

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze farmacologiche e tossicologiche,
dello sviluppo e del movimento umano

Ciclo XXXII

Settore Concorsuale: 05/F1

Settore Scientifico Disciplinare: BIO/13

Ruolo del gene umano *CYYR1*: dallo studio funzionale dell'orologio in *Danio rerio*
alla potenziale implicazione in processi tumorigenici

Presentata da: Pizzetti Fabrizio

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Hrelia Patrizia

Supervisore

Prof.ssa Frabetti Flavia

Esame finale anno 2020

<i>INTRODUZIONE</i>	5
La genomica funzionale nello studio dei processi tumorali.....	6
Il locus <i>CYYR1</i> in <i>Homo sapiens</i>	7
<i>CYYR1</i> nella letteratura scientifica.....	10
<i>CYYR1</i> e il pathway di Sonic Hedgehog.....	11
<i>CYYR1</i> e le cellule endoteliali.....	15
Il modello animale <i>Danio rerio</i>	15
Lo sviluppo embrionale del pesce zebra.....	17
Il gene <i>cyrr1</i> in <i>Danio rerio</i>	22
Il differenziamento cellulare come unità di base dello sviluppo.....	23
La miogenesi nei mammiferi.....	25
La miogenesi nei teleostei.....	28
Incapacità differenziativa nei rhabdomyosarcomi.....	31
<i>PARTE I</i>	35
Esperimenti di sovraespressione e perdita di funzione del gene <i>cyrr1</i> in <i>Danio rerio</i>	35
Materiali e metodi.....	36
Cura e mantenimento del modello animale <i>Danio rerio</i>	36
Accoppiamento e raccolta delle uova.....	37
Linee di zebrafish.....	39
Microiniezione in uova fecondate.....	40
Trascrizione in vitro del costrutto pCSII <i>cyrr1</i>	41
Colorazione di sezioni con ematossilina eosina.....	42
Whole-mount in situ hybridization (WISH).....	42
Immunofluorescenza (IF).....	44
Risultati.....	45
Summary dei Risultati della PARTE I.....	55
<i>PARTE II</i>	56
Studio di espressione del gene <i>CYYR1</i> nella miogenesi in relazione al pathway di Sonic Hedgehog.....	57
Materiali e metodi.....	57
Estrazione di RNA embrioni di <i>Danio rerio</i>	57
Linee cellulari e protocollo differenziativo.....	59
Trattamenti cellulari con SAG e Forskolina.....	60
Trattamenti con ciclopamina su embrioni di <i>Danio rerio</i>	61
Estrazione di RNA dalle linee cellulari.....	61
RT-PCR.....	61
Real-time PCR (qPCR).....	63
Estrazione proteica da linee cellulari.....	64
Estrazione proteica da embrioni di <i>Danio rerio</i>	64

Western Blot.....	65
Risultati	66
Summary dei Risultati della PARTE II	Errore. Il segnalibro non è definito.
<i>PARTE III</i>	85
Esperimenti di localizzazione e co-localizzazione dei prodotti proteici <i>cyvr1</i> e <i>lefty1</i>	86
Materiali e metodi	86
Amplificazione e purificazione di vettori di espressione ricombinanti	86
Microscopia confocale e live-imaging	87
Risultati	89
Summary dei Risultati della PARTE III	96
<i>PARTE IV</i>	97
Generazione di una linea mutante per il gene <i>cyvr1</i> in <i>Danio rerio</i> con la metodica CRISPR/Cas9: analisi fenotipica morfologica e molecolare.....	98
Materiali e metodi	98
Generazione della linea mutante per il gene <i>cyvr1</i>	98
Risultati	100
Summary dei Risultati della PARTE IV	105
<i>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</i>	106
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	115
<i>APPENDICE A</i>	122

Abstract

Il locus *CYYR1* (*Cysteine and tyrosine-rich 1*) identificato e clonato sul cromosoma 21 umano è stato caratterizzato dal punto di vista molecolare come un sistema multitrascritto, esclusivo dei vertebrati che ancora ad oggi è orfano di una funzione specifica. Dati presenti in letteratura e rintracciati su banche dati online mostrano una possibile relazione tra il gene *CYYR1* e il pathway di Sonic Hedgehog (SHH).

In questo progetto di tesi è stato utilizzato il modello animale *Danio rerio* per indagare il ruolo funzionale dell'ortologo (simbolo *cyrr1*), attraverso esperimenti di *gain* e *loss of function* che hanno permesso di dimostrare un suo coinvolgimento a livello dello sviluppo del sistema nervoso centrale, del cuore e del tessuto muscolare. Lo studio dell'ortologo in zebrafish è stato associato all'utilizzo di linee cellulari di rhabdomiosarcoma umano. I risultati ottenuti dall'induzione al differenziamento miogenico di queste linee, insieme ai dati ottenuti dall'inibizione dell'ortologo in *Danio rerio*, confermano il possibile coinvolgimento del gene *CYYR1* nella miogenesi.

Lo studio della relazione tra il pathway di SHH e l'espressione del gene *CYYR1* è stato condotto in entrambi i modelli con l'utilizzo di differenti sistemi di inibizione della via di segnalazione. I risultati ottenuti mostrano che sistemi inibitori agenti direttamente sul recettore SMO riducono l'espressione del gene, mentre inibizioni dirette del principale fattore trascrizionale a valle GLI1 non si riflettono nella modulazione del gene; questi dati fanno supporre che il gene sia regolato da una segnalazione SHH non canonica. Un dato inaspettato in *Danio rerio* ottenuto durante questi esperimenti di inibizione, ovvero la reversione di un fenotipo molto grave ad opera della sovraespressione dell'mRNA *cyrr1*, ha aperto una nuova linea di ricerca in collaborazione con l'Università di Warwick tesa a verificare la relazione tra il gene *cyrr1* e il gene *lefty1*. Gli esperimenti condotti presso il laboratorio della Prof.ssa Karuna Sampath hanno dimostrato la localizzazione del prodotto proteico *cyrr1* in *Danio rerio* e indagato possibili co-localizzazioni con la proteina *lefty1*.

Infine, in collaborazione con Dr. Gianluca Deflorian (Cogentech di Milano) e della Prof.ssa Anna Silvia Pistocchi (UNIMI), è stato generato un mutante di *Danio rerio* delecto per il gene *cyrr1* con la tecnica CRISPR/Cas9. La caratterizzazione del mutante *cyrr1*^{-/-} ha confermato alcuni dei dati ottenuti attraverso esperimenti di *loss of function* e apre ad interessanti sviluppi futuri per la completa comprensione del ruolo funzionale di questo gene.

INTRODUZIONE

La genomica funzionale nello studio dei processi tumorali

La genomica funzionale è il ramo della biologia che si occupa di definire la funzione delle singole unità geniche e le relazioni che intercorrono tra loro all'interno di contesti cellulari fisiologici e patologici, avvalendosi di diverse tecniche di indagine che spaziano dalle analisi bioinformatiche fino all'utilizzo di organismi modello. A partire dal completamento del sequenziamento del genoma umano avvenuto nel 2000, questa disciplina si è espansa apportando contributi importanti sia nei campi della ricerca di base che in contesti più applicativi legati ad esempio allo studio delle patologie complesse.

La genomica applicata allo studio del processo tumorale è da diversi anni impegnata nello scoprire mutazioni genetiche e riarrangiamenti strutturali cromosomici che possano predisporre alla cancerogenesi o alla formazione di un fenotipo tumorale [1]. In particolare gli studi genomici sono riconducibili a due categorie di approcci: un approccio massivo, nel quale vengono studiate globalmente alterazioni genetiche e di espressione nelle cellule tumorali, al fine di identificare pathway e singoli geni coinvolti nella trasformazione neoplastica e/o nel suo supporto. Tecniche tipiche di questo approccio sono ad esempio i microarray, le RNA-seq e le metanalisi di profili di espressione presenti in banche dati online. Un secondo approccio, in direzione opposta ma complementare, che parte dallo studio di un singolo gene e cerca di identificarne il suo ruolo funzionale in processi fisiologici e patologici. A questo scopo le tecniche principalmente impiegate sono quelle di *Reverse Genetics*, nelle quali l'induzione di alterazioni di una determinata sequenza genica o della sua espressione sono utilizzate per studiare i fenotipi cellulari e/o animali che ne derivano. L'utilizzo di organismi modello in studi di genomica funzionale è motivato sia dal considerevole lavoro di sequenziamento genomico e trascrittomico avvenuto negli ultimi decenni che dalla conservazione filogenetica dei loci genici.

Questi studi tracciano da un lato la possibilità di descrivere e analizzare il ruolo e le interazioni geniche che contribuiscono e sostengono la trasformazione neoplastica, dall'altro permettono una revisione puntuale delle annotazioni geniche al fine di studiarne e comprenderne struttura, espressione e funzione. Infatti molti loci genici clonati nell'uomo sono ad oggi orfani di uno specifico ruolo funzionale, a titolo esemplificativo basti pensare che per il più piccolo cromosoma umano, il cromosoma 21 (HC21), si hanno informazioni geniche dettagliate per solo 145 geni, rispetto ai 424 geni clonati su di esso [2].

In questo contesto si inserisce lo studio e l'attività di ricerca del laboratorio di Post genomica presso il dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale (DIMES), dove ho svolto il mio dottorato di ricerca teso ad indagare il ruolo funzionale fisiologico e patologico del locus genico umano *CYYR1*.

Il locus *CYYR1* in *Homo sapiens*

Il gene *CYYR1* (cysteine and tyrosine-rich protein 1) umano è stato identificato e clonato nel Laboratorio di Genomica del Dipartimento di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata (oggi DIMES) dell'Università di Bologna. Questo locus genico è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 in posizione 21q21.3, occupa una regione fisica di 107 kb che copre lo 0,3% dello stesso e mappa tra il gene *APP* (proteina precursore dell'amiloide) e il gene *ADAMTS1* codificante una metalloproteasi ADAM con motivo a trombospondina di tipo 1.

La sua isoforma di riferimento (GenBank NM_052954) è composta da 4 corti esoni separati a livello genomico da 3 lunghi introni, ha una *open reading frame* (ORF) di 462 nucleotidi e codifica per una proteina predetta di 154 amminoacidi (forma di riferimento, CYYR1 1,2,3,4) [3]. Un progetto di sequenziamento massivo (*NEDO human sequencing project*) ha però schedato un mRNA (GenBank #AK054581) più esteso nell'estremità 5' che identificherebbe una isoforma più lunga. L'estensione in 5' di questa isoforma conterrebbe una *open reading frame* (ORF) più estesa nella medesima fase di lettura della ORF appartenente alla isoforma di riferimento, il prodotto proteico risultante sarebbe di 262 amminoacidi, ma ad oggi questa isoforma lunga non è ancora stata clonata. Indizi a supporto dell'esistenza di questa isoforma lunga possono essere ritrovati nella presenza di isole ricche in citosina e guanina (CpG island) nei pressi dell'ipotetico sito promotore, suggerendo che la sua attività sia finemente regolata.

L'isoforma di riferimento è caratterizzata inoltre da uno splicing sottile che aggiunge una tripletta CAG tra l'esone 3 e l'esone 4 introducendo un residuo di alanina nella proteina [4].

Il prodotto proteico predetto dell'isoforma di riferimento è caratterizzato da un peptide segnale all'estremità N-terminale che coinvolge i primi 29 amminoacidi della sequenza, un dominio ad α -elica (predetto dall'aminoacido 62 all'86), un dominio centrale ricco in tirosina e cisteina (CCSYAY) che dà il nome al locus genico in quanto conservato nelle diverse isoforme e senza similarità con altri domini noti e infine

con altri domini noti e infine tre motivi ricchi in prolina (PPPY) all'estremità C-terminale.

Diversi software bioinformatici e banche dati online predicono la localizzazione della proteina a livello della membrana plasmatica. L'analisi bioinformatica condotta attraverso *Protein BLAST* non ha mostrato somiglianze significative tra il prodotto proteico predetto e altre proteine note, impedendo l'associazione tra strutture proteiche conosciute e un possibile ruolo funzionale del gene in studio.

Dal punto di vista evolutivo la proteina predetta codificata dall'isoforma di riferimento umana risulta essere altamente conservata nei vertebrati ed assente in batteri e invertebrati. In particolare mostra 81% di identità (86% di similarità) con la proteina predetta in *Mus musculus*, 68% di identità (77% di similarità) con la proteina di *Xenopus Laevis* e 51,2% di identità (64,5% di similarità) con il prodotto ortologo in *Danio rerio* [3].

Un articolo di *Pei e Grishin* del 2012 definisce una nuova famiglia proteica (*Shisa-like proteins*) caratterizzata da un peptide segnale, un dominio ricco in cisteina, un dominio ad α -elica transmembrana che termina frequentemente con un dominio ricco di aminoacidi carichi positivamente e una regione ricca di proline al carbossi-terminale. Gli autori includono *CYYR1* all'interno di questa famiglia nonostante vi siano differenze tra la struttura proteica predetta e quella delle proteine *Shisa-like* [5]. Le proteine di questa famiglia sono implicate in meccanismi di downregolazione e agiscono a livello recettoriale, inibendo la trasduzione del segnale.

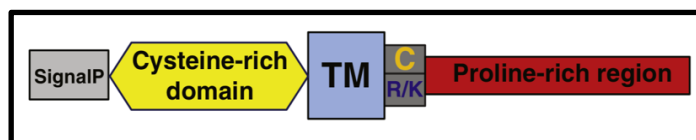


Figura 1. Immagine schematica dei domini funzionali della famiglia proteica *Shisa-like* tratta dal lavoro di *Pei e Grishin* del 2012 [5].

Nel 2014 abbiamo pubblicato uno studio di trascrittomica relativo al locus genico umano mostrando come esso sia un sistema multitrascritto del quale, oltre all'isoforma di riferimento descritta precedentemente, fanno parte altre cinque isoforme di splicing alternativo e un trascritto in antisenso denominato *CYYR1-ASI* che appartiene alla famiglia degli RNA non codificanti (ncRNA) [6].

Le diverse isoforme di splicing alternativo presentano variazioni sia delle regioni non tradotte (UTR) al 5' e 3', nonché la perdita di esoni presenti nell'isoforma di riferimento e/o aggiunta di nuovi tratti esonici.

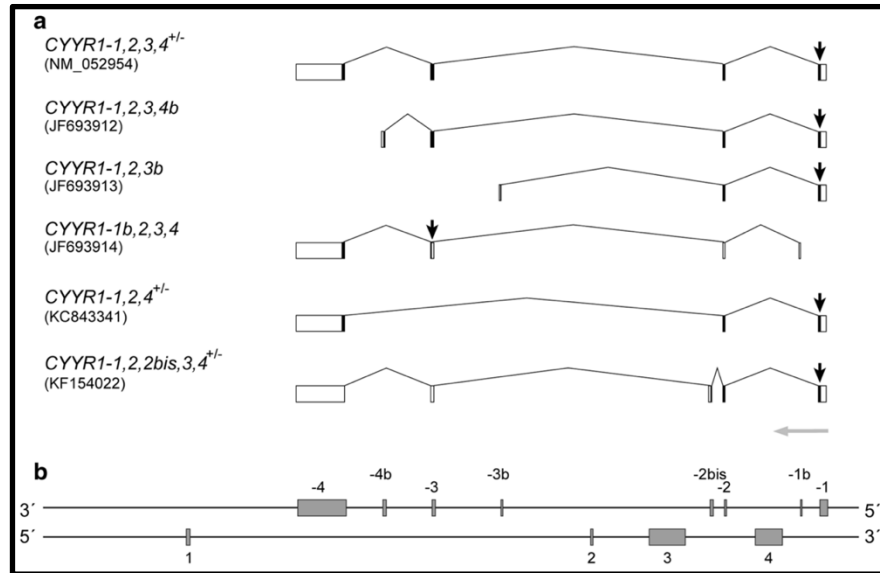


Figura 2. (A) Struttura dei trascritti delle sei isoforme del gene *CYYR1*. (B) Struttura del locus *CYYR1*. Le frecce nere indicano il punto di inizio della trascrizione mentre le frecce grigie indicano la direzione della trascrizione [6].

L'isoforma *CYYR1-1,2,3,4b* presenta un esone 4 alternativo e porta alla formazione di una proteina ipotetica caratterizzata dalla mancanza dei tre motivi PPPY all'estremità C-terminale.

L'isoforma *CYYR1-1,2,3b* presenta un esone 3 alternativo e il suo prodotto proteico predetto risulta essere più corto rispetto alla proteina ipotetica della forma di riferimento, con l'assenza dell' α -elica transmembrana e dei tre domini PPPY.

L'isoforma *CYYR1 1b,2,3,4* presenta un esone 1 alternativo posizionato a valle rispetto all'esone 1 della isoforma di riferimento.

L'isoforma *CYYR1 1,2,4* manca dell'esone 3 rispetto all'isoforma di riferimento, a livello traduzionale si ha un cambiamento nel normale schema di lettura a partire dall'aminoacido in posizione 61.

L'isoforma *CYYR1 1,2,2bis,3,4* è caratterizzata da un esone aggiuntivo denominato 2bis tra l'esone 2 e l'esone 3. Questo esone introduce un codone di STOP in fase comportando una proteina predetta tronca che mostra la perdita del dominio transmembrana e dei tre motivi PPPY.

L'analisi nucleotidica potrebbe indicare per questo trascritto le condizioni utili a evocare il noto meccanismo di controllo dell'espressione genica chiamato *Nonsense Mediated Decay* (NMD), che sembra però non trovare conferma nei dati di espressione recentemente pubblicati [6].

Lo studio di espressione del locus genico condotto attraverso esperimenti di PCR semiquantitativa relativa in diversi tessuti umani ha mostrato una eterogeneità di espressione delle diverse isoforme. L'espressione più elevata dei trascritti del locus è stata riscontrata in cuore, pancreas e colon mentre per quanto riguarda l'analisi di espressione della singola isoforma di riferimento (*CYYR1 1,2,3,4*), i tessuti con livelli più alti di espressione rilevati sono stati cervello, cuore e pancreas [6]. Nell'articolo viene testata l'espressione del locus anche in alcune linee cellulari primarie e tumorali, tra le quali le più trascrizionalmente attive risultano le CCL-54 (linea cellulare primaria di fibroblasti trisomici per il cromosoma 21) e le U2OS (linea cellulare di osteosarcoma umano). Inoltre dati originali prodotti nella mia tesi di laurea magistrale, volta ad individuare un modello cellulare dove poter studiare l'espressione del locus, hanno dimostrato una significativa ed eterogenea espressione dello stesso in linee cellulari umane di tumori pediatrici, quali rhabdomyosarcomi e medulloblastomi [7].

CYYR1 nella letteratura scientifica

L'analisi e lo studio della letteratura risultano di fondamentale importanza durante lo sviluppo di una ricerca, al fine di costruire ipotesi da cui partire e tesi da verificare, quando però ci si approccia ad un gene nuovo, di cui non sono presenti studi, l'analisi della letteratura diventa un'operazione di *data mining*. Non avendo a disposizione studi centrati nello specifico al gene di nostro interesse, si è reso necessario estrapolare le informazioni da analisi di genomica, dati supplementari, interrogare banche dati online e catalogare poi le informazioni rintracciate. In questi tre anni di Dottorato ho potuto collezionare molte osservazioni sperimentali che ci hanno portato ad indirizzare la ricerca verso lo studio dell'*interplay* tra il gene *CYYR1* e alcuni noti pathway differenziativi.

I dati più interessanti emersi dalla letteratura sono qui di seguito riportati al fine di comprendere meglio il contesto nel quale abbiamo formulato le nostre ipotesi e indirizzato la ricerca di funzione genica.

CYYR1 e il pathway di Sonic Hedgehog

Comprendere le interazioni che intercorrono tra un dato gene e altre vie di segnalazione già caratterizzate riveste un ruolo di primaria importanza. Questo approccio permette da un lato di indagarne la funzione e dall'altro di studiarne i meccanismi regolativi che sottendono la sua espressione.

Un'attenta analisi dei profili di espressione genica ottenuti attraverso microarray e schedati in banche dati online (Gene Expression Omnibus, Broad Institute Cancer Cell Line Encyclopedia), associata allo studio della letteratura hanno rafforzato l'ipotesi di un legame tra il gene *CYYR1* e il pathway di Sonic Hedgehog (SHH).

Il pathway di SHH è una via di segnalazione frequentemente utilizzata durante lo sviluppo per la comunicazione intercellulare. E' importante per l'organogenesi di quasi tutti gli organi nei mammiferi, così come nella rigenerazione e nella omeostasi tissutale [8]. L'attivazione di questo pathway può avvenire in due modi: la via canonica ligando-dipendente attraverso la quale il segnale è indotto dal recettore Patched 1 (PTCH1) e la via non canonica che utilizza meccanismi di attivazione a valle della proteina transmembrana Smoothened (SMO) [9].

La via canonica di segnalazione è attivata quando la glicoproteina SHH, secreta nello spazio extracellulare, si lega al recettore transmembrana PTCH1 inattivandolo. Il ruolo della proteina PTCH1 è a sua volta inibitorio nei confronti della proteina SMO, quindi l'interazione SHH-PTCH1 ha come conseguenza il rilascio della proteina SMO che è così libera di traslocare sulla membrana plasmatica in corrispondenza di una particolare struttura chiamata *cilium primario* (*primary cilium* - PC). Il PC è una struttura immobile composta da microtubuli che sporge dalla superficie di quasi tutte le cellule di mammifero [10]. Diversi recettori di segnalazione localizzano sulla membrana di questo organo compresi i recettori per SHH, Notch e Wnt [11, 12, 13]. La traslocazione della proteina Smo, che appartiene alla famiglia delle proteine G accoppiate al recettore (GPCR-like), attiva la cascata di segnalazione che ha come principale effettore a valle la famiglia di fattori trascrizionali Gli, in particolare GLI1. Questi fattori trascrizionali possiedono un motivo a dita di zinco (*zinc finger domain*) in grado di legare il DNA in corrispondenza di particolari siti di legame sequenza-specifici (*Gli1-binding site*). Una volta traslocati nel nucleo, questi fattori trascrizionali attivano la trascrizione di particolare geni tra cui GLI1 stesso e PTCH1 attivando rispettivamente meccanismi di feedback positivo e negativo [14].

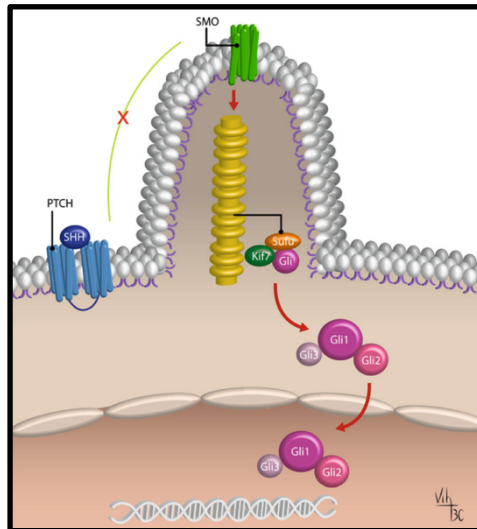


Figura 3. Immagine schematica della via canonica di attivazione del pathway di SHH [8].

La via di segnalazione non canonica può essere a sua volta suddivisa in due percorsi distinti (tipo I e tipo II) che hanno in comune l'indipendenza dai fattori trascrizionali Gli.

