati infine iniettati in embrioni allo stadio di una o due cellule alla concentrazione finale di 10 µM nell'ovocita. In entrambi i casi, dopo la microiniezione gli embrioni sono stati trasferiti in piastre e cresciuti fino allo stadio desiderato in incubatore a 28.5°C.

2.4.4 Verifica dell'effetto del morfolino

Gli embrioni iniettati sono stati bloccati allo stadio di 24 hpf o 48 hpf e l'RNA è stato estratto con TRIzol Reagent (Gibco), trattato con DNasi per eliminare il DNA genomico contaminante e quindi retrotrascritto esattamente con le stesse modalità descritte nella Parte Prima al paragrafo 2.1. Quindi sono state effettuate reazioni di PCR utilizzando *primer* disegnati per l'amplificazione dell'introne ritenuto in presenza del morfolino (MO) e *primer* per la beta-actina come controllo. Una terza coppia di *primer* è stata disegnata su due esoni a valle per escludere la presenza di DNA genomico contaminante.

<i>emilin3a</i> : primer per MO	
Oligonucl. senso	5'- TTT TGC ATT GTT TTC TTC TCC T -3'
Oligonucl. antisenso	5'- GAT GTC TTT CAA TGT GTT AT -3'
Dimensioni amplificato	224 bp solo in presenza del MO

<i>emilin3a</i> : primer per controllo DNA genomico	
Oligonucl. senso	5'- GAC TGT CTC GTT CAC TGT TC -3'
Oligonucl. antisenso	5'- CTG CAT AGG CAT TGG ACC TT -3'
Dimensioni amplificato	624 bp se contaminazione da DNA genomico, altrimenti 535 bp

<i>emilin3b</i> : primer per MO	
Oligonucl. senso	5'- TTC TTG CAT TTC CGT TGG TC -3'
Oligonucl. antisenso	5'- AGC ATC TGA AAC TGT AGG AC -3'
Dimensioni amplificato	255 bp solo in presenza del MO

<i>emilin3b</i> : primer per controllo DNA genomico	
Oligonucl. senso	5'- AAG CAA AAC TGA AAG ATG AG -3'
Oligonucl. antisenso	5'- CAT GTA GGG TTT AGG AGT GT -3'
Dimensioni amplificato	306 bp se contaminazione da DNA genomico, altrimenti 171 bp

Beta-actina	
Oligonucl. senso	5'-TGT TTT CCC CTC CAT TGT TGG -3'
Oligonucl. antisenso	5'- TTC TCC TTG ATG TCA CGG AC -3'
Dimensioni amplificato	500 bp

Le reazioni PCR sono state condotte in un volume totale di 50 μ l, come descritto in precedenza, utilizzando 300 ng di DNA e 2 U di Taq DNA Polimerasi DyNAzyme (Finnzymes).

2.4.5 Studio del fenotipo di embrioni iniettati con mRNA o morfolino

Per gli studi preliminari sul fenotipo, gli embrioni microiniettati con mRNA sono stati bloccati allo stadio di 24 hpf e l'effetto fenotipico è stato esaminato mediante ibridazione in situ *whole-mount*, come descritto al Paragrafo 2.2.1, con una sonda per il gene *myoD*, marcatore del mesoderma parassiale. Gli embrioni iniettati con il morfolino sono stati invece bloccati allo stadio di 24 hpf e 48 hpf, fissati in paraformaldeide al 4% e documentati al microscopio composto Leica DMR/Nomarski fornito di fotocamera digitale Leica DC500.

3 RISULTATI

3.1 Distribuzione filogenetica dei geni EDEN

Una ricerca di sequenze codificanti per geni EDEN nelle banche dati dei genomi di *Drosophila melanogaster* ed altri invertebrati, mediante comparazione con le sequenze umane e murine, non ha dato nessun riscontro significativo, suggerendo che questa superfamiglia genica abbia avuto origine durante l'evoluzione dei vertebrati (Tabella **C.1**). L'organismo più semplice in cui si è potuto identificare un gene EDEN è l'urocordato *Ciona intestinalis*, nel cui genoma è presente un gene codificante per una proteina contenente un dominio EMI nella porzione N-terminale e parzialmente correlato ad *Emid1* ed *Emid2* dei mammiferi (GenBank accession n. BW206258).

Un'analoga ricerca nei vertebrati inferiori ha rivelato che sia i teleostei (*Danio rerio* e *Takifugu rubripes*) sia gli anfibi (*Xenopus laevis*) possiedono diversi geni codificanti per proteine secrete contenenti un dominio EMI N-terminale e con un significativo grado di conservazione con le EDEN di mammifero. E' interessante sottolineare che in questi organismi non è stato rilevato alcun gene ortologo a *Mmrn1*, a indicare che questo gene, codificante per una proteina che risulta essere la meno conservata all'interno della famiglia delle emiline/multimerine e che è secreta esclusivamente dalle piastrine e dalle cellule endoteliali e quindi è specializzata per effettuare una funzione a livello di sistema cardiocircolatorio, si è evoluto in tempi successivi, con la comparsa dei vertebrati superiori. Utilizzando comparazioni di sequenza, infatti, il gene di Multimerina-1 è stato rilevato solo a partire dal pollo (*Gallus gallus*) e quello riscontrato in questo vertebrato superiore rimarrà l'assetto definitivo delle EDEN, così come lo riscontriamo nei mammiferi (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*). Questo assetto è caratterizzato dalla presenza di sette proteine EDEN raggruppabili nelle tre famiglie già citate nella Parte Prima (Tabella **C.1**).

L'analisi filogenetica effettuata confrontando le sequenze aminoacidiche dei geni EDEN in diversi cordati (*Ciona intestinalis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*) ha confermato che questa superfamiglia è comparsa nei cordati inferiori e si è espansa durante l'evoluzione dei vertebrati (Figura **C.2**). Per le successive analisi in zebrafish, mi sono concentrata sui membri della famiglia delle emiline/multimerine e delle emiline tronche, trascurando invece le Emid, in quanto le sequenze presenti nelle banche dati per i geni corrispondenti sono ampiamente incomplete e non sarebbe stato possibile, anche per le ridotte dimensioni degli esoni, produrre delle sonde abbastanza specifiche per effettuare l'ibridazione *in situ*.

CHORDATA

	INVERTEBRATA	UROCHORDATA	TELEOSTEA	AMPHIBIA	AVES	MAMMALIA		
	<i>Drosophila melanogaster</i> <i>Caenorhabditi</i>	<i>Ciona intestinalis</i>	<i>Fugu rubripes</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>
Emilina-1	-	-	+	+	+	+	+	+
Emilina-2	-	-	+	+	+	+	+	+
Multimerina-1	-	-	-	-	+	+	+	+
Multimerina-2	-	-	+	+	+	+	+	+
Emilina-3	-	-	+	+	+	+	+	+
Emid-1	-	"protoEmid"	+	+	+	+	+	+
Emid-2	-		+	+	+	+	+	+

Tabella C.1: Ricerca della presenza di proteine della superfamiglia EDEN in diversi organismi. E' riportata in modo schematico la presenza (segno +) o l'assenza (segno -) di ciascun componente della superfamiglia EDEN. La ricerca delle sequenze nella banca dati GenBank è stata condotta con il programma BLAST, utilizzando come *queries* le sequenze aminoacidiche umane complete di Emilina-1, Emilina-2, Emilina-3, Multimerina-1, Multimerina-2, Emid1 ed Emid2.

3.2 Identificazione di otto geni codificanti per emiline in zebrafish

La ricerca di proteine contenenti il dominio EMI in zebrafish, mediante comparazione di sequenza con l'utilizzo delle banche dati GenBank ed Ensembl, ci ha permesso di identificare otto geni codificanti per proteine della famiglia emiline/multimerine in *Danio rerio* (Tabella **C.2**). L'analisi di sequenza ha rivelato che questi geni sono ortologhi ai geni umani *EMILIN1*, *EMILIN2*, *MMRN2* ed *EMILIN3*, codificanti per Emilina-1, Emilina-2, Multimerina-2 ed Emilina-3, rispettivamente. Non è stato trovato invece nessun ortologo del gene di mammifero codificante per Multimerina-1, né in *Danio rerio* né in *Takifugu rubripes* o in anfibi. Ciascun gene delle emiline/multimerine è presente in zebrafish con due distinti paraloghi, che presentano simili gradi di conservazione della sequenza aminoacidica rispetto al corrispondente gene umano e variabili dal 46.5% (Multimerina-2b) al 79% (Emilina-1b) (Tabella **C.2**).

Abbiamo poi analizzato, mediante comparazione con il programma Needle (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/needle.html>), la percentuale di similarità reciproca dei due paraloghi di zebrafish, calcolata come percentuale di residui aminoacidici conservati: essi presentano sequenze distinte e con un grado di similarità significativo ma non particolarmente elevato, variabile dal 47% delle due isoforme di Emilina-2 al 59% delle due isoforme di Emilina-3. Ulteriori informazioni genomiche, derivate dalla ricerca nel database GenBank, hanno indicato che questi paraloghi di zebrafish sono localizzati su differenti cromosomi ma condividono una conservata sintenia, cioè geni fiancheggiati conservati, sia tra loro che con gli omologhi umani: ciascuna emilina di zebrafish presenta almeno un gene sintenico conservato con il corrispondente gene umano. In particolare, questa sintenia con gli omologhi umani è particolarmente evidente per le due isoforme di Multimerina-2 e di Emilina-3 (Tabella **C.3**).

La sequenza aminoacidica dedotta per le otto diverse emiline di zebrafish indica che la loro struttura in domini assomiglia fortemente a quella delle corrispondenti emiline/multimerine umane. Tutte possiedono un dominio EMI all'estremità N-terminale, seguito da una lunga regione con alta probabilità di formare strutture *coiled coil*. È interessante notare che il dominio EMI delle emiline di zebrafish contiene sette residui di cisteina conservati come nei mammiferi, con l'unica eccezione di Emilina-3a che manca della seconda cisteina. Come nelle corrispondenti isoforme umane e murine, la porzione C-terminale ha una diversa organizzazione nelle varie emiline di zebrafish e termina con un dominio gC1q. Questo dominio è assente in Emilina-3a e -3b, analogamente a quanto avviene per le Emilina-3 nei mammiferi (Figura **C.1**). L'analisi filogenetica, effettuata mediante comparazione multipla delle sequenze aminoacidiche complete di diverse specie (*Ciona intestinalis*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*) con l'algoritmo ClustalW, conferma il raggruppamento delle coppie di geni delle emiline di zebrafish con i corrispondenti paraloghi di uccelli e mammiferi (Figura **C.2**).

	Emilina-1	Emilina-2	Multimerina-1	Multimerina-2	Emilina-3	Emid-1	Emid-2
Emilina-1a	55.3	46.7	37.9	41.9	35.9	21.7	21.3
Emilina-1b	78.8	46.6	34.8	40.0	39.3	24.3	26.5
Emilina-2a	42.4	48.0	35.1	42.5	42.3	29.3	24.2
Emilina-2b	43.6	50.3	38.6	40.0	37.1	21.4	17.0
Multimerina-2a	39.8	41.5	38.1	46.7	38.6	19.6	20.7
Multimerina-2b	41.2	41.8	37.6	46.5	38.4	19.8	22.5
Emilina-3a	41.6	41.7	34.7	40.2	59.4	30.3	24.6
Emilina-3b	40.5	39.2	34.4	40.5	55.6	24.3	25.0

Tabella C.2: Comparazione di sequenza delle emiline di zebrafish. Percentuale di identità di sequenza aminoacidica tra le emiline/multimerine di zebrafish e le diverse proteine EDEN umane, ottenuta mediante allinamento globale con il programma Needle. Per ciascuna proteina di zebrafish il valore più elevato, corrispondente alla proteina umana più simile, è evidenziato in grigio.

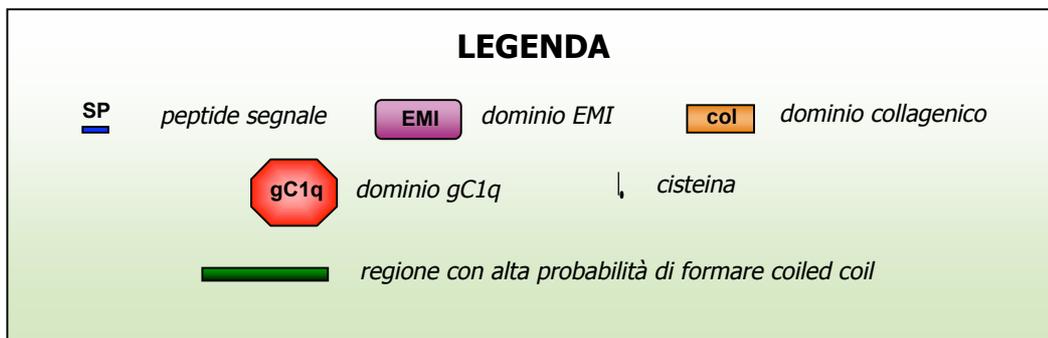
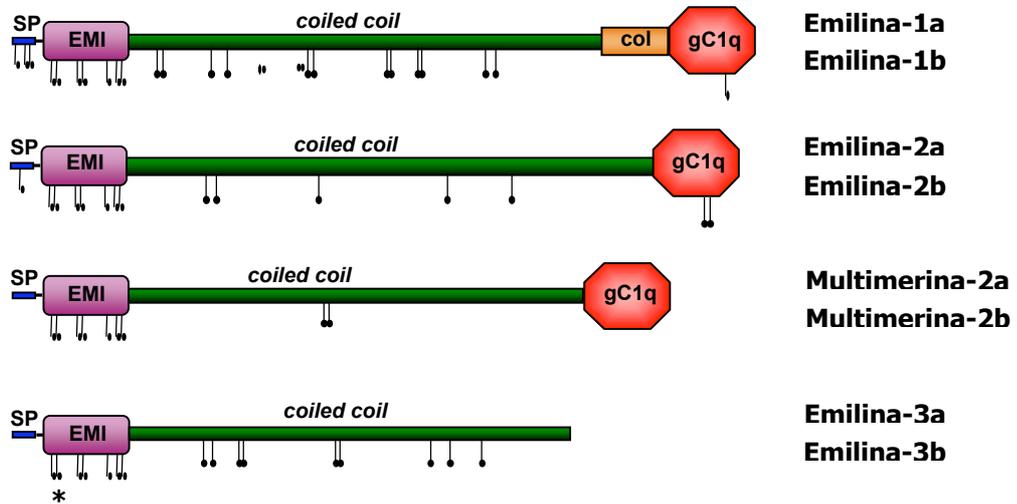


Figura C.1: Analisi della struttura delle emiline di zebrafish. Diagramma schematico della struttura delle emiline di zebrafish. I residui di cisteina conservati sono indicati con barre verticali. L'asterisco marca il secondo residuo di cisteina del dominio EMI, assente in Emilina-3a.

Gene	Similarità reciproca (%)	Localizzazione cromosomica	Geni fiancheggiati
<i>emilin1a</i>	52.2	Chr. 20, pos. 36.30 Mb	<i>stmn4, snap25a</i>
<i>emilin1b</i>		Chr. 17, pos. 12.53 Mb	<i>stmn4l, snap25b, khk</i>
<i>emilin2a</i>	47.4	Chr. 7, pos. 6.18 Mb	<i>myl9l, adcyap1a</i>
<i>emilin2b</i>		Chr 2, pos. 28.07 Mb	<i>myl9l*</i> , <i>adcyap1b</i> , <i>lipin2*</i> , <i>myomesin1*</i>
<i>mmrn2a</i>	53.6	Chr 13, pos. 24.90 Mb	<i>glud1a</i> , <i>synuclein*</i> , <i>bmpr1a</i> , <i>ldb3</i> , <i>opn4*</i>
<i>mmrn2b</i>		Chr 12, pos. 36.08 Mb	<i>glud1b</i> , <i>synuclein*</i> , <i>bmpr1ab</i> , <i>ldb3l</i> , <i>opn4*</i>
<i>emilin3a</i>	58.6	Chr 8, pos. 64.48 Mb	<i>ythdf1</i> , <i>dnajc5</i> , <i>SAMD10*</i>
<i>emilin3b</i>		Chr 23, pos. 3.79 Mb	<i>b4galt5</i> , <i>SAMD10*</i>

Tabella C.3: Caratteristiche molecolari delle emiline di zebrafish. Nella seconda colonna è riportata la percentuale di similarità reciproca dei due paraloghi di zebrafish, calcolata come percentuale di residui aminoacidici conservati mediante comparazione con il programma Needle (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/needle.html>). Il cromosoma e la posizione cromosomica di ciascun gene di zebrafish, derivate dalle annotazioni presenti in GenBank, è indicato nella terza colonna. L'ultima colonna mostra le sintenie, cioè i geni fiancheggiati conservati, per ciascuna emilina/multimerina di zebrafish; i geni sintenici il cui ortologo umano fiancheggia la corrispondente emilina/multimerina sono sottolineati. Gli asterischi marcano *loci* codificanti per *hypothetical proteins*, simili ai geni di zebrafish o umani indicati.

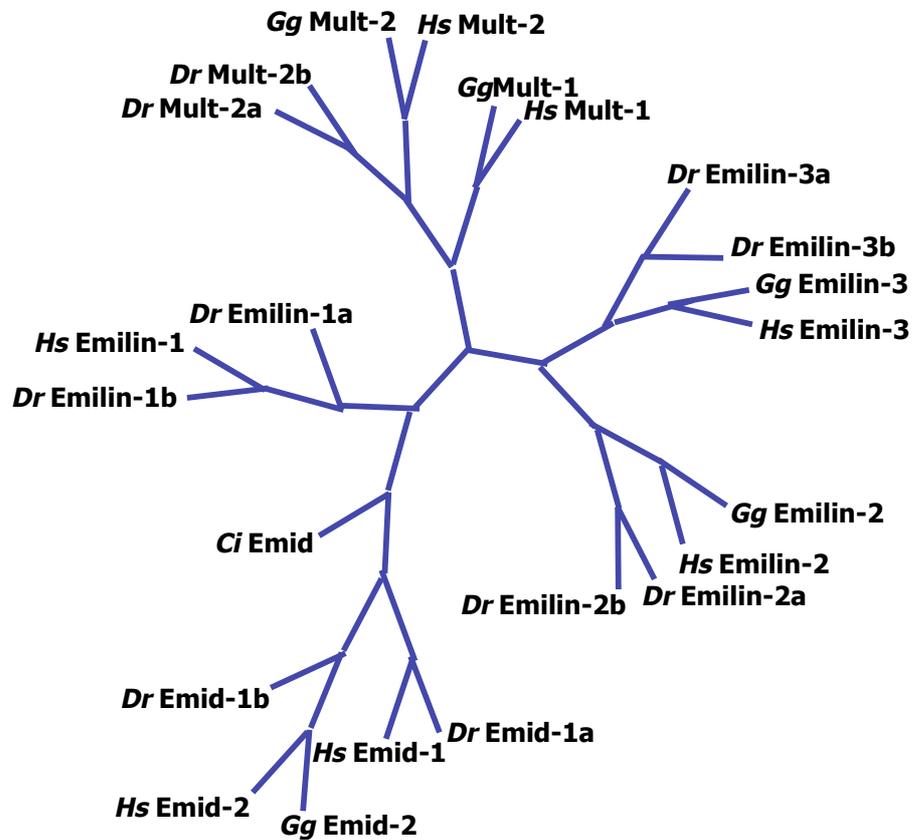


Figura C.2: Analisi filogenetica della superfamiglia EDEN. L'albero filogenetico privo di radici (*unrooted tree*) è stato generato mediante comparazione multipla delle sequenze aminoacidiche complete di quattro diverse specie di cordati (urocordati: *Ciona intestinalis*, teleostei: *Danio rerio*, uccelli: *Gallus gallus*, mammiferi: *Homo sapiens*), utilizzando l'algoritmo ClustalW ed il programma TreeView. *Ci*: *Ciona intestinalis*, *Dr*: *Danio rerio*, *Gg*: *Gallus gallus*, *Hs*: *Homo sapiens*. Mult: Multimerin.

3.3 Analisi dell'espressione delle emiline in zebrafish mediante WISH

In base alla sequenza nucleotidica degli otto geni identificati in zebrafish, ho clonato per ciascun gene l'esone più esteso, codificante per la regione *coiled coil*, che è la meno conservata tra le diverse emiline, in modo da ottenere sonde molto specifiche. Ho amplificato, mediante PCR con una DNA polimerasi ad alta fedeltà a partire da DNA genomico estratto da pesci *wild-type* adulti, segmenti di lunghezza variabile da 408 bp (*mmrn2a*) a 2059 bp (*emilin1b*), utilizzando per ciascun gene dei *primer* disegnati all'interno di un esone, in modo da amplificare il solo cDNA. Ho poi clonato i frammenti in un vettore e sequenziato per verificarne la corretta amplificazione. Ho quindi trascritto, a partire esclusivamente da amplificati totalmente privi di mutazioni, sonde a RNA antisense marcate con digossigenina, che ho usato per l'ibridazione *in situ* su embrioni interi di zebrafish a diversi stadi: 5 somiti (5s), 15 somiti (15s), 20 somiti (20s), 24 ore dopo la fecondazione (24 hpf), 40 ore dopo la fecondazione (40 hpf), 48 ore dopo la fecondazione (48 hpf) e 72 ore dopo la fecondazione (72 hpf). In tutti i casi, le sonde si sono dimostrate altamente specifiche e hanno rilevato un profilo di espressione distinto per ogni emilina; i due paraloghi corrispondenti a ciascuna emilina di mammifero hanno rivelato un quadro solo in parte sovrapponibile e spesso complementare fra loro. Per alcuni embrioni allo stadio di 24 hpf, dopo l'ibridazione *in situ* ho prodotto sezioni trasversali al vibratomo, in modo da indagare più in dettaglio il profilo di espressione rilevato su embrioni interi; in alcuni casi, le analisi di sezioni mi hanno consentito di identificare nuovi distretti, non individuabili facilmente in embrioni *in toto*, in cui le emiline sono espresse.

3.3.1 *emilin1a* ed *emilin1b*

A stadi precoci dello sviluppo di zebrafish (5s), il gene *emilin1a* è espresso nel mesencefalo (Figura **C.3A**). Questo *pattern* è mantenuto anche allo stadio di 15s, quando un'ulteriore espressione è rilevata nella porzione dorsale del primo rombomero del romboencefalo (Figura **C.3B**), come conferma una doppia ibridazione con una sonda *egr2*, che marca il terzo ed il quinto rombomero (Figura **C.3C**). Allo stadio di tarda somitogenesi (24 hpf), l'espressione nel sistema nervoso decresce, e forte positività per *emilin1a* viene rilevata nel mesenchima della testa, in particolare in associazione con i placodi ottici, otici e olfattivi (Figura **C.3D,E,K**), e nel pronefro (Figura **C.3L**). A questo stadio, *emilin1a* è anche abbondantemente espressa nel sistema circolatorio del tronco e della coda, specialmente a livello dell'aorta dorsale e della vena cardinale (Figura **C.3F,G,M**). A 48 hpf, la marcatura di *emilin1a* è ristretta a specifici territori, come la sclera e la retina dell'occhio in via di sviluppo, l'epifisi del sistema nervoso centrale ed il pronefro (Figura **C.3H-J**).

Un profilo di espressione un po' diverso è stato osservato per *emilin1b*. Questo gene è espresso allo stadio di 15s nel blastema caudale (Figura **C.4A**). A 24 hpf l'espressione è rilevata nella testa, con un profilo simile a quello di *emilin1a*, ma se confrontata con *emilin1a* la marcatura per *emilin1b* è più forte nel mesencefalo e più debole nella sclera (Figura **C.4B,H**). A questo stadio, i trascritti per *emilin1b* sono rilevati anche nel derma e nelle meningi del tronco e della coda (Figura **C.4D,I-J**), e nel cuore, dove l'espressione è mantenuta anche a 48 hpf, come è evidente nella doppia ibridazione con una sonda specifica per l'atrio, *myh6* (Figura **C.4B,C,G,H**). A 48 hpf, oltre al cuore, i trascritti per *emilin1b* diventano abbondanti nel neurocranio in via di sviluppo (Figura **C.4E,F**). In particolare, forte marcatura è rilevata nelle trabecole, nella cartilagine paracordale in via di sviluppo e nella commissura basicraniale anteriore (Figura **C.4G**), come appare chiaro dal confronto con una larva di 4 giorni le cui cartilagini del cranio sono state colorate con alcian blue (Figura **C.4G**).

3.3.2 *emilin2a* ed *emilin2b*

A tutti gli stadi di sviluppo, *emilin2a* è fortemente espresso nel sistema cardiocircolatorio. In embrioni di 5 e 15 somiti, i trascritti per *emilin2a* sono localizzati in due strisce di cellule appartenenti al mesoderma della piastra laterale, probabilmente corrispondenti ad angioblasti (Figura **C.5A**). A 24 hpf, la marcatura è presente in gruppi di macrofagi all'interno del tuorlo (Figura **C.5B**), e nel sistema cardiocircolatorio e nel derma del tronco e della coda (Figura **C.5C,D,H**). A 48 hpf, oltre all'espressione nelle strutture vascolari, i trascritti divengono rilevabili nel cuore a livello dell'atrio (Figura **C.5E**). A questo stadio, l'espressione di *emilin2a* è rilevata anche nella cresta ectodermica apicale degli abbozzi delle pinne, come conferma il fatto che una marcatura in parallelo con una sonda specifica per *fgf8a* conferisce all'embrione lo stesso *pattern* di colorazione delle pinne (Figura **C.5F,G**).

Come per *emilin2a*, l'espressione di *emilin2b* è abbondante nel sistema cardiovascolare. Allo stadio 15s, i trascritti di *emilin2b* sono rilevati nel cuore in via di sviluppo, nella vascolatura della testa e nell'aorta dorsale (Figura **C.6A-C**). A questo stadio di sviluppo, *emilin2b* mostra inoltre un'espressione peculiare in alcuni territori specifici del sistema nervoso centrale. In particolare, forte positività è rilevata nella porzione dorsale del quinto rombomero del romboencefalo, come conferma una doppia ibridazione con una sonda *egr2b* (Figura **C.6A**), e nella porzione posteriore del midollo spinale (Figura **C.6D**). A 24 hpf, oltre a una persistente marcatura del cuore, dell'aorta dorsale e dei vasi sanguigni cefalici, l'espressione di *emilin2b* è stata rilevata anche in altre strutture vascolari, come il canale primordiale del romboencefalo, i vasi sanguigni intersegmentali e la vena caudale, mentre la marcatura non è più rilevabile nel sistema nervoso centrale (Figura **C.6E-G,J,K**). A stadi successivi (40-48 hpf), l'espressione di *emilin2b* è mantenuta

solo nel cuore e nel sistema circolatorio della testa (Figura **C.6H,I**). In particolare, una marcatura più forte è rilevabile nel ventricolo e nella parte più posteriore della camera atriale, come dimostrato dalla doppia ibridazione con una sonda *myh6* (Figura **C.6H**).

3.3.3 *mmrn2a* e *mmrn2b*

Nessuna espressione rilevabile di *mmrn2a* è stata osservata a stadi di sviluppo precoci, e negli embrioni di 15s questo gene presenta una marcatura molto lieve solo in alcune cellule sparse nel mesenchima del tronco. A 24 hpf *mmrn2a* è espresso nel cuore, nella vena caudale, nella porzione posteriore della retina, nella parte più anteriore della lamina del pavimento del tronco neurale e nel mesenchima degli abbozzi delle pinne (Figura **C.7A-D,H**). A questo stadio, i trascritti di *mmrn2a* sono rilevati anche in una regione dell'intestino anteriore dove si svilupperà il bulbo intestinale, come confermato da una marcatura con una sonda per *insulin*, che colora il pancreas endocrino (Figura **C.7G**). A 48 hpf, *mmrn2a* è espresso nel sistema circolatorio della testa, nel cuore, nella lamina del pavimento e nel futuro bulbo intestinale (Figura **C.7E,F**).

Come *mmrn2a*, anche *mmrn2b* non sembra essere trascritta allo stadio di 5s, mentre in embrioni di 15s il gene presenta un'espressione ristretta ma distinta nella regione dorsale della coda (Figura **C.8A**). A 22 hpf, *mmrn2b* è espresso distintamente nel cuore, nella porzione interna della vescicola otica, nelle cellule endodermali che delimitano i ventricoli del mesencefalo e del romboencefalo e nei somiti posteriori a livello della coda (Figura **C.8B-E**). A 48 hpf, i trascritti di *mmrn2b* sono rilevati ancora nei somiti posteriori e nel mesenchima delle pinne pettorali, come avviene per *mmrn2a*. Quest'ultimo sito e la vescicola otica esprimono ancora *mmrn2b* a 72 hpf (Figura **C.8F**).