Il tipo I prevede che in assenza del ligando SHH (Figura 4, pannello a sinistra), PTCH1 interagisca con la ciclina B1 e un complesso pro-apoptotico che include la caspasi-9, il dominio CARD (dominio di reclutamento associato alla caspasi) contenente la proteina Tucan-1 e la proteina adattatore Dral. L'interazione tra PTCH1 e la ciclina B1 inibisce la proliferazione in quanto le impedisce di essere traslocata all'interno del nucleo. In alcune tipologie cellulari, il reclutamento di questo complesso pro-apoptotico dipende da un precedente taglio proteolitico nel dominio C-terminale di PTCH1 effettuato dalla caspasi-3 che si traduce nell'attivazione della caspasi-9. La caspasi-9 attivata accelera la formazione di questo complesso promuovendo a cascata l'attivazione della caspasi-3 che porta all'apoptosi cellulare. L'interazione tra PTCH1 e SHH (Figura 4, pannello a destra) interrompe l'interazione tra PTCH1 e la ciclina B1 con il complesso pro-apoptotico, probabilmente attraverso un cambiamento conformazionale di PTCH1, questo evento comporta un aumento proliferativo e di sopravvivenza cellulare [15].

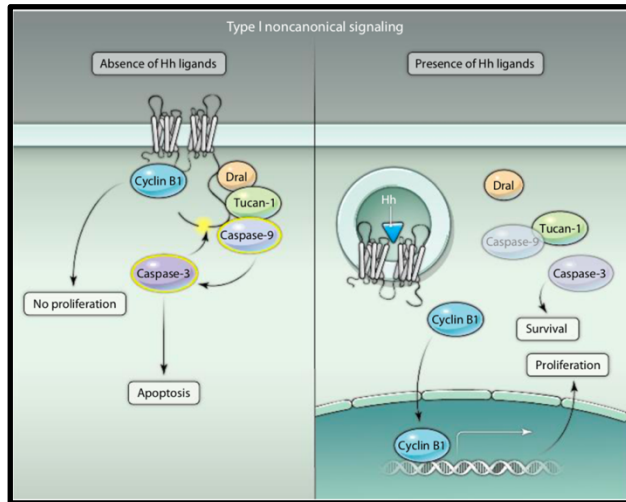


Figura 4. Immagine schematica della tipologia I di segnalazione non canonica di SHH. Le forme di caspasi gialle evidenziate e “in trasparenza” nel pannello di destra, indicano rispettivamente caspasi attive e inattive [15].

La tipologia II è SMO-dipendente in quanto questa proteina regola l'actina citoscheletrica attraverso le GTPasi RhoA e Rac1. Questa regolazione avviene in un contesto cellulare specifico, attraverso le proteine Gi e PI3K nei fibroblasti, e attraverso Tiam1 o attraverso i membri della famiglia delle chinasi Src (SFK) e Fyn nei neuroni. Inoltre, SMO stimola il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico (ER) nei neuroni spinali attraverso la generazione della forma catalitica PLC- γ che promuove la formazione di inositolo 3-fosfato (IP₃) e l'apertura dei canali IP₃-dipendenti.

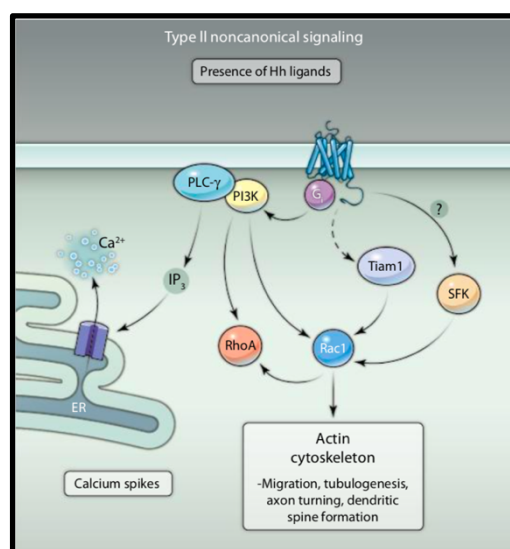


Figura 5. Immagine schematica della tipologia II di segnalazione non canonica SHH [15].

Studi recenti hanno evidenziato che il pathway di SHH risulta essere alterato in diverse tipologie di cancro tra cui alcuni tumori tipici dell'età pediatrica come rhabdomyosarcomi, medulloblastomi e osteosarcomi. Due articoli rispettivamente di *Staub et al* [16], e *Kool et al* [17], mostrano come tra i 21 geni overespressi in medulloblastomi SHH-dipendenti vi sia il gene *CYYRI*. Recentemente *Holger Weishaupt et al* [18] hanno pubblicato un articolo che integra e analizza i dati di 23 differenti *dataset* contenenti 1350 campioni di medulloblastoma e 291 campioni di cervello come controllo identificando *CYYRI* come appartenente alla *signature* dei medulloblastomi SHH-dipendenti. In linea con questi risultati alcuni dati di espressione genica presenti nei database sopra citati, mostrano una maggiore espressione del locus genico rispetto alle altre categorie di medulloblastoma (Wnt-dipendente, sottogruppo 3 e sottogruppo 4).

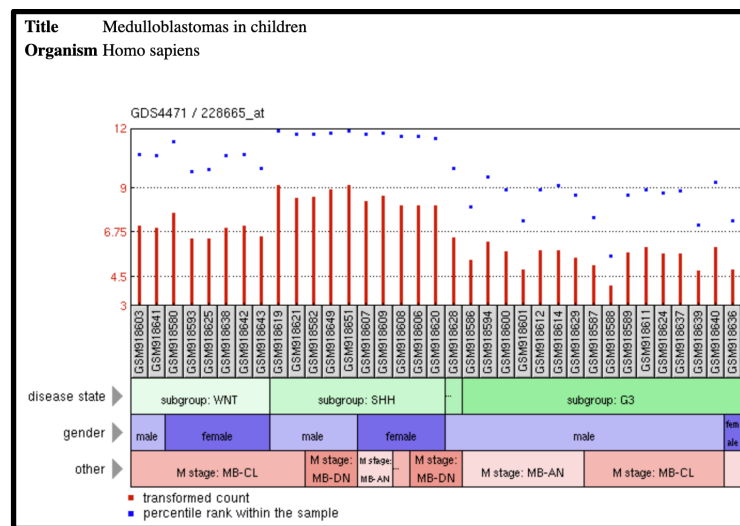


Figura 6. Parte del profilo di espressione del microarray numero GDS4471 / 228665_at schedato su GEO Profiles Omnibus.

Una modulazione del gene ad opera del pathway di SHH è stata rilevata anche nella tesi di dottorato del *Dr. Martin David Carkett* [19] che dimostra come il trattamento di espianti di arti superiori e inferiori di pollo, con differenti concentrazioni del morfogeno, upregolano diversi geni tra cui il gene *CYYRI*. In particolare il gene di nostro interesse risulta upregolato sia negli arti inferiori che superiori a 16 ore di trattamento con il morfogeno SHH alle dosi 4 nM e 8 nM.

CYYR1 e le cellule endoteliali

Alcuni articoli e tesi di laurea identificano il gene *CYYR1* tra i geni che marcano specificamente le cellule endoteliali umane in diversi tessuti tra i quali cornea [20], cervello, rene, polmone, cuore e fegato [21]. In accordo con questi dati anche le cellule endoteliali di polmone murine presentano *Cyyr1* come significativamente e altamente espresso [22]. Inoltre *Jeff Klomp e Asrar Malik* in osservazioni originali da congresso raccolte nell'abstract "*Genomic cell lineage analysis uncovers novel endothelial gene expression programs for metabolic and immune regulation*" che presenta un'analisi comparativa multi-tessuto volta ad identificare i geni specifici delle cellule endoteliali, hanno ritrovato *CYYR1* tra i più statisticamente e fortemente associati ad esse.

Recenti ricerche nel campo della biologia vascolare hanno rivelato un contributo significativo della segnalazione SHH non canonica, piuttosto che della segnalazione SHH canonica, nello sviluppo vascolare sia in condizioni fisiologiche che patologiche [23]–[25]. Infatti nelle cellule endoteliali, i morfogeni SHH innescano la via di segnalazione SHH non canonica che porta al differenziamento vascolare, alla maturazione e all'acquisizione di funzione [24], [26]–[29].

Il modello animale *Danio rerio*

Il laboratorio di Post genomica afferente al Dipartimento di Medicina specialistica, diagnostica e sperimentale (DIMES) presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca sotto la supervisione della Prof.ssa Flavia Frabetti, ha implementato uno stabulario di *Danio rerio* comunemente noto come *Zebrafish* (nome inglese) o *pesce zebra* (nome italiano). *Danio rerio* è un piccolo pesce d'acqua dolce che appartiene alla famiglia dei ciprinidi (*Cyprinidae*), vive nei corsi d'acqua del Sud Est Asiatico ed è onnivoro [30].

Questo modello animale negli ultimi decenni ha subito un esponenziale e importante incremento del suo utilizzo sia in studi genetici e di biologia dello sviluppo che in ambito tossicologico e in medicina traslazionale [31].

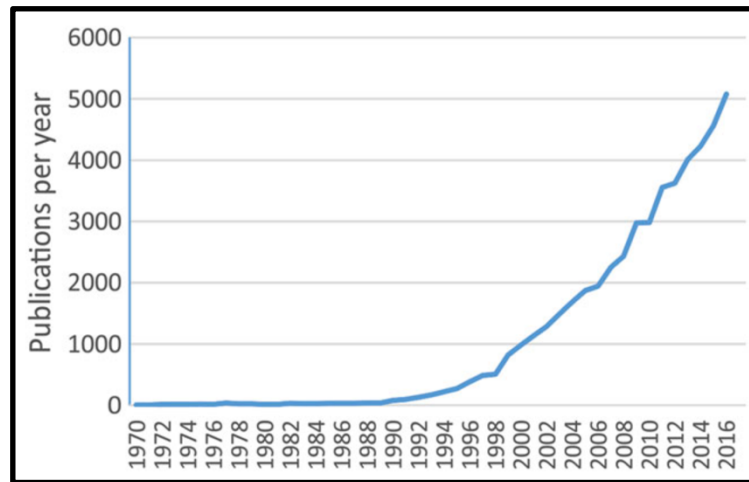


Figura 7. Il numero di pubblicazioni che utilizzano *Danio rerio* come modello animale per anno presenti in *Web of Science* tra il 1970 e il 2016 [31].

La rapida espansione di questo modello animale è dovuta da un lato alle sue caratteristiche fisiologiche e morfologiche che, in qualità di vertebrato, lo rendono un modello animale più vicino all'uomo rispetto agli invertebrati e dall'altro alla semplicità di allevamento e di manipolazione sperimentale. Inoltre le femmine arrivano a deporre uova in grande quantità durante tutto l'anno, fino a 200 uova a settimana se mantenute in condizioni ottimali [30], permettendo di effettuare studi su larga scala. Altro importante vantaggio è dato dalla trasparenza del corion e dell'embrione che consente di osservare tutte le fasi dell'embriogenesi fino a 24 ore dopo la fecondazione (*hour post fertilization - hpf*), caratteristica che può essere prolungata attraverso l'utilizzo dell'inibitore della sintesi di melanina (fenil-tiourea - PTU).

Dal punto di vista molecolare il genoma di zebrafish è organizzato in 25 cromosomi (assetto aploide), è stato completamente sequenziato e consta complessivamente di circa $1,7 \times 10^9$ paia di basi (base pair - bp). A causa di una duplicazione dell'intero genoma avvenuta circa 300 milioni di anni fa, molti loci genici in zebrafish presentano geni paraloghi. Il mappaggio genico ha mostrato la presenza di estese aree sinteniche tra il genoma di zebrafish e il genoma umano [32], validandolo come un ottimo modello animale in studi comparativi di genomica funzionale ed epigenetica.

Lo sviluppo embrionale del pesce zebra

Uno dei vantaggi che ha consolidato questo modello negli studi embriologici è legato alla rapidità di sviluppo embrionale e alla completa trasparenza del corion che permette di osservare tutti i movimenti cellulari dalle prime divisioni fino alla schiusa dell'uovo. Di seguito verranno riportate le principali fasi di sviluppo embrionale alla temperatura ottimale di crescita di 28.5°C, infatti temperature più alte o più basse accelerano o rallentano la cinetica di sviluppo.

La fonte di riferimento per il testo e le immagini è lo storico lavoro di *Kimmel et al* [33], nel quale gli autori descrivono le fasi di sviluppo suddividendole in sette periodi embrionali (zigote, segmentazione, blastula, gastrula, somitogenesi, faringula e schiusa).

Fase di zigote

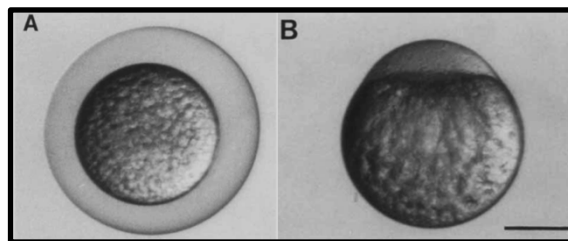


Figura 8. Fase zigotica: A: lo zigote circondato dal corion pochi minuti dopo la fecondazione, B: lo zigote decorionato con il polo animale verso l'alto, circa 10 minuti dopo la fecondazione [33].

Questa fase (Figura 8), che inizia dal momento della fecondazione e si conclude con la prima divisione cellulare (circa dopo 45 minuti), è caratterizzata da due importanti eventi. Il primo avviene a seguito del contatto tra lo spermatozoo e la zona pellucida che induce nell'uovo la reazione corticale. Questa reazione innescata dal rilascio del contenuto dei granuli corticali fra la zona pellucida e l'ovocita produce la contrazione del citoplasma e la formazione dello spazio perivitellino. Il secondo importante evento è dovuto alle contrazioni dell'actina citoscheletrica che determina lo spostamento del citoplasma non occupato dal tuorlo verso il polo animale della cellula. Il blastodisco localizzato così in posizione apicale modifica la forma della cellula da sferica a piriforme.

Fase di segmentazione

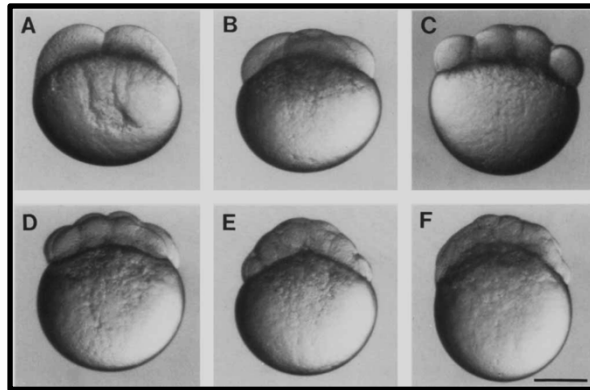


Figura 9. Fase di segmentazione: A: stadio a 2 cellule (0.75 hpf), B: stadio a 4 cellule (1 hpf), C: stadio a 8 cellule (1.25 hpf), D: stadio a 16 cellule (1.5 hpf), E: stadio a 32 cellule (1.75 hpf), F: stadio a 64 cellule (2 hpf) [33].

La fase di segmentazione (Figura 9) inizia a partire dalla prima divisione cellulare (circa 45 minuti dopo la fertilizzazione dell'uovo) e dura complessivamente 2 ore. A seguito della prima divisione, i blastomeri si dividono sincronicamente a intervalli di circa 15 minuti; queste divisioni sono incomplete e portano alla formazione di ponti citoplasmatici che mantengono le cellule connesse tra loro. Al termine di questa fase, il polo animale conta 64 cellule.

Fase di blastula

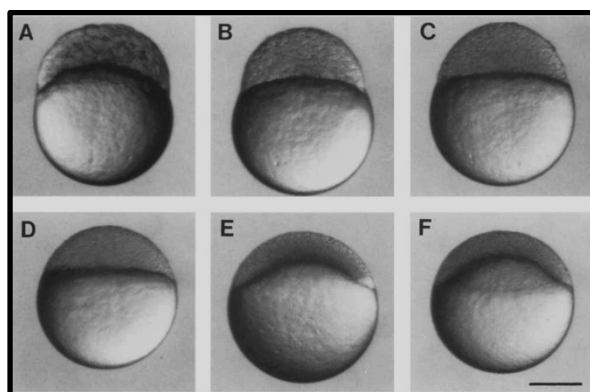


Figura 10. Fase di blastula: A: stadio a 256 cellule (2.5 hpf), B: stadio high (3.3 hpf). C: Transizione tra gli stadi high e oblungo (3.5 hpf). D: Transizione tra gli stadi oblungo e sfera (3.8 hpf). E: stadio a cupola (4.3 hpf). F: stadio di epibolia 30% (4.7 hpf) [33].

La blastula è quella fase di sviluppo embrionale che si protrae dallo stadio di 128 cellule fino all'inizio della gastrulazione. I vari stadi di sviluppo che si susseguono (128/256/1000 cellule, high, sfera, cupola e 30% epibolia) vengono distinti sulla base del polo animale che assume forme differenti grazie all'aumento del numero e della dimensione delle cellule. In questa fase si ha la *midblastula transition*, nella quale l'attivazione del genoma zigotico causa un rallentamento del ciclo cellulare dovuto alla comparsa delle fasi G1 e G2 nel ciclo replicativo. Questo rallentamento è accompagnato da divisioni cellulari asincrone e dall'inizio dei movimenti epibolici. Il termine epibolia indica una serie di movimenti operati dalle cellule dei foglietti ectodermici che, muovendosi insieme, avvolgono le strutture embrionali profonde portando alla formazione dei tre foglietti embrionali.

Fase di gastrula

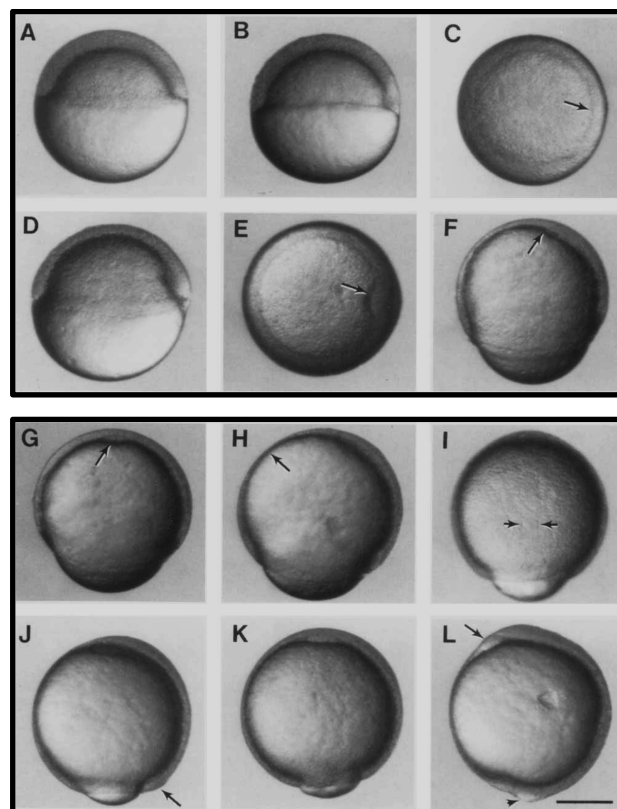


Figura 11. Fase di gastrula: A: stadio di epibolia 50% (5.25 hpf). B: stadio *germ ring* (5.7 hpf). C: visione del polo animale dello stadio *germ ring*. D: stadio *shield* (6 hpf). E: visione del polo animale allo stadio *shield*. F: stadio di epibolia 70% (7.7 hpf). G: visione ventrale dello stadio 70% epibolia. H: stadio di epibolia 75% (8 hpf). I: visione

dorsale dello stadio 80% epibolia (8.4hpf). J: stadio di epibolia 90% (9 hpf). K: visione ventrale dello stadio di epibolia 90%. L: stadio *tail bud* [33].

La gastrulazione è un processo caratterizzato da movimenti cellulari morfogenetici di evoluzione, involuzione, convergenza e dalla formazione degli assi di sviluppo embrionali. La migrazione e l'assottigliamento del blastodisco sul nucleo è un marker che viene utilizzato per stadiare le varie fasi di sviluppo che vengono classificate in base alla percentuale di tuorlo coperta da blastoderma (percentuale di epibolia). I movimenti epibolici continuano per tutta la gastrulazione fino a quando il tuorlo non è completamente ricoperto (*tail bud*). Durante questa fase embrionale vengono a formarsi i tre foglietti embrionali, ectoderma, mesoderma ed endoderma e si instaurano nuove relazioni tissutali che permetteranno la successiva formazione del sistema nervoso.

Fase di somitogenesi

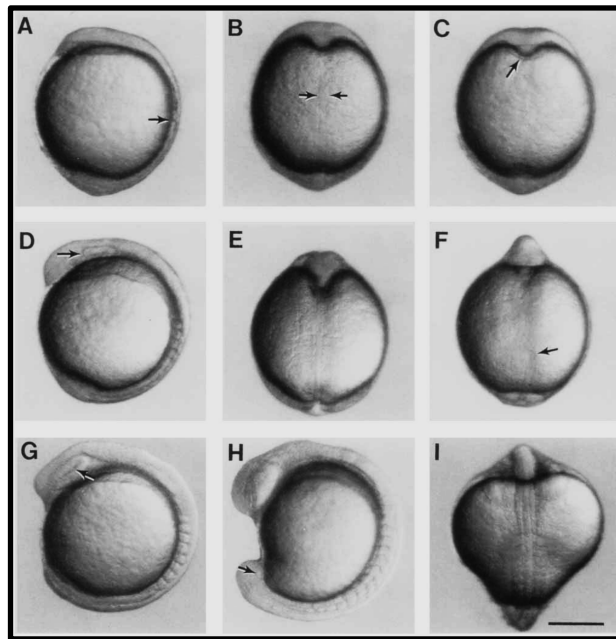


Figura 12. Fase di somitogenesi: A. 2 somiti; B. visione dorsale della fase di sviluppo 2 somiti; C. Visione ventrale della fase di sviluppo 2 somiti; D, E. 4 somiti; F. 5 somiti; G. 8 somiti; H. 13 somiti; J, K. 15 somiti; L. 17 somiti; M. 20 somiti; N, O. 25 somiti. Le frecce indicano la notocorda [33].

La somitogenesi è il processo attraverso il quale vengono a formarsi blocchi bilateralmente accoppiati di mesoderma parassiale detti somiti che si formano lungo l'asse anteriore-posteriore dell'embrione in sviluppo. Nei vertebrati, i somiti danno origine a muscolo scheletrico, cartilagine, tendini, endotelio e derma. La somitogenesi in zebrafish inizia a 10.5 ore dopo la fecondazione con la formazione della prima coppia di somiti, da questo momento in poi viene aggiunta una nuova coppia ogni 30' circa lungo l'asse antero-posteriore fino a raggiungere la numerosità di 26-30 coppie. I somiti in *Danio rerio* danno origine allo sclerotomo e al miotomo.

Come conseguenza della regolarità temporale con la quale nuove coppie di somiti vengono a formarsi, il numero dei somiti viene utilizzato per attribuire lo stadio dello sviluppo embrionale.

Fase di faringula e *hatching*

Dopo la somitogenesi, l'embrione continua ad accrescersi velocemente e ad allinearsi, in particolare l'angolo tra la testa e il tronco diminuisce passando da 120° a 125° intorno ai 3 giorni dopo la fertilizzazione (*dpf*). Durante questo periodo avvengono diverse modificazioni nell'embrione che determinano la progressione dell'organogenesi. Per esempio, si ha lo sviluppo dell'intestino e delle branchie, la comparsa di cellule pigmentate, la definizione delle cavità cardiache; è possibile osservare lo scorrimento del sangue nell'apparato circolatorio e contrazioni ritmiche coordinate che mimano i movimenti per il nuoto.

Al termine dello sviluppo embrionale all'interno dell'uovo, il tuorlo è completamente riassorbito e l'animale fuoriuscito dal corion diventa progressivamente autonomo nel movimento e successivamente nell'alimentazione.

Dopo tre giorni di sviluppo l'animale comincia la fase larvale che in 90 giorni circa determinerà il passaggio allo stadio adulto, caratterizzato dalla maturazione della capacità riproduttiva.

Il gene *cyyr1* in *Danio rerio*

Il locus *cyyr1*, in *Danio rerio*, è stato clonato nel 2002 partendo dall'analisi della *expressed sequence tag* (EST) AI396916 [3], mappa sul cromosoma 1 in una regione sintenica a quella umana. Il locus presenta 4 esoni e l'analisi condotta su *UCSC Genome Browser* non ha mostrato la presenza di altre EST che possano far ipotizzare l'esistenza di isoforme di splicing alternativo.

L'allineamento delle proteina CYR1 predetta per l'isoforma di riferimento di *Homo sapiens* e di *Danio rerio* mostra una similarità del 68% e una identità del 54% con la conservazione del peptide segnale e dei 3 domini funzionali sopra descritti.

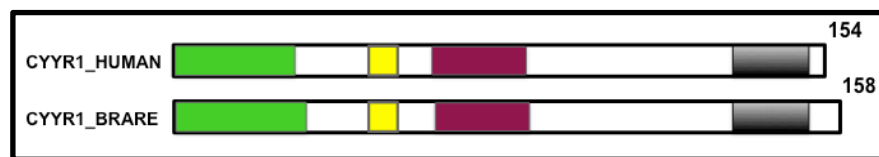


Figura 13. Allineamento delle due proteine predette per le isoforme di riferimento di *Homo sapiens* e *Danio rerio*. In verde il peptide segnale, in giallo il CCSYYAY box, in viola il tratto predetto transmembrana e in grigio i tre domini PPPY.

Studi di espressione genica massivi attraverso l'approccio della ibridazione in situ (ISH) effettuati da *Rauch et al* nel 2003 e schedati sul sito ZFIN (<https://zfin.org>) mostrano a 48 e 72 hpf l'espressione del trascritto a livello del cervello, dei neuromasti e delle pinne pettorali. Stadi precoci mostrano invece una ubiquitaria espressione del trascritto a livello dei somiti.

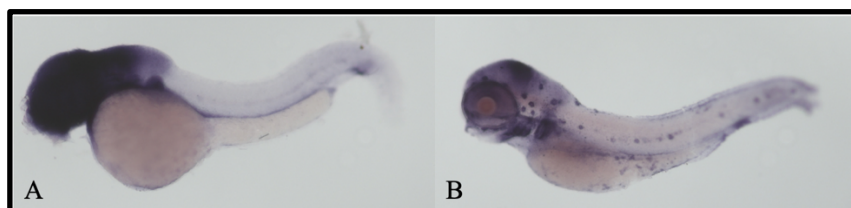


Figura 14. Pannello A: ISH del gene *cyyr1* 48hpf. Pannello B: ISH del gene *cyyr1* 72hpf.

Nel 2011 un articolo pubblicato dal gruppo di ricerca nel quale ho svolto la mia attività sperimentale ha dimostrato attraverso un approccio di RT-PCR semi-quantitativa relativa che il gene è espresso diversamente in organi, tessuti e fasi di sviluppo embrionali [34].

In particolare il tessuto che maggiormente esprime *cyrr1* è risultato essere l'ovaio mentre lo studio delle differenti fasi embrionali ha mostrato che il gene subisce un aumento di espressione nelle fasi di *shield*, *dome* e durante la somitogenesi, pur trattandosi di un gene ad effetto materno il cui trascritto risulta rintracciabile in ovociti non fecondati.

L'analisi della letteratura attraverso un processo di *data mining* già effettuato in precedenza per il locus umano, non ha portato per quanto riguarda il modello *Danio rerio* ad individuare ulteriori dati.

Nel 2006, *Xu et al* [35] tuttavia indicano *cyrr1* come un possibile gene bersaglio della via di Shh. Nel lavoro, volto a studiare i geni che vengono upregolati o downregolati in risposta all'attivazione e/o inibizione del pathway di Sonic Hedgehog (SHH), viene infatti rintracciata una EST (Expressed Sequence Tag) riconducibile al gene *cyrr1*, la cui espressione risulta essere downregolata dal trattamento con ciclopamina, noto inibitore del pathway di SHH, mentre è upregolata dalla microiniezione di mRNA dnPKA (Protein kinase A) che comporta una iperattivazione della via di segnalazione.

Nello stesso studio vengono inoltre analizzati tratti genici a meno di 5kb a monte e a valle della sequenza genica, la cui espressione varia in accordo con l'attivazione o inibizione del pathway di SHH, alla ricerca di sequenze consenso per i fattori di trascrizione di norma implicati nella segnalazione. Attraverso questa strategia, gli autori identificano due sequenze consenso (*Gli_0 motif* e *Gli_m1 site*) riconosciute e legate dal fattore di trascrizione GLI1. Nello specifico, viene identificata la sequenza consenso *Gli_0 motif* sulla sequenza genomica del gene *cyrr1* dimostrando un primo legame tra esso e un pathway molecolare coinvolto nello sviluppo e nella tumorigenesi.

Il differenziamento cellulare come unità di base dello sviluppo

La formazione di un organismo completo da un singolo uovo fecondato è un processo affascinante e molto complesso che comporta la generazione di innumerevoli cellule le quali, al momento opportuno, acquisiscono funzioni e morfologie specializzate, organizzandosi in strutture di ordine superiore quali tessuti e organi ben definiti. La maggior parte delle cellule segue un processo graduale di specializzazione con una fase finale, detta differenziazione terminale, caratterizzata dall'acquisizione di uno stato post-mitotico completamente differenziato [36].

Questa specializzazione cellulare è il risultato finale di diversi meccanismi che portano all'attivazione e/o inibizione di specifici geni e dei relativi prodotti, al fine di rallentare la proliferazione cellulare in favore dell'acquisizione di funzioni e morfologie specifiche dipendenti dalla tipologia cellulare.

L'accoppiamento temporale tra il rallentamento del ciclo cellulare e il differenziamento è cruciale sia per la normale crescita e lo sviluppo dell'organismo, che per l'omeostasi tissutale e la sostituzione cellulare durante tutto il corso della vita. Alcuni esempi di questo processo includono la formazione delle cellule neuronali e dei muscoli, i quali sono formati da cellule progenitrici in proliferazione che rallentano il ciclo cellulare mentre vengono attivati fattori di trascrizione specifici per la tipologia cellulare [36].

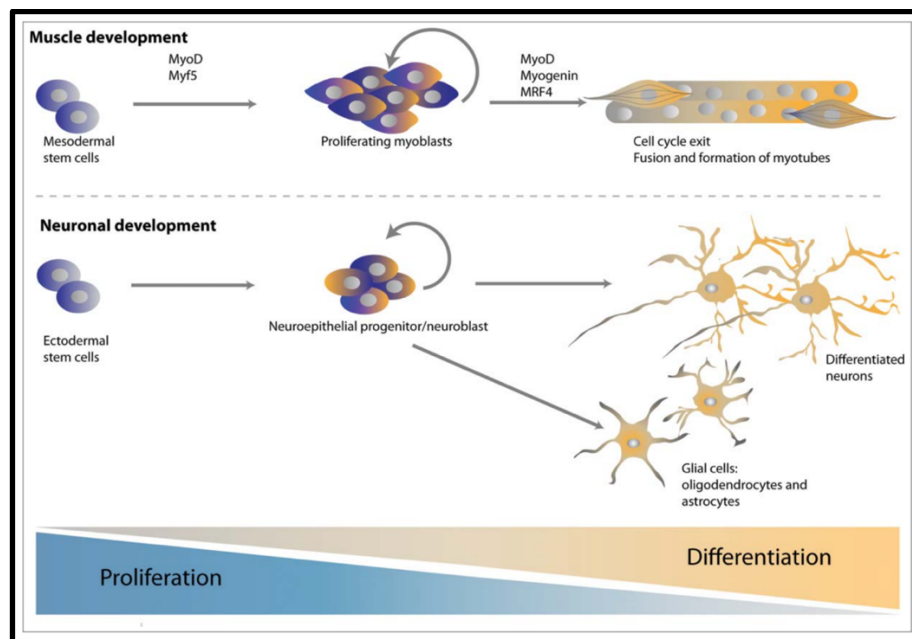


Figura 15. Visione schematica delle fasi di differenziamento muscolare (in alto) e di cellule neuronali (in basso) [36].

La perdita della capacità differenziativa e l'incapacità ad arrestare il ciclo cellulare possono portare ad una varietà di patologie e sono caratteristiche che contraddistinguono di norma le cellule tumorali.

La tumorigenesi infatti annovera tra le caratteristiche distintive, oltre alla rapida proliferazione, l'evasione dei meccanismi apoptotici, la disregolazione metabolica ed epigenetica, la dedifferenziazione ovvero la reversione fenotipica cellulare da uno stadio differenziato ad uno meno differenziato [37]. Recenti scoperte sulla frequenza delle alterazioni genetiche nel cancro umano hanno evidenziato una diffusa disregolazione dei rimodellatori cromatinici correlati alla differenziazione e dei fattori di trascrizione specifici per tipologia cellulare [38].

La miogenesi nei mammiferi

La miogenesi è il processo che porta alla formazione del tessuto muscolare, essa ha inizio durante l'embriogenesi, prosegue nel periodo post-natale e continua anche nella vita adulta. Questo processo si compone di diverse fasi definite ondate miogeniche, ciascuna delle quali è finemente regolata da diversi fattori e caratterizzata da importanti aspetti, alcuni conservati ed altri divergenti tra i vertebrati. Le caratteristiche comuni a tutti i vertebrati sono: la specificazione delle cellule progenitrici (*commitment*), i processi di proliferazione e migrazione, l'uscita dal ciclo cellulare, il differenziamento e la fusione [39].

Nei mammiferi la muscolatura scheletrica degli arti e del tronco ha origine dal mesoderma parassiale a partire dalla quarta settimana di sviluppo embrionale nel periodo somitico. A partire dal 21° giorno il mesoderma parassiale, posto ai lati della notocorda, è già organizzato in somitomeri che, successivamente, andranno incontro a fenomeni di frammentazione generando i somiti. La comparsa dei somiti, come riportato precedentemente, è scandita temporalmente in *Danio rerio*; in particolare nei mammiferi se ne formano tre per lato al giorno in senso antero-posteriore, fino ad un massimo di 42-44 paia. Ogni somite è suddiviso in dermamiotomo (dorso-laterale) e sclerotomo (ventro-mediale). Il dermamiotomo darà a sua volta origine al dermatomo e al miotomo mentre lo sclerotomo diventerà mesenchima dal quale si origineranno le vertebre [40].

Il miotomo è responsabile della formazione del tessuto muscolare, esso è distinto in due componenti: l'epimero localizzato dorsalmente rispetto al tubo neurale che è responsabile della muscolatura epiassiale (muscoli profondi del dorso) e l'ipomero localizzato superficialmente, ventralmente e lateralmente al tubo neurale che darà origine alla muscolatura ipoassiale (muscoli degli arti, diaframma, pareti corporee).

Le cellule del miotomo esprimono in modo caratteristico i geni *Pitx2* (paired like homeodomain 2), *Pax3* (paired box 3) e alcune sottopopolazioni cellulari anche *Pax7* (paired box 7); questi ultimi due fattori di trascrizione regolano sia le fasi precoci embrionali che l'attivazione delle cellule satelliti nell'organismo adulto a seguito della induzione di rigenerazione [41]. I progenitori epiassiali dipendono dai segnali di due noti morfogeni: la via di segnalazione di Sonic Hedgehog (SHH) e il pathway di Wingless 1 (WNT-1), le quali attivano un programma miogenico dipendente dal fattore trascrizionale Myf-5 (myogenic factor 5). I progenitori ipoassiali sono invece regolati dalla proteina WNT7a, la quale promuove una miogenesi dipendente da un altro fattore trascrizionale chiamato MyoD (myogenic differentiation 1).

I fattori trascrizionali Myf5 e MyoD, insieme a Mrf4 e alla miogenina, appartengono alla famiglia proteica dei fattori regolatori miogenici (MRFs), sono caratterizzati da un dominio di legame al DNA *helix-loop-helix* (HLH) e da un dominio basico indispensabile per l'interazione con le sequenze di legame (*binding sequence*) CANNTG presenti nei promotori e negli *enhancer* dei geni muscolari. Il dominio basico contiene anche il motivo AKT (alanina-treonina-lisina) che è necessario ai fini dell'attivazione trascrizionale dei geni bersaglio in quanto l'alanina agisce da stabilizzatore del dominio attivatore dei MRFs [42].

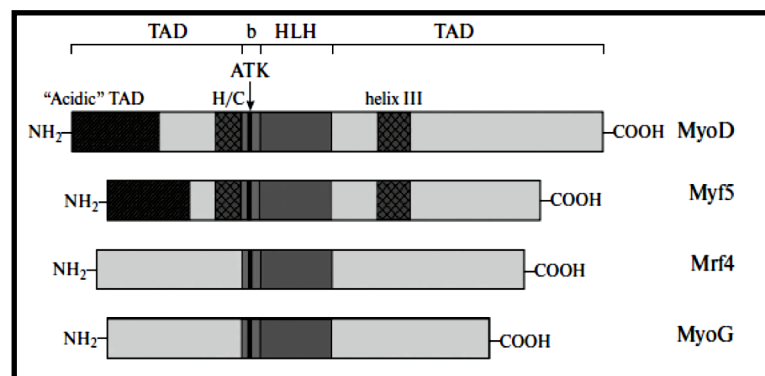


Figura 16. Struttura delle proteine appartenenti alla famiglia MRFs: MyoD, Myf5, Mrf4 e MyoG. TAD, dominio di trans attivazione; b, dominio basico; HLH, dominio Helix-Loop-Helix; “Acidic” TAD; ATK, motivo aminoacidico alanina-treonina-lisina; H/C, dominio ricco in istidine e cisteine; helix III, motivo C-terminale [42].

A valle della attività del fattore trascrizionale MyoD agisce la *miogenina* (MyoG) che promuove la trascrizione di geni che indirizzano i mioblasti verso un differenziamento terminale [42]. Al contrario la proteina BMP4 (bone morphogenetic protein 4) e la via di segnalazione Notch antagonizzano questo differenziamento terminale, in particolare BMP4 induce Pax3 nelle cellule progenitrici conservandole in uno stato indifferenziato, mentre Notch inibisce MyoD attraverso la cooperazione della proteina RPB-J con il fattore trascrizionale Hes1 [39].

Il passaggio trascrizionale dalla miogenesi embrionale a quella fetale è regolato dal fattore trascrizionale Nfix (nuclear factor IX). Durante questa fase le fibre secondarie che si originano dalla fusione dei mioblasti fetali vanno incontro ad allungamento e iniziano a diversificare in fibre di tipo 1 (lente - *slow*) o di tipo 2 (veloci - *fast*). Questa classificazione delle fibre muscolari è basata sulla velocità di contrazione ATP-dipendente. Purtroppo gli eventi che guidano la miogenesi fetale, dal punto di vista molecolare, non sono ancora ben compresi, anche se diversi studi nel modello animale *Mus musculus* hanno evidenziato il ruolo cruciale di Myog, MyoD e Myf5 [41].

Infine la miogenesi adulta (o post-natale) dipende principalmente da cellule staminali adulte residenti a livello muscolare chiamate cellule satelliti (SCs), le quali garantiscono la crescita fisiologica post-natale e la rigenerazione a seguito di un danno muscolare. Le SCs originano da cellule multipotenti nel dermamiotomo che sono Pax3 e Pax7 positive. In particolare le SCs adulte che esprimono Pax7 sono in stato quiescente (fase G0 del ciclo cellulare) e alcune presentano il locus *Myf5* attivato, a sottolineare la loro determinazione precoce in senso miogenico.

Il meccanismo attraverso cui le SCs ritardano il rientro in ciclo e il loro differenziamento è stato oggetto di diversi studi e ad oggi l'ipotesi più accreditata consiste nel fatto che l'mRNA di *Myf5* interagendo con il microRNA-31, sia trattenuto all'interno di granuli mRNP e rilasciato solo al momento dell'attivazione della cellula [43], [44].

Durante la rigenerazione muscolare, la proliferazione iniziale delle SCs ha come marcatori molecolari l'espressione di Pax7 e MyoD, quest'ultimo induce la ripresa del differenziamento muscolare fino alla fusione finale con le fibre preesistenti. Le cellule in via differenziativa esprimono Miogenina, Mrf4 e l'isoforma embrionale di MyHC.

Al termine di questo processo si innesca la maturazione e il rimodellamento delle fibre, che richiedono da un lato il ripristino delle giunzioni neuromuscolari e dall'altro il passaggio dalla isoforma embrionale di MyHC verso le sue isoforme adulte [39].

In figura 17 si può osservare uno schema degli eventi che guidano le SCs verso il differenziamento terminale ed i principali fattori trascrizionali coinvolti.

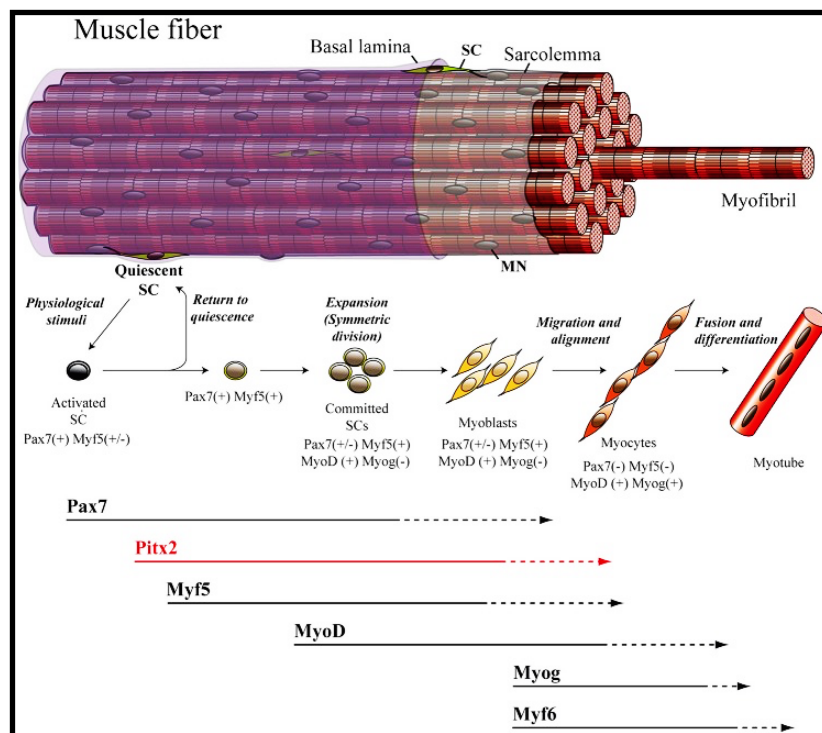


Figura 17. Eventi molecolari che guidano il differenziamento dalle cellule satelliti verso il muscolo scheletrico maturo [41].

La miogenesi nei teleostei

La miogenesi nei teleostei viene suddivisa in due fasi una prima embrionale-larvale-giovanile e una successiva definita fase adulta. Durante la somitogenesi il mesoderma parassiale si sviluppa dalle cellule poste intorno al bordo della gastrula e, successivamente, il tronco inizia ad uscire dall'uovo e la coda ad estendersi [45]. Al termine del primo giorno di sviluppo i somiti formati sono già distinti in sclerotomo e miotomo, quest'ultimo già innervato e funzionale.

A differenza dei mammiferi, in zebrafish, i mioblasti vengono commissionati prima della somitogenesi infatti, la prima ondata miogenica è generata già nelle cellule adassiali mesodermiche presomitiche positive per i marker MyoD e Myf5 [46]. Dopo la formazione dei somiti, queste cellule migrano in direzione radiale dalla notocorda verso la superficie del miotomo che esprime il fattore di trascrizione *prox1* ed il gene *smyhc1* (slow myosin heavy chain1), qui si formerà un primo strato di fibre lente. A seguire le cellule presomitiche laterali iniziano a migrare verso la parte profonda del somite, dando origine alle fibre rapide. A 24 hpf il miotomo di *Danio rerio* è funzionante, entrambe le tipologie di fibre formatesi vanno successivamente incontro alla miogenesi secondaria anche detta iperplasia stratificata (48-72 hpf), in cui la crescita delle fibre avviene per ipertrofia delle fibre muscolari pre-esistenti e iperplasia di cellule progenitrici miogeniche nello stadio larvale [39].

Nello zebrafish le prime fibre muscolari iniziano ad allungarsi prima che il dermamiotomo si sia completamente formato. Questo tessuto esprime Pax3 e Pax7 ed origina dalle cellule Row1, le quali formano una singola fila di epitelio esterno al miotomo. Durante le fasi tardive della segmentazione e nelle prime fasi larvali queste cellule proliferano dando origine al miotomo secondario; in particolare, le cellule indifferenziate Pax7 positive migrano dalla superficie esterna verso quella più interna dove formano un nuovo strato di fibre veloci.

Uno strato indifferenziato di cellule Pax7-positivo è mantenuto durante il periodo giovanile precoce e contribuisce continuamente alla crescita muscolare post larvale. Dal punto di vista molecolare si osserva che i fattori trascrizionali Myf5 e MyoD sono necessari e sufficienti a promuovere la miogenesi. L'espressione di MyoD è a sua volta regolata a monte dalla via di segnalazione Hedgehog (HH) e dai fattori Pax7 e Pax3. La proteina Sonic Hedgehog secreta dalla notocorda e dal midollo spinale ventrale, attraverso la down-regolazione di Pax7, permette il differenziamento dei due tipi di fibre, infatti le fibre lente richiedono più precocemente la via di segnalazione di HH attivata e il loro differenziamento dipende dal suo effettore a valle, gli2. Questo network coinvolge anche il repressore Prdm1a che, inibendo alcuni geni specifici delle fibre *fast* (*fastMyHCx*, *mylx2*, *tnnt3a* e *tnni2*) e il repressore Sox6, favorisce lo sviluppo delle fibre *slow* [39], [46].

Le fibre rapide invece richiedono una attivazione del pathway di HH più tardivo e hanno una minore dipendenza dal fattore trascrizionale gli2.

L'azione della proteina Bmp4 (bone morphogenetic protein 4), membro della famiglia dei TGF- β , sulle cellule adassiali ha un ruolo antagonista rispetto al pathway di HH. A questa importante regolazione è associata l'attività del fattore di trascrizione Pbx che agisce inducendo la trascrizione di geni delle fibre *fast* contrastando l'azione inibitoria di Prdm1a.