3.3.4 *emilin3a* ed *emilin3b*

A stadi precoci (5-15 somiti), il gene *emilin3a* è marcatamente espresso nel blastema caudale a livello della notocorda, con forte marcatura in un'area corrispondente alla *hinge* cordo-neurale (Figura **C.9A**). In embrioni di 20s, la marcatura per *emilin3a* nella notocorda si rafforza, specialmente a livello delle regioni del tronco e della coda (Figura **C.9B**). A 24 hpf, l'espressione nella notocorda si riduce e diviene ristretta alla regione posteriore, dove la marcatura compare nella lamina del pavimento del tubo neurale, nella *hinge* cordo-neurale e nell'ipocorda (Figura **C.9C**). A 48 hpf, l'espressione nella notocorda e nella lamina del pavimento scompare completamente ed i trascritti di *emilin3a* sono rilevabili esclusivamente a livello delle pinne pettorali e degli elementi cartilaginei degli archi branchiali e dello scheletro craniofacciale in via di sviluppo (Figura **C.9G,H**).

A differenza di quanto avviene per le altre Emiline di zebrafish, in cui i due paraloghi corrispondenti a ciascuna emilina di mammifero presentano un quadro di espressione complementare e solo parzialmente sovrapponibile, il profilo di espressione di *emilin3b* è molto simile a quello di *emilin3a*. In embrioni allo stadio di 5 e 15s, questo gene è infatti espresso fortemente nella notocorda e nella *hinge* cordo-neurale (Figura **C.10A**). La colorazione a livello della notocorda è mantenuta a 24 hpf, stadio in cui anche alcune cellule della lamina del pavimento del tubo neurale e dell'ipocorda sono lievemente positive (Figura **C.10A**). Questo profilo di espressione, in modo analogo a quanto avviene per *emilin3a*, scompare a 48 hpf, ed i trascritti di *emilin3b* diventano ristretti agli archi branchiali in via di sviluppo ed ai tessuti del mesenchima craniofacciale (Figura **C.10A**). Questo profilo di espressione particolare, e il notevole interesse del nostro laboratorio per Emilin-3, della quale abbiamo intrapreso, come descritto nella Parte Prima, un esperimento di inattivazione genica mirata in topo, ci hanno spinto ad approfondire le conoscenze di queste proteine anche nello zebrafish. Per questo, dopo avere studiato tutte le emiline/multimerine di zebrafish per quanto riguarda l'aspetto filogenetico e strutturale e la loro espressione genica, ho condotto alcune analisi di tipo funzionale aventi come oggetto esclusivamente i geni *emilin3a* ed *emilin3b*.

Figura C.3: Ibridazione *in situ whole-mount* di embrioni di zebrafish per *emilin1a* a diversi stadi di sviluppo. **A:** Espressione nel mesencefalo (freccia) a 5s. **B:** Espressione nel mesencefalo (freccia) e nel primo rombomero del rombencefalo (punta di freccia) a 15s. **C:** Una doppia marcatura con una sonda per *egr2b* (in rosso), che marca il terzo ed il quinto rombomero del rombencefalo, conferma l'espressione di *emilin1a* nella porzione dorsale del primo rombomero e del tetto del mesencefalo a 15s. **D:** Espressione nell'epifisi e nel mesenchima della testa, in particolare in corrispondenza del primordio ottico e di quello olfattivo, a 24 hpf. **E:** Espressione nella vescicola otica a 24 hpf. **F,G:** Espressione nel sistema circolatorio del tronco (F) e della coda (G) a 24 hpf. **H-J:** Basso (H) ed alto (I,J) ingrandimento di embrioni di 48 hpf, che rivelano l'espressione di *emilin1a* in epifisi, sclera e retina (H,I) e nel pronefro (H,J). **K:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf (il livello della sezione è indicato con una linea tratteggiata in D), che rivela l'espressione di *emilin1a* nel mesenchima della testa. **L:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf, in cui è evidente l'espressione nel pronefro. **M:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf (il livello della sezione è indicato con una linea tratteggiata in F), che rivela l'espressione nei vasi sanguigni arteriosi, venosi e intersegmentali (punte di freccia). Ad eccezione degli embrioni nei pannelli A, B ed M, il tuorlo è stato rimosso e gli embrioni sono stati appiattiti su di un vetrino. Nei pannelli A-J, la parte anteriore dell'embrione è sulla destra; nelle sezioni, il lato dorsale è in alto. I pannelli A-C e E-G sono vedute laterali; D, H ed I sono dorsali; J è ventrale. Ab: angioblasti, ac: aorta caudale, ad: aorta dorsale, e: epifisi, i: istmo, me: mesencefalo, ms: midollo spinale, no: notocorda, olf: placode olfattivo, ott: coppa ottica, p: pronefro, r1-r5: primo-quinto rombomero, re: retina, s: sclera, t: tetto, tu: tuorlo, vc: vena cardinale, vcp: vena cardinale posteriore, vo: vescicola otica.

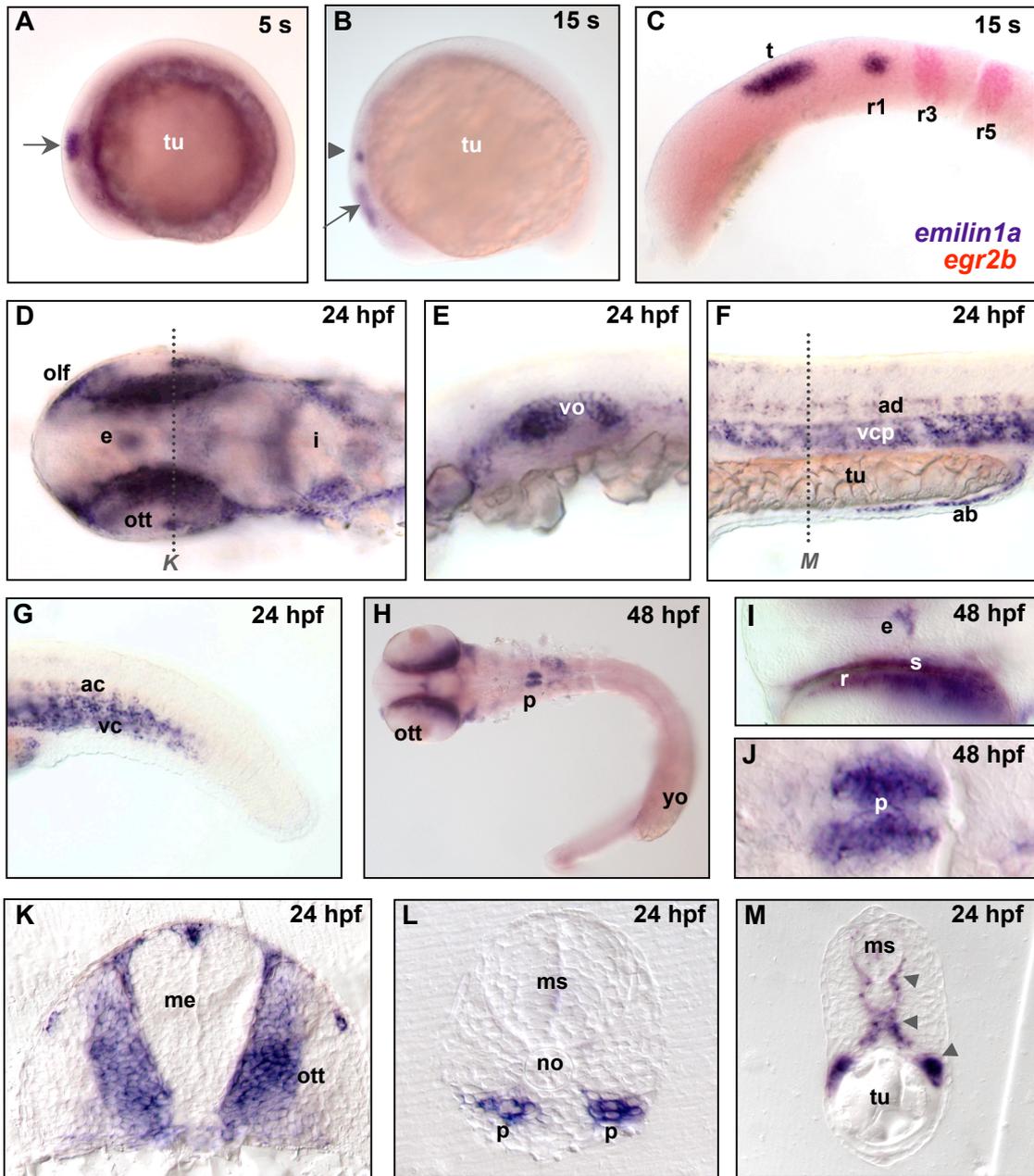


Figura C.4: Ibridazione *in situ whole-mount* per *emilin1b* in embrioni di zebrafish a diversi stadi di sviluppo. A:

B: Espressione nella sclera e nel mesencefalo a 24 hpf; è visibile anche un'area più scura, corrispondente alla marcatura del cuore. **C:** Visione laterale dell'espressione nel cuore in via di sviluppo a 24 hpf. **D:** Espressione nella meningi a 24 hpf. **E:** Doppia ibridazione con sonde per *emilin1b* (blu) e *myh6* (rosso), che confermano l'espressione nel cuore a 48 hpf. **F:** Espressione nelle cartilagini della barra epifisaria (punta di freccia) e nelle *trabeculae cranii* a 48 hpf. **G:** Espressione nel neurocranio in via di sviluppo a 48 hpf. **H:** Comparazione delle due immagini precedenti con una colorazione con alcian blue delle cartilagini del neurocranio di un embrione di 4 giorni. **I,J:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf (il livello a cui è stata effettuata la sezione è marcato con una linea punteggiata in B ed in D), che conferma l'espressione nel cuore, nel tetto del mesencefalo e nelle meningi. **K:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf, che dimostra l'espressione nel derma. Con l'eccezione di A, C e K, gli embrioni sono stati privati del tuorlo e appiattiti su un vetrino. In A, il lato posteriore dell'embrione è in alto; in B-H, il lato anteriore è a sinistra; nelle sezioni trasversali il lato dorsale è in alto. I pannelli B e D presentano visioni dorsali, E-H sono visioni ventrali, C è laterale. A: atrio, bc: blastema caudale, c: cuore, cba: commissura basicraniale anteriore, co: capsula otica, d: derma, m: meningi, ms: midollo spinale, no: notocorda, ott: coppa ottica, pe: piastra etmoidea, pq: palatoquadrato, s: sclera, t: tetto, tr: *trabeculae cranii*, tu: tuorlo, v: ventricolo.

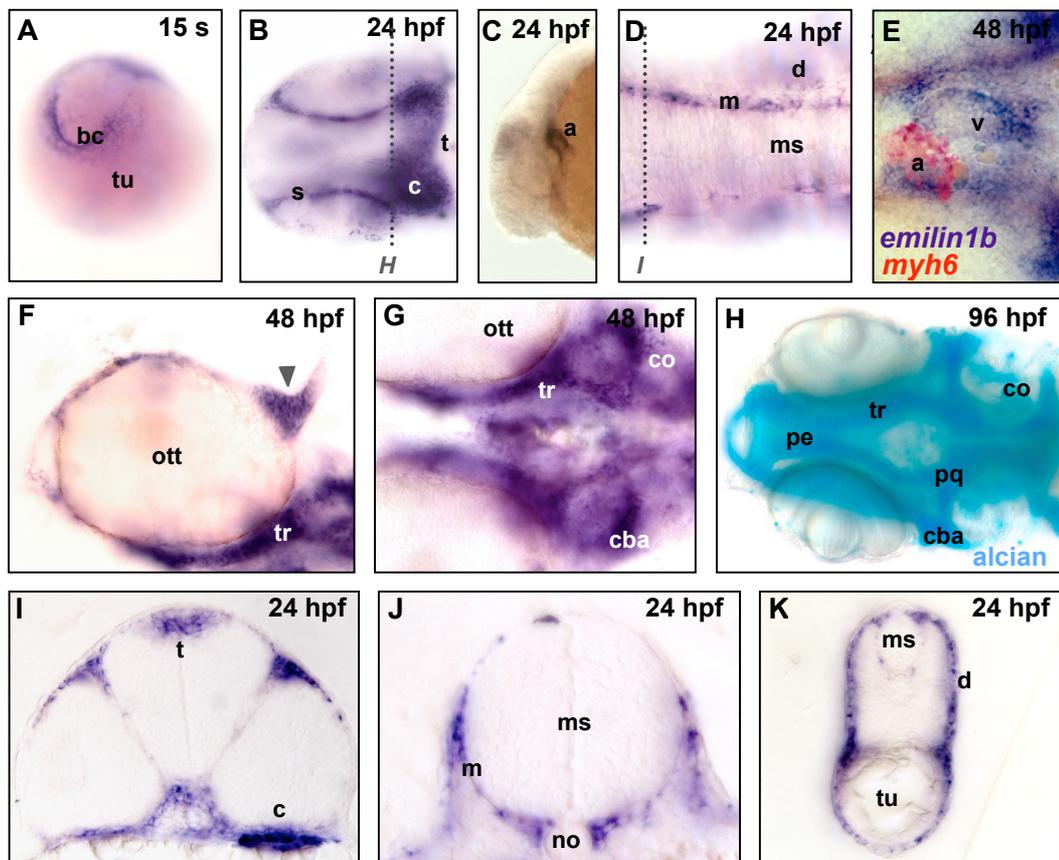


Figura C.5: Ibridazione *in situ whole-mount* per *emilin2a* in embrioni di zebrafish a diversi stadi di sviluppo. **A:** Espressione in cellule del mesoderma laterale a 15s. **B:** Espressione in cellule del tuorlo, corrispondenti a gruppi di macrofagi (punte di freccia), a 24 hpf. **C,D:** Espressione nel sistema circolatorio e nel derma del tronco (C) e della coda (D) a 24 hpf. **E:** Espressione nell'atrio del cuore in via di sviluppo a 24 hpf. **F:** Espressione nella cresta ectodermica apicale (punte di freccia) delle gemme delle pinne a 48 hpf. **G:** Colorazione della cresta ectodermica apicale (punte di freccia) delle gemme delle pinne a 48 hpf con una sonda per *fgf8a*, che rivela lo stesso profilo di *emilin2a*. **H:** Sezione trasversa di un embrione di 24 hpf (il livello della sezione è indicato con una linea grigia tratteggiata in C), che rivela l'espressione nella vascolatura (punte di freccia) e nel derma. Con l'eccezione dei pannelli A e B, il tuorlo è stato rimosso gli embrioni sono stati appiattiti. A è una visione dorsale, con la porzione anteriore dell'embrione verso l'alto; B-G sono visioni laterali, con la porzione anteriore verso sinistra; nella sezione, il lato dorsale è verso l'alto. A: atrio, ad: aorta dorsale; cea: cresta ectodermica apicale; d: derma, ep: epidermide, ml: mesoderma laterale, ms: midollo spinale, no: notocorda, tu: tuorlo, vc: vena cardinale, ve: ventricolo, vis: vene intersegmentali.

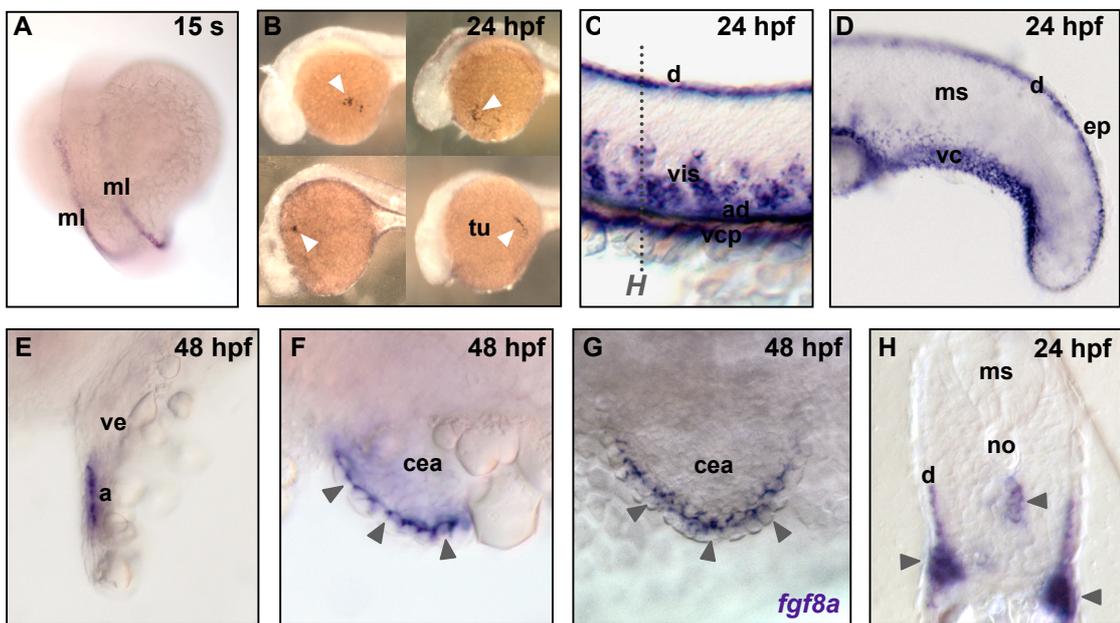


Figura C.6: Ibridazione *in situ whole-mount* per *emilin2b* in embrioni di zebrafish a diversi stadi di sviluppo. **A:** Espressione nel primordio del cuore e nella porzione dorsale del quinto rombomero del romboencefalo a 15s, come confermato dalla doppia marcatura con una sonda antisenso per *egr2b*, specifica per il terzo ed il quinto rombomero (in rosso). **B:** Espressione nei vasi sanguigni della testa (punte di freccia) e nel cuore a 15s. **C:** Espressione nell'aorta dorsale a 15s. **D:** Espressione nella regine posteriore del midollo spinale a 15s. **E:** Marcatura del cuore e del sistema circolatorio della testa a 24hpf. **F:** Visione laterale del tronco, che rivela l'espressione nell'aorta dorsale e nei vasi sanguigni intersegmentali. **G:** Espressione nella vena caudale a 24hpf. **H:** Doppia ibridazione con le sonde *emilin2b* (in blu) e *myh6* (in rosso), che rivelano l'espressione nel ventricolo e in parte della camera atriale del cuore a 40 hpf. **I:** A 48 hpf, l'espressione di *emilin2b* nel sistema circolatorio diviene ristretta ai vasi della testa. **J:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf (il livello della sezione è riportato con una linea punteggiata in E), che rivela l'espressione nel cuore e nel sistema circolatorio. **K:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf (il livello della sezione è rappresentato da una linea punteggiata in F), che conferma l'espressione nell'aorta dorsale e nei vasi sanguigni intersegmentali (punte di freccia). Tutti gli embrioni sono stati detuorlati e montati su un vetrino. In A-I, il lato anteriore dell'embrione è a sinistra; nelle sezioni trasversali il lato dorsale è in alto. I pannelli A, D, F e G sono visioni laterali; B e C sono dorsali; E, H ed I sono ventrali. A: atrio, aa1: arco mandibolare, ad: aorta dorsale, c: cuore, cpr: canale primordiale del romboencefalo, cr: cristallino, fc: fessura coroidea, me: mesencefalo, ms:midollo spinale, msp: midollo spinale posteriore, no: notocorda, ott: coppa ottica, r3: terzo rombomero; r5: quinto rombomero, v: ventricolo, vc: vena caudale, vis: vasi sanguigni intersegmentali.

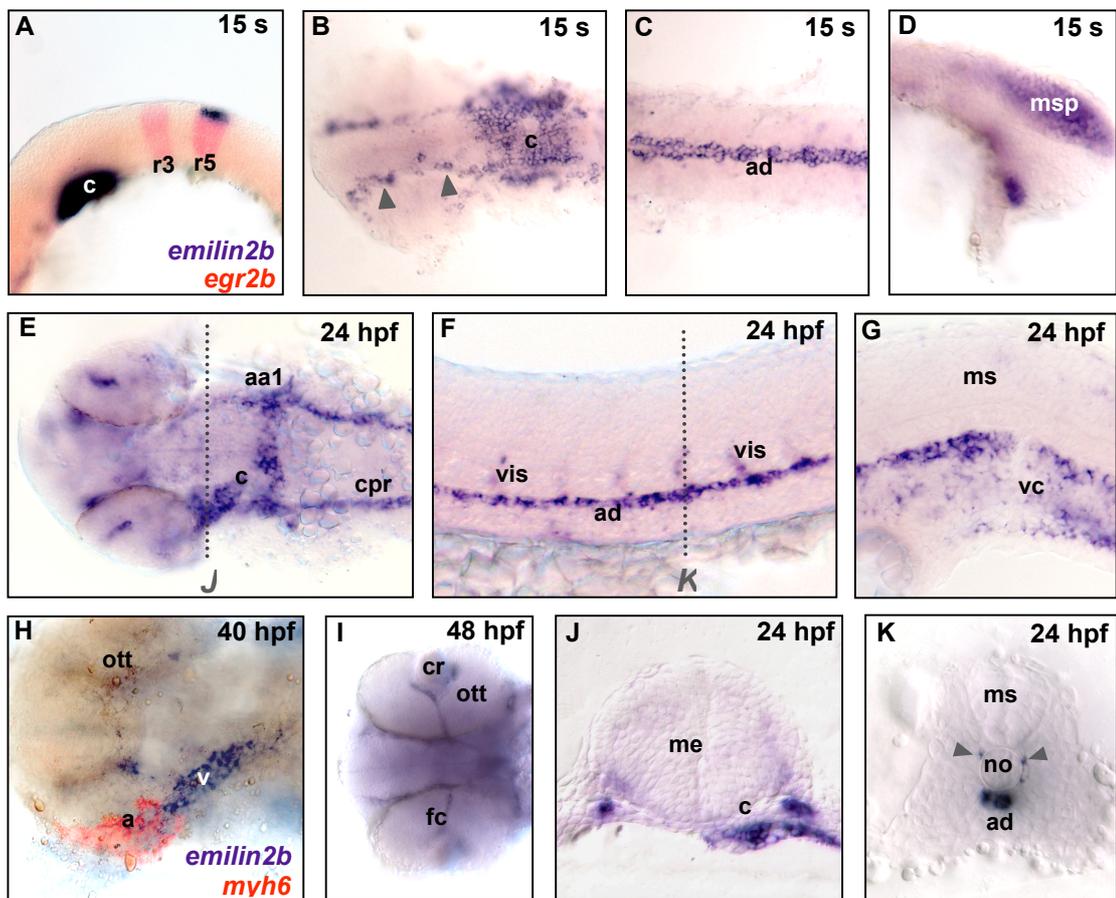


Figura C.7: Ibridazione *in situ whole-mount* per *mmrn2a* in embrioni di zebrafish a 24 hpf e 48 hpf. **A:** Espressione nella porzione posteriore della retina (punte di freccia) dell'occhio in via di sviluppo a 24hpf. **B:** Embrione di 24 hpf osservato ventralmente, in cui appare marcato il cuore. **C,D:** Espressione nella parte anteriore della lamina del pavimento del tubo neurale (C) e nella vena caudale (D) a 24 hpf. **E:** Espressione nel sistema circolatorio della testa a 48 hpf. **F:** Espressione in un territorio corrispondente al bulbo intestinale in via di sviluppo. **G:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf dopo doppia marcatura con sonde per *insulin* e per *mmrn2a*; la sonda per *insulin* (in rosso) marca i precursori delle cellule β del pancreas, localizzate dietro il bulbo intestinale, mentre *mmrn2a* marca il bulbo intestinale ma non il pancreas. **H:** Sezione trasversale di un embrione di 24 hpf, che rivela l'espressione negli abbozzi delle pinne. Tutti gli embrioni sono stati privati del tuorlo ed appiattiti. In A-F, il lato anteriore dell'embrione è a sinistra; nelle sezioni il lato dorsale è in alto. I pannelli A ed E sono visioni dorsali, B è una visione ventrale, C, D ed F sono visioni laterali. Ap: abbozzi delle pinne, bi: bulbo intestinale, c: cuore, lp: lamina del pavimento, ms: midollo spinale, no: notocorda, ott: coppa ottica, p: pancreas, vc: vena caudale, vst: vasi sanguigni della testa.

Figura C.8: Ibridazione *in situ whole-mount* per *mmrn2b* in embrioni di zebrafish a diversi stadi di sviluppo. **A:** Espressione nella regione posteriore della coda (freccia) a 15s. **B:** Espressione a 22 hpf nelle cellule ependimali che rivestono il ventricolo del mesencefalo. **C:** Espressione nel cuore a 22 hpf. **D:** Espressione nell'orecchio interno a 22 hpf. **E:** Espressione nei somiti posteriori a 22 hpf. **F:** Espressione nel mesenchima degli abbozzi delle pinne a 72 hpf. Con l'eccezione dell'embrione in A, il tuorlo è stato rimosso e gli embrioni sono stati montati su vetrino. In A, il lato anteriore dell'embrione è verso l'alto; in B-F, il lato anteriore è a sinistra. I pannelli A ed E sono visioni laterali, B-D e F sono visioni dorsali. Ap: abbozzi delle pinne, c: cuore, me: mesencefalo, oi: orecchio interno, ott: coppa ottica, so: somiti, tu: tuorlo.