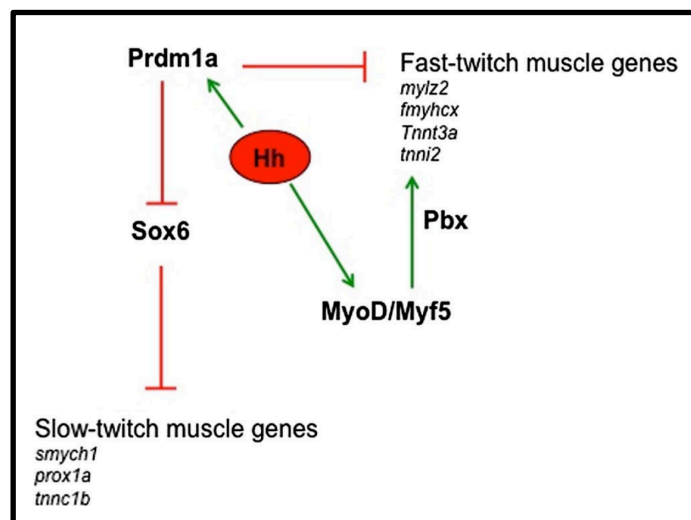


Figura 18. Rappresentazione schematica delle vie molecolari che regolano la diversificazione delle fibre muscolari in *Danio rerio* [39].

La seconda ondata miogenica interviene tra le 48 e le 72 hpf ed è operata dai progenitori miogenici residenti nel dermamiotomo, i quali portano alla formazione di fibre lente multinucleate. Il principale fattore trascrizionale di questa fase è *nfixa* che regola l'espressione di *slowMyHC* mediata da *nfatc4* e coopera con le proteine Mef2 (Myocyte enhancer factor 2). Ad oggi gli eventi alla base di questa seconda ondata miogenica non sono ancora bene caratterizzati.

La miogenesi continua anche nello stadio adulto, o post-larvale attraverso i meccanismi di iperplasia ed ipertrofia descritti precedentemente. Come già visto nei mammiferi anche in *Danio rerio* gli eventi molecolari legati alla rigenerazione muscolare sono regolati dall'attivazione delle cellule satelliti.

Le SCs a seguito di un danno muscolare migrano nel tessuto danneggiato e proliferano, in parallelo queste cellule up-regolano l'espressione dei fattori regolatori miogenici (MRFs) nelle miofibrille circostanti per sostenere la rigenerazione.

Lo studio dei meccanismi molecolari che portano al differenziamento completo del muscolo scheletrico rappresenta in ambito clinico una importante opportunità terapeutica. Come spiegato in precedenza, una delle patologie in cui i meccanismi differenziativi sono compromessi a scapito di una incontrollata proliferazione è il cancro, all'interno di questa sezione vedremo più nello specifico un tipo di tumore pediatrico in cui il differenziamento muscolare è fortemente compromesso: il rhabdomyosarcoma.

Incapacità differenziativa nei rhabdomyosarcomi

Il rhabdomyosarcoma (RMS) è un tumore mesenchimale a differenziazione muscolare striata, appartiene alla categoria dei sarcomi dei tessuti molli dove rappresenta oltre il 60% degli stessi. Statisticamente è il sarcoma più frequente in pazienti di età inferiore ai 15 anni, rappresentando il 5% delle neoplasie in età pediatrica e l'1.2% dei sarcomi in età adulta [47]. Alcune sindromi come la Neurofibromatosi di tipo 1 [48], [49], la sindrome di Li-Fraumeni [50], la sindrome di Beckwith-Wiedemann [51] sono state associate all'incremento del rischio di sviluppare rhabdomyosarcomi, ma nella maggior parte dei casi queste neoplasie sono di natura sporadica senza un fattore eziologico definito.

La tabella 1 riassume le principali sindromi e i geni ad esse associati che aumentano il rischio di sviluppare RMS.

Tabella 1.

Sindrome	Geni associati	Ref.
Li-Fraumeni	TP53	[50]
Neurofibromatosi di tipo 1	NF1	[52], [53]
DICER1	DICER1	[54]
Costello	HRAS	[55], [56]
Noonan	BRAF, KRAS, NRAS, PTPN11, RAF1 e SOS1	[55]
Beckwith-Wiedemann	IGF2, CDKN1C, H19 e KCNQ1OT1	[57]

Questi tumori dal punto di vista istopatologico vengono distinti tradizionalmente in due gruppi: i rhabdomyosarcomi embrionali (ERMS) il cui istotipo ricorda il muscolo scheletrico immaturo e i rhabdomyosarcomi alveolari (ARMS) più simili alle cellule degli alveoli polmonari.

Per quanto riguarda l'aspetto molecolare gli ARMS sono caratterizzati da alcune peculiari traslocazioni, in particolare le traslocazioni t(2;13) (q35;q14) e t(1;13)(p36;q14) rispettivamente nel 60% e nel 20% dei casi [58]. Questi riarrangiamenti cromosomici interessano i geni Pax3 (chr 2) e Pax7 (chr1) e danno origine a due geni di fusione le cui proteine sono rispettivamente PAX3- FOXO1 e PAX7-FOXO1. In entrambi i casi, la rottura a livello dell'introne 7 nei geni PAX e a livello dell'introne 1 in FOXO1 comporta la formazione di proteine aberranti caratterizzate dalla fusione tra il dominio di legame al DNA N-terminale di PAX3/PAX7 ed il dominio transattivante C-terminale di FOXO1 [59].

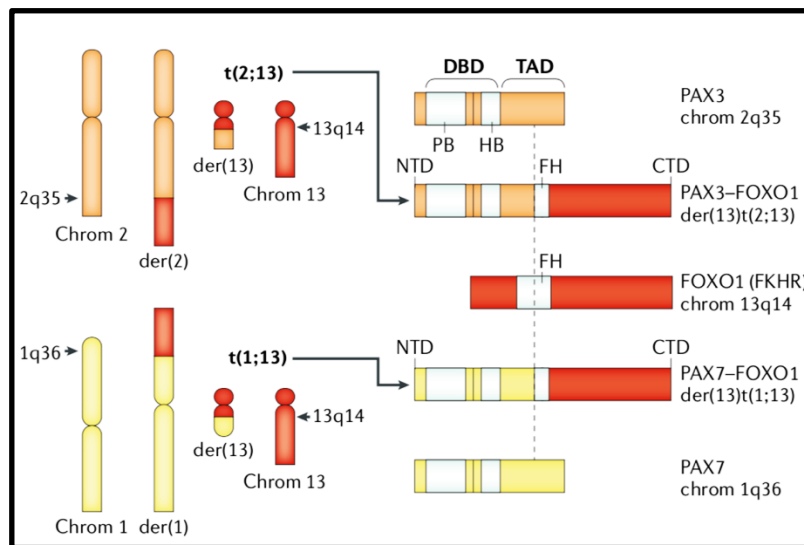


Figura 19. Schema riassuntivo delle traslocazioni PAX3-FOXO1 e PAX7-FOXO1.

NTD: estremità amino-terminale; CTD: estremità carbossi-terminale; TAD: dominio di attivazione del fattore di trascrizione oncogeno; Chrom: cromosoma; der: cromosoma derivato; DBD: dominio di legame del DNA; HB: dominio omeobox; FH: dominio appartenente a FOXO1; FKHR: FOXO1 omologo; PB: dominio box accoppiato [60].

La proteina di fusione PAX3-FOXO1, ha una emivita più lunga rispetto alla proteina Pax3 ed è capace di inibire l'espressione e l'attività di MyoD, abrogando di conseguenza la miogenesi [61].

A seguito invece dell'espressione del trascritto di fusione PAX7-FOXO1 si ha l'induzione del *signalling* di NFkB che coopera all'inibizione della miogenesi attraverso l'attivazione del complesso ciclina D1/CDK4 [61]. In modo interessante l'alto livello di espressione di PAX3-FOXO1 è il risultato di un aumento della trascrizione del gene di fusione, mentre l'alto livello di espressione di PAX7-FOXO1 consegue ad un aumento del numero di copie causato da amplificazioni del gene chimerico [62]. Tra i geni bersaglio di questi fattori trascrizionali chimerici troviamo ad esempio il fattore di crescita c-MET che possiede diversi siti di legame per PAX3 all'interno del suo promotore. L'elevata espressione di questo fattore di crescita induce i precursori muscolari a riattivare il ciclo cellulare con una conseguente soppressione del differenziamento miogenico [59].

Il ruolo di questi trascritti di fusione è stato indagato da diversi studi e quello che si evince è che la loro presenza è necessaria, ma non sufficiente ad avviare il processo di oncogenesi, infatti è fondamentale l'interazione con diversi altri oncogeni: tra i più importanti FGFR4 che promuove la proliferazione attraverso la sua attività di recettore tirosin chinasi.

Gli ERMS dal punto di vista epidemiologico presentano una distribuzione bimodale, con il picco maggiore nei primi 5 anni di vita e un secondo minore in adolescenza. Si osserva una maggiore incidenza nel sesso maschile [47]. Raramente presentano le traslocazioni citate per gli ARMS e sono generalmente caratterizzati dalla perdita allelica di una parte del cromosoma 11 (11p15.5), l'allele perso più frequentemente è quello materno. Una interessante ipotesi è che vi sia nella regione deleta un gene oncosoppressore. Tra i geni candidati ci sono CDKN1C, H19 e HOTS; ognuno dei quali è espresso specificatamente dall'allele materno che codifica per una proteina che inibisce la crescita cellulare [63].

Tra le caratteristiche comuni ad entrambi gli istotipi si osserva l'attivazione di oncogeni (tra cui *N-MYC*, *C-MET*, *EGFR* ed *FGFR4*) e l'alterazione di alcuni pathway: in particolare si osserva un'incapacità nell'attivazione delle vie di p53 ed RB [64]. Inoltre amplificazioni della regione 12q13, comunemente riscontrate nei sarcomi, sono state identificate anche in casi di RMS, tra i geni più noti interessati troviamo *CDK4*, *SAS*, e *GLI1* [65]. Alcune ricerche hanno messo in evidenza un potenziale contributo dell'alterazione del *signalling* di HH evidenziabile sia in biopsie tumorali che in linee

cellulari di rabdomiosarcoma [66], [67]. Più recentemente altri autori hanno indagato la possibilità di una attivazione aberrante di questo pathway in tumori tipici dell'età pediatrica ipotizzando un ruolo importante nella capacità metastatica e nella crescita tumorale [68]. Come emerge dai dati di letteratura qui brevemente riportati, i rabdomiosarcomi, indipendentemente dal sottotipo, sono caratterizzati da molteplici alterazioni molecolari che portano all'incapacità di terminare il differenziamento miogenico.

Uno degli aspetti di maggior interesse nei meccanismi di oncogenesi nei rabdomiosarcomi è la determinazione della cellula di origine, in questo campo diversi studi sembrano convogliare su due indiziati principali: le cellule staminali mesenchimali multipotenti (MSCs) e le cellule satelliti. Inoltre non è da escludere che i due sottotipi tumorali abbiano una genesi differente, in particolare le cellule satelliti sembrano avere un ruolo nella genesi dei ERMS mentre le MSCs nei rabdomiosarcomi alveolari [47], [64], [69].

La disponibilità di quasi 30 linee cellulari immortalizzate presenti per questa tipologia tumorale, di cui 12 linee dell'istotipo ARMS e 18 linee dell'istotipo ERMS, permette di avere a disposizione un ottimo modello cellulare sia per indagare il rapporto tra il livello di differenziamento alterato e il contesto genomico cellulare, sia per validare approcci terapeutici innovativi [64], [70]. In questo progetto di tesi, partendo da uno screening precedentemente effettuato nel mio lavoro di tesi magistrale [7] sono state utilizzate tre linee cellulari: RH30 rappresentativa dell'istotipo ARMS e le linee RD/12 e RD/18 rappresentative degli ERMS.

PARTE I

Esperimenti di sovraespressione e perdita di funzione del gene *cyrr1* in *Danio rerio*

Lo scopo di questa sezione è stato quello di valutare come interferenze nell'espressione del gene *cyrr1*, che hanno come risultato finale la sovraespressione e la downregolazione del gene stesso, possano influenzare l'embriogenesi di zebrafish. La sovraespressione è stata ottenuta attraverso la microiniezione dell'RNA messaggero trascritto in vitro del gene *cyrr1* in uova fecondate, mentre per la downregolazione sono stati microiniettati oligonucleotidi morfolinati antisense (comunemente noti come morfolini - MOs) in grado di appaiarsi all'RNA messaggero bersaglio e impedirne la traduzione. Le analisi morfologiche e molecolari dei fenotipi così ottenuti hanno indirizzato le fasi di studio successive.

Materiali e metodi

Cura e mantenimento del modello animale *Danio rerio*

Il modello animale utilizzato in questi studi di genomica funzionale è *Danio rerio*. Gli animali sono stabulati presso il "Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale" dell'Università di Bologna. Il loro allevamento viene effettuato rispettando le procedure standard di stabulazione [71]. La stabulazione degli animali avviene in un ambiente opportunamente adibito composto da 2 armadi-acquari da 8 piani ciascuno, in ogni ripiano sono presenti vasche di allevamento di volume variabile da 1 a 5 Litri. L'acqua del sistema è mantenuta ad una adeguata composizione e osmolarità e viene ricircolata in modo continuo attraverso un sistema di ugelli e canaline, coordinato da una pompa idraulica, in questo modo è assicurato un ricambio dell'acqua nelle singole vasche. Il sistema garantisce anche:

- il mantenimento di un livello d'acqua costante, grazie alla presenza di un serbatoio esterno la cui fuoriuscita di acqua è regolata da un galleggiante;
- il mantenimento della temperatura idonea, pari a 27,5 °C, grazie ad un termostato che regola l'accensione e lo spegnimento di un termo riscaldatore;
- la sterilizzazione dell'acqua, effettuata mediante lampada UV. Il sistema possiede opportuni filtri biologici a spugna dotati di batteri in grado di demolire le scorie azotate prodotte dai pesci.



Figura 20. Fotografia di un armadio-acquario utilizzato per la stabulazione presso il DIMES, Università di Bologna.

Settimanalmente vengono eseguiti controlli dei parametri chimico-fisici dell'acqua quali osmolarità, pH, durezza, concentrazione di nitrati e nitriti, monitoraggio della temperatura e ossigenazione delle vasche.

L'alimentazione degli animali è effettuata giornalmente, consta di due razioni giornaliere di cibo secco in scaglie di opportuna granulometria. Due volte a settimana l'alimentazione viene implementata con naupli di artemie saline. Durante i giorni festivi un sistema di mangiatoie provvede al rifornimento automatico delle vasche, inoltre negli ultimi anni una convenzione tra l'Università di Bologna e la "Charles River Laboratories" ha permesso l'assunzione di un operatore per monitorare le condizioni dello stabulario oltre che per provvedere manualmente alla somministrazione del cibo nei giorni di chiusura dei laboratori.

Accoppiamento e raccolta delle uova

Il dimorfismo sessuale nella specie *Danio rerio* è poco pronunciato. La femmina adulta è leggermente più grande del maschio da cui si distingue facilmente solo quando il ventre è più prominente a causa dell'accumulo di uova come si evince dalla figura 21.



Figura 21. Dimorfismo sessuale in *Danio rerio*, due esemplari, F: femmina e M: maschio <http://www.bettaportal.it/biotopo-asiatico/danio-rerio/>

Il fotoperiodo ottimale per il benessere di questo pesce tropicale è di 13 ore di luce e 11 ore di buio, il rituale di corteggiamento inizia in natura alle prime luci dell'alba. La fecondazione di questi animali è esterna, il maschio rincorre la femmina e dopo aver compiuto il rituale di corteggiamento, la femmina si adagia sul fondo e inizia a deporre le uova.

Al fine di poter progettare esperimenti e monitorare l'inizio dell'accoppiamento, le condizioni di alternanza giorno-notte sono state controllate attraverso un meccanismo di accensione e spegnimento automatico delle luci. Questa procedura veniva predisposta il pomeriggio precedente al giorno in cui si necessitava delle uova. Accoppiamenti multipli sono stati allestiti in speciali vaschette composte da una parte esterna, una interna dal fondo forato, in modo da permettere alle uova di stazionare in un'area non accessibile ai pesci e un setto separatore trasparente. Il setto separatore ha la funzione di permettere agli animali di vedersi durante la giornata, ma di impedirne l'unione, tale divisorio viene rimosso dopo una notte. Gli accoppiamenti sono stati allestiti con numeri differenti, generalmente due esemplari maschi e due esemplari femmine.



Figura 22. Vaschetta di accoppiamento con setto separatore inserito.
<https://www.carolina.com/zebrafish/zebra-fish-breeding-tank/161937.pr>

Al completamento della procedura, le uova contenute nella vaschetta esterna, vengono recuperate per capovolgimento su di un retino a maglie sottili, successivamente con l'ausilio di una buretta contenente acqua isosmotica vengono trasferite su una piastra di Petri e poste in un incubatore alla temperatura di 28.5 °C fino allo stadio desiderato. Nel caso in cui sia necessario effettuare manipolazioni entro le prime due divisioni cellulari, come la microiniezione di RNA messaggeri o di oligonucleotidi morfolinici antisenso, viene saltato il passaggio in incubatore e si procede immediatamente alla manipolazione.

Linee di zebrafish

Le linee di zebrafish utilizzate in questa sezione sono state tre: una linea di zebrafish *wild type* denominata AB, una linea transgenica chiamata Tg(*cldnb*:EGFP) in grado di esprimere la fluorescenza a livello delle cellule epiteliali dei neuromasti, utilizzata generalmente per marcare la linea laterale (un organo sensorio tipico dei pesci) e una linea Tg(*cmc2*:GFP) in grado di marcare il tessuto cardiaco. Gli esemplari di questa seconda linea non sono stabulati presso il nostro laboratorio, ma presso l'IFOM di Milano e sono stati gentilmente concessi per alcuni esperimenti dal ricercatore Dr. Gianluca Deflorian.

Microiniezione in uova fecondate

La microiniezione è una tecnica utilizzata per introdurre acidi nucleici o oligonucleotidi morfolinici antisenso all'interno di uova appena fecondate. L'attrezzatura necessaria per la microiniezione consta di tre componenti fondamentali: il microscopio, un microiniettore collegato ad un compressore e un micromanipolatore con base magnetica; completano la dotazione necessaria un *joystick*, l'*holder* nel quale posizionare l'ago e un braccio trainante.

Gli aghi possono essere finemente prodotti attraverso il riscaldamento di un capillare di vetro fino al punto di fusione e la successiva stiratura con uno strumento chiamato *puller*, oppure si possono acquistare aghi commerciali pronti all'uso. Nel caso dell'autoproduzione, da ogni capillare di vetro del diametro di 0.86 mm si possono ottenere due aghi che devono essere successivamente tagliati trasversalmente con una pinza al fine di ottenere il prodotto definitivo.

Lo strumento per la microiniezione, bilanciato adeguatamente per quel che riguarda trattenuta e rilascio di liquido, permette di ottenere iniezioni di pressione costante e assicura che, una volta determinato il volume di liquido da iniettare, ogni microiniezione sia identica alla successiva.

Le uova, prelevate come descritto in precedenza, vengono posizionate in una piastra Petri rivestita da uno strato di soft-agar con opportune scanalature necessarie all'allineamento delle uova in singola fila (Figura 23).

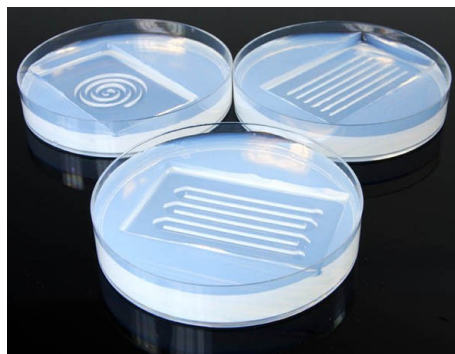


Figura 23. Piastra di Petri rivestita in *soft agar* contenete scanalature utili al posizionamento delle uova di zebrafish.

https://www.agnthos.se/index.php?id_product=204&controller=product

Una volta posizionate le cellule uovo fecondate si allestisce l'apparato di microiniezione aspirando con l'ago la soluzione da microiniettare, solitamente 2 μ L posizionati su una striscia di *parafilm* sterile. Successivamente la piastra di Petri viene posizionata sotto al microscopio e inizia la microiniezione delle uova a livello del tuorlo. I ponti citoplasmatici, presenti nelle fasi iniziali dello sviluppo embrionale tra tuorlo e blastomeri e tra blastomero e blastomero, permettono al costrutto di diffondere in modo omogeneo in tutte le cellule.

Dopo la procedura le uova vengono recuperate in una nuova piastra di Petri contenente acqua e poste in incubatore alla temperatura di 28.5°C fino allo stadio di sviluppo desiderato.

Gli esperimenti di sovraespressione e di perdita di funzione (*loss of function*) hanno previsto rispettivamente la microiniezione dell'RNA messaggero di *cyrr1* trascritto in vitro e due differenti morfolini progettati e costruiti per bersagliare il gene *cyrr1*. Il morfolino chiamato MO-ATG riconosce il codone di inizio della traduzione ed è in grado di inibire la traduzione sia del trascritto materno che del trascritto zigotico mentre il MO-E111 rileva la prima giunzione di splicing del trascritto ed inibisce esclusivamente il trascritto zigotico.

Tabella 2.

Morfolino	Sequenza
MO-ATG	5'-CGCTTCTGGGATTCTCCATAATC-3'
MO-E111	5'-GCTGAAAGTAGTTCTTCATACCGGC-3'

Trascrizione in vitro del costrutto pCSII *cyrr1*

Nel laboratorio di post genomica nel quale ho svolto la mia attività di ricerca, durante un lavoro contenuto nella tesi di Dottorato della Dr.ssa Maria Chiara Pelleri, è stata clonata la regione codificante (CDS) del gene *cyrr1* nel vettore di espressione pCSII. L'integrità e la concentrazione del costrutto è stata verificata attraverso gel di agarosio all'1% addizionato di Bromuro di Etidio (0.5 μ g/mL) e quantificazione con Nanodrop®. Il plasmide è stato successivamente digerito con l'enzima di restrizione Not1.

La miscela di reazione è stata ottenuta addizionando in una microprovetta da 1,5 mL: 3 µg di plasmide, 5 µL di buffer, 1 µL di enzima Not1 e una quantità di acqua sterile per raggiungere un volume finale di 50 µL. Il campione è stato incubato a 37°C per 4 ore. L'effettiva digestione è stata verificata attraverso un gel di agarosio 1% addizionato di Bromuro di Etidio. Successivamente il campione è stato purificato con il Kit QIAquick PCR Purification (Quiagen) e nuovamente valutato su gel di agarosio e quantificato attraverso la lettura al Nanodrop®.

La trascrizione del plasmide digerito è stata effettuata con mMACHINE™ SP6 Transcription Kit (ThermoFisher) che prevede una miscela di reazione contenente 500 ng di plasmide digerito, NTP/CAP in rapporto 1:2 rispetto al volume finale, 3 µL di buffer di reazione 10x, 2 µL di enzima SP6 e acqua DEPC per ottenere un volume finale di 20 µL. Il campione è stato incubato a 37°C per 4 ore. E' quindi stato aggiunto 1 µL di TurboDnasi al fine di rimuovere il DNA plasmidico e il tutto è stato incubato a 37°C per 30 minuti. L'RNA prodotto è stato recuperato con la classica metodica di estrazione fredda in fenolo/cloroformio e diluito in acqua DEPC. Prima di aliquotare l'RNA e conservarlo alla temperatura di -80°C, la sua integrità è stata valutata con gel di agarosio 1% addizionato di Bromuro di Etidio e la sua quantificazione è avvenuta tramite Nanodrop®.

Colorazione di sezioni con ematossilina eosina

Le sezioni dei campioni ottenute al microtomo sono state colorate con ematossilina-eosina secondo i protocolli standard che prevedono una fase di deparaffinazione tramite due passaggi in xilene e una fase di idratazione in una soluzione contenente acqua distillata ed etanolo a concentrazione discendente. A seguire le sezioni sono state colorate prima con il colorante ematossilina (Merck) e, dopo alcuni lavaggi con acqua distillata, con eosina (Merck). I campioni sono poi stati montati su appositi vetrini ed osservati in microscopia ottica classica. Le immagini sono stata acquisite con l'ausilio di una fotocamera.

Whole-mount in situ hybridization (WISH)

L'ibridazione in situ (ISH) è una tecnica che permette di evidenziare l'espressione tissutale di uno specifico gene tramite una reazione istochimica cromogenica.

Questa tecnica in *Danio rerio* può essere effettuata sugli embrioni interi (*whole mount*), data la caratteristica trasparenza che permette di osservare le cellule marcate anche nei tessuti più profondi. Il sistema utilizzato per rilevare il prodotto di trascrizione di un gene di nostro interesse consiste nel produrre un RNA antisenso (sonda) complementare all'RNA messaggero bersaglio in modo tale che essi possano appaiarsi. La sonda possiede un aptene legato covalentemente ad una frazione delle uridine che le permette di essere rilevata utilizzando specifici anticorpi monoclonali.

I passaggi fondamentali di questa tecnica sono tre: il fissaggio degli embrioni, sintesi della sonda e l'ibridazione.

Fissaggio degli embrioni: raggiunto lo stadio di sviluppo di interesse, gli embrioni vengono incubati in 500 µl di PFA 4% O/N alla temperatura di 4°C (generalmente ogni campione è formato da circa 20 embrioni). Il giorno successivo il campione viene disidratato attraverso passaggi da circa 5' l'uno, in soluzioni a concentrazione crescente di metanolo (25% MeOH e 75% PBS/Tween, 50% MeOH e 50% PBS/Tween, 75% MeOH e 25% PBS/Tween). L'ultimo trasferimento avviene in metanolo puro e i campioni così disidratati vengono conservati a -20°C.

Sintesi della sonda: la sonda è stata prodotta partendo da DNA plasmidico contenente il gene di interesse in modo simile alla trascrizione dell'RNA descritta in precedenza ma con l'aggiunta nella miscela di reazione di uridine-5'-trifosfato (UTP) legate ad uno specifico aptene, nel nostro caso la digossigenina. La sonda prodotta è stata valutata sia in gel di agarosio 1% addizionato con Bromuro di Etidio sia letta con Nanodrop® per verificarne concentrazione e purezza.

Ibridazione: il protocollo di ibridazione necessita di alcuni giorni di lavoro, qui di seguito viene riportato il protocollo da noi utilizzato.

Primo giorno

- Reidratazione mediante il passaggio in soluzioni a concentrazione crescente di PBS e decrescente di metanolo (75% MeOH e 25% PBS/Tween20, 50% MeOH e 50% PBS/Tween20, 25% MeOH e 75% PBS/Tween20), lavaggio finale in PBS/Tween20.
- Permeabilizzazione degli embrioni mediante digestione con Proteinasi K 10µg/ml in PBT, durata variabile in base allo stadio di sviluppo selezionato

- Fissaggio in PFA 4% in PBS per 20 minuti, a seguire la soluzione viene rimossa attraverso quattro lavaggi da 5' in PBS/Tween20 1%
- Preibridazione degli embrioni per almeno un'ora in 800 µl di miscela di preibridazione a 65°.
- Sostituzione della miscela di preibridazione con 200 µl di miscela di ibridazione contenente la sonda per il gene di interesse e incubazione O/N a 65°C.

Secondo giorno

- Si eseguono una serie di lavaggi per la completa rimozione della sonda in eccesso
- Preparazione degli embrioni in *blocking solution* per un'ora a temperatura ambiente, in agitazione.
- Incubazione con gli anticorpi anti-digossigenina coniugati alla fosfatasi alcalina diluiti in *blocking solution* a 4°C overnight, in agitazione.

Terzo giorno

- Si eseguono una serie di lavaggi per rimuovere gli anticorpi in eccesso e successivamente si sviluppano le colorazioni.
- Durante la il processo di rilevazione la colorazione deve essere monitorata al microscopio ottico entro i primi cinque minuti e successivamente ogni 10 – 15 minuti circa, a seconda di quanto velocemente procede. Si termina con quattro lavaggi veloci in TNT e due in PBT.

Immunofluorescenza (IF)

Gli embrioni ottenuti sono stati fissati allo stadio di sviluppo di interesse in una soluzione al 4% di PFA a 4°C per 45' e successivamente sono stati posti a -20°C O/N. Il giorno successivo sono stati eseguiti 2 lavaggi in PBS/Tween20 (PBST) e di seguito i campioni sono stati trattati 15' con la proteinasi K (10 µg/mL in PBST per embrioni 24 hpf, 15 µg/mL in PBST per embrioni 48 hpf e 30 µg/mL in PBST per embrioni 72 hpf) al fine di aumentare la penetrazione degli anticorpi. Al termine sono stati eseguiti i seguenti passaggi: fissaggio in 4% PFA per 30', quattro lavaggi in PBS di 5' ciascuno, un lavaggio di un'ora in acqua distillata e una incubazione di 7' in acetone freddo a -20°C, seguita da quattro lavaggi in PBST. I siti di legame del campione sono stati bloccati con una incubazione di un'ora a temperatura ambiente in una soluzione 1% BSA e 0,1% DMSO in PBST.

Infine gli embrioni sono stati incubati con anticorpo primario a 4°C O/N. Il giorno seguente sono stati eseguiti quattro lavaggi in PBST di 20' ciascuno e poi il campione è stato incubato sempre a 4°C O/N con l'anticorpo secondario. La rilevazione della fluorescenza è stata eseguita il terzo giorno dopo quattro lavaggi in PBST di 20' ognuno, una preincubazione in DAB di 30' e marcatura con perossidasi e H₂O₂. L'acquisizione delle immagini (*imaging*), ha previsto il montaggio dei campioni in una soluzione al 2% di agarosio a basso punto di fusione (*low melting agarose*). Le immagini sono state analizzate ed elaborate con il *software* ImageJ.

Risultati

La microiniezione di entrambi gli oligonucleotidi morfolinici antisenso è stata effettuata per diverse dosi al fine di valutare la dose subcritica che non avesse effetti tossici; i morfanti (embrioni microiniettati con il morfolino) sono stati osservati a 24 hpf, 48 hpf e 72 hpf.

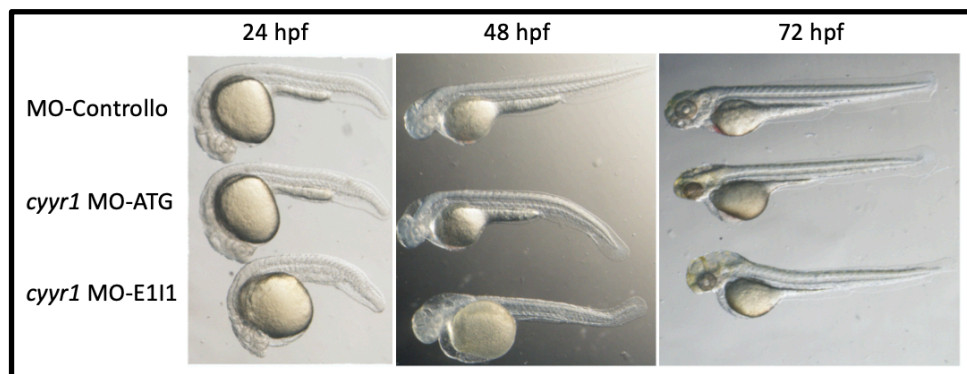


Figura 24. Immagini morfologiche di embrioni *Wild type* (in alto), morfanti *cyvr1* MO-ATG (in mezzo) e morfanti *cyvr1* MO-E111 (in basso) a 24, 48 e 72 hpf.

In tabella 3 sono schematizzati gli effetti fenotipici macroscopici osservati in rapporto alle diverse concentrazioni di morfolino testate.

Tabella 3.

Concentrazione MO	Effetti fenotipici osservati a 24 hpf
MO-ATG 0,1 mM	Diencefalo prominente Dimensioni inferiori
MO-E111 0,5 mM	Diencefalo prominente, Dimensioni inferiori
MO-ATG 0,1 mM + MO-E111 0,5 mM (MO mix)	Diencefalo prominente, Aumento distanza tra occhio e vescicola otica, Ipertrofia delle fibre muscolari del tronco

La microiniezione dei singoli MO, manifesta per entrambi un fenotipo caratterizzato da diencefalo prominente e dimensioni ridotte rispetto al controllo non microiniettato a 24 hpf. La microiniezione di una soluzione di entrambi i MO mostra un fenotipo più marcato caratterizzato da diencefalo prominente, un aumento della distanza tra occhio e vescicola ottica e una ipertrofia delle fibre muscolari del tronco.

La specificità dell'effetto fenotipico è stata valutata con esperimenti di co-microiniezione del MO mix con 100pg dell'mRNA di *cyrr1* (*rescue*); a tale scopo è stata effettuata una classificazione della gravità dei fenotipi: *normal* (fenotipo indistinguibile dal non microiniettato utilizzato come controllo), *mild* (diencefalo prominente e marcata ipertrofia delle fibre muscolari del tronco) e *severe* (importante compromissione del mesoderma e delle strutture assili).

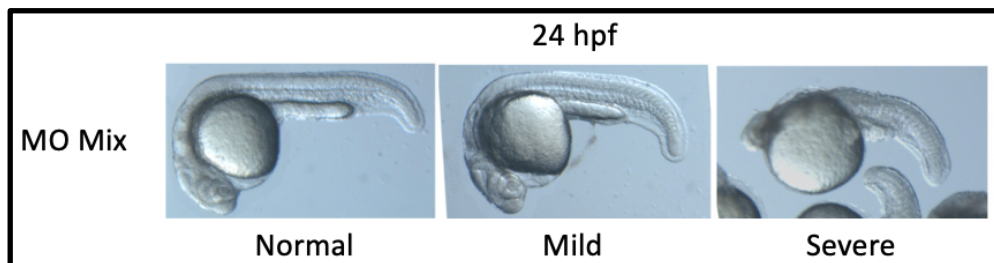


Figura 25. Classificazione della gravità fenotipica dei morfanti a 24 hpf.

Il grafico in figura 26 mostra la reversione parziale degli effetti fenotipici riscontrati nel *rescue*, con un aumento significativo dei fenotipi *normal* e *mild* rispetto ai fenotipi *severe*. In particolare nei morfanti circa il 58% degli embrioni mostra il fenotipo *severe* mentre la co-microiniezione di MO mix e mRNA *cyvr1* (*rescue*) riduce la percentuale di questi fenotipi al 20%. La riduzione dei fenotipi *severe* è contestuale ad un aumento dei fenotipi *normal* e *mild* nel *rescue* rispetto al morfante, confermando la bontà del sistema inibitorio utilizzato.

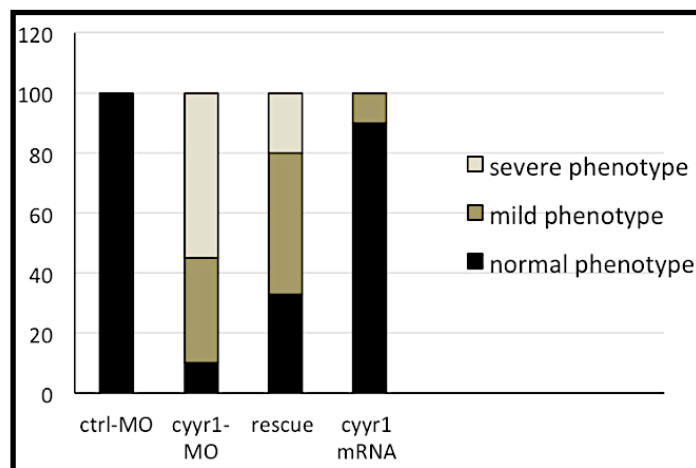


Figura 26. Grafico che mostra in termini percentuali la reversione dei fenotipi nel *rescue*. Ctrl-MO: controllo non microiniettato, *cyvr1*-MO: Mix di MO per il gene *cyvr1*, *rescue*: Mix di MO + 100 pg mRNA *cyvr1* e *cyvr1* mRNA: 100 pg mRNA *cyvr1*.

La microiniezione del solo mRNA *cyvr1* (100 pg) non sembra avere effetti fenotipici macroscopici evidenti (90% di fenotipi *normal*) e gli embrioni si sviluppano normalmente fino a 5 giorni, trascorso tale periodo gli animali sono stati soppressi per ragioni legate al protocollo di sperimentazione animale.

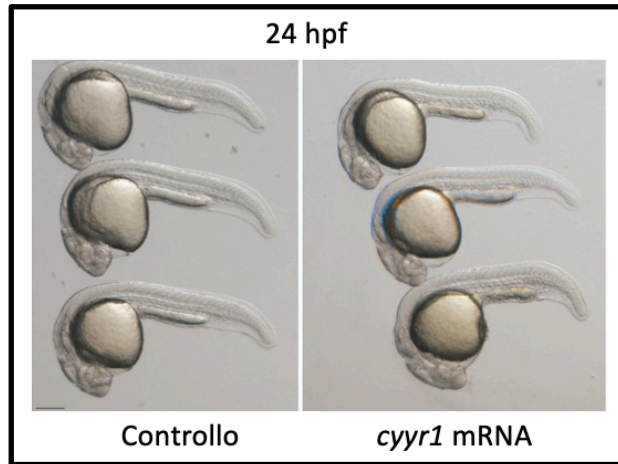


Figura 27. Vista laterale di embrioni a 24 hpf, a sinistra embrioni di controllo e a destra embrioni microiniettati con 100 pg di *cyyr1* mRNA.

La caratterizzazione dei morfanti è stata effettuata in prima analisi nelle strutture e negli organi che hanno mostrato una evidente compromissione (cervello e tessuto muscolare) per poi estendersi ad altri distretti anatomici come il cuore e la linea laterale posteriore.

Analisi fenotipica dell'assetto del sistema nervoso centrale

Le immagini seguenti ottenute in microscopia ottica mostrano il diencefalo prominente in entrambi i morfanti (MO-ATG e MO-E111), inoltre l'assetto del sistema nervoso centrale è anomalo con una posteriorizzazione marcata.

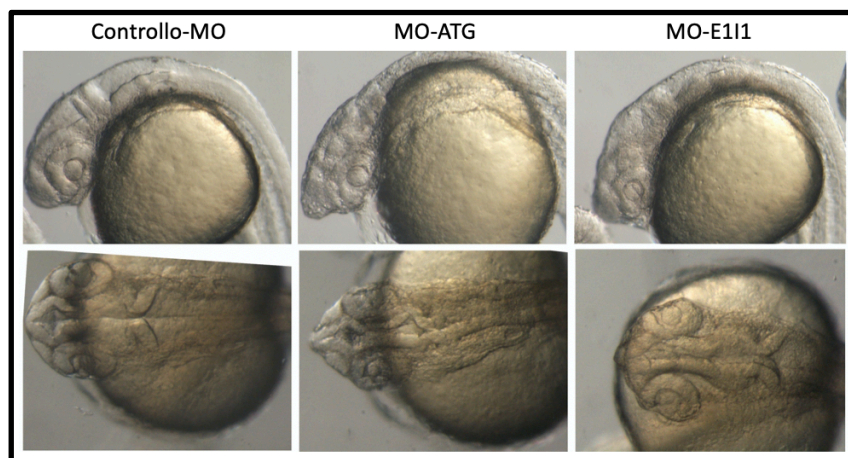


Figura 28. Vista laterale della testa (in alto) e dorsale (in basso) in embrioni a 28 hpf.

Al fine di valutare in modo più accurato la posteriorizzazione del sistema nervoso a centrale, è stato messo a punto un esperimento di doppia ISH per i geni *pax2a* e *egr2b*. Il gene *pax2a* marca specificamente l'organizzatore istmico (*midbrain hindbrain boundary* - MHB) e i neuroni della corda spinale mentre il gene *egr2b* marca specificamente il rombomero 3 e il rombomero 5.

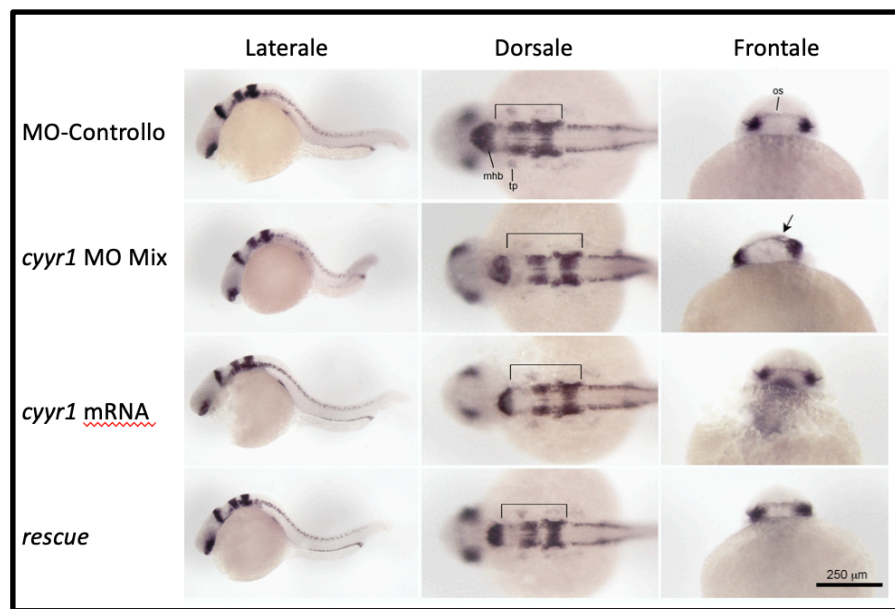


Figura 29. Doppia ISH dei geni *pax2a* e *egr2b* in embrioni a 28 hpf

La doppia ISH mostra un aumento della distanza tra la porzione terminale dell'organizzatore istmico e il rombomero 5 nei morfanti mentre la sovraespressione del gene *cyyr1* non sembra alterare l'assetto del sistema nervoso centrale. La co-microiniezione del mRNA *cyyr1* insieme al MO (*rescue*) reverte il fenotipo ristabilendo la corretta distanza tra l'organizzatore istmico e il rombomero 5. Il pannello rappresentativo in Figura 29 necessita di essere corroborato con una analisi quantitativa delle distanze misurate al fine di dare una significatività numerica al dato osservato.

Analisi fenotipica della muscolatura

L'ipertrofia delle fibre muscolari è stata studiata in prima analisi in sezioni del tronco di embrioni a 48 hpf attraverso una classica colorazione in ematossilina/eosina e successivamente con esperimenti di immunofluorescenza.

Le sezioni di seguito riportate mostrano che sia l'inibizione del gene attraverso la microiniezione dei MO che la sua sovraespressione (100 pg cyr1 mRNA) hanno come risultato una disorganizzazione delle fibre muscolari. Il tessuto muscolare del rescue ha una struttura e una organizzazione più simile al campione di controllo non microiniettato.

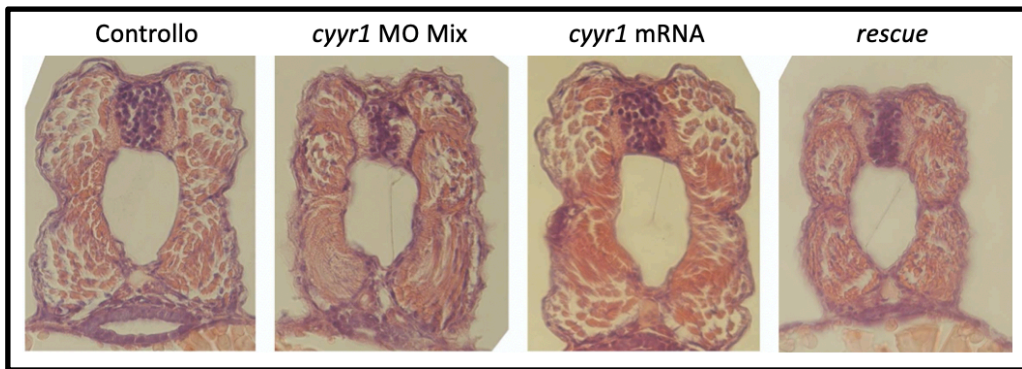


Figura 30. Colorazione ematossilina/eosina di sezioni del tronco di embrioni *Wild type* (controllo non microiniettato), morfanti *cyr1*, sovraespressi *cyr1* mRNA e *rescue* (co-microiniettati MO e *cyr1* mRNA) a 48 hpf.

Per valutare con maggiore precisione il fenotipo delle fibre muscolari sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza con diversi anticorpi primari in grado di riconoscere antigeni specifici delle miosine (Ab *all myosin*), delle sole miosine fast (Ab *fast myosin*) e delle sole miosine slow (Ab *slow myosin*). Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale.

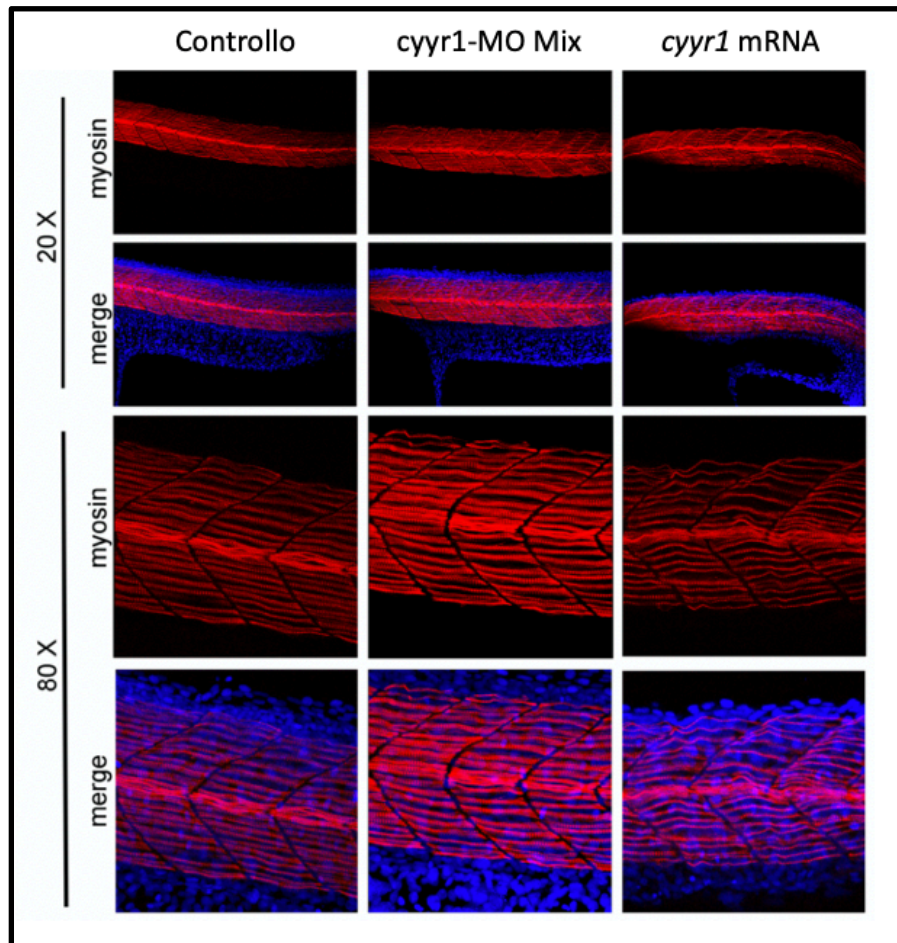


Figura 31. Immunofluorescenza di embrioni a 48 hpf, a sinistra il controllo non microiniettato (*Wild type*), al centro il morfante e a destra l’embrione microiniettato con 100 pg di *cyyr1* mRNA. In rosso le miosine (Ab *all myosin*) e in blu i nuclei (DAPI).