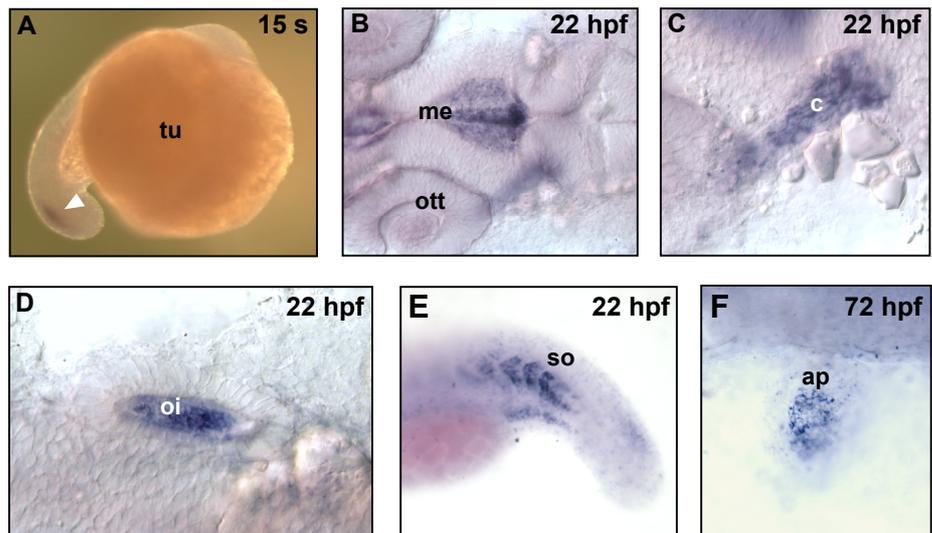
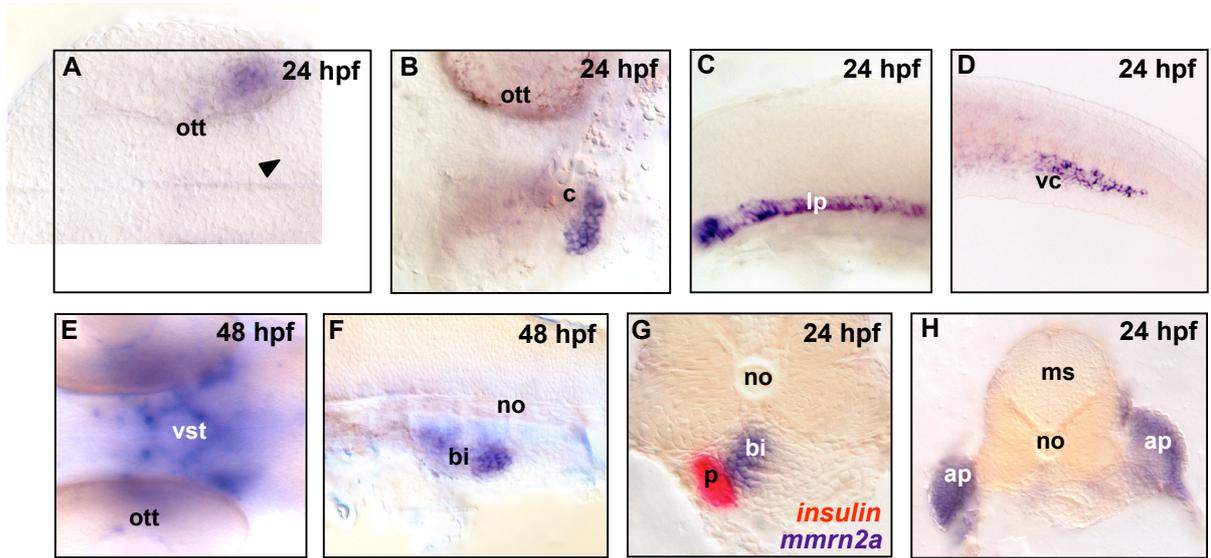
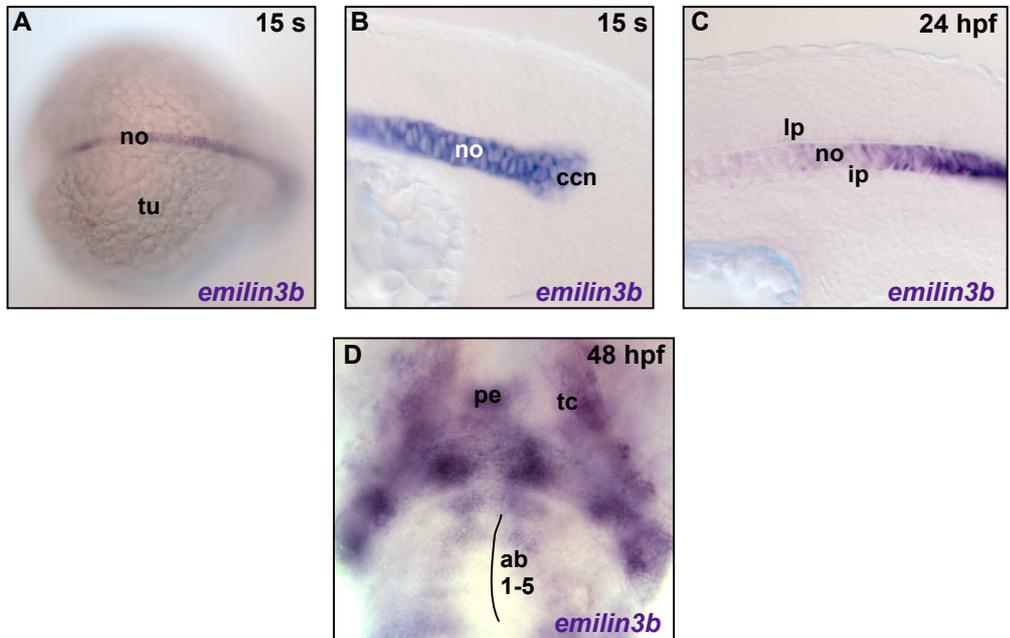
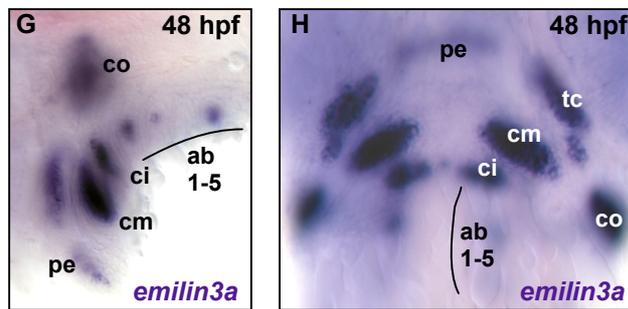


Figura C.9: Ibridazione *in situ whole-mount* per *emilin3a* in embrioni di zebrafish a diversi stadi di sviluppo. **A:** Espressione nella notocorda e nella cerniera cordo-neurale (asterisco) del blastema caudale a 15s. **B:** Forte marcatura della notocorda a 20 s. **C:** A 24 hpf, l'espressione di *emilin3a* si riduce nella notocorda e diventa evidente nella lamina del pavimento del tubo neurale in via di sviluppo e nella regione posteriore dell'ipocorda. **D,E:** Espressione di *emilin3a* nella cartilagine degli archi branchiali (G) e degli elementi cranio-facciali (H) a 48 hpf. Eccetto A e D, gli embrioni sono stati privati del tuorlo e appiattiti su vetrino. I pannelli A-C ed E sono visioni laterali, con il lato anteriore dell'embrione sulla sinistra; D è una visione dorsale, con il lato anteriore a sinistra. Ab1-5: primo-quinto archi branchiali, ccn: cerniera cordo-neurale, ci: cartilagine ioidea, cm: cartilagine mandibolare, co: cartilagine opercolare, ip: ipocorda, lp: lamina del pavimento, no: notocorda, pe: piatra etmoidea, tc: *trabeculae cranii*, tu: tuorlo.

Figura C.10: Ibridazione *in situ whole-mount* per *emilin3b* in embrioni di zebrafish a diversi stadi di sviluppo. **A:** Marcatura della notocorda a 15s. **B:** Ingrandimento della regione posteriore di un embrione di 15s, che rivela l'espressione nella notocorda e nella cerniera cordo-neurale. **C:** A 24 hpf, l'espressione di *emilin3b* nella notocorda si riduce e appare come una debole positività di alcune cellule nella lamina del pavimento del tubo neurale e dell'ipocorda. **D:** Marcatura del mesenchima cranio-facciale a 48 hpf. Con l'eccezione del pannello A, tutti gli embrioni sono stati detuorlati e montati su vetrino. Il pannello A è una visione dorsale, con la regione anteriore a sinistra; B e C sono visioni laterali, con la porzione anteriore dell'embrione a sinistra; D è una visione dorsale, con la regione anteriore in alto. Ab1-5: primo-quinto archi branchiali, ccn: cerniera cordo-neurale, ip: ipocorda, lp: lamina del pavimento, no: notocorda, pe: piatra etmoidea, tc: *trabeculae cranii*, tu: tuorlo.



3.4 Espressione di *emilin3a* e *3b* in embrioni trattati con farmaci e in embrioni mutanti

Per avere informazioni sulle possibili vie di segnale in cui *emilin3a* ed *emilin3b* possano essere coinvolte, ho effettuato esperimenti di ibridazione *in situ*, utilizzando le sonde specifiche per questi due geni, su embrioni trattati con farmaci che interferiscono specificamente con vie di segnale implicate nello sviluppo. Alterazioni nella presenza, nell'intensità o nella distribuzione del segnale di *emilin3a* ed *emilin3b* in tali embrioni, suggerirebbero infatti che questi geni si trovano a valle nella via di trasduzione del segnale esaminata. Ho analizzato innanzitutto embrioni trattati con ciclopamina sciolta in etanolo. Questo alcaloide, purificato da piante di *Veratrum californicum*, è un inibitore specifico della via di segnale di diversi membri della famiglia *hedgehog* (Neumann et al., 1999). Gli embrioni sono stati bloccati allo stadio di 15-18s, come anche embrioni di controllo trattati con il solo etanolo. Altre ibridazioni *in situ* sono state effettuate su embrioni trattati con il farmaco SU5402 sciolto in DMSO, che blocca la via di segnale di *fgf2a* (Raible e Brand, 2001), interferendo con il dominio ATPasi dei recettori di FGF, e su embrioni di controllo trattati con il solo DMSO, entrambi bloccati a 24 hpf. Per indagare sulla regolazione delle Emiline-3 da parte della via di segnale di Notch, ho studiato la loro espressione in embrioni trattati con DAPT, che blocca l'attività della gamma-secretasi coinvolta in questa via (Geling et al., 2002). Il taglio proteolitico effettuato dalla gamma-secretasi è responsabile infatti della produzione del dominio intracellulare di Notch, che è quindi in grado di traslocare al nucleo e regolare la trascrizione di geni bersaglio. Come controllo ho utilizzato embrioni non trattati, bloccati, come gli embrioni trattati, allo stadio di 20s. In tutti i casi esaminati, gli embrioni di controllo si sono rivelati fenotipicamente inalterati, mentre gli embrioni trattati presentavano le alterazioni indotte dal blocco della via di segnale specifica riportate in letteratura.

Inoltre, per verificare se le due isoforme di Emilina-3 presenti in zebrafish fossero regolate dal signaling dei fattori BMP, ho effettuato l'ibridazione *in situ* su embrioni mutanti *dino*, con mutazioni nel gene *chd* codificante per Chordin e mutanti *swirl*, in cui è mutato il gene *bmp2b* codificante per la proteina BMP2-4, entrambi bloccati a 24 hpf e confrontati con embrioni *wild-type* allo stesso stadio (Hammerschmidt et al., 1996). I mutanti *dino* dal punto di vista fenotipico sono apparsi, come descritto in letteratura, ventralizzati, presentando una traslocazione generale nell'organizzazione dorso-ventrale del mesoderma: le strutture dorsolaterali sono soppresse, la notocorda posteriore è assente e i somiti anteriori sono ridotti, mentre l'apparato circolatorio ed il pronefro, che derivano dal mesoderma più ventrale, appaiono espansi. Al contrario, i mutanti *swirl* sono dorsalizzati: la notocorda è ispessita, i somiti si estendono lateralmente, mentre sono assenti lo sviluppo del sangue e del pronefro. Inoltre, i mutanti *dino* presentano una generale espansione

delle strutture posteriori a discapito di quelle anteriori, e una generale riduzione dell'ectoderma, mentre i mutanti *swirl* hanno il fenotipo opposto.

Una volta appurato che gli embrioni trattati presentavano in seguito al trattamento le alterazioni riportate in letteratura, ho effettuato esperimenti ibridazioni *in situ* con le sonde specifiche per *emilin3a* ed *emilin3b*. In tutti i casi esaminati, non ho osservato alcuna particolare alterazione nell'espressione di questi due geni. In tutti gli embrioni mutanti o sottoposti ai diversi trattamenti, i due geni sono risultati espressi, e non ho rilevato alterazioni nell'intensità o nella distribuzione della colorazione (Figure **C.11** e **C.12**). Quindi è possibile concludere che *emilin-3a* e *emilin-3b* non sono geni regolati a valle delle vie di segnalazione di Notch, di FGF, di Hedgehog o di BMP.

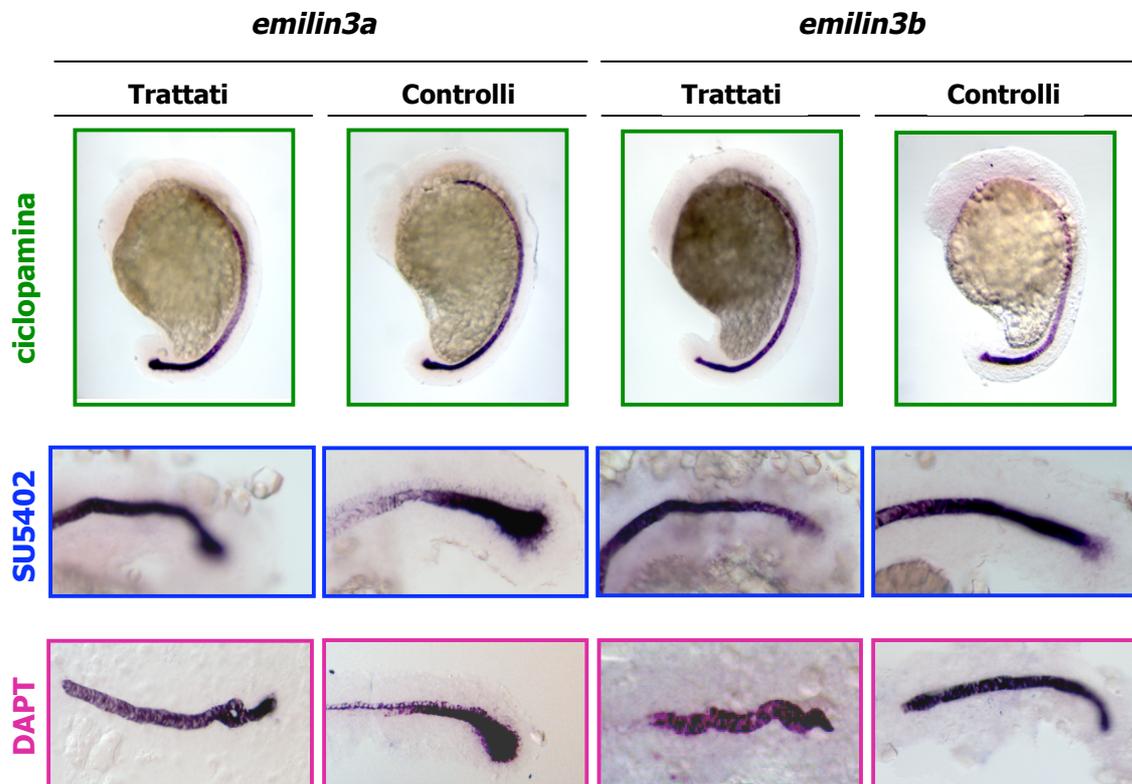


Figura C.11: Studio dell'espressione di *emilin3a* ed *emilin3b* in embrioni trattati con farmaci che interferiscono con specifiche vie di segnalazione. Sono riportati i risultati delle ibridazioni *in situ* effettuate con le sonde per *emilin3a* (a sinistra) ed *emilin3b* (a destra) su embrioni trattati con ciclopamina o controlli trattati con il solo etanolo e bloccati a 15-18s (riquadri verdi), su embrioni trattati con SU5402 o controlli trattati con DMSO e bloccati a 24 hpf (riquadri blu), e su embrioni trattati con DAPT o controlli non trattati e bloccati a 20s (riquadri viola).

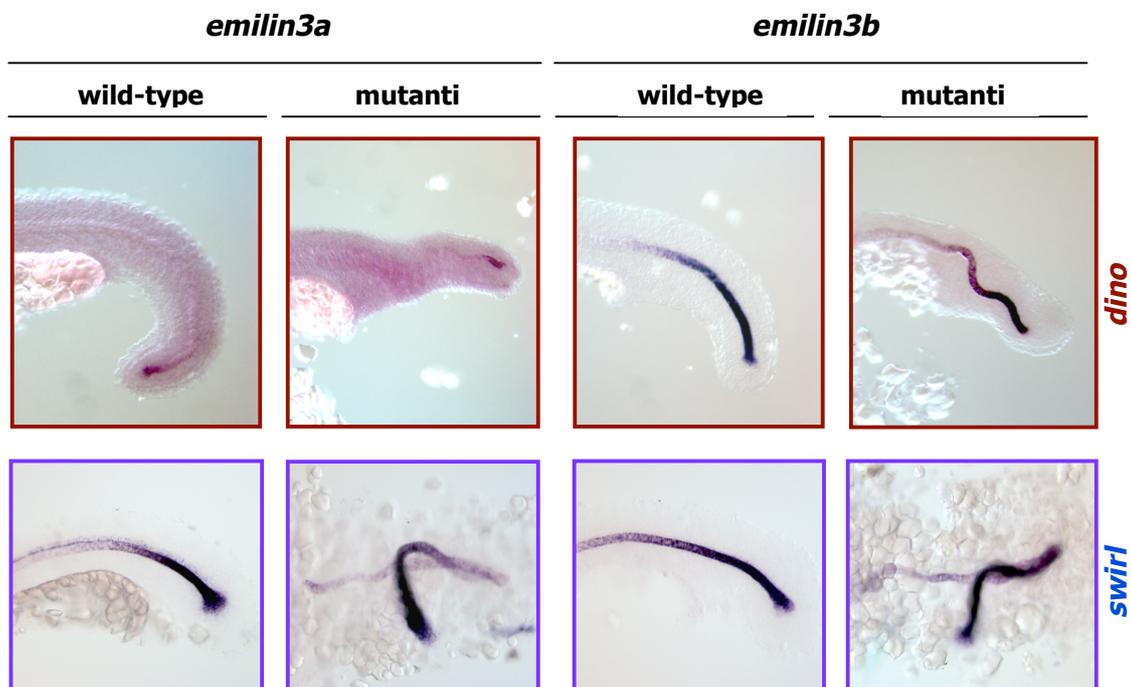


Figura C.12: Analisi dell'espressione di *emilin3a* ed *emilin3b* in embrioni mutanti *dino* e *swirl*. Sono riportati i risultati delle ibridazioni *in situ* effettuate con le sonde per *emilin3a* ed *emilin3b* su embrioni mutanti *dino* (in alto) e *swirl* (in basso), ciascuno con i relativi controlli *wild-type*.

3.5 Studi di *gain-of-function* mediante iniezione di mRNA

Dopo avere indagato la regolazione di *emilin3a* ed *emilin3b* da parte di geni coinvolti in alcune tra le vie di segnalazione più importanti per lo sviluppo embrionale, ho intrapreso uno studio di sovraespressione genica mediante iniezione di mRNA sintetizzato *in vitro* in embrioni allo stadio di una o due cellule. Poiché quando ho effettuato questi esperimenti non ero ancora in possesso della sequenza completa del cDNA codificante per queste due proteine, che ho ottenuto solo successivamente mediante 5'-RACE, e considerando anche il grado elevato di similarità strutturale tra emiline in zebrafish ed in topo, in questi esperimenti ho iniettato l'mRNA di Emilina-3 murina, trascritto a partire dal cDNA *full-length* clonato in pCS2-Chd-FLAG, presente nel nostro laboratorio.

Assieme all'mRNA di Emilina-3, di cui ho iniettato circa 500 ng per embrione, ho iniettato anche una soluzione di rosso fenolo, con funzione di tracciante per verificare l'avvenuta iniezione nel momento in cui essa è effettuata, e l'mRNA codificante per la GFP, grazie al quale, anche 24 ore dopo l'iniezione, ho potuto verificare se gli embrioni fossero stati effettivamente iniettati, e quindi se l'mRNA di Emilina-3, verosimilmente assimilabile a quello di GFP, fosse presente negli embrioni. Le analisi successive, che dovranno comunque essere completate con studi più approfonditi, sono state infatti effettuate nei soli embrioni che al microscopio a fluorescenza apparivano fluorescenti, ed in cui quindi con ogni probabilità l'mRNA di Emilina-3 era stato tradotto in proteina. La fluorescenza appariva distribuita in modo omogeneo in tutto l'embrione, e quindi l'mRNA si era distribuito in modo uniforme e non con un'espressione a mosaico, che nel mio caso non era desiderata, dal momento che il mio obiettivo era verificare gli effetti complessivi della sovraespressione di Emilina-3.

I miei precedenti studi di espressione in zebrafish hanno dimostrato che *emilin3a* ed *emilin3b* sono fortemente espresse nella notocorda, suggerendo che esse possano avere un possibile ruolo nella determinazione dei piani di sviluppo e del *pattern* corporeo dell'embrione. Perciò, in questi studi di sovraespressione ho effettuato un'ibridazione *in situ* con un gene marcatore del mesoderma parassiale: *myoD*. L'espressione di questo gene negli embrioni iniettati con l'mRNA di Emilina-3 murina, analizzata a 24 hpf, appare distribuita in modo paragonabile a quella rilevata in embrioni non iniettati o iniettati con il solo mRNA per GFP. L'intensità della colorazione, però appare diversa, nonostante la colorazione degli embrioni durante l'ibridazione *in situ* sia avvenuta per lo stesso intervallo di tempo; negli embrioni in cui Emilina-3 è sovraespressa, il segnale di *myoD* nelle due strisce di mesoderma laterale somitico è presente con intensità nettamente maggiore. Questi esperimenti preliminari, che dovranno esser confermati e validati con altri studi, suggeriscono che la sovraespressione di Emilina-3 nei primi stadi di sviluppo possa modificare il normale controllo del *pattern* corporeo dell'embrione.



Figura C.13: Ibridazione *in situ* con una sonda specifica per *myoD*, effettuata su embrioni di zebrafish iniettati con l'mRNA per Emilina-3. A destra è riportata l'ibridazione *in situ* su embrioni di controllo iniettati con il solo mRNA della GFP e bloccati allo stadio di 24 hpf, mentre a sinistra sono presentati embrioni iniettati con l'mRNA di Emilina-3 murina e bloccati allo stesso stadio. E' evidente un'intensificazione del segnale negli embrioni sovraespressanti Emilina-3.

3.6 Studi di *loss-of-function* mediante iniezione di morfolino

Un altro tipo di studi funzionali che ho recentemente intrapreso è la microiniezione in embrioni di zebrafish allo stadio di una o due cellule di oligonucleotidi antisenso morfolino. In questi oligonucleotidi, il deossiribosio è sostituito con un anello N-morfolino, che conferisce grande stabilità e consente di ottenere meno effetti aspecifici rispetto ad altri analoghi antisenso; i morfolino si legano all'mRNA e prevengono la traduzione se disegnati in corrispondenza del codone di inizio, o interferiscono con lo *splicing* se sono diretti contro un sito di *splicing*. Per la scelta del tipo di morfolino da adottare e della sua sequenza, è necessario conoscere la sequenza completa del cDNA di interesse, in particolare la regione al 5'. Le sequenze presenti in banca dati relative ad *emilin3a* ed *emilin3b* si sono rivelate incomplete, dal momento che non presentavano la sequenza corrispondente alla regione 5'-UTR e al peptide segnale, ma iniziavano con la prima cisteina del dominio EMI. È stato quindi necessario isolare la sequenza completa mediante 5'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Partendo da RNA totale estratto da embrioni di zebrafish allo stadio di 24 hpf, stadio in cui entrambi i geni sono fortemente espressi, e avvalendomi del sistema First Choice RLM-RACE dell'Ambion, sono riuscita ad amplificare, mediante una PCR *nested* con *primer* specifici disegnati sulle sequenze note, la regione trascritta al 5' di entrambi i geni.

Gli amplificati ottenuti sono stati nel vettore pGEM-T Easy e sequenziati. Sono così risalita per entrambi i geni alla sequenza trascritta in 5', comprendente la regione 5'-UTR e la sequenza codificante per il peptide segnale e parte del dominio EMI, che erano assenti nelle banche dati (Figura **C.14**). Lo studio della sequenza completa del cDNA e del gene, ricavata mediante ricerca in banca dati utilizzando la sequenza completa, mi ha permesso di definire in modo preciso la composizione in esoni per i due geni, schematizzata in Figura **C.15**. Il gene *emilin3a* è costituito da 3 esoni separati da 2 introni, e la capacità codificante è, come nel topo, molto elevata e pari addirittura a circa l'83%. Il gene *emilin3b* invece è costituito da 5 esoni e presenta introni di dimensioni molto ampie, con un introne che si estende per più di 16000 bp; perciò la capacità codificante è molto inferiore a quella del gene *emilin3a*, risultando pari a circa il 5%.

Sulla base delle sequenze complete così ricostruite, ho effettuato un'attenta analisi dei due geni per scegliere che tipo di strategia adottare. Non era realizzabile la strategia basata su morfolino disegnati a livello del codone di inizio affinché avvenisse un impedimento sterico alla traduzione; infatti, non erano disponibili degli anticorpi specifici per le due Emiline-3 di zebrafish, che sarebbero stati necessari per provare l'efficacia dell'inattivazione, quantificabile come riduzione dei livelli di proteina o sua assenza. Quindi ho verificato la possibilità di costruire dei morfolino su un sito di *splicing*. Infatti, con questo tipo di strategia, è possibile studiare l'efficienza dei morfolino mediante reazioni di RT-PCR, senza necessità quindi di possedere anticorpi specifici. Nel progettare morfolino su un sito di *splicing* è possibile disegnare oligonucleotidi che eliminano un esone

rilevante per la funzione della proteina oppure oligonucleotidi che hanno come effetto la ritenzione di un introne. Nel nostro caso, il primo tipo di approccio non era conveniente, in quanto per avere un efficace *knockdown* avremmo dovuto eliminare il secondo esone, codificante per parte del dominio EMI ma, dal momento che il primo ed il terzo esone per entrambi i geni presentano lo stesso *frame* di lettura, avremmo corso il rischio che venisse prodotta una proteina ancora funzionale. Quindi abbiamo deciso di indurre per entrambi i geni la ritenzione del primo introne, avendo anche constatato che in esso sono presenti numerosi sequenze codificanti per codoni di stop, per cui la proteina prodotta sarebbe stata troncata molto precocemente e a metà del dominio EMI. In Figura **C.15** sono schematizzati per *emilin3a* ed *emilin3b* la posizione in cui si legano i morfolino così progettati ed i prodotti teorici ottenuti in seguito alla ritenzione del primo introne.

Ho iniettato separatamente in embrioni allo stadio di una o due cellule i diversi morfolino ad una quantità finale di circa 10 ng, assieme ad una soluzione di rodamina destrano, tracciante fluorescente per rintracciare gli embrioni effettivamente iniettati. Dopo avere cresciuto gli embrioni fino allo stadio 24 hpf, una parte degli embrioni iniettati è stata utilizzata per estrarne l'RNA ed effettuare RT-PCR atte dimostrare l'efficacia del morfolino, ed una parte è stata fissata per l'osservazione del fenotipo. Oltre alle iniezioni dei morfolino separatamente, ho iniettato anche i morfolino per *emilin3a* e per *emilin3b* simultaneamente, ed ho fissato gli embrioni a 24 hpf e a 48 hpf per l'osservazione del fenotipo dovuto all'assenza di entrambe le proteine; infatti, l'elevata similarità di struttura tra le due isoforme di Emilina-3 di zebrafish potrebbe dare luogo a fenomeni di compensazione funzionale fra le due proteine. In tutti i casi, come controllo negativo, ho iniettato anche degli oligonucleotidi con sequenza simile a quella del corrispondente morfolino, ma in cui 5 nucleotidi erano mutati (5-mis); in questo modo è stato possibile osservare se il morfolino inducesse effetti aspecifici. Un altro gruppo di embrioni è stato iniettato con la sola soluzione di Danieu e rodamina destrano ma priva di morfolino, come ulteriore controllo negativo per escludere nell'osservazione del fenotipo gli effetti dovuti alla procedura di iniezione, che a volte può dare luogo ad alterazioni nello sviluppo. Gli esperimenti di iniezione sono stati ripetuti diverse volte, in ognuna delle quali gli embrioni sono stati contati a circa 5 ore dall'iniezione, ed è stata calcolata per ogni gruppo la mortalità. Confrontando volta per volta la mortalità degli embrioni di controllo con quella degli embrioni iniettati con il morfolino, è stato possibile, aumentando o riducendo le dosi di morfolino iniettato nelle iniezioni successive, raggiungere un compromesso in cui si è potuto osservare in un adeguato numero di embrioni effetti abbastanza rilevanti.

Come accennato prima, un vantaggio dei morfolino costruiti su un sito di *splicing* è il fatto che per verificarne l'efficacia non è necessario effettuare un western blot, ma è sufficiente una RT-PCR effettuata con *primer* disegnati *ad hoc* per evidenziare la differenza tra RNA estratto da embrioni morfanti e da embrioni *wild-type*. A tale scopo, ho disegnato tre coppie di *primer* per

ciascuno dei due geni. Una prima coppia di oligonucleotidi mi è servita per verificare l'effetto del morfolino; essa è stata disegnata per amplificare la regione a cavallo tra l'esone e l'introne coinvolti nel legame del morfolino, cioè in entrambi i casi un *primer* è sul primo esone e l'altro sul primo introne: in questo modo, si ottiene un amplificato solo nel caso in cui il morfolino si leghi correttamente al sito di *splicing* e avvenga la ritenzione dell'introne. Ho inoltre disegnato su due diversi esoni una seconda coppia di *primer*, allo scopo di escludere la presenza di eventuali tracce di DNA genomico contaminante. Per *emilin3a*, questi due *primer* si trovano uno sul secondo e l'altro sul terzo esone, mentre per *emilin3b* sono sul quarto e sul quinto esone; in questo caso, la presenza di DNA genomico è segnalata da un aumento nelle dimensioni dell'amplificato, dovuto all'amplificazione dell'introne ritenuto. Come controllo positivo, ho effettuato anche un'amplificazione con *primer* per la beta-actina, una proteina ubiquitaria.