L’immunofluorescenza mostra un aumento marcato della fluorescenza a livello delle fibre muscolari del morfante in rapporto alla fluorescenza delle fibre muscolari dell’embrione di controllo. Inoltre in modo interessante la sovraespressione di *cyyr1* comporta un calo della fluorescenza delle miosine e una struttura più disarticolata del tessuto muscolare rispetto all’embrione non microiniettato.

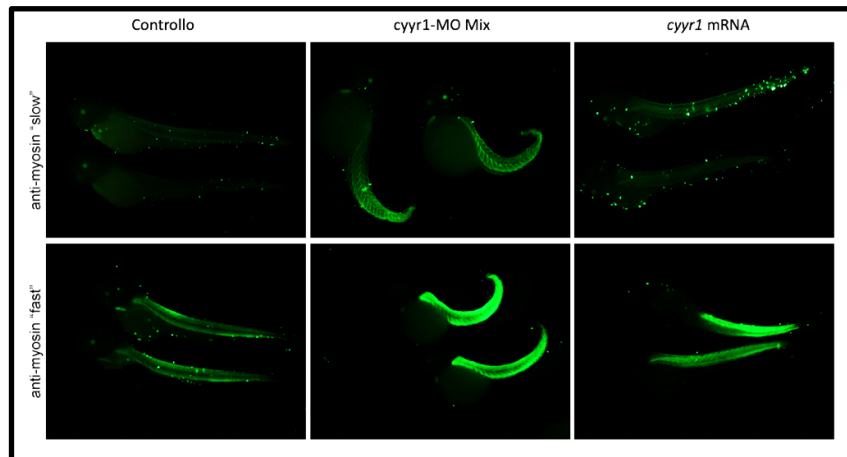


Figura 32. Vista laterale di immunofluorescenza di embrioni non microiniettati a destra, morfanti *cyyr1* al centro e sovraespressi *cyyr1* mRNA a 72 hpf, in alto Ab miosine delle fibre *slow* e in basso Ab miosine delle fibre *fast*.

L'immunofluorescenza specifica per marcare le fibre *slow* e *fast* mostra per entrambe un aumento di fluorescenza nel morfante rispetto all'embrione di controllo in linea con i dati ottenuti nelle immunofluorescenze per le miosine (Ab *all myosin*). La sovraespressione del gene sembra invece avere un differente effetto sulle due tipologie di fibre, la fluorescenza delle fibre *slow* è molto simile al controllo mentre la fluorescenza delle fibre *fast* aumenta.

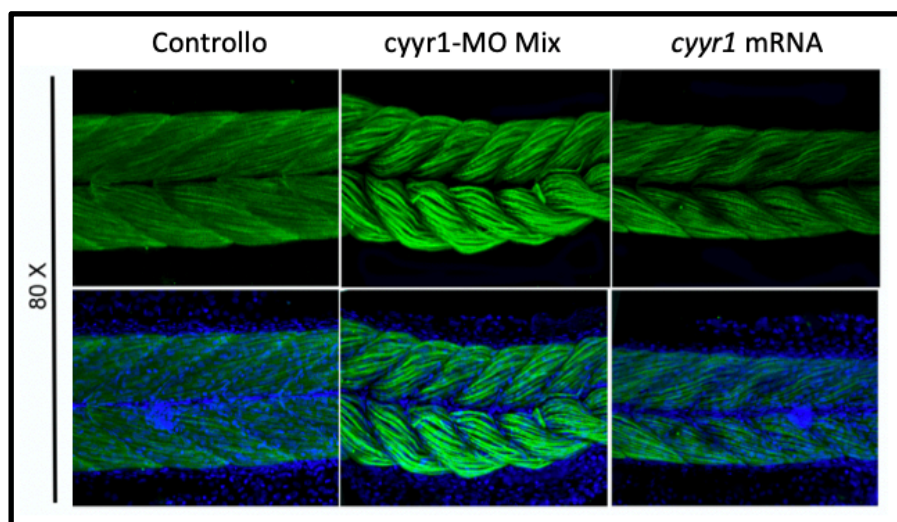


Figura 33. Vista laterale (ingrandimento 80X) di immunofluorescenze di embrioni non microiniettati a destra, morfanti *cyyr1* al centro e sovraespressi *cyyr1* mRNA a 72 hpf, in verde le miosine *fast* e in blu i nuclei (DAPI).

Immagini di microscopia confocale ad un ingrandimento maggiore mostrano un aumento delle dimensioni delle fibre muscolari fast nei morfanti mentre la sovraespressione di *cyrr1* evidenzia una disorganizzazione delle fibre muscolari rispetto all'embrione non microiniettato. Il dato ottenuto da questa analisi fenotipica è stato indagato maggiormente nei paragrafi successivi attraverso esperimenti di Real-time PCR (qPCR) e Western Blot.

Analisi fenotipica del cuore

Il fenotipo cardiaco è stato studiato con un duplice approccio, in particolare è stata utilizzata la microscopia a fluorescenza su una linea transgenica di zebrafish Tg(*cmlc2*:GFP) che marca in modo specifico la catena leggera della miosina cardiaca 2 (*cmlc2*) associata alla ISH per il gene medesimo.

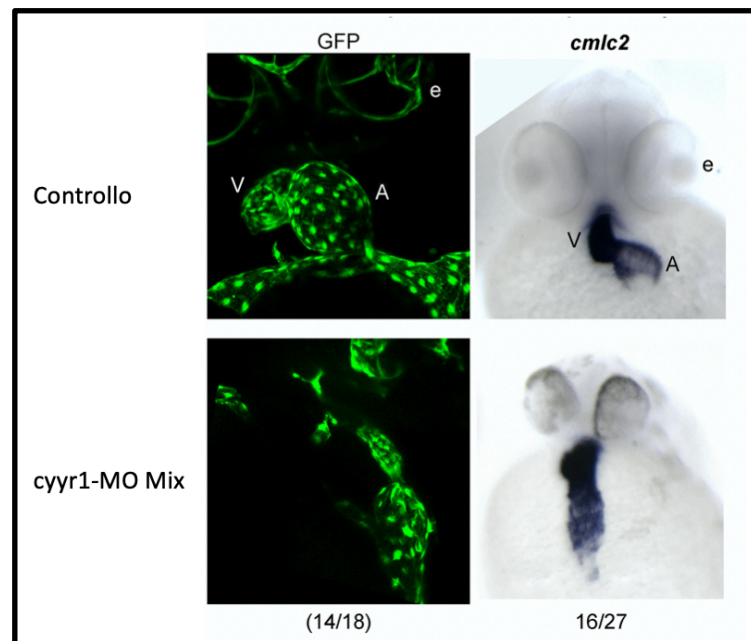


Figura 34. Immagini di microscopia a fluorescenza sulla linea transgenica Tg(*cmlc2*:GFP) non microiniettata (in alto) e microiniettata con MO (in basso) a 48 hpf nei pannelli di sinistra, Immagini di microscopia ottica della ISH per il medesimo gene a 48 hpf. V: ventricolo, A: Atrio, e: occhio.

La ISH per il gene *cmlc2* mostra una espressione nel morfante paragonabile a quella del controllo non microiniettato, ma una disposizione anomala dell'atrio e del ventricolo, dato che è stato riscontrato nel 60% dei morfanti. L'espressione invariata del gene *cmlc2* mostra che questa alterazione non sembra essere dovuta ad un mancato differenziamento dei cardiomiociti. Le immagini di microscopia a fluorescenza ottenute sulla linea Tg(*cmlc2*:GFP) confermano l'assetto anomalo cardiaco osservato in ISH.

Analisi fenotipica della linea laterale

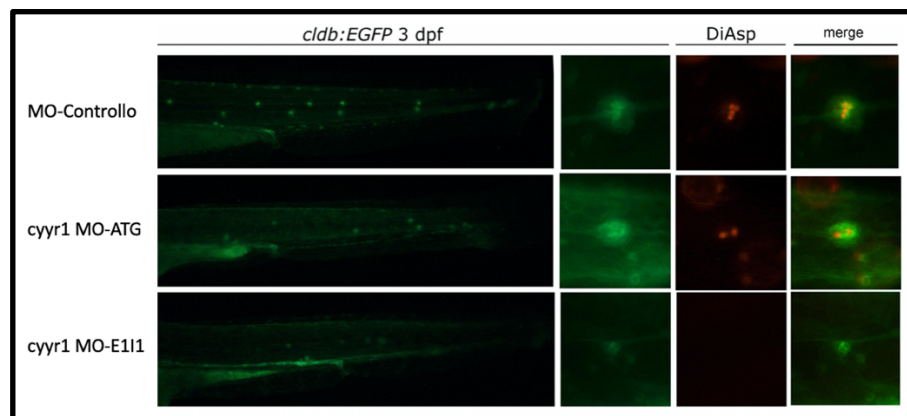


Figura 35. Vista laterale di embrioni non microiniettati (in alto), morfanti *cyyr1* MO-ATG (al centro) e morfanti *cyyr1* MO-E111 (in basso) della linea Tg(*cdb*:EGFP), marcatura dei neuromasti in verde (EGFP) e delle cellule ciliate in rosso (DiAsp).

La marcatura con un colorante vitale DiAsp che viene incorporato dalle cellule ciliate permette di valutare la presenza delle stesse all'interno di organi sensori chiamati neuromasti. Nel morfante ottenuto attraverso la microiniezione del MO-ATG si evidenzia una riduzione della positività al colorante rispetto all'embrione di controllo. La microiniezione del MO-E111 ha un effetto maggiore rispetto al MO-ATG che comporta una abolizione completa delle cellule ciliate nei neuromasti analizzati. L'esperimento mostrato in Figura 35 necessita di essere ripetuto al fine di poter attribuire una significatività statistica alla riduzione del numero di cellule ciliate nei neuromasti.

Oltre alla perdita delle cellule ciliate nei neuromasti abbiamo osservato un rallentamento della deposizione dei neuromasti durante la migrazione del primordio, che risulta globalmente rallentato rispetto al controllo non microiniettato (dato non mostrato).

Summary dei Risultati della PARTE I

L'inibizione del gene *cyrr1* ottenuta attraverso la microiniezione in embrioni appena fecondati di oligonucleotidi morfolinici antisenso ha mostrato alterazioni del sistema nervoso centrale, del tessuto muscolare, del miocardio e della numerosità delle cellule ciliate nei neuromasti.

L'mRNA *cyrr1* trascritto in vitro e microiniettato in embrioni appena fecondati al fine di ottenere un sistema di sovraespressione del gene in studio, non ha mostrato alterazioni macroscopiche nelle strutture embrionali da noi osservate.

La co-microiniezione dei morfolini insieme all'mRNA *cyrr1* trascritto in vitro, reverte in modo consistente il fenotipo dei morfanti, dimostrando la significatività del sistema utilizzato per inibire il gene.

PARTE II

Studio di espressione del gene *CYYR1* nella miogenesi in relazione al pathway di Sonic Hedgehog

Gli scopi di questa sezione sono stati principalmente due: da un lato lo studio dell'espressione del gene *cyrr1* in rapporto alla miogenesi, dall'altro l'analisi del possibile interplay tra il gene *cyrr1* e il pathway morfogenico di Sonic Hedgehog.

Lo studio dell'espressione del gene in rapporto alla miogenesi è stato effettuato in linee cellulari di rhabdomyosarcoma (RH30, RD/12 e RD/18) e in una linea cellulare murina (C2C12) attraverso l'induzione del differenziamento in coltura cellulare e la successiva analisi proteica e trascrizionale. Parallelamente abbiamo meglio caratterizzato l'espressione genica a livello trascrittomico e proteico e in *Danio rerio* in rapporto all'inibizione e alla upregolazione del gene *cyrr1*.

L'indagine dell'*interplay* tra il pathway di SHH e l'espressione del gene *cyrr1* è stata condotta, sia sui modelli cellulari che sul modello animale, utilizzando sostanze chimiche in grado di inibire il pathway a monte agendo a livello recettoriale (SAG e ciclopamina) o a valle direttamente sul fattore trascrizionale GLI1 (Forskolina). Inoltre in *Danio rerio* è stato messo a punto un sistema indiretto di inibizione del pathway di SHH attraverso la microiniezione del mRNA *lefty1*.

I modelli utilizzati in questa sezione sono stati tre: linee cellulari di rhabdomyosarcoma, una linea cellulare murina e il modello animale *Danio rerio*.

Materiali e metodi

In aggiunta ai Materiali e metodi già descritti nella "Parte I" sono state impiegate altre tecniche descritte qui di seguito.

Estrazione di RNA embrioni di *Danio rerio*

L'RNA di pesce zebra è stato utilizzato per diversi studi, quali l'analisi dei geni del differenziamento miogenico e del pathway di SHH in rapporto all'espressione di *cyrr1*, studi di espressione in zebrafish (*wild type* e transgenici) con overespressione o inibizione di *cyrr1*.

Raccolte le uova fecondate e poste in incubatore fino allo stadio desiderato, sono state successivamente suddivise in micropiastre da 1.5 mL nella numerosità di circa 20-25 uova e, dopo aver rimosso l'acqua con una pipetta Pasteur, è stato aggiunto 1 mL

di TRIzol® Reagent che in un solvente come il fenolo l'RNA forma complessi con il guanidinio tiocianato e le molecole d'acqua separandosi da DNA e proteine.

Successivamente ogni campione si lascia incubare 5' a temperatura ambiente in modo da permettere la completa dissociazione dei complessi nucleo proteici. Trascorso questo tempo si aggiunge cloroformio in un rapporto 1:5 e si agita vigorosamente per 15-20", lasciando successivamente incubare 2-3' a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione si procede alla centrifugazione del campione a 12,000 RCF per 15' in una centrifuga precedentemente raffreddata a 4°C. Al termine della centrifugazione il campione presenta 3 fasi: in alto una fase acquosa contenente l'RNA, una fase intermedia biancastra contenente DNA e una fase fenolica di color rosa in basso contenente proteine. Recuperata con attenzione la fase acquosa viene trasferita in una nuova microprovetta da 1mL e l'RNA viene fatto precipitare attraverso l'aggiunta di 0,5 mL di Isopropanolo. Dopo una incubazione di 10' a temperatura ambiente e la centrifugazione del campione a 12,000 RCF per 10' a 4°C, si ottiene un *pellet* di RNA di colore biancastro. Rimosso il surnatante, il *pellet* subisce un lavaggio attraverso l'aggiunta di 1 mL di Etanolo 75% e una breve risospensione con l'utilizzo di un vortex. Il campione viene successivamente centrifugato a 7500 RCF per 5' a 4°C, al termine della centrifuga si rimuove il surnatante e si lascia asciugare il *pellet* aiutandosi con striscioline di carta Whatman. Il *pellet* viene poi risospeso in acqua RNase-free (20-30 µL) e incubato a 55-60 °C per 10' in modo da facilitare la risolubilizzazione dell'RNA.

Al termine di queste fasi l'RNA è sempre stato purificato da eventuali contaminazioni di DNA, a tale scopo i campioni sono stati trattati con DNAsi (SIGMA®, Saint Louis, Missouri, USA) secondo il protocollo della ditta. Questo trattamento prevede l'aggiunta di un Buffer in rapporto 1:10 e della DNAsi al campione, una successiva incubazione a temperatura ambiente per 15' e infine l'aggiunta di una Stop Solution in rapporto 1:10 contenente EDTA con una incubazione di 10' a 70°C al fine di denaturare l'enzima. La purificazione del campione è stata ottenuta attraverso l'addizione di una soluzione di LiCl, il quale a basse temperature favorisce la precipitazione dell'RNA. L'incubazione overnight (O/N) a -20°C e la successiva centrifugazione a 14,000 RCF per 20' a 4°C ha permesso di riottenere il *pellet* di RNA che previo lavaggio con un 1 mL di Etanolo 70° e successiva asciugatura, è stato risospeso in acqua RNase-free (20 µL) e incubato a 55° per 10' al fine di risolubilizzarlo.

Gli RNA così ottenuti sono stati valutati in purezza e concentrazione mediante lettura con Nanodrop® e successiva valutazione dei rapporti di assorbanza 260/30 e 260/280, in aggiunta l'integrità delle bande degli RNA ribosomiali è stata valutata attraverso una corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1% addizionato di Bromuro di Etidio (0.5 µg/mL).

Linee cellulari e protocollo differenziativo

Le linee cellulari di rhabdomiosarcoma e la linea murina C2C12, utilizzate in questo studio, sono state fornite dal gruppo di ricerca del Prof. Pier Luigi Lollini del DIMES dell'Università di Bologna. Le linee cellulari sono state mantenute in coltura in terreno *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) addizionato con 10% di *Fetal Bovine Serum* (FBS), 1% penicillina/streptomycin e 1% glutamina. Le colture sono state allestite in fiasche T25 e poste in incubatore alla temperatura di 37°C e al 5% di CO₂. Vengono riportate qui di seguito le linee cellulari utilizzate con una breve descrizione.

C2C12: linea cellulare di mioblasti murini derivata da cellule satelliti isolate da muscolo rigenerante di topo adulto [72].

RD/12: subclone della linea cellulare RD, derivante da una biopsia di rhabdomiosarcoma pelvico di una bambina di 7 anni. La linea cellulare RD appartiene all'istotipo ERMS e le principali alterazioni correlate riguardano da un lato l'assetto cromosomico, in quanto presentano 51 cromosomi iperdiploidi, dall'altro alterazioni molecolari, tra le quali l'amplificazione dell'oncogene *MYC*, mutazioni omozigoti di *TP53* e la mutazione Q61H di *NRAS* [73]. Questa linea cellulare se sottoposta ad opportune condizioni di coltura favorevoli il differenziamento miogenico risulta incapace di differenziare.

RD/18: subclone della linea cellulare RD, derivante da una biopsia di rhabdomiosarcoma pelvico di una bambina di 7 anni. La linea cellulare RD appartiene all'istotipo ERMS e le principali alterazioni correlate riguardano da un lato l'assetto cromosomico, in quanto presentano 51 cromosomi iperdiploidi, dall'altro alterazioni molecolari, tra le quali l'amplificazione dell'oncogene *MYC*, mutazioni omozigoti di *TP53* e la mutazione Q61H di *NRAS* [73]. A differenza della linea cellulare RD/12, la linea cellulare RD/18 presenta se opportunamente stimolata una buona capacità differenziativa.

RH30: linea cellulare derivante da una coltura di una metastasi nel midollo osseo di ARMS di un ragazzo sedicenne. Dal punto di vista delle alterazioni cromosomiche presenta triploidia con un numero compreso tra 51 e 87, mentre a livello di alterazioni molecolari esprime la traslocazione t(2;13) e presenta l'amplificazione della regione 12q13-q15 [73].

Il protocollo di induzione del differenziamento prevede come prima fase la conta cellulare attraverso la camera di Burker e la successiva semina delle cellule in fiasche T25 (ogni linea cellulare è stata seminata con una numerosità dipendente dalle capacità intrinseca di crescita). In particolare sono state utilizzate 200.000 cellule in ciascuna fiasca T25 per le linee cellulari RD/12 e RD/18, 500.000 cellule per la linea RH30 mentre 350.000 cellule per la linea cellulare murina C2C12. Le cellule, così seminate, sono state mantenute in terreno completo (DMEM addizionato con 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS), 1% di penicillina/streptomicina e 1% glutammina) per tre giorni. Il terzo giorno dopo un breve lavaggio in PBS, il terreno completo è stato sostituito con un terreno privo di fattori di crescita (DMEM addizionato con 2% *Horse Serum* (HS), 1% di penicillina/streptomicina e 1% glutammina), successivamente le cellule sono state mantenute in questo terreno per i tempi stabiliti.

Trattamenti cellulari con SAG e Forskolina

L'inibizione del pathway di Sonic Hedgehog nelle linee cellulari attraverso due inibitori: l'inibitore SAG (Smoothed Agonist; Cas 364590-63-6, Merck millipore, Milano) che è un agonista di Smo e l'inibitore FSK (Forskolin Cas 66575-29-9 Sigma-Aldrich). Gli esperimenti sono stati condotti seminando 500 000 cellule (RH30) in T25, lasciandole crescere per un giorno e successivamente sono stati cambiati i terreni di coltura.

Entrambi i trattamenti hanno previsto una fase preliminare utile ad identificare dosi e tempi corretti di trattamento (dato non mostrato) che ha portato alla scelta della dose 100 nM e i tempi 6h e 24h per il SAG mentre per la Forskolina sono state valutate le dosi 50 µM e 100 µM per 24 e 48 ore. Il controllo di ogni esperimento è stato ottenuto utilizzando un pari volume di solvente (DMSO) diluito nel terreno di crescita. Ogni esperimento è stato effettuato in triplicato biologico.

Linee di zebrafish

Le linee di zebrafish utilizzate in questa sezione sono state: la linea di zebrafish *wild type* denominata AB e una linea transgenica Tg(*shh:mCherry*) in grado di esprimere fluorescenza rossa a livello delle aree anatomiche in cui è attivo il pathway di Sonic Hedgehog. La linea transgenica utilizzata non è stabulata presso il nostro laboratorio, ma presso l'IFOM di Milano e gentilmente concessa per alcuni esperimenti dal ricercatore Dr. Gianluca Deflorian.

Trattamenti con Ciclopamina su embrioni di *Danio rerio*

I trattamenti con ciclopamina sono stati effettuati su pool di circa 30 embrioni, in particolare dopo la fecondazione gli embrioni sono stati posti in piastre da 6 cm di diametro e l'acqua è stata sostituita con E3 medium con ciclopamina alla concentrazione di 50 e 100 μM . Gli embrioni sono stati lasciati crescere in incubatore per 24 hpf e successivamente l'RNA è stato estratto con TRIzol® Reagent (Ambion, Paisley, UK).