In Figura **C.16** sono riassunti i risultati delle reazioni di RT-PCR ottenute con le diverse coppie di *primer* sugli embrioni iniettati con i morfolino per *emilin3a* e *emilin3b*. Come risulta evidente anche dal confronto con l'amplificazione del DNA genomico utilizzata come ulteriore controllo, è stata del tutto esclusa la presenza nei campioni di DNA genomico contaminante, che avrebbe reso dubbia la provenienza degli amplificati ottenuti nella reazione con i *primer* disegnati per verificare l'effetto del morfolino. In queste ultime reazioni, invece, ho ottenuto prodotti di amplificazione esclusivamente nei campioni di RNA estratti da embrioni iniettati con il morfolino. Nei campioni isolati da embrioni iniettati con il 5-mis o da embrioni non iniettati non ho rilevato alcuna amplificazione, mentre il frammento ottenuto dall'amplificazione del DNA genomico presentava dimensioni paragonabili a quelle ottenute con i *primer* disegnati a cavallo della regione in cui si lega il morfolino. In base a queste analisi, si può dedurre che l'interferenza con lo *splicing* da parte del morfolino ha avuto successo, e probabilmente non è stata nemmeno prodotta alcuna proteina, dato che negli introni ritenuti sono presenti molte sequenze di stop contigue. Come risulta evidente anche dalla Figura **C.16**, negli embrioni iniettati con il morfolino gli amplificati sono stati ottenuti a livelli molto più bassi rispetto a quelli degli altri campioni, suggerendo che gli mRNA aberranti contenenti l'introne ritenuto, oltre a non portare a corretta traduzione della proteina, siano in gran parte degradati.

Una volta verificata l'efficace produzione di mRNA aberranti da parte dei morfolino per le due isoforme di Emilina-3, ho eseguito un'analisi fenotipica dei diversi embrioni iniettati. Una prima conseguenza della iniezione dei morfolino è stato un generale ritardo nello sviluppo degli embrioni iniettati rispetto ai controlli; questo però appare un effetto generale di tutti i morfolino, essendo presente in tutti gli embrioni iniettati, compresi quelli con i morfolino di controllo. Per quanto riguarda gli aspetti fenotipici, gli embrioni di controllo, iniettati con il 5-mis, sono risultati in gran parte totalmente paragonabili ad embrioni *wild-type* allo stesso stadio di sviluppo, nonostante

alcuni presentassero malformazioni, normalmente presenti in una parte degli embrioni iniettati e imputabili alla procedura di iniezione. Per entrambe le due isoforme di Emilina-3, gli embrioni iniettati con un singolo morfolino diretto contro il sito di *splicing* hanno mostrato alterazioni piuttosto lievi a carico dell'organizzazione dei somiti, mentre quelli iniettati con entrambi i morfolino contemporaneamente, e soprattutto quelli bloccati a 48 hpf, hanno evidenziato forti alterazioni nella formazione dei somiti (Figura **C.17**). Negli embrioni di controllo, infatti, a questo stadio i somiti apparivano ben evidenti e presentavano la forma a V tipica, mentre in gran parte degli embrioni iniettati con i morfolino e con ritenzione dell'introne, pur essendo normalmente presenti la notocorda ed il tubo neurale, i somiti non presentavano confini ben delimitati né tantomeno erano a forma di V. Negli embrioni iniettati con i due morfolino specifici per le due isoforme di Emilina-3, inoltre, i somiti presentavano un margine abbastanza definito, e solo in pochi individui, esclusivamente nella porzione più dorsale e quindi più vicina alla notocorda.

Figura C.14: Rappresentazione delle sequenze al 5' di *emilin3a* (in alto) ed *emilin3b* (in basso), identificate mediante 5'RACE, e della posizione in cui avviene il legame del morfolino. Per entrambi i geni sono riportati la regione al 5', il primo esone ed il primo introne; per *emilin3a* è presente anche parte del secondo esone. In maiuscolo sono indicati gli esoni ed in corsivo minuscolo gli introni, separati dai primi da una punta di freccia. In carattere verde è evidenziato il codone di inizio della traduzione. E' evidenziata in arancione la sequenza appartenente al primo esone ed al primo introne contro cui è stato disegnato il morfolino, mentre sono sottolineati con una freccia viola i siti di legame dei *primer* utilizzati per le PCR successive, atte a verificare l'effetto dei morfolino.

TGTTAGGTGG TATAGAGGGT GGTCCATGT AAATGAGGTG GTCCAGTGTT TTATGAGGTG
 TCCAGGACTC TCAGTTCAG CAGTCTGCAG GAATCTCAGC ATCACTACCA CAGCTGGAGC
 ACAGTGTCTT TTTTAGACAT TTAGATTTTG CTATATTTAC AAAGACCCAA CATGGAAAGA
 CAAACTTTAA CATATATCAA TTTTLAGGTC TGTGCTCTGT TTTTGGAGTA GATTTTTTTG
 GAGCAATAGA AGTATTTTCT CTTCATTTT TTTGTTATTC ACCTGAGTTT TGAATATTTA
 CAAAAATCAT **G**CTACTGGAG AAGATTTTGC ATTGTTTTCT TCTCCTTTGG AGTTTTATTT
 TACTGTGAC AGCATTTCAC CCAGCTGCAA ATCTATATAG TTTCTACTCT GGACCTCAAC
 CACAGTCTAA CTCGGAGAAA CCAAC**GGCCA** **GGCACAAgta** **agtatccatg** **agtaa**aatga
 ttattctctt aattaataaa tcaggaggca aacagcagt ggaatgttaa taacacattg
aaagacatct gtacgccaat atactgctga tactaaattt gaacttttta cctgtgttac
 aagtcttgtg aatattcatt cattcatttg acataggtgg ttattacaat tgtaattttt
 ctcaatattg gtgaatcaag ttaaaaaaaaa agtttgaaaa ttcgttttat taataattat
 taattttttt gcataattat ttttaggagg attgtatttt ttcataagtaa tattgtataa
 attgtttatt gttacaagta gaatcataaa ccaatgttaa tatctttgta aaaatgtaaa
 tattaactat ttaatattat ctaataacta attttaact aaatataatt agttgctgta
 aaaatgttgt ttatcttagc tatttagcta tttagcaaaa aacatactgt cattatccgt
 agcacttcat tttatgttgt ccttgttaca tgtttaattc tcaactgcctc aaacttgtct
 cttcttagGA ACCACTGTGC ATATGTTGTG GAGAAGACTG TCTCGTTCAC TGTTCAAGAT
 GGAGCAGCTC CCTTCATGAA

TTATGGCTTT TTCTGCTGGT GTTTTGTGCT CTGCTGCTTG AAG**AT**GAGGT GGATTCCTTGC
 ATTTCCGTTG GTCACACTGC TACTGACTTC AGCTGATGCC AAAGGAACTT TCTATGGAAG
 TCCATATAGA TACAATCTAC ACAAGTCTGG AAGCGTCCCG CAGCACAACC CTGGAAAACC
 AATG**GGGCAT** **CATAA**gtaag **taaacgctaa** agtttactga aggtttaaag ttacaatttc
 tgacttatta atgcatctgt gtgtgaaatg caatgcagtg acagcagtgt cctacagttt
cagatgcttt atttacaata actttataca acattttcgg taacacttta gaataactat
 ccgttataac tagttaatag accattaata aactgtttgt taacaagtta taaatgactt
 gttaaataaa agttaatagt ttgttaatta ttcataactg tgcattatag atggctaata
 gatagcttac aagctgttcg ttaacaagtt ataaatgaca actgtatttt aatgacttag
 gactatactt aataaattag taatagatca tgaacaagcg gttagtaaata aacttaataa
 aggattgtta agtatcagtt aatagtgtat atatgttatt gggacgttat tctaaagttg
 cagctgtttt taatttatta acttttagta aatgaggaat agttgcaact ttagaatatc
 gtccaataaa catacataag ctaataacta acgcttaact aatataagta catatggctg
 ctttcatgt ttaaacctc ctcgctaacc tccatgtgga tggcttttca cctgttacia
 gtttgttcag tagctcgaag tgtactgtac gtcggtagac ttcagatgca gaggagctga
 ccatgacgat ggggtgcaag tccaccgaaa aacagtttca gaaagcagat aaaacaaaca
 cagaagccaa aaaaaaagt aaataacatg gtgagaatgt

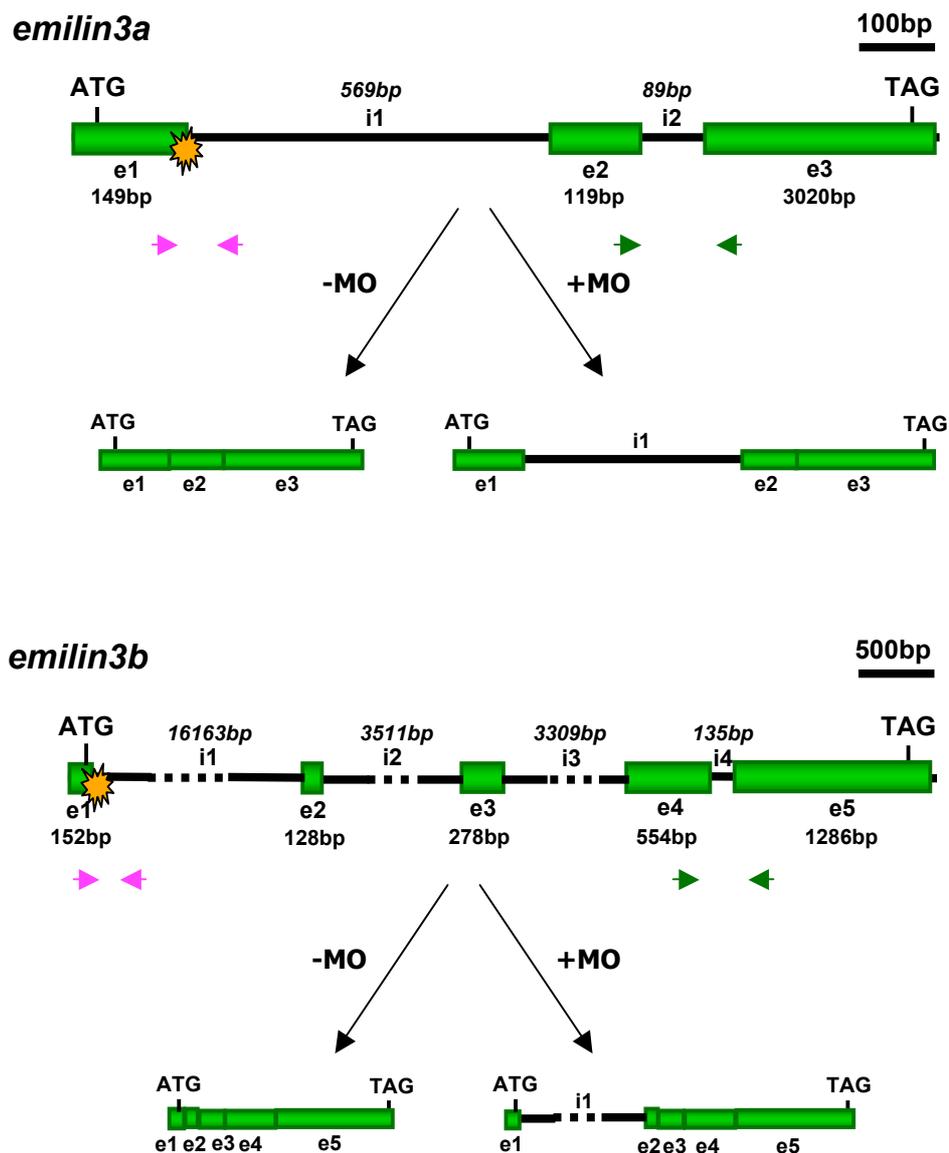


Figura C.15: Rappresentazione schematica del gene *emilin3a* (in alto) ed *emilin3b* (in basso) e dell'effetto del legame del morfolino al sito di *splicing* del primo introne. Sono raffigurati con rettangoli gli esoni e con linee gli introni, e sono riportate le dimensioni di entrambi. Con una stella è identificato il sito di legame del morfolino ed in basso sono riportati i trascritti prodotti dal processamento dell'mRNA in assenza (a sinistra) ed in presenza (a destra) del morfolino (MO). Sono indicate con frecce viola le posizioni dei *primer* utilizzati per le RT-PCR per verificare l'effetto del morfolino e con frecce verdi quelle dei *primer* per escludere la presenza di DNA genomico contaminante.

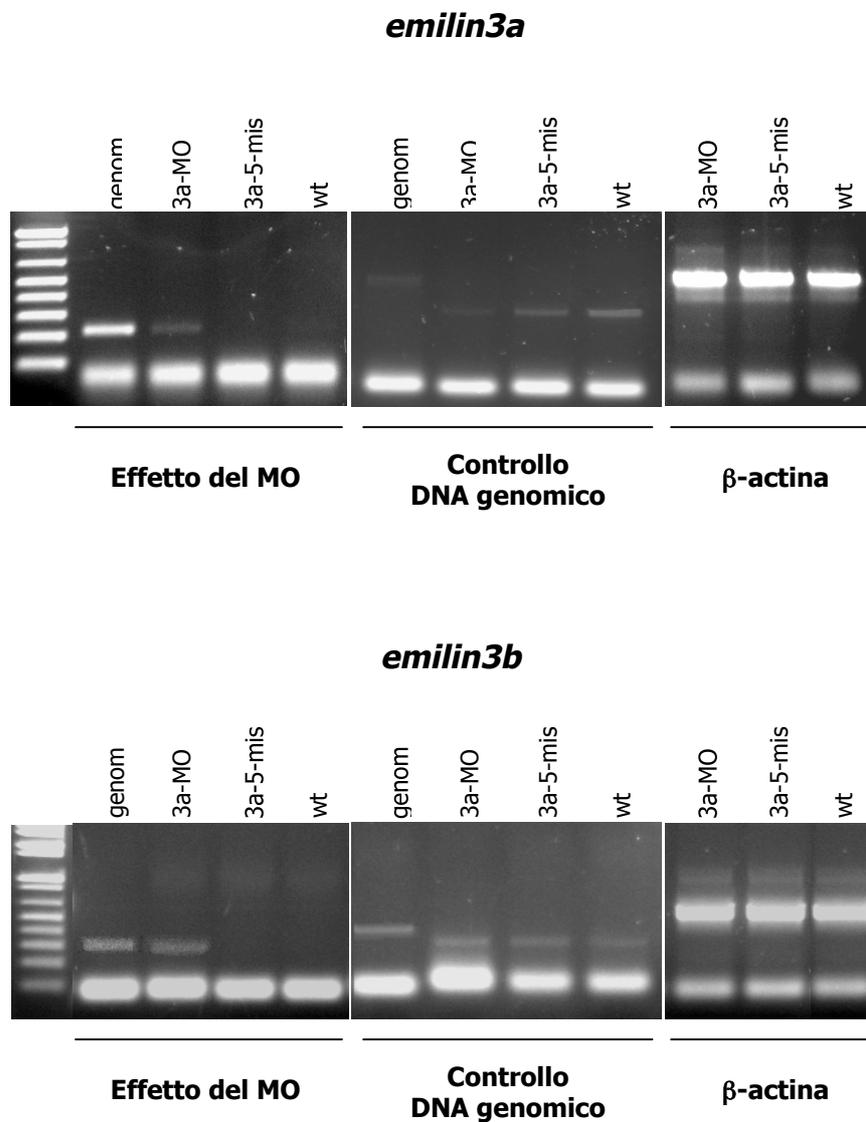


Figura C.16: Analisi mediante RT-PCR per la verifica dell'effetto del morfolino (MO). Sono presentate, per *emilin3a* e per *emilin3b*, tre reazioni: la prima per verificare l'avvenuto effetto del morfolino (Effetto del MO), la seconda per controllare l'assenza di DNA genomico contaminante (Controllo DNA genomico) e la terza con i *primer* per la β -actina come controllo positivo (β -actina). Sono presenti in tutti i casi, sebbene alcune risultino molto lievi, le bande corrispondenti agli amplificati attesi.

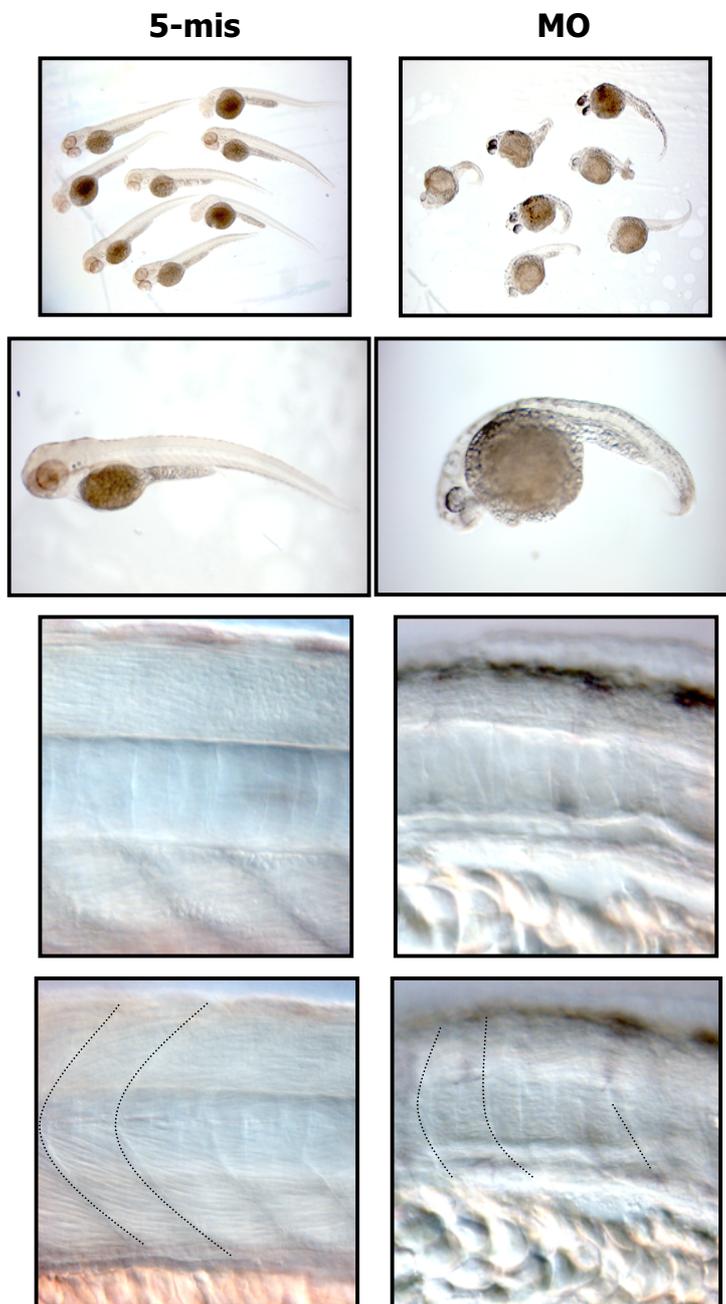


Figura C.17: Fenotipo degli embrioni morfanti. Sono messi a confronto embrioni iniettati con il 5-mis (embrioni di controllo) e embrioni iniettati simultaneamente con i morfolino diretti contro *emilin3a* ed *emilin3b* (MO). Negli embrioni iniettati con i morfolino specifici, sono evidenti un grave ritardo ed anomalie nello sviluppo e forti alterazioni nella formazione dei somiti, i cui confini sono indicati da linee tratteggiate.

La recente descrizione di una nuova superfamiglia di proteine della MEC, la superfamiglia EDEN (EMI-Domain Endowed proteiNs) (Braghetta et al., 2004), ha indotto il nostro laboratorio a investigarne le funzioni, con particolare interesse per la famiglia delle emiline/multimerine. La proteina capostipite, Emilina-1, è stata inizialmente identificata all'interfaccia tra il nucleo centrale di elastina e le microfibrille esterne. Proprio a questa sua peculiare localizzazione a livello delle fibre elastiche Emilina-1 deve il nome: Emilin è infatti l'acronimo di *Elastin Microfibril Interface Located proteIN* (Bressan et al., 1993). Una simile localizzazione non è stata descritta per altre proteine delle fibre elastiche, suggerendo perciò da subito che Emilina-1 potesse avere una funzione del tutto particolare. Questa proteina presenta nella sua porzione N-terminale un caratteristico dominio ricco in cisteine, il dominio EMI, e la ricerca altre proteine che lo contenessero ha portato all'identificazione nei mammiferi di sette proteine contenenti un dominio EMI all'estremità N-terminale ed alla definizione della superfamiglia EDEN. Complessivamente queste proteine sono distribuite in modo diffuso nell'organismo, con un *pattern* di sovrapposizione in alcuni organi e tessuti, di complementarità in altri e sito-specifico in altri ancora, suggerendo così che queste proteine possano avere in parte funzioni comuni e quindi una certa possibilità di compensazione funzionale. Particolarmente abbondante risulta essere l'espressione delle emiline/multimerine in diversi distretti del sistema cardiovascolare.

Per ottenere informazioni della funzione che queste proteine possono svolgere *in vivo* all'interno della MEC, il nostro laboratorio ha intrapreso un programma di inattivazione genica mirata, mediante ricombinazione omologa in cellule ES, di tutti i membri della famiglia, generando topi *knockout* che mancano di ciascuna proteina della famiglia delle emiline/multimerine. Il topo *knockout* per *Emilin1* (Zanetti et al., 2004) presenta un fenotipo lieve, caratterizzato da alterazioni nelle fibre elastiche a livello di aorta e di pelle e da difetti morfologici e di adesione a carico delle cellule endoteliali e muscolari lisce dei vasi sanguigni. Più recentemente sono stati ottenuti i topi *knockout* per *Emilin2* e *Mmrn2* che, come i topi privi di Emilina-1, dimostrano un fenotipo vitale e non presentano alcuna marcata alterazione anatomica o funzionale. Tuttavia, recentemente è stato osservato che tutti questi animali presentano un fenotipo iperteso, indicando come queste proteine siano particolarmente importanti per l'omeostasi del sistema cardiovascolare. Per i topi *Emilin1*^{-/-} in particolare, il fenotipo iperteso è stato correlato con un'alterata regolazione del *signaling* di TGF- β 1 (Zacchigna et al., 2006), anche se è probabile che diversi siano i meccanismi implicati e che ogni proteina della famiglia agisca in questo senso in modo precipuo. È particolarmente interessante considerare il rapporto che è stato dimostrato tra Emiline e TGF- β 1, ovvero tra una proteina della MEC e un fattore di crescita. Infatti è ormai noto che le proteine della MEC non giocano solo un

ruolo strutturale nel determinare l'architettura generale di tessuti e organi, ma sono anche in grado di localizzare, concentrare e sequestrare vari tipi di fattori di crescita. Un esempio paradigmatico in questo senso è portato dalle tre Fibrilline, proteine anch'esse componenti delle fibre elastiche, e dalle quattro LTBP, proteine che legano i TGF- β , in grado di modellare tanto la forma quanto la funzione dei tessuti (Isogai et al., 2003). Tipicamente, la capacità di queste proteine di interagire con i diversi fattori di crescita è determinata dalla presenza di specifici domini ricchi in cisteine, rappresentati nel caso delle emiline/multimerine dal dominio EMI, presente ed altamente conservato in tutte le proteine della famiglia.

Per comprendere l'evoluzione dei geni codificanti per le emiline ed ottenere maggiori conoscenze sulle loro possibili funzioni durante lo sviluppo, in questo lavoro di tesi ci siamo avvalsi dei vantaggi forniti da un organismo modello, lo zebrafish, isolando gli ortologi delle emiline in *Danio rerio* ed analizzando il loro profilo di espressione spazio-temporale durante l'embriogenesi. Questo teleosteo si è rivelato negli ultimi anni un modello eccellente per lo studio dello sviluppo dei vertebrati. Dato l'alto grado di conservazione delle vie di segnalazione tra i vertebrati, zebrafish è stato ampiamente utilizzato per studiare geni e malattie umane. Come organismo modello lo zebrafish offre enormi vantaggi, come le dimensioni ridotte, il rapido sviluppo esterno e la trasparenza degli embrioni, caratteristiche grazie alle quali si è in grado di superare alcune limitazioni imposte dal modello murino. L'avanzamento del sequenziamento del genoma di questo organismo, la facilità di studiarne l'espressione genica mediante ibridazione *in situ* e la disponibilità di numerose tecniche per la manipolazione della funzione genica rendono *Danio rerio* un potente modello per la comprensione della regolazione e della funzione dei geni. Recentemente sono stati pubblicati diversi studi compiuti in zebrafish ed aventi come oggetto proteine della MEC. Per esempio è stata studiata l'espressione di due geni codificanti per la Tropoelastina (Miao et al., 2007) e per la Fibronectina (Sun et al., 2005), sono state identificate diverse integrine (Mould et al., 2006) e caratterizzati i geni codificanti per metalloproteinasi (Zhang et al., 2003a; Yoong et al., 2007) e per loro inibitori (Zhang et al., 2003b). Il mio lavoro riguardante l'identificazione e lo studio dell'espressione delle emiline in zebrafish rappresenta il primo studio dei geni codificanti per emiline nei vertebrati inferiori (Milanetto et al., 2008).

Una ricerca in banche-dati contenenti genomi di invertebrati non ha portato all'identificazione di alcun gene con una significativa similarità con le emiline di mammifero, indicando che, come altri geni principalmente coinvolti nella biologia vascolare, questa superfamiglia genica ha avuto origine durante l'evoluzione dei vertebrati. L'organismo più semplice in cui abbiamo identificato infatti un gene EDEN è l'urocordato *Ciona intestinalis*, nel cui genoma è presente un gene correlato ad *Emid1* ed *Emid2* dei mammiferi e codificante per una proteina con un dominio EMI N-terminale seguito da una regione collagena. È interessante notare che nei genomi dei teleostei (*Danio rerio*, *Takifugu*

rubripes) e degli anfibi (*Xenopus laevis*, *Silurana tropicalis*) sono presenti diversi geni codificanti per proteine della superfamiglia EDEN, suggerendo che questi geni abbiano avuto origine precocemente nel phylum *Chordata* durante la transizione verso i vertebrati. In base alle informazioni attuali, possiamo ipotizzare che la superfamiglia genica EDEN si sia originata da un gene ancestrale apparso nei primi cordati e codificante per una proteina contenente un dominio EMI a monte di una regione collagenica ('proto-Emid'); questo gene, mediante una duplicazione, avrebbe poi originato i due geni codificanti per le proteine Emid1 e Emid2, cioè la famiglia distinta presente in tutti i vertebrati e correlata alle emiline/multimerine solo dal dominio EMI. Nella transizione verso i vertebrati inferiori, probabilmente mediante processi di riarrangiamento genico ed *exon shuffling*, seguiti da duplicazioni successive, si sono formati nuovi geni in cui il dominio EMI si è legato ad una regione *coiled-coil* originando così fin dai pesci l'ampia famiglia delle emiline/multimerine. Future analisi del genoma di cordati inferiori di cui sono al momento in corso progetti di sequenziamento del genoma, come urocordati (*Ciona*), cefalocordati (*Branchiostoma*) e agnati (*Petromyzon*), saranno sicuramente preziose per comprendere appieno la filogenesi e l'evoluzione di questa superfamiglia genica.

Il genoma di zebrafish contiene otto geni codificanti per proteine altamente simili alle emiline/multimerine di mammifero, e tutti questi geni sono presenti come paraloghi duplicati. Paraloghi di zebrafish duplicati sono stati riportati anche per altri componenti della MEC, come la Tropoelastina (Miao et al., 2007), la Matrilina-3 (Ko et al., 2005) e la Fibronectina (Sun et al., 2005). La presenza di geni duplicati codificanti per emiline in zebrafish è in accordo con la duplicazione genomica che è probabilmente avvenuta nella linea ancestrale dei pesci, dopo la sua divergenza dalla linea che ha dato origine agli altri vertebrati (Christoffels et al., 2004). In questo contesto è interessante notare che i geni duplicati per le emiline sono posizionati in differenti cromosomi, a indicare che si tratta di geni distinti; inoltre ogni coppia di paraloghi di zebrafish è fiancheggiata da geni conservati, formando duplicati sintenici, ed almeno un membro di ciascuna coppia di paraloghi di zebrafish presenta una sintenia conservata anche con il singolo ortologo umano. Studi di genomica comparativa hanno dimostrato che solo una porzione relativamente piccola di geni originati dopo l'iniziale evento di duplicazione genomica avvenuto nei progenitori dei teleostei sono stati mantenuti ed è stato calcolato che solo il 20% circa dei geni umani in singola copia possiede due corrispondenti ortologi in zebrafish (Postlethwaith et al., 2000). Perciò, la presenza in *Danio rerio* di due distinti paraloghi per ciascuna delle emiline risulta di particolare rilievo. E' importante anche specificare che tutte le quattro coppie di geni paraloghi presenti in zebrafish risultano funzionali per la trascrizione e la traduzione; inoltre, ciascuna coppia codifica per proteine con una organizzazione strutturale in domini altamente conservata. Ciononostante, le sequenze aminoacidiche delle due proteine codificate da queste coppie geniche sono

sostanzialmente differenti, con una similarità reciproca di circa il 50% di residui conservati. La conservazione di due geni attivamente espressi per ciascuna emilina, con un grado relativamente alto di divergenza di sequenza, suggerisce che essi possano essere andati incontro a qualche sub-specializzazione funzionale. Questo aspetto è stato spesso riscontrato per geni di zebrafish con un profilo di espressione spaziale e temporale complesso, cioè con un'elevata probabilità di sub-funzionalizzazione (Lynch e Force, 2000). Questo è molto probabilmente anche il caso dei geni analizzati in questa tesi. Infatti, nonostante i paraloghi di geni per emiline duplicati abbiano profili di espressione largamente sovrapposti, essi presentano anche significative differenze spaziali e/o temporali. È interessante notare che in diversi organi la somma dei *pattern* di espressione di ciascuna coppia di paraloghi di zebrafish riassume l'espressione dell'ortologo murino.