Estrazione di RNA dalle linee cellulari

L'estrazione di RNA dalle linee cellulari è stata effettuata utilizzando il TRIzol® Reagent (Ambion, Paisley, UK) seguendo le indicazioni fornite dalla ditta. In particolare il protocollo prevede una prima fase di preparazione del campione, nella quale viene aspirato il terreno T25, si effettua un lavaggio con 3 mL di PBS e infine si aggiungono 2 mL di TRIzol® Reagent facendo avvenire la lisi cellulare direttamente in fiasca. Successivamente si trasferiscono i 2 mL di TRIzol® Reagent dalla fiasca a due microprovette da 1,5 mL e si processano come da protocollo precedentemente descritto. L'integrità e la purezza dell'RNA è stata valutata con gel d'agarosio all'1% addizionato di Bromuro di Etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) e Nanodrop®.

RT-PCR

La retrotrascrizione (RT) degli RNA ottenuti (sia da campioni umani che di *Danio rerio*) è stata eseguita attraverso il protocollo dalla Bio-Rad® utilizzando l'enzima iScript Reverse Transcription Supermix contenente i deossiribonucleotidi trifosfato (dNTPs) la trascrittasi inversa e ioni Mg^+ . Ogni RT è stata effettuata

utilizzando 1 µg di RNA, portato ad un volume finale di 16 µL a cui sono stati aggiunti 4 uL di iScript Supermix. Il protocollo di reazione impostato nel termociclatore (BIOER GenePRO) è il seguente:

- Priming: 5' a 25 °C
- Retrotrascrizione: 20' a 46 °C
- Inattivazione: 1' a 95 °C
- Conservazione a 4 °C

La qualità del cDNA così ottenuto è stata verificata attraverso la classica reazione a catena della polimerasi (PCR), in particolare abbiamo utilizzato la Biomix Red (Bioline, London, UK), Il protocollo di reazione prevede di aggiungere dentro ad una microprovetta da 0,2 mL: 1 µL di cDNA, 12,5 µL di Biomix Red, un volume di primer senso e antisenso corrispondente ad una concentrazione finale tipicamente di 300 nM e acqua fino a raggiungere un volume finale di 25 µL. Successivamente i campioni sono trasferiti nel termociclatore (BIOER GenePRO) impostando il seguente programma:

1. 2' a 94 °C
2. 30" a 94 °C
3. 30" alla T di *annealing* della coppia di primer
4. 30" a 72 °C
5. 7' a 72 °C

Le fasi 2, 3 e 4 sono state ripetute per il numero di cicli di interesse, in particolare per il controllo delle retrotrascrizioni abbiamo effettuato 25 cicli.

La verifica degli ampliconi è eseguita attraverso elettroforesi su gel di Agarosio. 2% addizionato di Bromuro di Etidio (0.5 µg/mL). Al termine della corsa elettroforetica l'immagine è stata acquisita attraverso lo strumento GelDoc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Nelle Tabelle in Appendice A è presente la lista completa delle coppie di primer utilizzate in questo lavoro di tesi.

Real-time PCR (qPCR)

La Real-time PCR è una tecnica quantitativa relativa per studiare l'espressione genica, il principio base prevede che venga condotta un PCR in cui la formazione dei prodotti di amplificazione viene misurata ad ogni ciclo. Esistono diverse modalità per monitorare la formazione degli ampliconi, in questo lavoro abbiamo utilizzato l'intercalante SYBR Green, il quale è in grado di legarsi ai doppi filamenti di DNA durante la fase di *extension* e, se opportunamente eccitato alla corretta lunghezza d'onda, di emettere fluorescenza. Le misure di fluorescenza effettuate strettamente relate alla quantità di trascritto presente nel nostro campione, permettono di valutare l'espressione del gene di interesse nei campioni in studio. In particolare sono stati utilizzati cDNA appartenenti a tre modelli: embrioni di zebrafish, mioblasti murini (C2C12) e linee di rhabdomyosarcoma umano (RD/12, RD/18, e RH30).

Alcune coppie di primer utilizzati per il campione murino e le linee di rhabdomyosarcoma hanno richiesto la determinazione della loro efficienza, a tale scopo sono state preparate cinque diluizioni seriali a partire da un pool di cDNA creato con un ugual volume di ogni condizione biologica in esame. Queste cinque diluizioni hanno permesso la costruzione di una retta di taratura dalla cui pendenza si è determinata l'efficienza di amplificazione dei primer.

La miscela di reazione preparata per ogni pozzetto di una piastra di Real-time PCR conteneva: l'enzima SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) diluito 1:2 i primer (alla concentrazione finale di 300 nM), il cDNA (4 µg per il campione murino e di *Danio rerio*, 25 µg per le linee di rhabdomyosarcoma) e acqua per portare al volume finale di 20 µL.

Lo strumento utilizzato è stato il CFX-96 TM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), su cui è stato impostato il seguente protocollo:

1. 30" a 95°C
2. 5" a 95°C
3. 30" a T (temperatura di annealing della coppia di primer)
4. Go to 2, 39 Melt curve 65°-95° con incremento di 0,5

Le fasi 1,2 e 3 sono ripetute per 40 cicli.

Il risultato di ogni esperimento di Real-time PCR è stato espresso in termini di quantificazione relativa normalizzata su almeno 2 geni espressi in modo stabile (*housekeeping*) in tutti i campioni biologici esaminati. In particolare per la linea cellulare murina C2C12 sono stati utilizzati i geni *housekeeping Gapdh* e *Tbp* mentre per gli embrioni di *Danio rerio* i geni *slc25a5* e *ef1a*. I geni *housekeeping* utilizzati invece nelle linee cellulari di rhabdomyosarcoma sono stati *TBP* e *ACTIN* per la linea RH30 mentre *ACTIN* e *B2M* per le linee RD/12 e RD/18. I risultati mostrati nei diversi grafici presentati sono stati espressi in termini di *fold change* ponendo l'espressione del campione di controllo pari a 1 ovvero utilizzando la consolidata formula del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Estrazione proteica da linee cellulari

Le cellule sono state distaccate secondo protocollo standard con tripsina-EDTA (Microgen, Londra, UK). Dopo due lavaggi in PBS freddo seguiti da centrifugazioni a 2000 rpm per 5', il pellet è stato trasferito in microprovette da 1,5 mL e centrifugato a 1000 g per 5' a 4°C. Eliminato il surnatante viene aggiunto direttamente al sedimento il tampone di lisi, precedentemente preparato e composto da una soluzione di Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) Buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) alla quale vengono aggiunti un riducente dei ponti disolfuro delle proteine chiamato Ditiotreitolo (DTT, Bio-Rad, Hercules, CA, US) alla concentrazione di 1mM e un inibitore delle proteasi, il Fenilmetilsufonil fluoruro (PMSF, Bio-Rad) alla stessa concentrazione. Dopo tre cicli di congelamento a -80 °C e scongelamento rapido a 37°C alternati, il campione viene centrifugato a 14000 g per 20' a 4°C. Il surnatante contenente le proteine viene prelevato, trasferito in una nuova microprovetta e quantificato tramite il metodo BCA. La curva standard per l'interpolazione dei valori di assorbanza è stata prodotta utilizzando sieroalbumina bovina (BSA).

Estrazione proteica da embrioni di *Danio rerio*

Una ventina di embrioni per campione allo stadio embrionale prescelto sono stati trasferiti in una microprovetta da 1,5 mL, dopo la rimozione dell'acqua residua è stato aggiunto lo stesso tampone di lisi utilizzato per le colture cellulari. I campioni sono stati processati e quantificati come precedentemente descritto.

Western Blot

Lo studio del prodotto proteico del gene *cyrr1* durante il differenziamento nelle linee cellulari RH30, RD/12 e RD/18 è stato condotto utilizzando la tecnica del Western Blot sui lisati totali ottenuti dalla coltura di queste linee cellulari sia in terreno completo che in terreno HS 2% per 9 giorni.

Questo approccio è stato utilizzato anche per lo studio delle miosine *fast* e *slow* in embrioni di zebrafish a 72 dpf.

Sono stati caricati 40 µg dei lisati in un gel di poliacrilammide 7,5%, (miosine), 15% (*cyrr1*) a seconda del peso molecolare di ciascuna proteina. Dopo l'elettroforesi, le proteine sui gel sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (porosità di 0,2 µM, Bio-Rad) attraverso una camera di trasferimento. Il blocco di siti non specifici è stato eseguito incubando la membrana con una soluzione di *blocking* di *Nonfat dry milk* (Blotting Grade Blocker, Bio-Rad) 5% in TBS-T (Tween-20 0.05% in TBS) per 1 ora in agitazione. La membrana è stata poi incubata durante la notte a 4°C con anticorpo primario diluito in soluzione di blocking. Gli anticorpi primari utilizzati in questo studio sono stati: EB165 (Anti-chicken fast myosin heavy chain – monoclonale - Abcam), F59 (Anti-chicken slow myosin heavy chain – monoclonale - Abcam), GAPDH (Anti-rabbit GAPDH - monoclonale - Cell Signaling Technology -), VINCULINA (Anti-rabbit Vinculin monoclonale - Abcam) e CYYR1 (Anti-rabbit *cyrr1* - policlonale - Abcam).

Risultati

Espressione del gene *CYYR1* in linee cellulari di rhabdomyosarcoma e nella linea murina C2C12 durante il differenziamento miogenico

Durante il mio lavoro di Tesi Magistrale [7] avevo analizzato l'espressione del locus genico *CYYR1* in diverse linee cellulari di rhabdomyosarcoma, attraverso un approccio molecolare in PCR e qPCR, dimostrando sia una diversa attività trascrizionale del locus che una eterogeneità di espressione a livello delle singole isoforme. L'attività trascrizionale del locus in condizioni di coltura in terreno completo (10% FBS) mostra che la linea cellulare RH30 esprime il locus a livello di un gene costitutivamente espresso mentre l'espressione è più ridotta nelle linee RD/12 e RD/18.

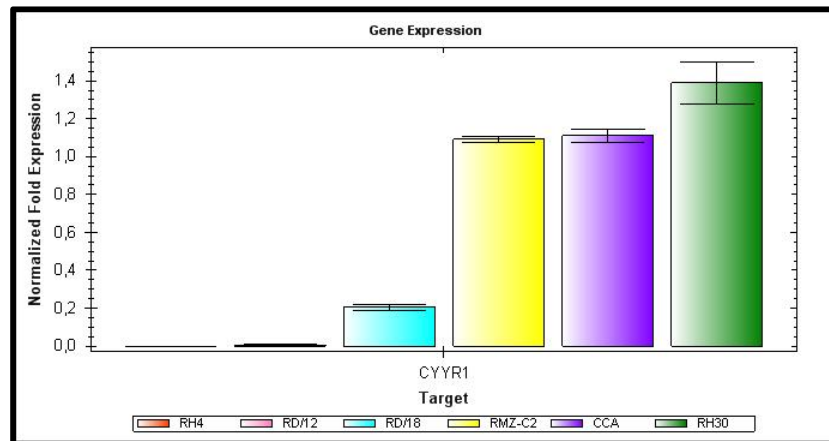


Figura 36. Quantificazione relativa del locus *CYYR1* in linee cellulari di rhabdomyosarcoma umano, immagine tratta dalla Tesi Magistrale [7].

Il possibile coinvolgimento del gene *CYYR1* nel differenziamento miogenico è stato indagato in queste tre linee cellulari di rhabdomyosarcoma e nella linea cellulare di mioblasti murini C2C12. Quest'ultima linea è stata utilizzata al fine di studiare un andamento più fisiologico di differenziamento in quanto le linee cellulari utilizzate sono tutte tumorali con assetti cromosomici aberranti.

L'approccio utilizzato ha previsto l'induzione del differenziamento in coltura cellulare e la successiva analisi del mRNA attraverso esperimenti di qPCR. In particolare sono state condotte due analisi: una volta a studiare le ore subito successive

all'induzione dello stimolo differenziativo (sostituzione del terreno completo con terreno 2% HS) e un'altra più tardiva per valutare il differenziamento terminale. Il differenziamento a breve termine è stato valutato a 7, 14 e 24 ore di stimolo differenziativo nella linea cellulare RH30, mentre per il differenziamento terminale è stato valutato 1 giorno, 3 giorni e 9 giorni in terreno addizionato del 2% HS nelle linee RH30, RD/12 e RD/18.

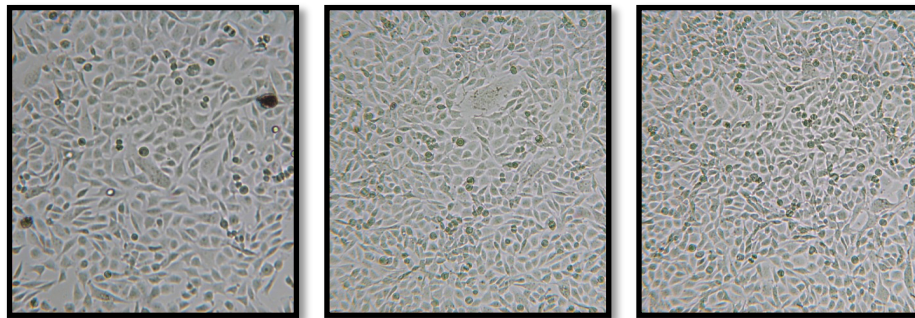


Figura 37. Microfotografie ottenute dalla osservazione in contrasto di fase (con ingrandimento 40X) della linea RH30. Da sinistra a destra riprese a 7, 14, 24 ore di stimolo differenziativo in terreno addizionato del 2% HS (microscopio Labovert FS, Leitz; telecamera Leica MC170HD).

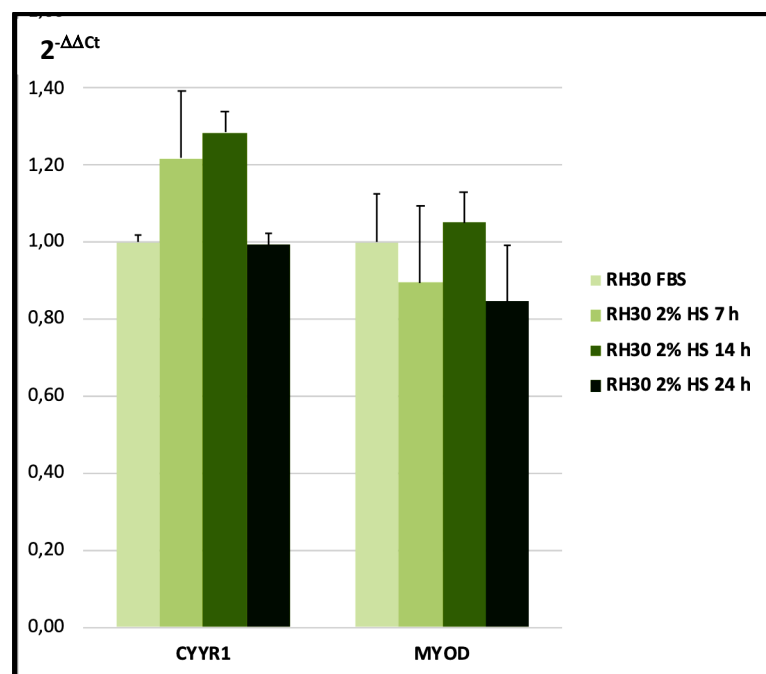


Figura 38. Grafico di espressione in qPCR dei geni *CYR1* e *MYOD* normalizzata sui geni *housekeeping* *TBP* e *ACTIN* durante l'induzione del differenziamento miogenico in

tempi precoci (7, 14, 24 h). L'espressione è espressa in termini di *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) rispetto al relativo controllo in terreno completo la cui espressione è posta a 1. Ogni campione è stato valutato in triplicato tecnico e i dati medi sono riportati in grafico con le relative deviazioni standard.

Il grafico in figura 38 riporta l'espressione del locus genico *CYYRI* e del gene *MYOD* valutata in termini di $2^{-\Delta\Delta C_t}$ rispetto al campione di controllo la cui espressione è posta a 1 e normalizzata su 2 geni *housekeeping* durante le prime 24 ore di induzione al differenziamento. Entrambi i geni, nella linea cellulare RH30, non sembrano mostrare variazioni di espressione significative ai tempi da noi analizzati.

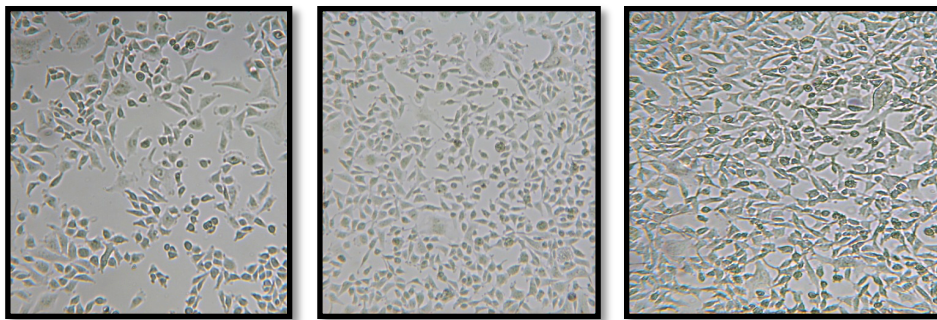


Figura 39. Microfotografie ottenute dalla osservazione in contrasto di fase (con ingrandimento 40X) della linea RD/12. Da sinistra a destra a 1, 3 e 9 giorni di stimolo differenziativo (terreno addizionato del 2% HS).

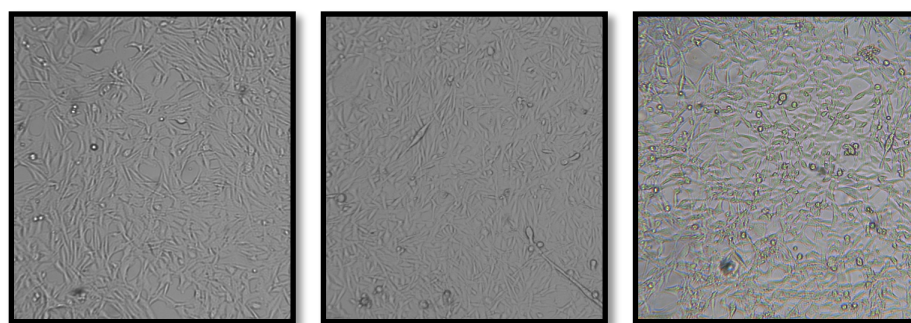
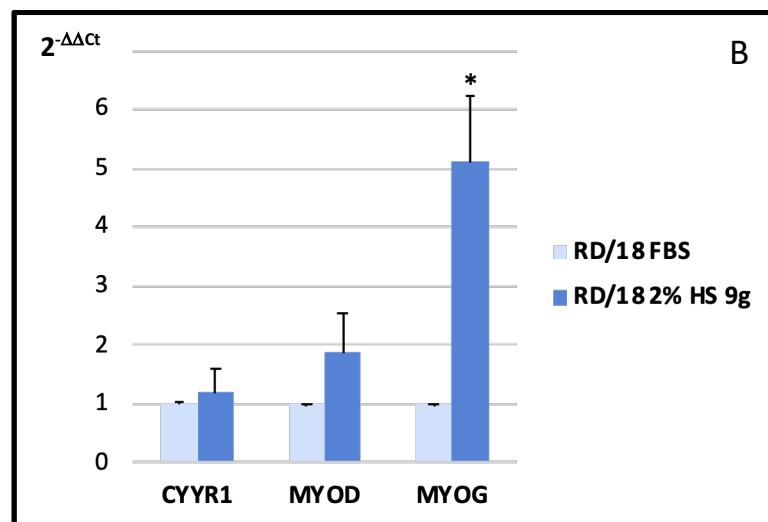
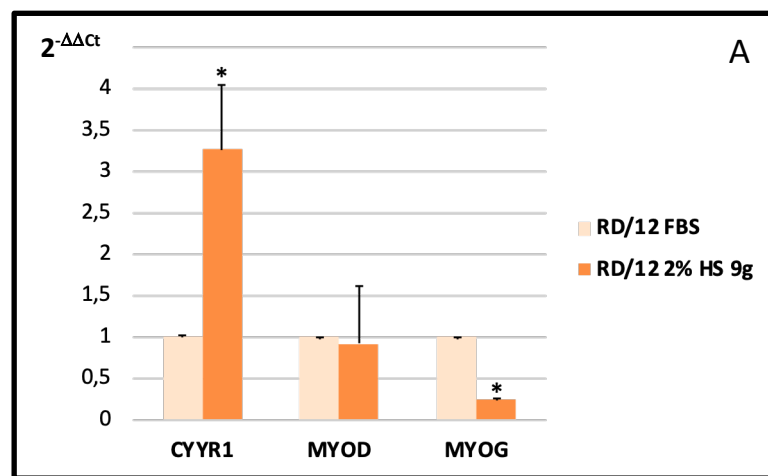


Figura 40. Microfotografie ottenute dalla osservazione in contrasto di fase (con ingrandimento 40X) della linea RD/18. Da sinistra a destra a 1, 3 e 9 giorni di stimolo differenziativo (terreno addizionato del 2% HS).

Nelle linee RH30, RD/12 e RD/18 indotte al differenziamento e mantenute per 9 giorni in terreno addizionato di HS 2% è stata valutata l'espressione di *CYYR1*, contestualmente all'analisi dell'espressione di geni di differenziamento precoci (*MYOD*) e tardivi (*MYOG*). I dati mostrati sono normalizzati sull'espressione degli *housekeeping* *B2M*, *ACTIN*, e *TBP* ed espressi in termini di $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativamente al campione di controllo la cui espressione è posta a 1. I dati sono la media di due esperimenti indipendenti per la linea cellulare RH30 e tre esperimenti indipendenti per le altre due linee cellulari, la significatività è riportata in termini di $p\text{-value} < 0,05$.



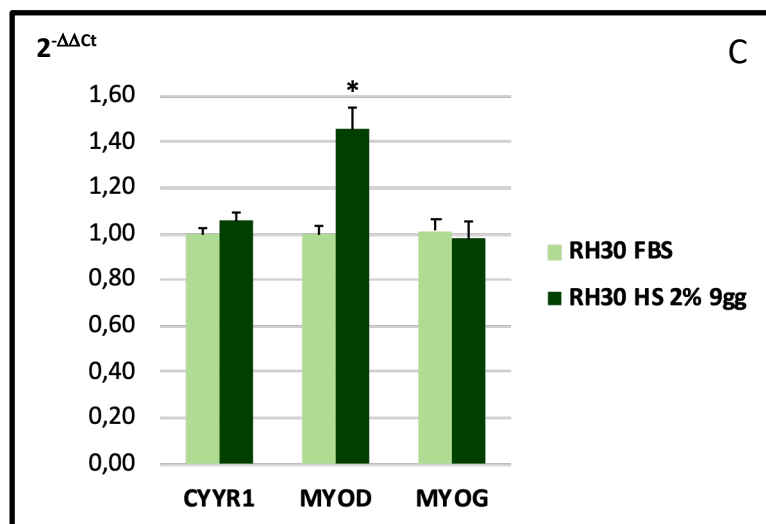


Figura 41. Analisi del differenziamento in qPCR nelle linee cellulari di rhabdomiosarcoma RD/12 (Pannello A), RD/18 (Pannello B) e RH30 (Pannello C) dopo 9 giorni in terreno 2% HS e rispettivi controlli in terreno completo 10% FBS. I dati sono espressi in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relativamente al campione di controllo e l'espressione dei geni *CYR1*, *MYOD* e *MYOG* è normalizzata su tre geni *housekeeping*. Ogni pannello è stato ottenuto dalla media di tre esperimenti indipendenti e la significatività è stata espressa in termini di $p\text{-value} < 0,05$ ottenuta attraverso il t-test.