Analisi bioinformatiche indicano che le quattro coppie di geni duplicati in zebrafish sono gli ortologi dei geni di mammifero codificanti per Emilina-1, Emilina-2, Multimerina-2 ed Emilina-3. Come si può notare, l'unico gene della famiglia delle emiline/multimerine per cui non è stato identificato un ortologo in *Danio rerio* è quello codificante per Multimerina-1. È interessante notare che ortologi di questo gene sono assenti anche in altri teleostei e negli anfibi, e che il più semplice vertebrato in cui abbiamo potuto identificare un gene codificante per Multimerina-1 è il pollo. Ciò indica che il gene per Multimerina-1 si è originato più tardi durante l'evoluzione dei vertebrati, probabilmente per una duplicazione del gene per Multimerina-2, la proteina maggiormente correlata a Multimerina-1 fra le diverse emiline/multimerine. Multimerina-1 possiede alcune caratteristiche peculiari, come la presenza di un lunga regione con funzioni di pro-peptide a monte del dominio EMI e la capacità di legare il fattore V della coagulazione nel plasma (Hayward e Kelton, 1995), indicando che la proteina possiede alcune funzioni altamente specializzate.

Le caratteristiche strutturali delle emiline di zebrafish sono altamente conservate rispetto a quelle delle loro controparti murine, condividendo un'omologia di struttura dei domini e di sequenza. Tutte le cisteine e diversi altri residui aminoacidici del dominio EMI N-terminale sono altamente conservati, ad eccezione di Emilina-3a, che manca della seconda cisteina. Lo stesso residuo è assente anche in Multimerina-1 dei mammiferi (Doliana et al., 2000a), suggerendo che tale cisteina non sia essenziale per l'organizzazione tridimensionale e/o la funzione del dominio EMI.

Se confrontati con i dati disponibili per il topo, i risultati dell'espressione dei geni delle emiline in zebrafish rivelano molte sovrapposizioni nei profili di espressione tra vertebrati superiori ed inferiori, ma presentano anche alcune caratteristiche finora identificate solo in zebrafish. Come atteso, i geni codificanti per gli ortologi di Emilina-1, Emilina-2 e Multimerina-2 sono largamente espressi a livello del sistema cardiovascolare dell'embrione di zebrafish. In particolare, *emilin2a* ed *emilin2b* sono risultati abbondantemente trascritti nel sistema cardiovascolare a tutti gli stadi

dell'embriogenesi analizzati. L'espressione di questi due geni inizia allo stadio di 5-15 somiti, cominciando per *emilin2a* con due strisce di cellule appartenenti al mesoderma della piastra laterale e probabilmente corrispondenti ad angioblasti che daranno origine al sistema cardiovascolare dell'embrione (Weinstein, 1999). Negli stadi successivi di sviluppo, entrambi i geni di Emilina-2 in zebrafish appaiono espressi nel cuore e nei vasi sanguigni della testa e del tronco. Oltre al sistema cardiovascolare, un'ulteriore espressione dei geni per Emilina-2 è stata osservata in altre strutture, come la cresta ectodermica apicale degli abbozzi delle pinne per *emilin2a* ed in alcuni distretti del sistema nervoso per *emilin2b*. Complessivamente, il profilo di espressione dei due geni codificanti per Emilina-2 in zebrafish riflette i principali siti di trascrizione del gene ortologo murino *Emilin2*, che è stato rilevato infatti nei vasi sanguigni, nel cuore, negli abbozzi degli arti e nel sistema nervoso centrale (Leimeister et al., 2002; Braghetta et al., 2004).

Anche le coppie di geni paraloghi codificanti per Emilina-1 e Multimerina-2 sono abbondanti nel sistema cardiovascolare durante lo sviluppo di zebrafish. In particolare, a stadi tardivi (24-48 hpf), *emilin1a* ed *emilin1b* appaiono espressi prevalentemente dai vasi sanguigni, dal cuore e dalle cellule mesenchimali di vari organi, in accordo con i dati di espressione disponibili per il topo (Braghetta et al., 2002). A stadi più precoci (5-25 somiti), invece, l'espressione di entrambi i geni codificanti per Emilina-1 in zebrafish appare ristretta a distinti distretti del sistema nervoso centrale, un organo che non è mai stato riscontrato positivo per *Emilin1* in studi di ibridazione *in situ* su sezioni di embrione di topo (Braghetta et al., 2002; Leimeister et al., 2002). Il *pattern* di espressione di *mrrn2a* ed *mrrn2b* rivela invece un altro aspetto interessante; i due paraloghi codificanti per Multimerina-1 in zebrafish, infatti, appaiono espressi con un profilo che globalmente riepiloga la distribuzione sia di Multimerina-1 sia di Multimerina-2 nei mammiferi. Durante lo sviluppo del topo, i trascritti di *Mrrn2* sono ristretti a cellule dell'endotelio e dell'endocardio, mentre *Mrrn1* è espresso nel mesenchima della regione parassiale del tronco e nel mesenchima di altri distretti, come i placodi olfattivi ed otici e gli abbozzi degli arti (Leimeister et al., 2002; Braghetta et al., 2004). Durante lo sviluppo di zebrafish, i due geni *mrrn2a* e *mrrn2b* coprono entrambi i *pattern* di espressione; ciò appare un'altro aspetto decisamente di rilievo, dal momento che il genoma di zebrafish non sembra contenere alcun gene ortologo codificante per Multimerina-1. Come discusso in precedenza, questo gene si è evoluto più tardi durante lo sviluppo dei vertebrati; perciò, è plausibile che nei vertebrati inferiori la sua funzione sia svolta almeno in parte da *mrrn2a* ed *mrrn2b*, i cui *pattern* di espressione consistono sia nei derivati endoteliali sia in quelli mesenchimali e riassumono quelli di *Mrrn1* e *Mrrn2* nel topo.

I due ortologi di *Emilin3* mostrano durante lo sviluppo dello zebrafish il profilo di espressione più peculiare, in accordo con la particolare struttura della proteina Emilina-3 e con la sua classificazione in una famiglia a sé stante. A tutti gli stadi dello sviluppo di zebrafish analizzati,

emilin3a ed *emilina3b* presentano un profilo di espressione molto simile e quasi del tutto sovrapponibile, a differenza delle coppie di paraloghi per le altre emiline/multimerine. Ciò suggerisce che per Emilina-3 i due geni duplicati nel corso dell'evoluzione dei teleostei non siano andati incontro a significativi fenomeni di sub-funzionalizzazione, i quali sembrano invece avere influito notevolmente sulle coppie di paraloghi per le altre emiline. Tuttavia, durante l'evoluzione nessuno dei due geni è diventato 'superfluo', andando incontro a perdita di funzione e accumulo di mutazioni trasformandosi in uno pseudogene. I due geni *emilin3a* ed *emilina3b*, infatti, oltre ad essere trascritti con profili spazio-temporali molto simili, sembrano avere mantenuto entrambi una funzionalità di trascrizione e traduzione: le loro sequenze aminoacidiche codificano in entrambi i casi per proteine intere e funzionali, altamente conservate fra loro.

L'analisi dei profili di espressione dei due geni per Emilina-3 di zebrafish ha rivelato un'altro aspetto di particolare rilievo. A tutti gli stadi dello sviluppo di zebrafish analizzati, *emilin3a* ed *emilina3b* presentano un *pattern* molto caratteristico che non include strutture cardiovascolari. Questo aspetto rende questi due geni marcatamente differenti dagli altri geni codificanti per emiline/multimerine, suggerendo che essi possano svolgere un ruolo peculiare all'interno della superfamiglia EDEN. A stadi precoci di sviluppo embrionale, infatti, entrambi i geni dimostrano una fortissima espressione nel blastema caudale a livello della notocorda e nella cerniera cordo-neurale, una struttura contenente una popolazione di cellule staminali multipotenti, mentre livelli di espressione inferiori sono rilevati nella lamina del pavimento del sistema nervoso centrale e nell'ipocorda. In particolare, a partire dallo stadio di *tail bud* a quello di 24hpf, l'espressione nella notocorda, dapprima unico sito di espressione, si riduce favorendo la comparsa del segnale a livello della lamina del pavimento del tubo neurale e dell'ipocorda; questo segnale si intensifica progressivamente in questi distretti, a discapito della notocorda, con l'avanzare dello sviluppo e che si estende gradualmente verso la porzione anteriore dell'embrione. A stadi più avanzati di sviluppo, invece, entrambi i trascritti di Emilina-3 sono stati rilevati nei primordi cartilaginei di vari elementi scheletrici della testa. I dati ricavati mediante RT-PCR ed ibridazione *in situ* su embrioni di topo e presentati nella seconda parte di questa tesi confermano che il profilo di espressione dei geni codificanti per le due isoforme corrispondenti a Emilina-3 in zebrafish è in gran parte in accordo con quello dell'ortologo murino. Il gene murino *Emilin3* infatti è espresso dapprima nel blastema caudale e in seguito nello scheletro in via di sviluppo. I siti di espressione precoce dei geni *emilin3a* ed *emilin3b* riflettono quelli di geni coinvolti in processi induttivi chiave, come *shh* (Placzek e Briscoe, 2005), e suggeriscono che questa particolare famiglia di emiline possa essere coinvolta, a differenza dagli altri componenti della superfamiglia EDEN, nel generare segnali per la corretta distribuzione delle strutture lungo la linea mediana durante lo sviluppo embrionale.

Dato il particolare profilo di espressione di *emilin3a* ed *emilin3b*, e dato anche il progetto di inattivazione genica mirata del loro ortologo murino intrapreso in parallelo con questi studi, ho iniziato alcuni studi di tipo funzionale in zebrafish aventi come scopo una maggiore comprensione del ruolo biologico di queste due proteine durante lo sviluppo dei vertebrati. Un primo passo è stato la ricerca di possibili vie di trasduzione del segnale da cui l'espressione dei geni *emilin3a* e *emilin3b* possa essere regolata. A tale scopo, ho eseguito esperimenti di ibridazione *in situ* su embrioni di zebrafish trattati con farmaci che bloccano in modo specifico vie di trasduzione di segnale rilevanti nello sviluppo. In particolare, ho esaminato il coinvolgimento nella regolazione dell'espressione delle due isoforme di Emilina-3 di Hedgehog, osservando embrioni trattati con ciclopamina, di FGF, effettuando ibridazioni di embrioni trattati con SU5402, e di Notch, trattando gli embrioni con DAPT. Inoltre ho ripetuto eseguiti indagini analoghe su embrioni zebrafish mutanti *dino*, con mutazioni nel gene *chd* codificante per Chordin, e mutanti *swirl*, in cui è mutato il gene *bmp2b* codificante per la proteina BMP2-4. In tutti i casi questi studi non hanno evidenziato alcuna alterazione nel profilo di espressione di *emilin3a* ed *emilin3b*: i due geni risultano trascritti, distribuiti in modo analogo ad embrioni di controllo e con un'intensità del segnale paragonabile ad essi. Ciò indica che le vie di segnalazione esaminate non sono coinvolte nella regolazione di Emilina-3 durante lo sviluppo embrionale di zebrafish. Rimangono però da indagare altre potenziali vie di segnalazione, tra cui quella di Wnt, che potrebbero regolare l'espressione di Emilina-3. Prossimamente ripeterò gli esperimenti di ibridazione *in situ* per *emilin3a* e *emilin3b* su embrioni di zebrafish trattati con cloruro di litio, un potente bloccante della via Wnt/ β -catenina.

L'assenza di alterazioni nell'espressione genica in embrioni zebrafish mutanti o trattati con farmaci non esclude che Emilina-3 possa essere coinvolta in qualche via di *signaling*: Emilina-3a ed Emilina-3b infatti potrebbero essere non a valle, ma a monte di qualche via di segnalazione; in questo caso agirebbero esse stesse da regolatori, probabilmente indiretti, delle proteine prese in considerazione. I risultati ottenuti con il topo *knockout* per Emilina-1, infatti, hanno rivelato a sorpresa che questa proteina è un importante regolatore dell'attività del fattore di crescita TGF- β 1, poichè il suo dominio EMI interagisce con TGF- β 1, impedendo il taglio della forma inattiva di questa molecola da parte delle convertasi furiniche e quindi mantenendolo sequestrato nella MEC nella sua forma inattiva (Zacchigna et al., 2006). E' possibile quindi che anche Emilina-3, che come Emilina-1 possiede il dominio EMI, sia coinvolta nella regolazione di vie di segnale.

Allo scopo di indagare sulle funzioni delle due isoforme di Emilina-3 in zebrafish, ho avviato uno studio funzionale sui due fronti complementari della *reverse genomics* utilizzando *Danio rerio* come modello sperimentale: uno studio di *gain-of-function* mediante iniezione di mRNA in ovociti fecondati, e uno studio di *loss-of-function* mediante *knockdown* con morfolino. La tecnica dell'iniezione di mRNA in embrioni allo stadio di una o due cellule è largamente utilizzata per

studiare gli effetti della sovraespressione di un gene, ma anche per analizzare il rapporto struttura-funzione o per studiare l'effetto di specifiche mutazioni nella sequenza. Per la sovraespressione di Emilina-3 in zebrafish, ho iniettato in embrioni allo stadio di una o due cellule l'mRNA *full-length* di *Emilin3* murino. Questa scelta è stata dettata sia dal fatto che in questi studi non disponevo ancora della sequenza completa dei cDNA di *emilin3a* ed *emilin3b*, sia dalla notevole similarità di sequenza tra le due isoforme di zebrafish e l'ortologo murino. Gli embrioni iniettati si sono rivelati vitali e non hanno evidenziato alterazioni fenotipiche grossolane. Uno studio molecolare mediante ibridazione *in situ* con una sonda per *myoD*, gene marcatore del mesoderma parassiale, mi ha permesso però di rilevare che negli embrioni sovraespressanti *Emilin3* l'espressione di *myoD* risulta anch'essa aumentata. Nonostante il carattere ancora parziale di questi studi, che andranno approfonditi con ulteriori esperimenti ed analisi, è possibile ipotizzare che gli ortologi di Emilina-3 in zebrafish possano essere implicati nella comunicazione tra la notocorda ed il circostante mesoderma parassiale, partecipando alla trasmissione di segnali per la formazione e la segmentazione dei somiti.

Oltre ad esperimenti di sovraespressione, ho anche condotto studi di *loss-of-function* in zebrafish, mediante iniezione di oligonucleotidi antisense morfolino per *emilin3a* ed *emilin3b*. Tale tipo di studi ha implicato la conoscenza della sequenza completa dei geni di *emilin3a* ed *emilin3b*, ed in particolare della regione 5'-terminale trascritta. Infatti per il corretto disegno del morfolino e la progettazione della strategia da attuare per verificarne la sua efficacia, è necessario conoscere al meglio la struttura e la sequenza del gene di interesse. A questo proposito, ho isolate le regioni 5' dei cDNA di *emilin3a* e *emilin3b* mediante particolari procedure di RT-PCR, utilizzando una metodologia 5'-RACE efficiente che facilita il clonaggio dell'estremità 5' del cDNA. Infatti, grazie a questo particolare protocollo di 5'-RACE, l'amplificazione avviene esclusivamente per i cDNA trascritti a partire da RNA provvisto di *cap* al 5', mentre viene resa impossibile l'amplificazione di rRNA, tRNA, mRNA degradato o DNA genomico.

Il sequenziamento degli amplificati ottenuti mi ha permesso, mediante ricerca in banche dati, di risalire alle sequenze geniche complete di *emilin3a* ed *emilin3b* e quindi anche all'organizzazione di questi geni di zebrafish, che si è rivelata particolare. Infatti *emilin3a* è un gene abbastanza breve e presenta solo 3 esoni, con una capacità codificante estremamente elevata, e pari addirittura all'83%; *emilin3b* invece è un gene molto più grande, con una capacità codificante nettamente inferiore (circa del 5%), poichè tale gene presenta numerosi introni, alcuni dei quali molto ampi. In gene *Emilin3* murino ha una capacità codificante piuttosto elevata, di circa il 60%, e si avvicina quindi più a *emilin3a* che a *emilin3b*, come sembrerebbero confermare le percentuali di similarità rilevate dal confronto tra le sequenze aminoacidiche delle corrispondenti proteine in zebrafish e topo. Un'ipotesi potrebbe essere che *emilin3a* fosse inizialmente l'unico ortologo presente in origine

nei precursori dei teleostei e che quindi sia stata questa isoforma a trasferirsi nei vertebrati durante l'evoluzione, e che invece *emilin3b* abbia avuto origine più tardi, in seguito all'evento di duplicazione del genoma di zebrafish. Dal punto di vista della struttura delle proteine, invece esse appaiono strettamente correlate, dal momento che presentano un peptide segnale, un dominio EMI altamente conservato, a parte l'assenza già trattata della seconda cisteina in *emilin3a*, ed una lunga regione in grado di formare strutture *coiled-coil*. Come nelle isoforme murine è assente il dominio C-terminale gC1q, e questa assenza, come suggerito anche nel topo, potrebbe implicare una particolare organizzazione sovramolecolare e una diversa funzione di Emilina-3 rispetto agli altri componenti della superfamiglia EDEN.

La progettazione di un esperimento di *knockdown* con morfolino richiede, oltre alla conoscenza precisa della sequenza dei geni in questione, anche di attuare diverse considerazioni per disegnare un morfolino altamente specifico ed efficace. La prima è la scelta del bersaglio per il morfolino. Infatti i morfolino sono stati inizialmente introdotti come agenti terapeutici diretti contro il segnale di inizio della traduzione, in quanto, legandosi e creando quindi un ingombro sterico nei pressi dell'ATG erano in grado di ostacolare il legame del ribosoma e bloccare la sintesi proteica (Summerton e Weller 1997). Per verificare l'efficacia di questo tipo di morfolino, valutabile quindi come riduzione nei livelli di proteina, è necessario effettuare analisi di western blotting, che è possibile solo se si dispone di anticorpi specifici per la proteina di interesse. Nel nostro caso però non erano disponibili anticorpi specifici diretti contro le due diverse proteine di zebrafish. Per gli studi di *knockdown* in zebrafish ci siamo quindi focalizzati sul disegno di oligonucleotidi morfolino di seconda generazione, che in vari studi si sono rivelati estremamente efficaci: in questo caso, i morfolino vengono disegnati in modo da bloccare gli eventi di processazione nucleare dell'RNA, in particolare lo *splicing* del pre-mRNA, se sono diretti contro un sito di *splicing* (Draper et al., 2001). In modo analogo a quelli disegnati sull'ATG, tali morfolino sono in grado di impedire il legame dello spliceosoma alla sequenza bersaglio e quindi portano alla produzione di un mRNA privo di un esone chiave oppure di un mRNA in cui viene ritenuto un introne. Questa strategia presenta alcuni significativi vantaggi rispetto al blocco della traduzione: innanzitutto è possibile creare effetti specifici, come la delezione di esoni o la ritenzione di introni desiderati; inoltre i risultati possono essere quantificati e caratterizzati mediante reazioni di RT-PCR, senza dover essere in possesso di anticorpi, né dover attendere che la proteina venga degradata prima di poter misurare un effetto di *knockdown*. Se si desidera effettuare la delezione di un introne, è necessario verificare con attenzione il *reading frame* degli esoni a valle, in quanto si potrebbe avere la produzione di una proteina incompleta ma comunque potenzialmente funzionale. E' necessario, inoltre, come per qualsiasi strategia che coinvolga oligonucleotidi antisense, che il morfolino presenti una auto-complementarietà molto ridotta, in modo da evitare la formazione di dimeri che ridurrebbero la

biodisponibilità del morfolino in grado di legare la sequenza bersaglio. Inoltre, studi in bibliografia hanno dimostrato che un morfolino ottimale dovrebbe estendersi per circa 25 bp ed avere un elevato contenuto in G/C, per aumentare l'affinità al bersaglio, ma non deve presentare sequenze in cui si succedono segmenti di G contigue, che potrebbero ridurne la solubilità in acqua (GeneTools, LLC).

Sulla base delle diverse considerazioni appena esposte, per il *knockdown* di *emilin3* e *emilin3b* in zebrafish ho disegnato dei morfolino diretti contro le sequenze di *splicing* presenti tra il primo esone ed il primo introne dei due geni, in modo che per entrambi i geni venga mantenuto nell'mRNA maturo il primo introne. Il primo esone di *emilin3a* e *emilin3b* codifica per il 5'-UTR, il peptide segnale e una porzione del dominio EMI, mentre in entrambi i geni il primo introne presenta numerosi segnali di fine traduzione; perciò, la ritenzione dell'introne porterebbe in entrambi i casi alla produzione di una proteina troncata a metà del dominio EMI e quindi non funzionale. Nelle reazioni di PCR eseguite allo scopo di verificare l'effetto dei morfolino, ho riscontrato che l'mRNA estratto dagli embrioni iniettati con il morfolino specifico è presente a livelli molto più bassi rispetto a quelli iniettati con il morfolino di controllo, che presenta una sequenza simile a quella del corrispondente morfolino, ma in cui 5 nucleotidi sono mutati (5-mis) o con la soluzione acquosa. E' plausibile ipotizzare che i pre-mRNA che sono stati bersaglio del morfolino, e quindi presentano un introne ritenuto con numerose sequenze di stop in successione, vengano riconosciuti come anomali e degradati probabilmente con meccanismi di *nonsense-mediated RNA decay* (Maquat, 2002). D'altra parte, essendo l'esperimento disegnato in modo da portare ad un blocco della traduzione della proteina, questo possibile fenomeno non sfavorisce l'efficacia del morfolino ma anzi abbattendo i livelli del mRNA bersaglio ne aumenta l'efficacia.

L'azione dei morfolino si è rivelata altamente specifica per entrambe le isoforme di Emilina-3, portando alla ritenzione dell'introne negli embrioni zebrafish morfanti, rilevata con RT-PCR in assenza di DNA genomico contaminante. Dal punto di vista dell'effetto fenotipico, sia per *emilin3a* che per *emilin3b* gli embrioni iniettati con un singolo morfolino non hanno manifestato alterazioni particolarmente evidenti, a parte una mortalità lievemente superiore ai controlli e un ritardo nello sviluppo; tali effetti però sono probabilmente imputabili alla procedura della iniezione di morfolino e dovranno essere ulteriormente indagati con esperimenti di iniezione su più larga scala e a diversi dosaggi di morfolino. Invece, il *knockdown* simultaneo di entrambe le isoforme di Emilina-3 ha portato a marcate alterazioni durante lo sviluppo di zebrafish. Come nel topo, infatti, anche in zebrafish geni con elevata omologia di sequenza e di struttura possono dare origine a fenomeni di compensazione funzionale; ciò è particolarmente rilevante per i due paraloghi codificanti per Emilina-3 in zebrafish, che come già discusso prima presentano dei profili di espressione del tutto sovrapponibili ed una omologia di sequenza molto elevata. Perciò, ho deciso di iniettare embrioni

zebrafish allo stadio di una o due cellule con entrambi i morfolino contemporaneamente, ciascuno nelle concentrazioni utilizzate per la singola iniezione. In questi embrioni, oltre ad un forte ritardo nello sviluppo rispetto ai controlli, ho rilevato marcate alterazioni nell'organizzazione dell'embrione. Gli embrioni morfanti sono risultati più piccoli rispetto ai controlli e presentavano una porzione anteriore ridotta rispetto al resto dell'organismo; inoltre la parte posteriore è apparsa fortemente disorganizzata: per alcuni embrioni non è stato nemmeno possibile distinguere le diverse strutture che compongono il tronco e la coda. Il particolare forse più rilevante in questi embrioni morfanti, da correlare con i risultati ottenuti negli esperimenti di *gain-of-function*, è stata l'assenza di somiti con margini e forma ben definiti; i somiti degli embrioni morfanti infatti non presentavano la tipica forma a cuneo, ma mostravano dei confini irregolari e spesso curvi. Un simile fenotipo è stato osservato in bibliografia nei mutanti *you*, identificati in uno *screening* di mutagenesi su larga scala del genoma di zebrafish (van Eeden et al., 1996), e che presentano appunto una morfologia alterata del miotomo, che non ha più la forma di un cuneo (a V), ma risulta invece arrotondato (a U).

I risultati ottenuti negli esperimenti di *knockdown* con morfolino in zebrafish suggeriscono che Emilina-3 sia coinvolta in alcuni processi morfogenetici durante lo sviluppo embrionale. Questi esperimenti tuttavia dovranno essere ripetuti e corroborati con l'iniezione e l'osservazione di un numero elevato di embrioni, accompagnata da ibridazione *in situ* con sonde e marcatori specifici. Sarà certamente interessante ripetere anche per gli embrioni morfanti l'ibridazione *in situ* con la sonda *myoD* e con altri marcatori di mesoderma: infatti è plausibile ritenere che vi sia una riduzione nell'espressione di *myoD* negli embrioni in cui la funzione delle due isoforme di Emilina-3 è ridotta. Data l'espressione particolare dei due geni codificanti per Emilina-3 in zebrafish, che è risultata sovrapponibile a quella di geni della famiglia *hedgehog*, è possibile ipotizzare che Emilina-3 svolga un'attività in qualche modo correlata ai geni di questa famiglia. Il fatto che in esperimenti di ibridazione *in situ* su embrioni zebrafish trattati con ciclopamina, e quindi in cui il segnale Hedgehog è inibito, gli individui trattati dimostrino un'espressione di *emilin3a* ed *emilin3b* praticamente identica ai controlli non trattati, sembra escludere che le due isoforme di Emilina-3 si trovino a valle della via di segnalazione di Hedgehog, mentre esse potrebbero invece trovarsi a monte. Molti aspetti della via di segnalazione di Hedgehog rimangono ancora oscuri, in particolare le molecole che sono in grado di controllare i movimenti del peptide lipidico Hedgehog una volta secreto ed il suo legame al recettore nelle cellule bersaglio all'interno dell'embrione sono ancora poco conosciute. Nei vertebrati sono state identificate numerose proteine in grado di legare direttamente le molecole di Hedgehog secrete e di inibirne l'attività, come la proteina HIP localizzata sulla superficie cellulare o la proteina secreta GAS1 (Chuang e McMahon, 1999; Lee et al., 2001), ma anche regolatori in senso positivo, come il proteoglicano eparan-solfato (Eugster et

al., 2007). Le due isoforme di Emilina-3 di zebrafish potrebbero agire su Hedgehog in modo simile a ciò che avviene per Emilina-1 e TGF- β 1 in topo, rendendo il fattore non più disponibile per il suo legame al recettore ed inibendo quindi la sua attività di controllo dei movimenti e del destino dei mioblasti fiancheggianti la notocorda, per esempio per quanto riguarda la scelta di differenziare in cellule muscolari a contrazione lenta oppure rapida.

Nel mio lavoro di dottorato, lo studio dell'espressione e della funzione delle emiline, in particolare gli ortologi di *Emilin3*, nel modello vertebrato *Danio rerio* è avvenuto in parallelo con un progetto dedicato all'inattivazione mirata del gene *Emilin3* in topo. La similarità strutturale, i profili di espressione parzialmente sovrapponibili dei geni *Emilin1*, *Emilin2* e *Mmrn2* ed il lieve fenotipo osservato nei corrispondenti topi *knockout* suggeriscono una probabile funzione compensatoria tra i diversi membri della famiglia delle emiline/multimerine. Perciò per ottenere una completa comprensione delle funzioni svolte dai diversi membri della superfamiglia EDEN *in vivo*, è necessario inattivare sistematicamente in topo tutti i geni corrispondenti, individualmente, ma anche in forma di doppi e multipli *knockout*, con l'approccio del *gene targeting*.

La proteina codificata dal gene *Emilin3*, protagonista di questo studio di dottorato, sembra essere molto interessante e ha numerosi aspetti peculiari che la rendono unica tra tutte le emiline/multimerine. In origine questa proteina era stata denominata Emilina-T, che sta per "Emilina tronca" (Doliana et al., 2000a). Infatti, da un confronto con le altre proteine della famiglia delle emiline/multimerine, Emilina-3 presenta la caratteristica peculiare di essere priva del dominio C-terminale C1q (gC1q). Il resto della sua struttura primaria, costituita dal dominio EMI all'estremità N-terminale, seguito da una lunga regione *coiled-coil*, è invece abbastanza simile alle altre proteine della famiglia. Studi svolti in precedenza hanno dimostrato che Emilina-1 ed Emilina-2 formano omo- ed eterotrimeri stabili e che il dominio gC1q è essenziale per indurre l'assemblaggio dei trimeri, la cui formazione è alla base della successiva aggregazione in polimeri di ordine superiore mediante formazione di ponti disolfuro intermolecolari (Mongiat et al., 2000; Doliana et al., 2001). Studi nel nostro laboratorio hanno ulteriormente confermato che l'assemblaggio in trimeri è una caratteristica comune di Emilina-1, Emilina-2 e Multimerina-2 (Martina Milanetto e Paolo Bonaldo, dati non pubblicati). L'assenza del dominio gC1q in Emilina-3 suggerisce che questa proteina possa presentarsi con una differente struttura terziaria e quaternaria all'interno della MEC.

Gli studi di RT-PCR su tessuti di topo adulto e di ibridazione *in situ* a diversi stadi dello sviluppo pre- e post-natale del topo hanno dimostrato che *Emilin3* ha un *pattern* di espressione diverso e più ristretto se confrontato con gli altri geni della famiglia. Il gene *Emilin3* è abbondante nei tessuti epiteliali dell'intestino, con una debole espressione anche nel mesenchima circostante. E' noto che questo tessuto è una parte del blastema caudale, che possiede nel topo un'attività di

centro di segnalazione e di induzione nella formazione del mesoderma e dei somiti (Gofflot et al., 1997; Liu et al., 2004). Con il procedere dello sviluppo, l'espressione appare localizzata esclusivamente in tessuti di origine mesenchimale, come il dotto tracheo-bronchiale prima ed il tessuto connettivo di trachea e bronchi a stadi più tardivi. Dal momento che l'espressione di *Emilin3* aumenta in proporzione con il progredire della formazione del tratto respiratorio inferiore, può essere ipotizzato un ruolo di Emilina-3 durante l'organogenesi precoce. L'espressione di *Emilin3* in tessuti di derivazione mesenchimale continua per tutto il periodo prenatale, mentre dopo la nascita si riduce a pochi organi, come ovaie, testicoli, utero ed intestino.

In uno studio presente in letteratura, è stato osservato che cellule staminali mesenchimali umane indotte a differenziare in senso osteogenico esprimono ad alti livelli il gene per Emilina-3, inoltre l'omologo murino appare espresso nello sviluppo scheletrico a livello del pericondrio, proponendo un ruolo di Emilina-3 nei processi di osteogenesi (Doi et al., 2003). Considerato anche il profilo di espressione peculiare da me osservato durante gli stadi precoci dello sviluppo dello zebrafish, sulla base di queste diverse osservazioni si può ipotizzare per Emilina-3 un potenziale ruolo nel *patterning* e nello sviluppo precoce dell'embrione, un ruolo che va al di là della semplice funzione strutturale di una proteina della MEC. Come conseguenza, è plausibile ritenere che l'inattivazione mirata di questo gene dia origine a un topo *knockout* con un fenotipo diverso e probabilmente più forte rispetto a quelli osservati per gli altri membri della famiglia delle emiline/multimerine.

La produzione di un topo *knockout* mediante *gene targeting* rappresenta un progetto lungo e complesso, nel quale ogni singola fase presenta delle problematiche particolari. Nel laboratorio in cui ho svolto il mio lavoro di tesi esiste una lunga esperienza su questo tipo di tecnologie in topo, e sono stati prodotti con successo topi *knockout* per diversi geni codificanti per proteine della MEC, come il collagene VI (Bonaldo et al., 1998; Irwin et al., 2003), l'Emilina-1 (Zanetti et al., 2004; Zacchigna et al., 2006), l'Emilina-2 e la Multimerina-2 (P. Bonaldo e coll., dati non pubblicati). Due diversi tentativi di produzione di topi *knockout* per il gene *Emilin3*, attuati in passato nello stesso laboratorio, erano entrambi falliti sia per la frequenza di ricombinazione omologa particolarmente bassa dimostrata da questo gene, sia per questioni sperimentali specifiche. Nel primo tentativo, infatti, una mutazione puntiforme nella cassetta *neo^R* presente nel costrutto di inattivazione aveva reso le cellule ES trasformate con tale vettore non resistenti alla presenza di G418 nel terreno di coltura, rendendo così impossibile l'isolamento di alcun clone ricombinante omologo. Nel secondo tentativo invece, dopo la preparazione di un nuovo costrutto per l'inattivazione, erano stati isolati tre cloni ES ricombinanti omologhi, ma, a causa di una condizione di aneuploidia di questi stessi cloni, non è stato possibile ottenere topi chimere in grado di trasmettere il gene inattivato alla progenie, dal momento che cellule ES aneuploidi non sono in grado di colonizzare efficacemente i

tessuti e la linea germinale dell'embrione ospite. Alcuni studi in letteratura hanno in effetti dimostrato che le cellule ES presentano un notevole grado di instabilità cromosomica durante la coltura *in vitro*, e che la percentuale di cellule aneuploidi aumenta con l'aumentare del tempo di mantenimento in coltura e del numero di passaggi (Robertson, 1987; Nagy et al., 2003).

Dopo i precedenti tentativi falliti del laboratorio di produrre topi *knockout* per *Emilin3*, si erano prospettate due possibili vie per ottenere tali topi. La prima possibilità era subclonare i tre cloni di cellule ES ricombinanti omologhi isolati nell'esperimento precedente, derivando alcune decine di subcloni da ciascun clone di cellule ES; su ciascun subclone doveva essere effettuata l'analisi del cariotipo e successivamente si poteva procedere *in vivo* esclusivamente con i cloni euploidi eventualmente isolati verificando la loro capacità di trasmettere la mutazione alla linea germinale. Una possibilità alternativa, più dispendiosa in termini di tempo, ma con maggiori probabilità di successo, era invece effettuare una nuova elettroporazione con il costrutto di inattivazione usando una linea di cellule ES R1 con cariotipo stabile e ripetere la microiniezione in blastocisti con i nuovi cloni ricombinanti omologhi isolati. Abbiamo perciò deciso di seguire questa seconda strategia e eseguendo un nuovo esperimento di inattivazione mirata di *Emilin3* su larga scala.

Studi in letteratura hanno dimostrato che la frequenza di ricombinazione omologa è più elevata quando il DNA utilizzato per la preparazione del costrutto di inattivazione è derivato dallo stesso ceppo murino da cui sono state isolate le cellule ES (te Riele et al., 1992). Per il nostro progetto di inattivazione sono state utilizzate cellule ES derivate dal ceppo 129/Sv, e per questo motivo il DNA utilizzato per la preparazione del costrutto derivava da un clone fagico isolato da una libreria genomica del ceppo 129/Sv. In questo modo, è stata evitata ogni potenziale riduzione nella frequenza di inattivazione causata da polimorfismi di sequenza tra vettore di inattivazione e DNA delle cellule ES. Il secondo importante fattore da considerare nella preparazione di un costrutto di *targeting* è la lunghezza delle regioni di omologia tra la sequenza di DNA endogeno ed il DNA del costrutto: all'aumentare delle regioni di omologia corrisponde un aumento nelle frequenze di ricombinazione omologa, con un limite inferiore di circa 3 kb (Dang et al., 1992). Nel nostro vettore, la regione di omologia con il gene endogeno era di 5.9 kb, di cui circa 2kb nel braccio corto e 3.9 kb nel braccio lungo di omologia. La presenza di un sito unico di restrizione per la linearizzazione del costrutto di inattivazione è molto importante, poiché la frequenza di ricombinazione omologa è più elevata se per l'elettroporazione delle cellule ES viene utilizzato DNA linearizzato (Hasty et al., 1992); nel nostro caso, è stato scelto un sito *XhoI* localizzato al 5' del gene *Emilin3* presente nel costrutto. Un altro fattore rilevante da considerare è la presenza nel vettore di inattivazione di cassette con *marker* selezionabili. Nel nostro caso è stato seguito l'approccio della doppia selezione, grazie al quale è possibile ottenere un incremento di 3-10 volte

negli eventi di ricombinazione omologa rispetto all'utilizzo del solo *marker* per la selezione positiva (Mansour et al., 1988). Nel costrutto usato per il *targeting* di *Emilin3* sono presenti contemporaneamente il gene batterico per la neomicina fosfotransferasi-II (*neo^R*) come *marker* per la selezione positiva, ed il gene per la timidina chinasi del virus Herpes Simplex per la selezione negativa. Prima dell'introduzione della cassetta *neo^R* inoltre è stata effettuata nel costrutto una delezione di circa 0.4 kb nella regione codificante per i primi 50 residui aminoacidici di Emilina-3, incluso il peptide segnale, rendendo dopo la ricombinazione omologa l'allele *Emilin3* mutato in modo *null*, ovvero incapace di produrre alcun prodotto funzionale.

Nella procedura di *knockout* in topo, sicuramente l'aspetto più importante è il fatto che le cellule ES devono mantenere, anche dopo la propagazione e la manipolazione *in vitro*, la loro capacità di contribuire alla formazione di tutti i tessuti dell'embrione, inclusa la linea germinale. La coltura inaccurata di queste cellule spesso è alla base del loro differenziamento, che porta alla perdita della totipotenza e all'incapacità di colonizzare la linea germinale dei topi chimera. Per evitare tali problemi, le cellule ES devono essere mantenute in coltura con estrema cura, in appropriate condizioni di coltura (*feeder layer* di fibroblasti, mezzo supplementato con LIF, siero testato per cellule ES) e diluendole mediante tripsinizzazione ogni 2 o 3 giorni, in modo che le colonie non diventino troppo grandi e tendenti al differenziamento. È importante anche il tempo in cui le cellule vengono mantenute in coltura, perché una coltura prolungata influisce in modo negativo sulla loro totipotenza. Per questo motivo, in questo lavoro di tesi sono sempre stati evitati passaggi eccessivi e prolungati e le cellule ES sono state mantenute il più possibile a basso numero di passaggi in coltura. Nel nostro esperimento di inattivazione sono state elettroporate con il costrutto per *Emilin3* cellule ES della linea R1 al passaggio 14 (Nagy et al., 1993; Bonaldo et al., 1998), ovvero un passaggio del tutto appropriato, essendo nel *range* comunemente usato per l'utilizzo di questa linea cellulare (passaggi 12-19) e soprattutto molto al di sotto del numero che influisce drammaticamente sulla totipotenza delle cellule ES (Nagy et al., 2003).

Data la bassa efficienza di ricombinazione omologa rilevata per *Emilin3* nei precedenti tentativi di inattivazione, nel nostro progetto abbiamo deciso di elettroporare un numero molto elevato di cellule ES, eseguendo per la prima volta nel laboratorio un esperimento di *gene targeting* in grande scala. Infatti, un totale di 1.7×10^8 cellule della linea R1 è stato elettroporato con il vettore di inattivazione linearizzato con *XhoI* e successivamente piastrato e mantenuto in coltura per sette giorni su un monostrato di fibroblasti inattivati *neo^R* in presenza di G418 per la selezione positiva e di ganciclovir per la selezione negativa. Dalle cellule resistenti alla selezione sono stati inizialmente isolati 1505 cloni cellulari, dei quali 996 sono sopravvissuti e sono stati cresciuti in coltura ed analizzati per la presenza dell'allele ricombinante di *Emilin3*. Particolarmente importante ed impegnativo in questa fase, considerando il grande numero di cloni isolati

nell'esperimento ed i falliti precedenti tentativi nell'ottenere topi *knockout* per *Emilin3*, è stato il monitoraggio quotidiano al microscopio ottico di tutti i cloni cellulari per verificarne e registrarne la morfologia, la dimensione delle colonie e l'eventuale presenza di segni di differenziamento. Tra tutti i cloni mantenuti in coltura, solo una frazione molto esigua (meno del 2%) ha evidenziato morfologia non ottimale o cenni di differenziamento, indicando come le condizioni di coltura e selezione utilizzate in questo esperimento su larga scala siano state del tutto adeguate.

Un altro aspetto particolarmente importante ed impegnativo di questo studio è stato lo *screening* genotipico dei cloni isolati, allo scopo di identificare i cloni in cui aveva avuto luogo un corretto evento di ricombinazione omologa del gene *Emilin3*. Normalmente tale *screening* viene eseguito mediante Southern blot, una tecnica sensibile ed accurata ed in grado di rilevare con estrema precisione la presenza dell'allele correttamente ricombinato nei cloni isolati da esperimenti di *gene targeting* in cellule ES (Bonaldo et al., 1998; Zanetti et al., 2004). In un tipico esperimento di *gene targeting* in cellule ES, in cui vengono isolate ed analizzate poche centinaia di cloni, lo *screening* iniziale di tutti i cloni con il Southern blot richiede mediamente da due o tre mesi, permettendo quindi di identificare l'eventuale presenza di cloni con un corretto evento di ricombinazione omologa in tempi adeguati. Lo *screening* mediante Southern blot del migliaio di cloni isolati da questo esperimento di inattivazione su larga scala risultava evidentemente un percorso del tutto inadeguato, sia per i costi elevati che per i tempi estremamente lunghi che l'analisi di tutti i cloni avrebbe richiesto. Un'alternativa economica e rapida al Southern blot per l'analisi genomica è il metodo dell'amplificazione mediante PCR, una metodica ampiamente utilizzata per un vari tipi di analisi del DNA e dell'RNA, ma che si presenta particolarmente critica e problematica se utilizzata nello *screening* genomico dei cloni ottenuti da esperimenti di *gene targeting* in cellule ES. Rispetto al Southern blotting, la PCR infatti presenta un rischio più elevato di rilevare falsi positivi e negativi, ed è necessario ottimizzare accuratamente le condizioni di reazione allo scopo di ridurre al minimo questa eventualità. Considerando inoltre la frequenza di ricombinazione particolarmente bassa per il gene *Emilin3*, l'utilizzo della PCR come metodo di *screening* dei cloni ES isolati ha richiesto una messa a punto molto accurata delle condizioni di reazione, proprio per evitare che un raro clone correttamente ricombinato potesse sfuggire all'identificazione. In secondo luogo, la lunghezza dei frammenti amplificati in questo tipo di analisi risulta molto più elevata dei prodotti comunemente ottenuti nelle reazioni di PCR. Lo *screening* con PCR delle cellule ES sottoposte a *gene targeting* richiede l'utilizzo di un *primer* oligonucleotidico all'interno della cassetta *neo^R* e di un secondo *primer* per il gene di interesse localizzato in una regione del gene non compresa nel costrutto utilizzato per il *gene targeting*; in questo modo, infatti, solo l'allele correttamente ricombinato può essere amplificato. Date le dimensioni dei bracci di omologia presenti nel nostro costrutto di inattivazione, lo *screening* dei cloni mediante PCR

richiedeva l'amplificazione di un frammento di oltre 2 kb, dimensioni superiori a quelle ottenibili con le tipiche reazioni di PCR con *Taq* o altre comuni DNA polimerasi batteriche.

Per questo progetto abbiamo quindi dovuto fare affidamento a procedure di PCR ad alta efficienza, testando e successivamente utilizzando una polimerasi altamente processiva: la polimerasi Phusion della ditta Finnzymes, in grado di produrre amplificati di grandi dimensioni. Oltre a permettere l'amplificazione di frammenti molto estesi, l'elevata efficienza di questo enzima comporta anche una drastica riduzione nei tempi di reazione: rispetto ad una reazione PCR con una normale *Taq* polimerasi richiede complessivamente circa 4 ore, mentre la PCR con il sistema Phusion richiede solo 90 minuti. Per la messa a punto delle condizioni ottimali di reazione per lo *screening* dei cloni, mi sono avvalsa dell'uso di un prezioso controllo positivo, rappresentato da un clone di cellule ES ottenuto in uno dei precedenti tentativi di *knockout* per il gene *Emilin3*. Il sistema di PCR basato sull'enzima Phusion ha comunque richiesto, prima di procedere con lo *screening* primario dei cloni ricombinanti, un lungo lavoro di ottimizzazione, per mettere a punto una reazione di PCR con il massimo della sensibilità e della specificità, variando le combinazioni dei *primer*, le temperature ed i tempi di reazione, la concentrazione del DNA genomico da analizzare. Infine, per aumentare la sensibilità e la specificità dello *screening* genotipico dei cloni mediante PCR, ho messo a punto una reazione *nested* che utilizza per una seconda reazione una coppia di oligonucleotidi interni all'amplificato ottenuto dalla prima reazione. Con questa seconda reazione ho dimostrato che è possibile ottenere un amplificato visibile anche nel caso in cui la prima reazione appaia negativa, aumentando considerevolmente la sensibilità dello *screening*.

Nello *screening* primario dei 996 cloni di cellule ES, utilizzando le condizioni di PCR così ottimizzate, abbiamo identificato complessivamente sette cloni ricombinanti omologhi. Considerando il numero totale di cloni sottoposti allo *screening*, la frequenza di ricombinazione omologa ottenuta nell'esperimento di inattivazione mirata in grande scala per il gene *Emilin3* è dello 0,7%. Tale frequenza risulta particolarmente bassa se paragonata alle frequenze di ricombinazione omologa mediamente dimostrate per altri geni. Ad esempio, studi di inattivazione genica mirata, eseguiti in precedenza nell'ambito di altri progetti di *knockout* nel nostro laboratorio, hanno evidenziato frequenze di ricombinazione variabili dal 10% (per il gene *Multimerin2*) al 3% (per il gene *Col6a1*). Diversi studi in letteratura hanno affrontato l'importante questione dell'efficienza del processo di ricombinazione omologa in cellule ES, dimostrando che diversi parametri sono in grado di influenzare tale processo; anche in condizioni sperimentali ottimali, la frequenza assoluta di ricombinazione è estremamente variabile fra i diversi *loci* genici e sembra dipendere primariamente dallo stato cromatinico del gene di interesse (Bollag et al., 1989). Fra i fattori endogeni in grado di influenzare la frequenza di ricombinazione omologa, vi è anche il livello di espressione del gene di interesse da parte delle cellule ES: a parità di altre condizioni, infatti,

geni espressi a livelli relativamente elevati in cellule ES presentano mediamente frequenze di ricombinazione più alte. Studi di RT-PCR condotti in precedenza nel nostro laboratorio hanno dimostrato livelli di espressione di *Emilin3* estremamente bassi in cellule ES (Miriam Zanetti e Paolo Bonaldo, dati non pubblicati), a differenza dalle altre Emiline, che risultano espresse a livelli molto più marcati nelle stesse cellule (Braghetta et al., 2004). Tale osservazione è quindi del tutto in accordo con la frequenza di ricombinazione particolarmente ridotta osservata per questo gene, sia negli esperimenti di inattivazione precedenti, sia in quello esposto in questa tesi.

Quattro dei sette cloni di cellule ES ricombinanti omologhi identificati con questo *screening* mediante PCR sono stati scelti per il trasferimento *in vivo*. Tali cloni, rispettivamente denominati con i numeri 2, 48, 698 e 706, sono stati quindi scongelati, mantenuti in coltura con grande cautela ed ulteriormente caratterizzati mediante Southern blot prima della microiniezione in blastocisti per la produzione di topi chimera. L'analisi di Southern blot, effettuata con una sonda per *Emilin3* esterna al costrutto ed una digestione del DNA genomico in grado di distinguere fra l'allele normale e quello correttamente ricombinato, ha confermato che i quattro cloni presentano entrambe le bande, con le corrette dimensioni, ed hanno quindi un genotipo eterozigote *Emilin3^{+/-}*, escludendo quindi sia l'eventuale presenza di falsi positivi sia la possibilità di errori avvenuti durante le complesse procedure di manipolazione e congelamento a cui era stato sottoposto il migliaio di cloni isolato inizialmente. Poiché il processo di ricombinazione casuale risulta molto più frequente del processo di ricombinazione omologa, ho eseguito ulteriori indagini allo scopo di escludere in questi quattro cloni la possibile presenza, oltre all'integrazione omologa, di una eventuale seconda integrazione casuale del costrutto nel genoma delle cellule ES. A tale scopo, ho progettato una reazione di PCR disegnata specificamente per l'amplificazione di una porzione della cassetta HSV-*tk*; tale cassetta è localizzata nel costrutto esternamente alla regione di omologia e viene persa in caso di ricombinazione omologa, mentre viene mantenuta quando il costrutto si integra in maniera casuale nel genoma. L'assenza di prodotti amplificati nei quattro cloni ricombinanti omologhi ha definitivamente escluso la presenza di integrazioni casuali del costrutto nel loro genoma.

Sulla base di queste evidenze, ciascuno dei quattro cloni di cellule ES è stato trasferito *in vivo* mediante iniezione in blastocisti, una procedura ampiamente utilizzata per la colonizzazione di embrioni ospiti da parte di cellule ES e conseguente produzione di topi chimera. I quattro cloni, al momento della microiniezione, non presentavano alcun segno di differenziamento nelle piastre di coltura ma apparivano come piccole colonie tondeggianti e dai margini ben definiti, confermando che le condizioni di coltura in cui sono sempre state mantenute le cellule ES erano ottimali. Per ogni clone sono stati eseguiti diversi cicli di microiniezione in blastocisti *wild-type* derivate da topi del ceppo C57BL/6; le blastocisti iniettate sono state quindi impiantate, in media 8-10 blastocisti

per ciascuna femmina, in femmine pseudogravide di ceppo CD1, scelto perché le femmine risultano molto robuste e premurose con i cuccioli, che quindi hanno molte più probabilità di sopravvivere.

Nelle procedure di produzione di topi chimera, le blastocisti e le cellule ES derivano da ceppi murini differenti e caratterizzati da un diverso colore del pelo, nel nostro caso rispettivamente nero per il ceppo C57BL/6 ed agouti per il ceppo 129/Sv. In questo modo, in seguito all'incorporazione delle cellule ES nella massa cellulare interna delle blastocisti ospiti e alla conseguente colonizzazione dei tessuti embrionali, si ottengono animali chimerici con un colore del pelo misto, nero ed agouti, in proporzioni variabili in base all'entità del contributo delle cellule ES ai tessuti dell'embrione. In base a precedenti studi avvenuti nel nostro laboratorio, è stato stimato che per ciascun clone di cellule ES, in condizioni ottimali di iniezione *in vivo*, un numero medio di 50-80 blastocisti iniettate ed impiantate è in genere sufficiente per verificarne la totipotenza e la capacità di generare chimere. Nel nostro caso, sono state iniettate da 54 a 72 blastocisti per ciascuno dei cloni. Per tutti i cloni sono stati ottenuti dei cuccioli, indicando che le condizioni di coltura, iniezione e manipolazione delle blastocisti stesse erano ottimali e non avevano influito sulla loro vitalità e sullo sviluppo. Alcuni topi ottenuti presentavano un elevato grado di chimerismo, un buon indicatore dell'entità della colonizzazione delle cellule ES, con 6 chimere che presentavano un chimerismo superiore all'80%. Tra i quattro cloni, i migliori sono risultati il clone 2 ed il clone 706, che hanno dato origine rispettivamente a 4 ed 1 chimere con grado di chimerismo compreso tra 80 e 100%, mentre il clone 698 ha prodotto 12 chimere con un grado di chimerismo molto basso, dal 10% al 15%. Questi risultati molto promettenti, in quanto dimostrano una capacità molto marcata di questi cloni cellulari di colonizzare i tessuti ospiti, ci hanno permesso di supporre che le rispettive chimere fossero in grado di trasmettere alla progenie l'allele inattivato di *Emilin3*, data la probabile colonizzazione della linea germinale da parte delle cellule ES microiniettate. Infatti, un ampio numero di osservazioni effettuate nel laboratorio, all'interno di altri progetti di *knockout* e di iniezione di cellule ES in blastocisti, hanno evidenziato che topi chimera con un percentuale di chimerismo del 50% o superiore hanno un'ottima probabilità di trasmettere la mutazione nella linea germinale, e tale probabilità risulta ancora più elevata quando il chimerismo raggiunge valori fra l'80% ed il 100%.

Per comprendere se gli animali chimerici della generazione G_0 fossero in grado di trasmettere l'allele inattivato alla loro progenie e per ottenere topi eterozigoti ed infine omozigoti per l'allele inattivato, gran parte delle chimere ottenute, a partire da quelle con grado di chimerismo più elevato, è stata quindi accoppiata con topi *wild-type* del ceppo C57BL/6. Per due dei quattro cloni, il clone 2 ed il clone 706, è avvenuta la trasmissione della mutazione del gene *Emilin3* alla linea germinale, consentendo la generazione di topi F_1 con genotipo eterozigote (*Emilin3^{+/-}*) per la mutazione stessa. Per i cloni 27 e 698, invece, nonostante diverse chimere

ottenute presentassero un buon grado di chimerismo, non abbiamo osservato trasmissione dell'allele mutante alla linea germinale. Infatti, in un totale di più di cento cuccioli generati per ciascuno di questi due cloni, non è stato generato alcun cucciolo agouti eterozigote per l'allele inattivato, ma sono stati ottenuti esclusivamente cuccioli neri.

I risultati ottenuti nella produzione di chimere dai quattro cloni ES ricombinanti omologhi, e la loro capacità di trasmissione alla linea germinale, rispecchiano quanto emerso dai miei studi sul cariotipo dei diversi cloni isolati in questo esperimento. Infatti, dato che i precedenti tentativi del laboratorio di produrre topi *knockout* per *Emilin3* erano falliti anche a causa dell'instabilità cromosomica e del cariotipo aberrante dei cloni ES, parte del mio lavoro è stata dedicata ad una accurata analisi cariotipica dei cloni di cellule ES isolati in questo studio, nonché delle cellule ES R1 di partenza e di alcuni cloni di cellule ES ottenuti in altri esperimenti di inattivazione genica mirata di differenti geni della famiglia delle emiline/multimerine. Questa analisi ha dimostrato che le cellule ES della linea R1 al passaggio 15, circa lo stesso passaggio a cui i cloni ricombinanti omologhi sono stati trasferiti *in vivo*, contenevano circa l'85% di metafasi euploidi, confermando la loro bontà dal punto di vista cariotipico. Nell'analizzare i quattro cloni ricombinanti per *Emilin3* trasferiti *in vivo*, la correlazione tra cariotipo dei cloni e trasmissione dell'allele inattivato alla linea germinale è parsa subito evidente: per i cloni 27 e 698, con maggioranza di cellule ES aneuploidi, rispettivamente il 65% ed il 72%, non sono stati ottenuti infatti topi agouti nella generazione F₁, mentre il clone 2, con la quasi totalità di cellule euploidi, ha trasmesso l'allele mutante alla progenie, anche se finora ha generato un solo topo agouti eterozigote. Sorprendentemente, il clone 706, che ha offerto i risultati più positivi per quanto riguarda la generazione di topi eterozigoti, ha evidenziato in una frequenza elevata di piastre metafasiche una trisomia a carico del cromosoma 4. È riportato in letteratura che nelle cellule ES sono frequenti anomalie cromosomiche, soprattutto dopo ripetuti passaggi in coltura (Longo et al., 1997). In particolare, la trisomia del cromosoma 8 sembra conferire un vantaggio nella proliferazione per le cellule con cariotipo aberrante, che crescono più rapidamente rispetto alle cellule euploidi, portando alla deplezione ed infine alla perdita delle cellule ES con cariotipo normale. Questo fenomeno sembra essere una spiegazione per la mancata trasmissione, in molti casi, dell'allele inattivato alla linea germinale (Liu et al., 1997). Anche nel nostro caso, quindi, questa aberrazione cromosomica poteva teoricamente inficiare i topi *knockout* ottenuti dal clone 706, rendendoli potenzialmente trisomici e perciò del tutto inadatti alle analisi del fenotipo. Ho quindi effettuato un'analisi del cariotipo su linfociti estratti da milza di topi *wild-type* e topi *knockout* ottenuti da incroci fra individui maschi e femmina eterozigoti per l'allele inattivato e derivati dal clone 706. Questa analisi non rilevata evidenziato alcuna anomalia cariotipica in questi topi: tutte le metafasi osservate presentavano 40 cromosomi e non c'era traccia della fusione cromosomica a carico del cromosoma

4. Evidentemente, nel passaggio *in vivo* è avvenuta una selezione naturale per la trasmissione alla linea germinale delle poche cellule euploidi presenti nel clone 706. Una tipica popolazione di cellule ES consiste di cellule competenti per la trasmissione alla linea germinale e di una frazione variabile di cellule che non sono in grado di colonizzare i tessuti dell'embrione ospite o di contribuire alla linea germinale delle chimere. Probabilmente nel nostro caso le poche cellule euploidi del clone 706 appartenevano al primo gruppo e, nonostante i dati in letteratura documentino spesso l'effetto contrario, queste cellule hanno avuto il sopravvento sulle ben più numerose cellule con metafasi trisomiche. Rimane ancora da spiegare il motivo per cui cellule ES derivate da una linea euploide e mantenute in coltura in condizioni decisamente molto controllate siano riuscite comunque a dare origine a cloni fortemente aneuploidi, come alcuni cloni tra quelli ricombinanti omologhi (il 27 ed il 698), ma anche alcuni cloni di controllo elettroporati e selezionati ma non ricombinanti omologhi. Tuttavia, queste evidenze sembrano escludere la possibilità di una correlazione diretta tra l'inattivazione mirata del *locus Emilin3* e la produzione di anomalie nel cariotipo delle cellule ES elettroporate.

Nonostante il numero relativamente esiguo di topi eterozigoti finora ottenuti, dal loro incrocio siamo riusciti ad ottenere topi *knockout* per il *locus Emilin3* ($Emilin3^{-/-}$) derivati da due cloni indipendenti di cellule ES: il clone 2 ed il 706. Questi topi sono vitali e non presentano evidenti anomalie fenotipiche e sono apparsi alla nascita nei rapporti mendeliani corretti, senza sbilanciamenti in favore di uno dei due sessi. Per il clone 2, i rapporti mendeliani appaiono distorti, ma si tratta con buona probabilità di una osservazione fuorviante dovuto allo scarso numero di animali, sicuramente non significativo dal punto di vista statistico, ottenuto fino ad ora per questo clone. I topi $Emilin3^{-/-}$ sono stati caratterizzati mediante PCR ed RT-PCR: come atteso, nel genoma dei topi *knockout* è presente esclusivamente l'allele inattivato, mentre l'mRNA di Emilina-3 è espresso esclusivamente dai topi *wild-type* e in misura minore dai topi eterozigoti $Emilin3^{+/-}$, essendo invece del tutto assente nei topi $Emilin3^{-/-}$. Ciò conferma che il tipo di costrutto disegnato per l'inattivazione mirata del gene *Emilin3* porta effettivamente ad una completa incapacità di produzione di trascritti per Emilina-3 da parte dei due alleli mutati nei topi omozigoti *knockout*, dimostrando che non sono intercorsi fenomeni di riarrangiamenti genici o di produzione di trascritti per Emilina-3 in seguito ad imprevisti fenomeni quali promotori alternativi o *splicing* aberranti. Ulteriore e definitiva conferma potrà avvenire con la dimostrazione che non viene prodotta dai topi *knockout* alcuna proteina funzionale. Al momento non sono disponibili anticorpi specifici per Emilina-3 murina; abbiamo comunque già avviato una collaborazione con il Prof. Alfonso Colombatti (CRO-ICCS, Aviano; Università di Udine) mirata alla produzione di anticorpi policlonali e monoclonali specifici per questa proteina. In ogni caso, è ragionevole pensare che, data la totale assenza di mRNA normale nei topi *knockout*, non possa essere sintetizzato né tantomeno secreto

nella MEC alcun prodotto di Emilina-3. Infatti, come descritto prima, l'allele *Emilin3* mutato presenta una delezione di circa 0.4 kb nella regione codificante per i primi 50 residui aminoacidici della proteina, incluso il codone di inizio ed il peptide segnale, rendendolo perciò incapace di produrre alcun prodotto funzionale.

L'analisi del fenotipo di topi *knockout* per un gene di interesse rappresenta un lavoro lungo e laborioso, che prende spunto dal *pattern* di espressione spazio-temporale del gene stesso focalizzando l'analisi ai tessuti in cui il gene è maggiormente espresso. Un aspetto particolarmente peculiare di *Emilin3* in topo è la sua forte espressione nella cresta genitale a partire dallo stadio E12.5 di sviluppo, mantenendosi anche nell'adulto a livello di ovario e testicolo. Perciò, una prima analisi fenotipica effettuata nei topi *Emilin3^{-/-}* è stata la verifica della loro fertilità. I topi *knockout*, in accoppiamenti con topi *wild-type* del ceppo C57BL/6, si sono rivelati fertili. Infatti, sia incrociando maschi *knockout* con femmine *wild-type*, sia incrociando femmine *knockout* con maschi *wild-type*, sono stati ottenuti cuccioli vivi. Come ulteriore conferma, è stata ottenuta una progenie anche dall'incrocio fra topi *knockout* femmine e maschi.

Un altro aspetto interessante da indagare nello studio del fenotipo dei topi *Emilin3^{-/-}*, è rappresentato dall'analisi dell'apparato scheletrico dei topi *knockout* mediante colorazione delle cartilagini con alcian blue e delle ossa con alizarina. Infatti, gli esperimenti di ibridazione *in situ* condotti sia in topo sia in zebrafish hanno rivelato una forte espressione di *Emilin3* a livello delle cartilagini a stadi tardivi dello sviluppo. Ho avviato molto recentemente tale analisi, che richiede diverse settimane di lavoro per l'allestimento delle preparazioni istologiche, iniziando con un topo *wild-type* ed un topo *knockout* entrambi di circa 3 mesi di età. Sebbene si tratti di un'osservazione effettuata su una singola coppia di topi, e quindi con un significato del tutto preliminare, non ho riscontrato alcuna evidente anomalia nelle ossa lunghe, ma ho osservato una forte riduzione della componente cartilaginea a livello delle suture delle ossa piatte del cranio. Certamente può trattarsi di un dato di rilievo, ma queste analisi dovranno essere ripetute su un numero maggior di topi, e soprattutto a diversi stadi di sviluppo pre- e post-natale, per poter verificare l'effettivo coinvolgimento di Emilina-3 nella formazione delle cartilagini e nell'ossificazione.

Se i dati ottenuti con il *knockdown* delle due isoforme di Emilina-3 in zebrafish saranno confermati e quindi se questi due geni risulteranno rilevanti nella formazione corretta dei somiti nello zebrafish, in particolare del miotomo e quindi della futura muscolatura, sarà interessante anche effettuare nei topi *Emilin3^{-/-}* studi istologici approfonditi a livello dei muscoli, per rivelare un'eventuale funzione analoga anche per l'ortologo murino.

Studi precedenti avevano dimostrato che topi *knockout* *Emilina1^{-/-}* sono fortemente ipertesi; inoltre, recenti studi non pubblicati hanno evidenziato che anche i topi *knockout* per altre emiline/multimerine presentano valori pressori più elevati rispetto ai controlli. Perciò, abbiamo

effettuato alcune misure mirate alla rilevazione della pressione sistolica e diastolica dei topi Emilin3^{-/-}. Poiché i livelli pressori possono variare notevolmente in base al ceppo murino, abbiamo confrontato individui omozigoti *knockout* con individui *wild-type* derivati dallo stesso incrocio tra topi eterozigoti. I valori medi della pressione sistolica e diastolica, rilevate mediante *tail-cuff* in un intervallo di tempo di cinque giorni, sono risultati significativamente superiori nei topi *knockout* rispetto ai topi *wild-type*. Questo dato appare certamente di particolare rilievo, considerando la presenza di un fenotipo iperteso anche nei topi *knockout* per altre emiline/multimerine ed il ruolo del dominio EMI di Emilina-1 nella regolazione dell'attività del TGF- β 1 (Zacchigna et al., 2006). Una possibile ipotesi perciò è che nel topo vi sia potenziale interazione tra Emilina-3 ed i fattori della famiglia TGF- β tramite il dominio EMI, e che tale interazione possa svolgere qualche ruolo nella regolazione della pressione arteriosa. Tuttavia, tale ipotesi appare poco plausibile, almeno sulla base delle nostre conoscenze attuali, poiché sia in topo sia in zebrafish il gene per Emilina-3 non appare espresso nel sistema cardiocircolatorio a nessuno degli stadi analizzati. Va peraltro considerato che l'assenza di mRNA per Emilina-3 nel cuore e nei vasi sanguigni, rilevata mediante RT-PCR ed esperimenti di ibridazione *in situ*, pur essendo un dato di rilievo, non può però dare alcuna indicazione certa sull'effettiva localizzazione della proteina. Appare quindi di fondamentale importanza la produzione di anticorpi specifici per Emilina-3, grazie ai quali, mediante western blot e analisi immunostochimiche, si potrà individuare i distretti in cui Emilina-3 è accumulata. E' necessario inoltre precisare che i dati attualmente disponibili e relativi ai valori pressori dei topi Emilin3^{-/-} rivestono ancora una valenza preliminare. La rilevazione infatti è stata condotta su un numero relativamente esiguo di topi, sebbene omogenei tra loro per quanto riguarda l'età. Queste analisi saranno quindi estese nei prossimi mesi su un campione più ampio e rappresentativo di topi Emilin3^{-/-}, e saranno anche condotti ulteriori studi indagando altri parametri di funzionalità cardiovascolare nei topi *wild-type* e *knockout* e la loro risposta a diversi stimoli vasodilatatori e vasocostrittori.

E' necessario in ogni caso sottolineare che i topi *knockout* ottenuti per il momento possiedono un *background* genetico misto, dal momento che derivano in parte dal ceppo C57BL/6 ed in parte dal ceppo 129/Sv. Perciò le eventuali alterazioni fenotipiche riscontrate in questi topi dovranno essere indagate più accuratamente in topi Emilin3^{-/-} con *background* genetico puro. Negli studi di *knockout* in topo, ciò viene ottenuto mediante 8-10 successivi reincroci (*backcrossing*) dei topi mutanti per il gene di interesse con topi *wild-type* di ceppo *inbred* aventi *background* puro. Al momento sto effettuando gli incroci iniziali di *backcrossing* dei topi Emilin3^{-/-} di prima generazione con topi *wild-type* di ceppo C57BL/6; quando arriverò all'ottava o alla nona generazione, potrò considerare i topi *knockout* geneticamente puri. In questi topi *knockout* di ceppo puro le analisi fenotipiche potranno essere condotte con maggiore efficienza ed accuratezza,

perché dal punto di vista del *background* genetico tutti gli individui *knockout* saranno perfettamente paragonabili sia tra di loro sia con i topi *wild-type*, e quindi alterazioni anche fini rivelate negli individui *knockout* avranno una valenza significativa e saranno da imputare esclusivamente all'inattivazione genica di *Emilin3*.

In conclusione, gli studi effettuati in parallelo in due organismi modello così diversi eppure così strettamente correlati come lo zebrafish ed il topo si sono rivelati reciprocamente utili, in quanto la facilità nell'effettuare lo studio dell'espressione e della funzione delle emiline in *Danio rerio* mi ha permesso, ben prima di riuscire ad effettuare analoghi studi nel topo, di gettare le basi per le future analisi del fenotipo dei topi *knockout*. Allo stesso tempo, la conoscenza dell'espressione e della funzione delle emiline nel topo mi ha permesso di comprendere maggiormente i dati di espressione ottenuti per tutti i componenti della famiglia nello zebrafish ed ha posto le basi per studi funzionali futuri in zebrafish che potrebbero interessare, oltre ad *Emilina-3*, anche le altre proteine della famiglia delle emiline/multimerine, potenzialmente implicate nello sviluppo e nella funzione del sistema cardiovascolare, ma anche di altre strutture, come le pinne e lo scheletro.

Bibliografia

- **Abe K., Niwa H., Iwase K., Takiguchi M., Mori M., Abe S.I., Abe K., Yamamura K.I.** (1996). Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell. Res.* **25**, 27-34.
- **Agrotis A., Kalinina N., Bobik A.** (2005). Transforming growth factor-beta, cell signaling and cardiovascular disorders. *Curr Vasc Pharmacol.* **1**, 55-61.
- **Alison M.R., Poulson R., Jeffery R., Dhillon A.P., Quaglia A., Jacob J., Novelli M., Prentice G., Williamson J., Wright N.A.** (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* **406**, 257.
- **al Shani R., Kinnaird J., Burke J., Bishop J., Bishop J.O.** (1990). Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by chromosomal position effect. *Mol. Cell. Biol.* **10** 1192-1198.
- **Altman P.L., Katz D.D., eds** (1979). *Inbred and genetically defined strains of laboratory animals*. Part I: Mouse and rat. Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, Maryland.
- **Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- **Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S., Chiu C.P., Harris C.P., Waknitz M.A., Itskovitz-Eldor J., Thomson J.A.** (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol.* **227**, 271-8.
- **Amma L.L., Goodyear R., Faris J.S., Jones I., Ng L., Richardson G., Forrest D.** (2003). An emilin extracellular matrix protein identified in the cochlear basilar membrane. *Mol. Cell. Neurosc.* **23**, 460-472.
- **Amsterdam A., Burgess S., Golling G., Chen W., Sun Z., Townsend K., Farrington S., Haldi M., Hopkins N.** (1999). A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev* **13**, 2713–2724.
- **Amsterdam A., Lin S., Hopkins N.** (1995). The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol.* **171(1)**, 123-9.
- **Amsterdam A., Lin S., Moss L.G., Hopkins N.** (1996). Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. *Gene* **173**, 99–103.
- **Amsterdam A., Nissen R.M., Sun Z., Swindell E.C., Farrington S., Hopkins N.** (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12792-12797.

- **Argenton F., Zecchin E., Bortolussi M.** (1999). Early appearance of pancreatic hormone expressing cells in the zebrafish embryo. *Mech. Dev.* **87**: 217-221.
- **Babinet C., Cohen-Tannoudji M.** (2001). Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazing versatile tool for the study of mammalian biology. *An. Acad. Bras. Cienc.* **73**, 366-383.
- **Balling R., Brown S. D.M., Hrabe de Angelis M., Justice M., Nadean J., Peters J.** (2000). Great time for mouse genetics; getting ready for large scale ENU mutagenesis. *Mamm. Genome* **11**, 471-478.
- **Bassett D.I., Currie P.D.** (2003). The zebrafish as a model for muscular dystrophy and congenital myopathy. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 2**, R265-270.
- **Bedell M.A., Largaespada D.A., Jenkins N.A., Copeland N.G.** (1997). Mouse models of human disease. Part II: Recent progress and future directions. *Genes & Dev.* **11**, 11-43.
- **Belien J.A., van Diest P.J., Baak J.P.** (1999). Relationships between vascularization and proliferation in invasive breast cancer. *J. Pathol.* **189**, 309-318.
- **Berdougo E., Coleman H., Lee D.H., Stainier D.Y., Yelon D.** (2003). Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development* **130(24)**: 6121-9.
- **Berghmans S., Jette C., Langenau D., Hsu K., Stewart R., Look T., Kanki J.** (2005). Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *Biotechniques* **39**, 227-237.
- **Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L.** (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**, 534-7.
- **Bollag R.J., Watdman A.S., Liskay M.R.** (1989). Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Annual Rev. Genet.* **23**: 199-225.
- **Bonaldo P., Braghetta P., Zanetti M., Piccolo S., Volpin D., Bressan G.M.** (1998b). Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: an animal model for Bethlem myopathy. *Hum. Mol. Genet.* **7(13)**:2135-40.
- **Bonaldo P., Chowdhury K., Stoykova A., Torres M., Gruss P.** (1998). Efficient Gene Trap Screening for Novel Developmental Genes Using IRES_geo Vector and *in Vitro* Preselection. *Exp. Cell Res.* **244**, 125-136.
- **Braat A.K., van de Water S., Korving J., Zivkovic D.** (2001). A zebrafish vasa morphant abolishes vasa protein but does not affect the establishment of the germline. *Genesis* **30(3)**, 183-185.
- **Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E.** (1984). Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* **309**, 255-256.

- **Braghetta P., Ferrari A., de Gemmis P., Zanetti M., Volpin D., Bonaldo P., Bressan G.M.** (2002). Expression of the EMILIN-1 gene during mouse development. *Matrix Biol.* **21**, 603-609.
- **Braghetta P., Ferrari A., de Gemmis P., Zanetti M., Volpin D., Bonaldo P., Bressan G.M.** (2004). Overlapping, complementary and site-specific expression pattern of genes of the EMILIN/Multimerin family. *Matrix Biol.* **22(7)**, 549-556.
- **Brazelton T.R., Rossi F.M., Keshet G.I., Blau H.M.** (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-9.
- **Bressan G.M., Castellani I., Colombatti A., Volpin D.** (1983). Isolation and characterization of a 115,000-dalton matrix-associated glycoprotein from chick aorta. *J. Biol. Chem.* **258**, 13262-13267.
- **Bressan G.M., Daga-Gordini D., Colombatti A., Castellani I., Marigo V., Volpin D.** (1993). Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J. Cell Biol.* **121**, 201-212.
- **Brinster R.L.** (1974). The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* **140(4)**, 1049-56.
- **Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M., Senear A.W., Warren R., Palmiter R.D.** (1981). Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27**, 223-31.
- **Brinster R.L., Chen H.Y., Messine A., van Dyke T., Levine A.J., Palmiter R.D.** (1984). Transgenic mice harbouring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumor. *Cell* **37**, 367-379.
- **Brook F.A., Gardner R.L.** (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 5709-5712.
- **Brown S.D., Balling R.** (2001). Systematic approaches to mouse mutagenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 268-273.
- **Brown S.D., Nolan P.M.** (1998). Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. *Human mol. Genet.* **7(10)**, 1627-1633.
- **Brownlie A., et al.** (1998) Positional cloning of the zebrafish sauterne gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nature Genet.* **20**, 244–250.
- **Capecchi M.R.** (2001). Generating mice with targeted mutations. *Nat. Med.* **7(10)**, 1086-90.
- **Cecconi F., Meyer B.I.** (2000). Gene trap: a way to identify novel genes and unravel their biological function. *FEBS Lett.* **480**, 63-71.

- **Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A.** (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643–655.
- **Charles D.R.** (1950). Radiation-induced mutations in mammals. *Radiol.* **55**, 579-581.
- **Christian S., Ahorn H., Novatchkova M., Garin-Chesa P., Park J.E., Weber G., Eisenhaber F., Rettig W.J., Lenter M.C.** (2001). Molecular cloning and characterization of EndoGlyx-1, an EMILIN-like multisubunit glycoprotein of vascular endothelium. *J. Biol. Chem.* **276**, 48588-48595.
- **Christoffels A., Koh E.G., Chia J.M., Brenner S., Aparicio S., Venkatesh B.** (2004). Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol. Biol. Evol.* **21**:1146-1151.
- **Chuang P.T., McMahon A.P.** (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397(6720)**:617-21.
- **Clarke D.L., Johansson C.B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H., Lendahl U., Frisè J.** (2000). Generalised potential of adult neural stem cells. *Science* **288**, 1660-1663.
- **Colombatti A., Bressan G.M., Castellani I., Volpin D.** (1985). Gp115, a glycoprotein isolated from blood vessels, is widely distributed in connective tissue. *J. Cell Biol.* **100**, 18-26.
- **Colombatti A., Doliana R., Bot S., Canton A., Mongiat M., Mungiguerra G., Paron-Cilli S., Spessotto P.** (2000). The EMILIN protein family. *Matrix Biol.* **19**, 289-301.
- **Colombatti A., Poletti A., Bressan G.M., Carbone A., Volpin D.** (1987). Widespread codistribution of glycoprotein gp 115 and elastin in chick eye and other tissues. *Coll. Relat. Res.* **7**, 259-275.
- **Copeland, N.G., N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, J.T. Eppig, L.J. Maltais, J.C. Miller, W.F. Dietrich, A. Weaver, S.E. Lincoln, R.G. Steen, L.D. Stein, J.H. Nadeau, and E.S. Lander** (1993). A genetic linkage map of the mouse: Current applications and future prospects. *Science* **262**, 57-66.
- **Corey D., Abrams J.** (2001). Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development. *Genome Biology* **2**, 1015.1–1015.3.
- **Costantini F., Lacy E.** (1981). Introduction of a rabbit γ -globin gene into the mouse germ line. *Nature* **294**, 92-94.
- **Cui Z., Clark K.J., Kaufman C.D., Hackett P.B.** (2001). Inhibition of skiA and skiB gene expression ventralizes zebrafish embryos. *Genesis* **30**, 149–153.

- **Daga-Gordini D., Bressan G.M., Castellani I., Volpin D.** (1987). Fine mapping of tropoelastin-derived components in the aorta of developing chick embryo. *Histochem. J.* **19**, 623-632.
- **Dani C., Smith A.G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C., Ailhaud G.** (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J. Cell Sci.* **110**, 1279-85.
- **Danielian P.S., Muccino D., Rowitch D.H., Michael S.K., McMahon A.P.** (1998). Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr. Biol.* **3;8(24)**,1323-6
- **Deng C., Capecchi M.R.** (1992). Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and targeting locus. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3365-3371.
- **Detrich H.W., Zon L.I., Westerfeld M.** (1998a). *The Zebrafish, Vol 2: Genetics and Genomics*. New York: Academic.
- **Detrich H.W., Zon L.I., Westerfeld M.** (1998b). *The Zebrafish, Vol 1: Biology*. New York: Academic.
- **Dodd A., et al.** (2004). Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS Lett.* **561**, 89–93.
- **Doetschman T.C., Eistetter H.R., Katz M., Schmidt W., Kemler R.** (1985). The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.* **87**, 27
- **Doetschman T., Gregg R.G., Maeda N., Hooper M.L., Melton D.W., Thompson S., Smithies O.** (1987). Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* **330**, 576-8.
- **Doi M., Nagano A., Nakamura Y.** (2004). Molecular cloning and characterization of a novel gene, *EMILIN-5*, and its possible involvement in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **313**, 888-893.
- **Doliana R., Bot S., Bonaldo P., Colombatti A.** (2000a). EMI, a novel cysteine-rich domain of EMILINs and other extracellular proteins, interacts with the gC1q domains and participates in multimerization. *FEBS Lett.* **484**, 164-168.
- **Doliana R., Bot S., Mungiguerra G., Canton A., Paron Cilli S., Colombatti A.** (2001). Isolation and characterization of EMILIN-2, a new component of the growing EMILINs family and a member of the EMI domain-containing superfamily. *J. Biol. Chem.* **276**, 12003-12011.

- **Doliana R., Canton A., Bucciotti F., Mongiat M., Bonaldo P., Colombatti A.** (2000b). Structure, Chromosomal Localization and Promoter Analysis of the Human Elastin Microfibril Interface located protein (EMILIN) Gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 785-792.
- **Doliana R., Mongiat M., Bucciotti F., Giacomello E., Deutzmann R., Volpin D., Bressan G.M., Colombatti A.** (1999). EMILIN, a component of the elastic fiber and a new member of the C1q/tumor necrosis factor superfamily of proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 16773-16781.
- **Doolittle D.P., Davisson M.T., Guidi J.N., Green. M. C.** (1996). *Catalog of mutant genes and polymorphic loci*. In Genetic variants and strains of the laboratory mouse, 3rd ed. (ed. M.F. Lyon, S. Rastan, and S.D.M. Brown), pp. 17- 854. Oxford University Press, Oxford, UK.
- **Draper B.W., Morcos P.A., Kimmel C.B.** (2001). *Genesis* **30**, 154–156.
- **Driever W., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Neuhaus S.C., Malicki J., Stemple D.L., Stainier D.Y., Zwartkuis F., Abdelilah S., Rangini Z., Belak J., Boggs C.** (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* **123**, 37–46.
- **Drummond I.A., Majumdar A., Hentschel H., Elger M., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Neuhaus S.C., Stemple D.L., Zwartkuis F., Rangini Z., Driever W., and Fishman M.C.** (1998). Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* **125**, 4655–4667.
- **Ekker S.C., Larson J.D.** (2001). Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* **30**, 89–93.
- **Ernest S., Rauch G.J., Haffter P., Gelsler R., Petlt C., Nicolson T.** (2000). Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for hereditary deafness. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2189-2196.
- **Essner J., Johnson R., Hackett P.J.** (1999). Overexpression of thyroid hormone receptor alpha 1 during zebrafish embryogenesis disrupts hindbrain patterning and implicates retinoic acid receptors in the control of hox gene expression. *Differentiation* **65**, 1–11.
- **Eugster C., Panáková D., Mahmoud A., Eaton S.** (2007). Lipoprotein-heparan sulfate interactions in the Hh pathway. *Dev. Cell* **13(1)**:57-71.
- **Evans M.J., Kaufman M.H.** (1981). Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- **Fan L., Alestrom A., Alestrom P., Collodi P.** (2004). Development of cell cultures with competency for contributing to the zebrafish germ line. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **14**, 43–51.
- **Festing M.F.W.** (1994). Inbred strains of mice. *Mouse Genome*, **92**, 373-495.

- **Galli R., Borello U., Gritti A., Minasi M.G., Bjornson C., Coletta M., De Angelis M.G., Fiocco R., Cossu G., Vescovi A.L.** (2000). Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat. Neurosci.*, **3(10)**, 986-991.
- **Gao X., Kemper A., Popko B.** (1999). Advanced transgenic and gene-targeting approaches. *Neurochem. Res.* **24**, 1181-1188.
- **Gardner R.L., Brook F.A.** (1997). Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int. J. Dev. Biol.*, **41**, 235-243.
- **Geling A., Steiner H., Willem M., Bally-Cuif L., Haass C.** (2002). A γ -secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep.* **3(7)**, 688-694.
- **Gofflot F., Hall M., Morriss-Kay G.M.** (1997). Genetic patterning of the developing mouse tail at the time of posterior neuropore closure. *Dev. Dyn.* **210**: 431-445.
- **Goldsmith P., Harris W.A.** (2003). The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **14**, 11-18.
- **Golic K.G., Lindquist S.** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyze site-specific recombination in the Drosophila genome. *Cell* **59**, 499-509.
- **Goodell M.A., Jackson K.A., Majka S.M., Mi T., Wang H., Pocius J., Hartley C.J., Majesky M.W., Entman M.L., Michael L.H., Hirschi K.K.** (2001). Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann. NY Acad. Sci.* **938**, 208-18.
- **Gordon J.W., Ruddle F.H.** (1981). Integration and stable germ line transmission of gene injected into mouse pronuclei. *Science* **214**, 1244-1246.
- **Gordon J.W., Scangos J.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H.** (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 7380-7384.
- **Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfiling E., Kemler R.** (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9065-9069.
- **Green E.L., Roderick T.H.** (1966). *Biology of the laboratory Mouse*. Green E. L. ed. McGraw-Hill, New York.
- **Gridley T.** (1991). Insertional versus targeted mutagenesis in mice. *New Biol.* **3**, 1025-1034.
- **Grunwald D.J.** (1996). A fin-de siecle achievement: charting new waters in vertebrate biology. *Science* **274**, 1634-1635.
- **Grunwald D.J., Kimmel C.B., Westerfield M., Walker C., Streisinger G.** (1988). A neural degeneration mutation that spares primary neurons in the zebrafish. *Dev. Biol.* **126**, 115-128.

- **Grunwald D.J., Streisinger G.** (1992a). Induction of mutations in the zebrafish with ultraviolet light. *Genet. Res.* **59**, 93–101.
- **Grunwald D.J., Streisinger G.** (1992b). Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet. Res.* **59**, 103–116.
- **Guille M.** (1999). Molecular methods in developmental biology: Xenopus and zebrafish. In: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana.
- **Haffter P., Granato M., Brand M., Mullins M.C., Hammerschmidt M., Kane D.A., Odenthal J., van Eeden F.J.M., Jiang Y.J., Heisenberg C.P., Kelsch R.N., Furutani-Seiki M., Vogelsang E., Beuchle D., Schach U., Fabian C., Nusslein-Volhard C.** (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 1–36.
- **Halloran M.C., Sato-Maeda M, Warren JT, Su F, Lele Z, Krone PH, Kuwada JY, Shoji W.** (2000). Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* **127**, 1953–1960.
- **Hammer R.E., Brinster R.L., Rosenfeld M.G., Evans R.M., Mayo K.E.** (1985). Expression of human growth hormones-releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature* **315**, 413-416.
- **Hammerschmidt M., Blader P., Strahle U.** (1999). Strategies to perturb zebrafish development. *Methods Cell Biol.* **59**, 87–115.
- **Hammerschmidt M., Serbedzija G.N., McMahon A.P.** (1996). Genetic analysis of dorsoventral pattern formation in the zebrafish: requirement of a BMP-like ventralizing activity and its dorsal repressor. *Genes Dev.* **10**:2452-2461.
- **Harbers K., Jhanner D., Jaenisch R.** (1981). Microinjection of cloned retroviral genomes into the mouse zygote. Integration and stable transmission in the animal. *Nature* **293**, 540-542.
- **Hardouin S.N., Nagy A.** (2000). Mouse models for human disease. *Clin. Genet.*, **57**, 237-244.
- **Hasty P., Rivera-Pérez J., Bradley A.** (1991). The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5586-5591.
- **Hayward C.P., Cramer E.M., Song Z., Zheng S., Fung R., Massé J.M., Stead S.H., Podor T.J.** (1998). Studies of multimerin in human endothelial cells. *Blood* **91**, 1304-1317.
- **Hayward C.P., Furmaniak-Kazmierczak E., Cieutat A.M., Moore J.C., Bainton D.F., Nesheim M.E., Kelton J.G., Cote G.** (1995b). Factor V is complexed with multimerin in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules. *J. Biol. Chem.* **270**, 19217-19224.

- **Hayward C.P., Hassell J.A., Denomme G.A., Rachubinski R.A., Brown C., Kelton J.G.** (1995a). The cDNA sequence of human endothelial cell multimerin. A unique protein with RGDS, coiled-coil, and epidermal growth factor-like domains and a carboxyl terminus similar to the globular domain of complement C1q and collagens type VIII and X. *J. Biol. Chem.* **270**, 18246-18251.
- **Hayward C.P., Kelton J.G.** (1995). Multimerin. *Curr. Opin. Hematol.* **2**, 339-344.
- **Hayward C.P., Warkentin T.E., Horsewood P., Kelton J.G.** (1991). Multimerin: a series of large disulfide-linked multimeric proteins within platelets. *Blood* **77**, 2556-2560.
- **Heiniger H.J., Dorey J.J.** (1980). *Handbook on genetically standard Jax mice*. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine.
- **Henikoff S., Till B., Comai L.** (2004). TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiology* **135**, 630–636.
- **Herzog W., Zeng X., Lele Z., Sonntag C., Ting J., Chang C., Hammerschmidt M.** (2003) Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Developmental Biology* **254**, 36–49.
- **Hill A., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.** (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Science* **86**, 6–19.
- **Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E.** (1994). *Manipulation the Mouse Embryo. A laboratory manual, second edition*. Developmental Genetics and Embryology of the Mouse: Past, Present, and Future. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 7-18.
- **Iannaccone P., Zhon X., Khokha M., Boucher D., Kuehn M.** (1992). Insertional mutation of a gene involve in growth regulation of the early mouse embryo. *Dev. Dynam.* **194**, 198-208.
- **Imai Y., Talbot W.S.** (2001). Morpholino phenocopies of the bmp2b/swirl and bmp7/snailhouse mutations. *Genesis* **30**, 160–163.
- **Irwin W.A., Bergamin N., Sabatelli P., Reggiani C., Megighian A., Merlini L., Braghetta P., Columbaro M., Volpin D., Bressan G.M., Bernardi P., Bonaldo P.** (2003). Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat. Genet.* **35(4)**:367-71.
- **Isogai Z., Ono R.N., Ushiro S., Keene D.R., Chen Y., Mazzieri R., Charbonneau N.L., Reinhardt D.P., Rifkin D.B., Sakai L.Y.** (2003). Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J. Biol. Chem.* **278(4)**:2750-7.
- **Jackson K.A., Mi T., Goodell M.A.** (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96(25)**, 14482-6.
- **Jaenisch R.** (1997) DNA methylation and imprinting. Why bother? *TIG*, **13**, 323-329.

- **Jaenisch R., Mintz B.** (1974). Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1250-1254.
- **Justice M. J.** (2000). Capitalising on large-scale mouse mutagenesis screens. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 109-115.
- **Kang S.H., Cho M.J., Kole R.** (1998). Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* **37**, 6235–6239.
- **Karlen S., Rebagliati M.** (2001). A morpholino phenocopy of the cyclops mutation. *Genesis* **30**, 126–128.
- **Keller G.M.** (1995) In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 862–869
- **Kessel M., Gruss P.** (1990). Murin developmental control genes. *Science* **249**, 374-379.
- **Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dynam.* **203**, 253-310.
- **Kishore U., Gaboriaud C., Waters P., Shrive A.K., Greenhough T.J., Reid K.B., Sim R.B., Arlaud G.J.** (2004). C1q and tumor necrosis factor superfamily: modularity and versatility. *Trends Immunol.* **25**, 551-61.
- **Ko Y.P., Kobbe B., Paulsson M., Wagener R.** (2005). Zebrafish (*Danio rerio*) matriline: shared and divergent characteristics with their mammalian counterparts. *Biochem. J.* **386**:367-379.
- **Kobayashi K., Ohye T., Pastan I., Nagatsu T.** (1996). A novel strategy for the negative selection in mouse embryonic stem cells operated with immunotoxin-mediated cell targeting. *Nucleic Acids Res.* **24(18)**, 3653-5.
- **Kramer J., Hegert C., Guan K., Wobus A.M., Muller P.K., Rohwedel J.** (2000). Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech. Dev.*, **92**, 193-205.
- **Kuehn M.R., Stoye J.P.** (1992). Insertional mutagenesis and mouse development. In *Development-The Molecular Genetic Approach*. Russov V. E. A., Brody S., Cove D., Ottolenghi S., Springer, Berlin pp. 420-439.
- **Kühn R., Schwenk F., Aguet M., Rajewsky K.** (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* **269(5229)**:1427-9.
- **Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M.** (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.*, **6(11)**, 1229-34.

- **Lawson N.D., Weinstein B.M.** (2002). Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 674-682.
- **Leahy A., Xiong J.W., Kuhnert F., Stuhlmann H.** (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J. Exp. Zool.* **284**, 67–81.
- **Lee C.S., Buttitta L., Fan C.M.** (2001). Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98(20)**:11347-52.
- **Leimeister C., Steidl C., Schumacher N., Erhard S., Gessler M.** (2002). Developmental expression and biochemical characterization of Emu family members. *Dev. Biol.* **249**, 204-218.
- **Lele Z., Bakkers J., Hammerschmidt M.** (2001). Morpholino phenocopies of the swirl, snailhouse, somitabun, minifin, silberblick, and pipetail mutations. *Genesis* **30**, 190–194.
- **Lewandoski M.** (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Rev. Genet.* **2**, 743-755.
- **Li S., Crenshaw E.R., Rawson E., Simmons D., Swanson L., Rosenfeld M.** (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. *Nature* **347**, 528–533.
- **Liu C., Knezevic V., Mackem S.** (2004). Ventral tail bud mesenchyme is a signaling center for tail paraxial mesoderm induction. *Dev. Dyn.* **229(3)** 600-6.
- **Liu W.Y., et al.** (2005). Efficient RNA interference in zebrafish embryos using siRNA synthesized with SP6 RNA polymerase. *Dev. Growth Differ.* **47**, 323–331.
- **Liu X., Wu H., Loring J., Hormuzdi S., Distèche C.M., Bornstein P., Jaenisch R.** (1997). Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission. *Dev. Dyn.* **209(1)**:85-91.
- **Long Q., Meng A., Wang H., Jessen J.R., Farrell M.J., Lin S.** (1997). GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development* **124**, 4105–4111.
- **Longo L., Bygrave A., Grosveld F.G., Pandolfi P.P.** (1997). The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res.* **6(5)**:321-8.
- **Lynch M., Force A.** (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154(1)**:459-73.
- **Ma C., Fan L., Ganassin R., Bols N., Collodi P.** (2001). Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 2461–2466.

- **Malicki J., Jo H., Wei X., Hsiung M., Pujic Z.** (2002). Analysis of gene function in the zebrafish retina. *Methods* **28**, 427–438.
- **Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R.** (1988). Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**, 348-352.
- **Maquat L.E.** (2002) Nonsense-mediated mRNA decay. *Curr. Biol.* **12**, R196-197.
- **Martin G.R.** (1981). Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7634-7638.
- **McCallum C., Comai L., Greene E., Henikoff S.** (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology* **18**, 455–457.
- **McMahon A.P., Bradley A.** (1990). The *Wnt-1 (int-1)* proto-oncogene is required for development of a large region of mouse brain. *Cell* **62**, 1073-1085.
- **Meisler M.H.** (1992). Insertional mutation of “classical” and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet.* **8**, 341-344.
- **Mezey E., Chandross K.J., Harta G., Maki R.A., McKercher S.R.** (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-82.
- **Miao M., Bruce A.E., Bhanji T., Davis E.C., Keeley F.W.** (2007). Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish. *Matrix Biol.* **26(2)**:115-24.
- **Milanetto M., Tiso N., Braghetta P., Volpin D., Argenton F., Bonaldo P.** (2008). Emilin genes are duplicated and dynamically expressed during zebrafish embryonic development. *Dev. Dyn.* **237(1)**:222-32.
- **Mintz B., Iilmensee K.** (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **72(9)**, 3585-9.
- **Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M., Yamanaka S.** (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**, 631–642.
- **Mongiat M., Mungiguerra G., Bot S, Mucignat M.T., Giacomello E., Doliana R., Colombatti A.** (2000). Self-assembly and supramolecular organization of EMILIN. *J. Biol. Chem.* **275**, 25471-25480.
- **Mongiat M., Ligresti G., Marastoni S., Lorenzon E., Doliana R., Colombatti A.** (2007). Regulation of the extrinsic apoptotic pathway by the extracellular matrix glycoprotein EMILIN2. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7176-87.

- **Morse D.R., Wilcko J.M., Pullon P.A., Furst M.L., Passo S.A.** (1981). A comparative tissue toxicity evaluation of the liquid components of gutta-percha root canal sealers. *J. Endod.* **7**, 545-50.
- **Mortensen R.M., Zubiatur M., Neer E.J., Seidman J.G.** (1991). Embryonic stem cells lacking a functional inhibitory G-protein subunit (alpha i2) produced by gene targeting of both alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**, 7036-40.
- **Mould A.P., McLeish J.A., Huxley-Jones J., Goonesinghe A.C., Hurlstone A.F., Boot-Handford R.P., Humphries M.J.** (2006). Identification of multiple integrin beta1 homologs in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Cell Biol.* **20**:7-24.
- **Müller U.** (1999). Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech. Dev.* **82**, 3-21.
- **Mullins M., Nusslein-Volhard C.** (1993). Mutational approaches to studying embryonic pattern formation in the zebrafish. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **3**, 648–654.
- **Nagy A., Moens C., Ivanyi E., Pawling J., Gertenstein M., Hadjantonakis A.K., Pirity M., Rossant J.** (1998). Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr. Biol.* **8**, 661-4.
- **Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R.** (2003). *Manipulating the Mouse Embryo. A laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Nasevicius A., Ekker S.C.** (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**, 216–220.
- **Needleman S.B., Wunsch C.D.** (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**:443-453.
- **Neely M.N., Pfeifer J.D., Caparon M.** (2002). Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infect. Immun.* **70**, 3904-3914.
- **Neumann C.J., Grandel H., Gaffield W., Schulte-Merker S., Nüsslein-Volhard C.** (1999). Transient establishment of anteroposterior polarity in the zebrafish pectoral fin bud in the absence of sonic hedgehog activity. *Development* **126(21)**:4817-26.
- **Nica G., Herzog W., Sonntag C., Hammerschmidt M.** (2004) Zebrafish pit1 mutants lack three pituitary cell types and develop severe dwarfism. *Molecular Endocrinology* **18**, 1196–1209.
- **Nichols J., Evans E.P., Smith AG.** (1990). Establishment of germ-linecompetent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* **110(4)**, 1341-8.
- **Nichols J., Zevnik B., Anastassiadis K., Niwa H., Klewe-Nebenius D., Chambers I., Scholer H., Smith A.** (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95(3)**, 379-91.

- **Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G.** (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat.Genet.* **24**, 372-6.
- **Nusslein-Volhard C., Wieschaus E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795–801.
- **Oxtoby E., Jowett T.** (1993). Cloning of the zebrafish *krox-20* gene (*krx-20*) and its expression during hindbrain development. *Nucleic Acids Res.* **21**:1087-1095.
- **Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Brinberg N.C., Evans R.M.** (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with a metallothionein-growth hormone fusion gene. *Nature* **300**, 611-615.
- **Pereira L., D'Alessio M., Ramirez F., Lynch J.R., Sykes B., Pangilinan T., Bonadio J.** (1993). Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 961-968.
- **Peterson B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P.** (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-1170.
- **Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R.** (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
- **Postlethwait J., Amores A., Cresko W., Singer A., Yan Y.L.** (2004). Subfunction partitioning, the teleost radiation and the annotation of the human genome. *Trends Genet.* **20**:481-490.
- **Postlethwait J., Amores A., Force A., Yan Y.L.** (1999). The zebrafish genome. *Methods Cell Biol.* **60**, 149–163.
- **Prouty M.G., Correa N.E., Barker L.P., Jagadeeswaran P., Klose K.E.** (2003). Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**, 177-182.
- **Raible F., Brand M.** (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by *Fgf* signaling during early zebrafish development. *Mech. Dev.* **107(1-2)**:105-17.
- **Ramirez-Solis R., Lin P., Bradley A.** (1995). Chromosomal engineering in mice. *Nature* **378**, 720-724.
- **Reifers F., Bohli H., Walsh E.C., Crossley P.H., Stainier D.Y., Brand M.** (1998). *Fgf8* is mutated in zebrafish acerebellar (*ace*) mutants and is required for maintenance of midbrain–hindbrain boundary development and somitogenesis. *Development* **125**:2381–2395.
- **Rijkers T., Peetz A., Ruther U.** (1994). Insertional mutagenesis in transgenic mice. *Transgenic Res.* **3**, 203-215.

- **Riley B., Chiang M., Storch E., Heck R., Buckles G., Lekven A.** (2004) Rhombomere boundaries are Wnt signaling centers that regulate metameric patterning in the zebrafish hindbrain. *Dev. Dynam.* **231**, 278–291.
- **Russell L.B.** (1991). Factors that affect the molecular nature of germ-line mutations recovered in the mouse specific-locus test. *Environ. Mol. Mutagenesis* **18**, 298-302.
- **Russell L.B.** (2000). In *Mutation and the Environment*, Part C, Willey, New York.
- **Russell W.L.** (1951). X-ray-induced mutations in mice. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**, 327-336.
- **Sadler K., Amsterdam A., Soroka C., Boyer J., Hopkins N.** (2005). A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps18, nf2 and foie gras as models of liver disease. *Development* **132**, 3561–3572.
- **Sanz-Moncasi M.P., Garin-Chesa P., Stockert E., Jaffe E.A., Old L.J., Rettig W.J.** (1994). Identification of a high molecular weight endothelial cell surface glycoprotein, endoGlyx-1, in normal and tumor blood vessels. *Lab. Invest.* **71**, 366-373.
- **Sauer B.** (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* **14(4)**, 381-92.
- **Sauer B., Henderson N.** (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **85**, 5166-5170.
- **Schwartzberg P.L., Goff S.P., Robertson E.J.** (1989). Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells. *Science* **246**, 799-803.
- **Seale P., Asakura A., Rudnicki M.A.** (2001). The potential of muscle stem cells. *Dev. Cell.* **1(3)**, 333-42.
- **Shapiro L., Scherer P.E.** (1998). The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr. Biol.* **8**, 335-338.
- **Shockett P.E., Schatz D.G.** (1996). Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5173-5176.
- **Smith A.G.** (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 435-62.
- **Smith A.G., Heath J.K., Donaldson D.D., Wong G.G., Moreau J., Stahl M., Rogers D.** (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-90.
- **Smith A.G., Hooper M.L.** (1987). Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **121**, 1-9.

- **Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A. Kucherlapati R.S.** (1985). Insertion of DNA sequence into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* **317**, 230-234.
- **Soriano P., Montgomery C., Geske R., Bradley A.** (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* **64**, 693-702.
- **Spessotto P., Bulla R., Danussi C., Radillo O., Cervi M., Monami G., Bossi F., Tedesco F., Doliana R., Colombatti A.** (2006). EMILIN1 represents a major stromal element determining human trophoblast invasion of the uterine wall. *J. Cell Sci.* **119**, 4574-84.
- **Spessotto P., Cervi M., Mucignat M.T., Mungiguerra G., Sartoretto I., Doliana R., Colombatti A.** (2003). β 1 Integrin-dependent Cell Adhesion to EMILIN-1 is mediated by the gC1q Domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 6160-6167.
- **Stainier D.Y., Fouquet B., Chen J.N., Warren K.S., Weinstein B.M., Meiler S.E., Mohideen M.A., Neuhaus S.C., Solnica-Krezel L., Schier A.F., Zwartkruis F., Stemple D.L., Malicki J., Driever W., Fishman M.C.** (1996). Mutations affecting the formation and function of the cardiovascular system in the zebrafish embryo. *Development* **123**, 285-292.
- **Stanford W.L., Cohn J.B., Cordes S.P.** (2001). Gene-Trap Mutagenesis: Past, Present and Beyond. *Nature Rev. Genet.* **2**, 756-768.
- **Stewart T.A., Pattenglae P.K., Leder P.** (1984). Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. *Cell* **38**, 627-637.
- **Storb U., O'Brien R.L., McMullen M.D., Gollahon K.A., Brinster R.L.** (1984). High expression of cloned immunoglobulin kappa gene in transgenic mice is restricted to B lymphocytes. *Nature* **310**, 238-241.
- **Stoykova A., Chowdhury K., Bonaldo P., Torres M., Gruss P.** (1998). Gene Trap Expression and Mutational Analysis for Genes Involved in the Development of the Mammalian Nervous System. *Dev. Dynam.* **212**, 198-213.
- **Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., Singer F.** (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**, 293-296.
- **Summerton J., Weller D.** (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Development* **7**, 187-195.
- **Sun L., Bradford C., Barnes D.** (1995). Feeder cell cultures for zebrafish embryonal cells in vitro. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **4**, 43-50.
- **Sun L., Zou Z., Collodi P., Xu F., Xu X., Zhao Q.** (2005). Identification and characterization of a second fibronectin gene in zebrafish. *Matrix Biol.* **24**:69-77.

- **Sun Z., Amsterdam A., Pazour G., Cole D., Miller M., Hopkins N.** (2004). A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney. *Development* **131**, 4085–4093.
- **Tatsumi K., Miyai K., Notomi T., Kaibe K., Amino N., Mizuno Y., Kohno H.** (1992). Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nature Genet.* **1**, 56–58.
- **Taylor J., Van de Peer Y., Braasch I., Meyer A.** (2001). Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **356**, 1661–1679.
- **Taylor M.R., Hurley J.B., Van Epps H.A., Brockerhoff S.E.** (2004). A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4584-4589.
- **te Riele H., Maandag E.R., Berns A.** (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA construct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5128-5132.
- **Thomas K.R., Folger K.R., Capecchi M.R.** (1986). High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* **44**, 419-28.
- **Thomas K.R., Capecchi M.R.** (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo derived stem cells. *Cell* **51**, 503-512.
- **Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- **Tomasiewicz H.G., Flaherty D.B., Soria J.P., Wood J.G.** (2002). Transgenic zebrafish model of neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* **70**, 734-745.
- **van der Putten H., Botteri F.M., Miller A.D., Rosenfeld M.G., Fran H., Evans R.M., Verma I.M.** (1985). Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6148-6152.
- **van Eeden F.J., Granato M., Schach U., Brand M., Furutani-Seiki M., Haffter P., Hammerschmidt M., Heisenberg C.P., Jiang Y.J., Kane D.A., Kelsh R.N., Mullins M.C., Odenthal J., Warga R.M., Allende M.L., Weinberg E.S., Nüsslein-Volhard C.** (1996). Mutations affecting somite formation and patterning in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**:153-64.
- **von Melchner H., DeGregori J.V., Rayburn H., Reddy S., Friedel C., Ruley H.E.** (1992). Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. *Genes Dev.* **6**, 919-927.

- **Wagner A.** (1998). The fate of duplicated genes: loss or new function? *Bioessays* **20**, 785–788.
- **Wagner E.F., Stewart T.A., Mintz B.** (1981). The human beta-globin gene and a functional thymidine kinase gene in developing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5016-5020.
- **Wagner T.E., Hoppe P.C., Jollick J.D., Scholl D.R., Hodinka R.L., Gault J.B.** (1981). Microinjection of a rabbit beta-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and the offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6376-6380.
- **Wang H., Long Q., Marty S.D., Sassa S., Lin S.** (1998). A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat. Genet.* **20**, 239-243.
- **Wang R., Clark R., Bautch V.L.** (1992). Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. *Development* **114**, 303-16.
- **Wei X., Malicki J.** (2002). *nagie oko*, encoding a MAGUK-family protein, is essential for cellular patterning of the retina. *Nat. Genet.* **31**, 150–157.
- **Weinberg E.S., Allende M.L., Kelly C.S., Abdelhamid A., Murakami T., Andermann P., Doerre O.G., Grunwald D.J., Riggelman, B.** (1996). Developmental regulation of zebrafish MyoD in *wild-type*, *no tail* and *spadetail* embryos. *Development* **122**, 271 -280.
- **Weinstein BM.** (1999). What guides early embryonic blood vessel formation? *Dev. Dyn.* **215**:2-11.
- **Westerfield M.** (1994). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of the Zebrafish (Danio Rerio)*. Eugene, OR: University of Oregon, Institute of Neuroscience.
- **Whitfield T.T.** (2002). Zebrafish as a model for hearing and deafness. *J. Neurobiol.* **53**, 157-171.
- **Wienholds E., Schulte-Merker S., Walderich B., Plasterk R.** (2002) Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. *Science* **297**, 99–102.
- **Wienholds E., van Eeden F., Kusters M., Mudde J., Plasterk R., Cuppen E.** (2003) Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Research* **13**, 2700–2707.
- **Williams R.L., Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A., Gough N.M.** (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-7.
- **Wolgemuth Brinster R.L., Palmiter R.D.** (1989). Transgenic mice overexpressing the mouse homeobox-containing gene *Hox-1.4* exhibit abnormal gut development. *Nature* **337**, 464-467.

- **Xu X., Meiler S.E., Zhong T.P., Mohideen M., Crossley D.A., Burggren W.W., Fishman M.C.** (2002). Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat. Genet.* **30**, 205-209.
- **Yagi T., Ikawa Y., Yoshida K., Shigetani Y., Takeda N., Mabuchi I., Yamamoto T., Aozawa S.** (1990). Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with the use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9918-9922.
- **Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S.** (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**, 92-6.
- **Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A.** (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **31**, 281-292.
- **Yoong S., O'Connell B., Soanes A., Crowhurst M.O., Lieschke G.J., Ward A.C.** (2007). Characterization of the zebrafish matrix metalloproteinase 9 gene and its developmental expression pattern. *Gene Expr. Patterns* **7(1-2)**:39-46.
- **Zacchigna L., Vecchione C., Notte A., Maretto S., Cifelli G., Dupont S., Ferrari A., Maffei A., Marino G., Cordenonsi M., Selvetella G., Aretini A., Colonnese C., Bettarini U., Russo G., Fabbro C., Soligo S., Adorno M., Braghetta P., Bonaldo P., Volpin D., Piccolo S., Lembo G., Bressan G.M.** (2006). Emilin-1, a cysteine-rich glycoprotein of elastic fibers, is required for blood pressure homeostasis by regulation TGF- β maturation. *Cell* **124**, 929-942.
- **Zambrowicz B.P., Friedrich G.A., Buxton E.C., Lilleberg S.L., Person C., Sands A.T.** (1998). Disruption and sequence identification of 2000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* **392**, 608-611.
- **Zanetti M., Braghetta P., Sabatelli P., Mura I., Doliana R., Colombatti A., Volpin D., Bonaldo P., Bressan G.M.** (2004). EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 638-650.
- **Zhang J., Bai S., Tanase C., Nagase H., Sarras M.P. Jr.** (2003). The expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev. Genes Evol.* **213(8)**:382-9.
- **Zhang J., Bai S., Zhang X., Nagase H., Sarras M.P. Jr.** (2003). The expression of gelatinase A (MMP-2) is required for normal development of zebrafish embryos. *Dev. Genes Evol.* **213(9)**:456-63.

- **Zhou X., Sasaki H., Lowe L., Hogan B.L., Kuehn M.R.** (1993). Nodal is a novel TGF- β -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**, 543-547.
- **Zon L., Peterson R.** (2005). In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews in Drug Discovery* **4**, 35-44.

Ringraziamenti

Sono moltissime le persone che vorrei ringraziare per essermi state vicino in diversi modi durante questi tre anni. Innanzitutto un grazie al Prof. Paolo Bonaldo per avermi sempre stimata e sostenuta, per avermi trasmesso conoscenze, ottimismo ed entusiasmo; alla Dott.ssa Paola Braghetta per avere contribuito alla mia formazione, per gli innumerevoli consigli e soprattutto per avermi insegnato la pazienza; al Prof. Dino Volpin per avere collaborato alla riuscita del mio progetto ed essersi sempre interessato alla sua realizzazione; al Direttore del Dipartimento, il Prof. Giorgio Bressan, per i preziosi suggerimenti, ed alla Prof.ssa Ines Castellani. Un grazie anche alle segretarie del Dipartimento per le loro attenzioni nei miei confronti ed i numerosi chiarimenti.

Grazie al Prof. Francesco Argenton per avere messo a mia disposizione conoscenze e risorse per gli studi condotti in zebrafish e alla Dott.ssa Natascia Tiso per la collaborazione nelle microiniezioni e nelle sedute di fotografia. Un ringraziamento alla Prof.ssa Majone per avermi insegnato con pazienza e dedizione l'affascinante tecnica dell'analisi del cariotipo. Un grazie anche al Prof. Giuseppe Lembo ed al suo gruppo per avermi fornito in tempi brevissimi i risultati della rilevazione della pressione nei topi *knockout*.

Un grandissimo grazie al mio laboratorio: vecchi maestri, in particolare Miriam, Marija e Kosi, ed attuali colleghi (Tania, Paolo, Anna, Erika, Matilde, Paola, Alvisè, Dario, Gaia, Nicola, Alessandra) per le chiacchierate, l'aiuto, i consigli e le risate. Nuovamente grazie ad Alvisè per il suo aiuto nella realizzazione di alcuni esperimenti nell'ambito del progetto di inattivazione mirata in topo e ad Erika per la collaborazione nel taglio code.

Un grosso grazie a Marija per il sostegno a distanza e per avere passato a me il testimone sull'inattivazione genica mirata di *Emilin3*: alla fine ce l'abbiamo fatta! Un ringraziamento anche a Graziano, Ananth e Masafumi per la loro gentilezza, i passaggi in macchina ed i piani di viaggio. Grazie soprattutto al gruppo del prof. Argenton, in particolare Natascia, Nicola, Enrico, Enrico, Alice e Francesca, tra cui ho trovato sincera amicizia, aiuto disinteressato ed innumerevoli consigli... un grazie di cuore: la collaborazione con voi è stata uno degli aspetti più belli e produttivi del mio dottorato!

Ringrazio inoltre i miei genitori e le mie sorelle Anna Caterina e Cristina perché ogni tanto cercano di capire che cosa sto facendo: spero che leggendo questa tesi riescano ad avere le idee un po' più chiare! Grazie perché mi siete sempre vicino e mi sostenete con simpatia in ogni modo possibile. Un grazie, il più grande, ad Alessio per le imitazioni, le risate, i chichessia, i consigli, le tabelle, i post-it, le litigate, le tabulazioni, i viaggi e le serate passate a trasformare i sogni in realtà... sono solo due righe, ma sai già quante altre cose avrei da dirti! Un grazie infine a tutte le persone che hanno contribuito anche solo con un sorriso a rendere più felice ogni giorno di questi tre anni...