Nella linea RD/12 (Figura 41: Pannello A) a 9 giorni di crescita in terreno 2% HS si osserva un aumento significativo della trascrizione di *CYR1* e una drastica riduzione dell'espressione del gene *MYOG*. La linea cellulare RD/18 (Figura 41: Pannello B) mostra invece un aumento significativo del marker di differenziamento tardivo a 9 giorni mentre l'espressione del gene *CYR1* non ha variazioni significative. La linea cellulare RH30 (Figura 41: Pannello C), che ha l'espressione basale più elevata delle 3 linee di rhabdomiosarcoma testate a 9 giorni mostra un incremento significativo del gene *MYOD* mentre sia il fattore trascrizionale *MYOG* che il gene *CYR1* non hanno cambiamenti significativi di espressione.

Al fine di valutare la variazione di espressione del gene *Cyrr1* in rapporto ad un differenziamento miogenico in una condizione più fisiologica è stata utilizzata la linea cellulare C2C12, un modello molto utilizzato in questi studi e gentilmente fornito dal Prof. Pierluigi Lollini.

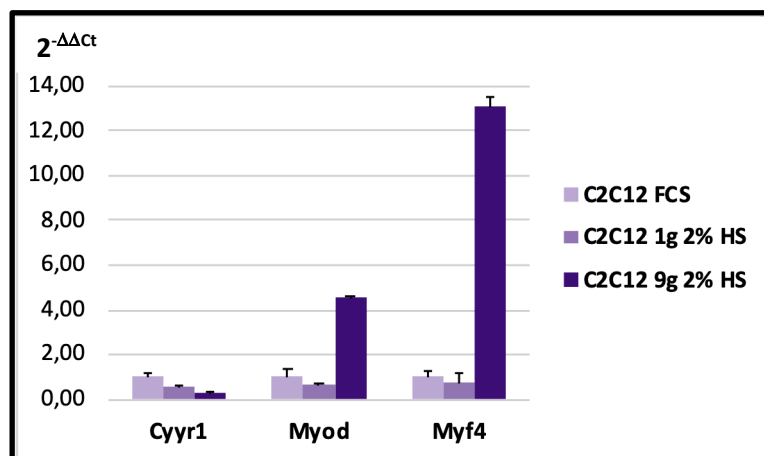


Figura 42. Analisi del differenziamento in qPCR nella linea cellulare murina C2C12 dopo 1 e 9 giorni in terreno 2% HS e relativo controllo in terreno completo 10% FCS. I dati sono espressi in $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relativamente al campione di controllo e l'espressione dei geni *Cyyr1*, *Myod* e *Myf4* è normalizzata sui geni *Tbp* e *Gapdh*. Le barre di errore sono espresse in termini di errore standard (SE) e il grafico mostrato è relativo ad un singolo esperimento.

Il grafico ottenuto in figura 42 mostra le variazioni di espressione dei geni *Cyyr1*, *MyoD* e *Myf4*, che rappresentano rispettivamente marker del differenziamento miogenico precoce e tardivo, a tempi diversi di induzione al differenziamento. I dati sono normalizzati sui geni housekeeping *Tbp* e *Gapdh* ed espressi in termini di $2^{-\Delta\Delta C_t}$ relativamente al campione di controllo la cui espressione è posta a 1. L'espressione di *Cyyr1* diminuisce durante il differenziamento mentre i geni *Myod* e *Myf4* aumentano in modo molto evidente a 9 giorni di crescita in terreno addizionato con 2% HS.

Parallelamente a questo approccio è stata sviluppata e ottimizzata la tecnica del Western Blot attraverso l'utilizzo di un anticorpo commerciale policlonale (Abcam) per la visualizzazione del prodotto proteico del gene *CYYR1* umano. Le linee cellulari di rhabdomiosarcoma testate in questi esperimenti sono state RH30, RD/12 e RD/18. Gli esperimenti effettuati hanno evidenziato la presenza di due bande, una prima banda più alta del peso molecolare di 28 kDa e una più bassa di circa 13,5 kDa. Queste bande potrebbero corrispondere rispettivamente all'isoforma NEDO con peso molecolare predetto di 28,2 kDa e all'isoforma canonica della proteina *CYYR1* priva di peptide segnale con peso molecolare predetto di 13,5 kDa.

L'epitopo di 31 amminoacidi utilizzato per la produzione dell'anticorpo policlonale da noi utilizzato è infatti comune ad entrambe le isoforme.

In figura 43 è riportata l'espressione proteica corrispondente all'analisi densitometrica effettuata al Gel Doc 2000 (BioRad), i valori sono stati normalizzati sull'intensità della proteina GAPDH.

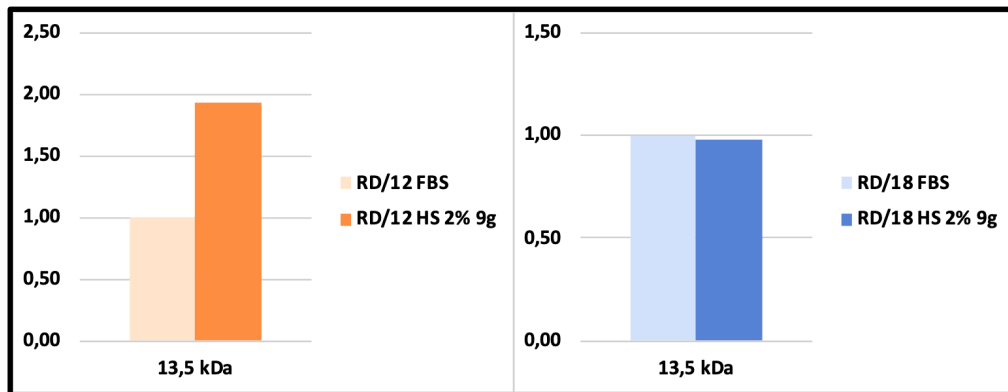


Figura 43. Grafici relativi alla analisi densitometrica della banda 13,5 kDa normalizzata sulla banda del GAPDH relativo alla medesima linea cellulare; linea RD/12 sulla sinistra e linea RD/18 sulla destra. Il grafico è relativo ad un singolo esperimento.

Nella linea cellulare RD/12, l'analisi densitometrica della banda di 13,5 kDa ascrivibile al prodotto proteico del gene *CYYR1* mostra un aumento di circa due volte della espressione proteica a 9 giorni in terreno HS 2% rispetto al campione di controllo mantenuto in terreno completo. Al contrario l'analisi effettuata nella linea cellulare RD/18 non mostra una variazione nell'espressione proteica del gene *CYYR1* in linea con i dati ottenuti in trascrittomica attraverso l'approccio in qPCR. Questo dato preliminare necessita di essere ripetuto al fine di validare in modo più consistente l'andamento osservato.

Espressione del gene *cyyr1* in *Danio rerio* e analisi molecolari nei morfanti e nei sovraespressi in rapporto alla miogenesi

L'espressione del gene *cyyr1* in *Danio rerio* è stata valutata attraverso esperimenti di ISH, utilizzando una sonda complementare all'mRNA di *cyyr1*. I risultati ottenuti per gli stadi 6 somiti, 24 hpf e 72 hpf sono riportati in Figura 44.



Figura 44. ISH del gene *cyr1* agli stadi embrionali da sinistra a destra: 6 somiti, 24 hpf e 72 hpf. *cns*: sistema nervoso centrale, *m*: mesoderma, *pLL*: linea laterale posteriore.

Le immagini ottenute dalle ISH mostrano una marcatura evidente del gene *cyr1* a livello del sistema nervoso centrale, a partire dallo stadio embrionale 6 somiti fino agli stadi più tardivi di 24 hpf e 72 hpf. Risulta essere positivi alla sonda anche la linea laterale posteriore, il mesoderma e come confermato dalle sezioni trasversali anche i somiti.

Al fine di valutare l'importanza del dosaggio del gene *cyr1* durante la miogenesi in *Danio rerio*, sono stati valutati in qPCR e in Western blot embrioni microiniettati con mRNA *cyr1*, morfolini e co-microiniettati con entrambi (*rescue*). L'analisi molecolare realizzata in Real-Time PCR a partire da RNA estratti da embrioni non microiniettati (controllo) e microiniettati con il MO è stata condotta sui geni: *myoD* (marcatore precoce di differenziamento) e due marcatori più tardivi, la catena pesante delle miosine lente (*smyhc1*) e la catena leggera delle miosine delle fibre veloci (*mylz2*). I dati ottenuti e graficati in Figura 45 sono normalizzati sui geni *housekeeping efla* e *slc25a5* ed espressi in termini di $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relativamente al campione di controllo posto a 1.

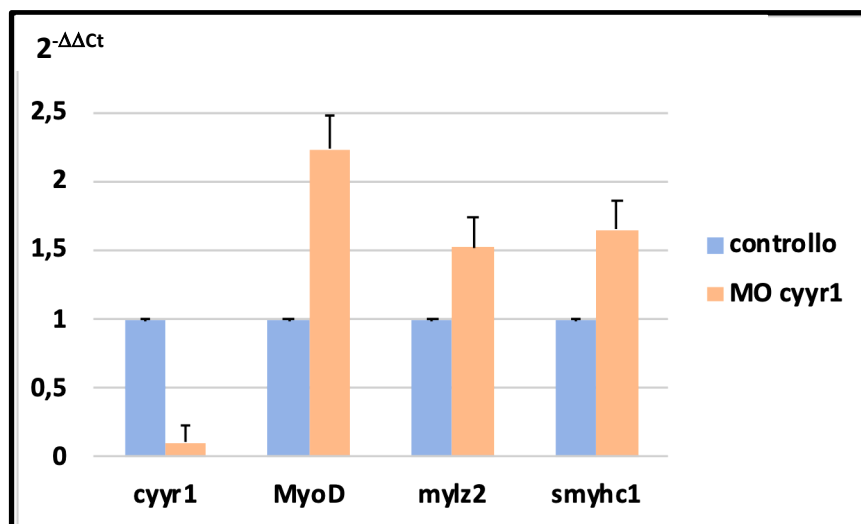
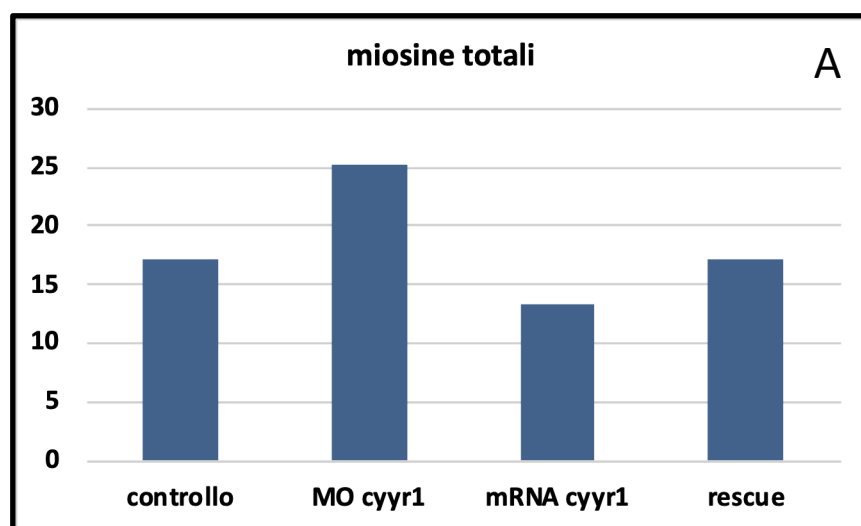


Figura 45. Analisi dell'espressione quantitativa relativa (qPCR) dei geni *cyr1*, *myoD*, *mylz2* e *smyh1* in embrioni di zebrafish a 24 hpf non microiniettati (controllo) e trattati con MO *cyr1*. L'espressione è stata normalizzata sui geni *ef1a* e *slc25a5* ed espressa in termini di *fold change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) rispetto al relativo controllo non microiniettato. Ogni gene è stato valutato in triplicato tecnico e i dati medi riportati in grafico sono corredati dai rispettivi errori standard.

La microiniezione del morfolino (MO *cyr1*) inibisce significativamente l'espressione del gene *cyr1* mentre l'espressione dei trascritti miogenici *myoD*, *mylz2* e *smyh1* aumenta significativamente rispetto agli embrioni non microiniettati (controllo). All'analisi trascrittomica è stato associato lo studio di proteine marcatrici del differenziamento terminale, in particolare sono stati utilizzati tre differenti anticorpi in grado legare tutte le miosine, le sole miosine *fast* e le sole miosine *slow*.



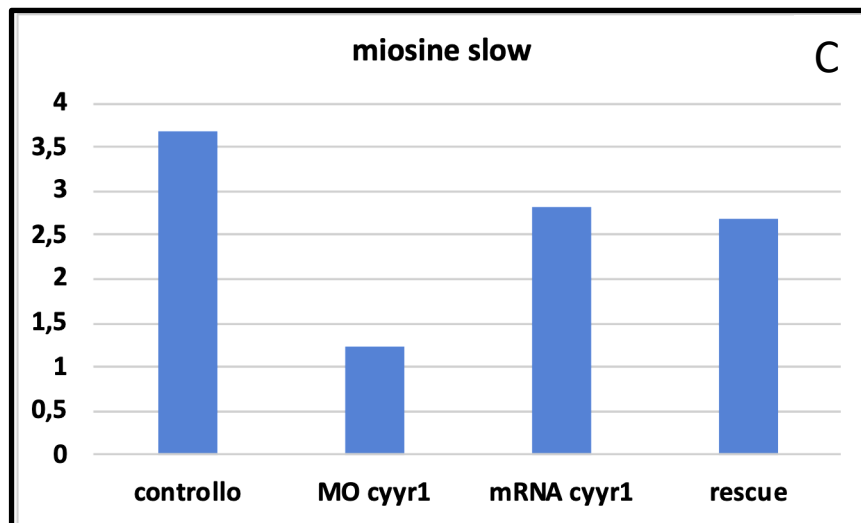
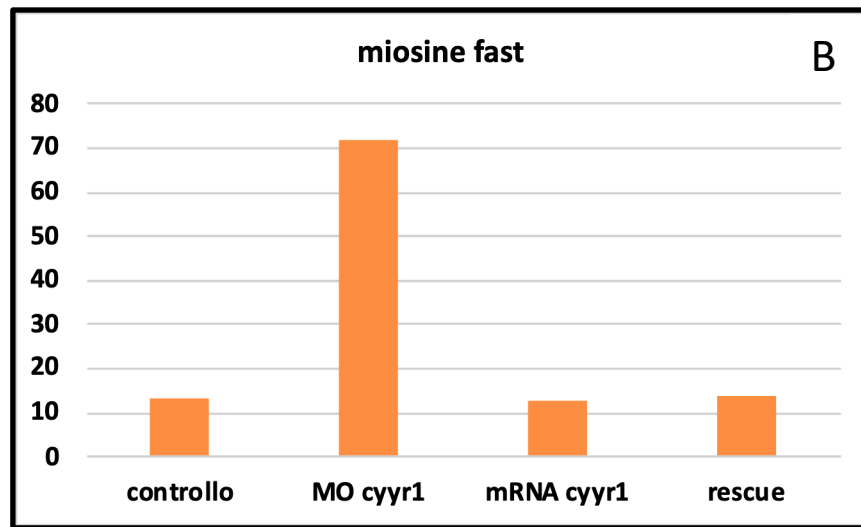


Figura 46. Grafici della analisi densitometrica delle bande ottenute in Western blot per le miosine totali (Pannello A), le sole miosine *fast* (Pannello B) e le sole miosine *slow* (Pannello C) normalizzata sulla banda della Vinculina nel medesimo campione biologico.

L'analisi densitometrica relativa alle miosine (Pannello A) evidenzia come nei morfanti vi sia un aumento della loro espressione, a differenza della microiniezione del messaggero di *cyr1* che ne comporta una loro riduzione. In modo interessante la co-microiniezione del mRNA *cyr1* e del MO (*rescue*) rimodula il livello proteico delle miosine ad un valore più simile al campione di controllo.

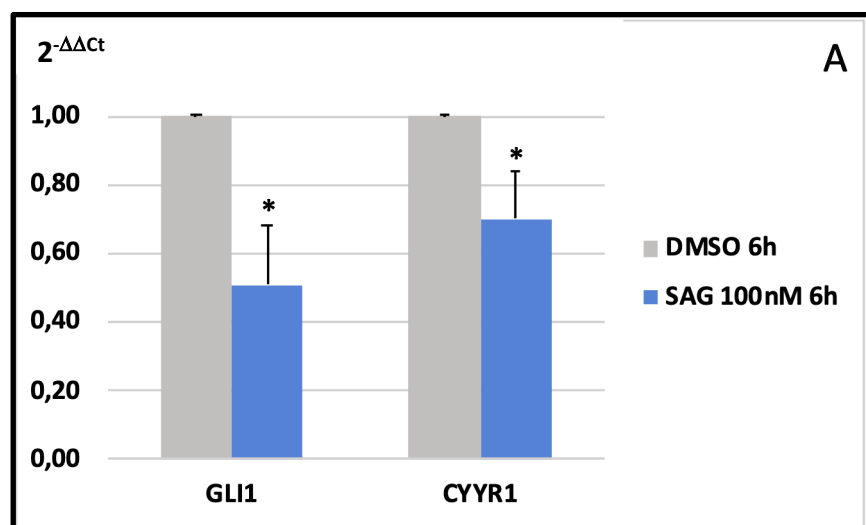
Il pannello B relativo al Western Blot specifico per le miosine *fast*, mostra un importante aumento della loro espressione a seguito dell'inibizione del gene *cyyr1*; questo aumento viene completamente revertito nel *rescue*.

Differentemente da quanto osservato nell'analisi delle miosine *fast*, per le miosine *slow* vi è un significativo decremento della loro espressione sia nei morfanti che nei microiniettati con l'mRNA *cyyr1*. Nel *rescue* si osserva una attenuazione della riduzione causata dal MO ma non si ha un completo recupero della loro espressione a livelli di controllo.

Esperimenti di inibizione del pathway di SHH nella linea cellulare RH30

L'*interplay* tra il gene *CYYR1* e il pathway di SHH è stato studiato nella linea di rabdomiosarcoma (RH30) utilizzando degli inibitori chimici grado di antagonizzare la via di segnalazione a diversi livelli. In particolare sono stati eseguiti dei trattamenti in coltura utilizzando il SAG per inibire la via a livello recettoriale in quanto agisce sulla proteina SMO e la Forskolina per inibire direttamente il fattore trascrizione a valle.

Al fine di valutare l'effettiva inibizione del pathway abbiamo scelto di monitorare l'espressione del gene *GLI1*, quale gene trascritto a seguito dell'attivazione della via di segnalazione. Una serie di esperimenti (non mostrati) ha permesso di determinare le dosi e i tempi adeguati di trattamento per osservare l'effettiva inibizione del pathway. Data l'azione molto rapida dell'inibitore SAG sono risultati utili i tempi 6 e 24 ore mentre la Forskolina, ad azione più lenta, le 48 ore.



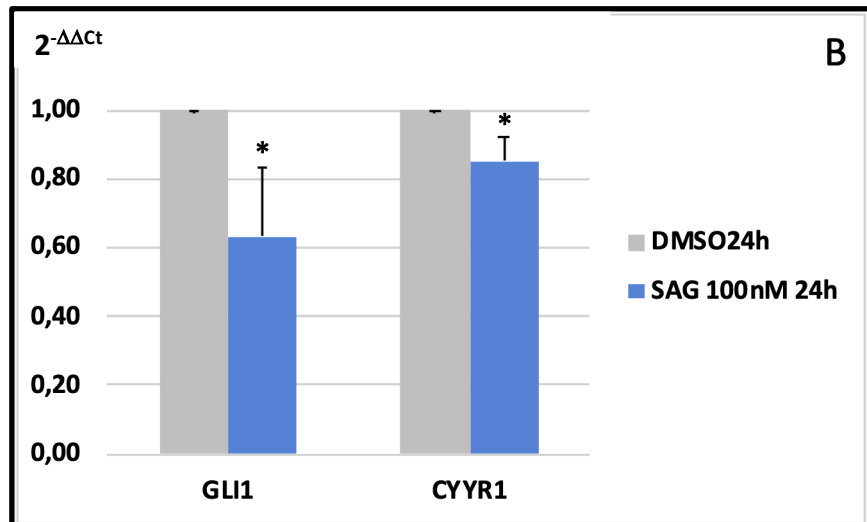


Figura 47. Espressione quantitativa relativa dei geni *GLI1* e *CYR1* in seguito a trattamento con SAG alla concentrazione 100 nM per 6 (A) e 24 ore (B) normalizzata sui geni *ACTIN* e *TBP*. Sia il pannello A che il pannello B sono stati ottenuti dalla media di tre esperimenti indipendenti e la significatività statistica è stata espressa in termini di *p-value* < 0,05 ottenuta attraverso il t-test.

L'analisi dell'espressione genica in Real-Time PCR dei *CYR1* e *GLI1* è stata effettuata normalizzando i campioni sui geni *housekeeping* *ACTIN* e *TBP* ponendo a 1 i rispettivi campioni di controllo. I grafici in figura 47 sono ottenuti entrambi dalla media di tre esperimenti indipendenti. I pannelli (A e B) in figura 47 mostrano una significativa inibizione dell'espressione di entrambi i loci genici analizzati, l'azione complessiva è maggiore a 6 ore rispetto alle 24 ore. Si specifica che il DMSO non ha comportato variazioni significative nella espressione dei geni studiati relativamente al controllo non trattato (dato non mostrato).

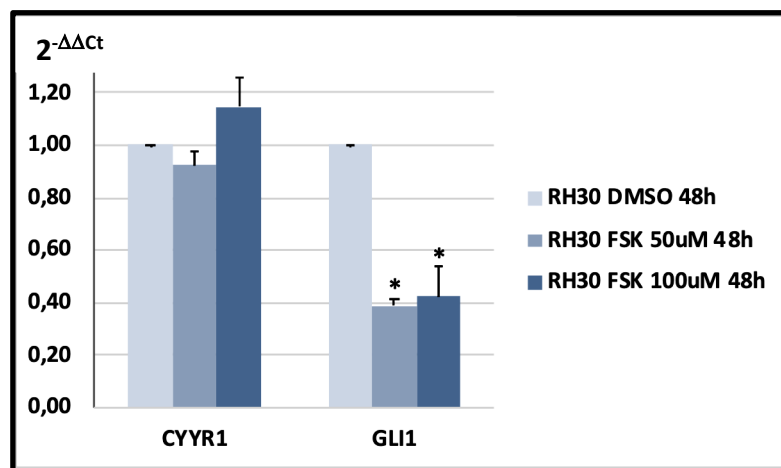


Figura 48. Espressione quantitativa relativa dei geni *GLI1* e *CYR1* in seguito a trattamento con Forskolina alle concentrazioni 50 e 100 μM per 48 ore, normalizzata sui geni *ACTIN* e *TBP*. Il risultato è ottenuto dalla media di due esperimenti indipendenti e la significatività statistica è stata espressa in termini di *p-value* < 0,05 ottenuta attraverso il t-test.

Il grafico in figura 48 è stato ottenuto dalla media di due esperimenti indipendenti e mostra l'espressione dei geni *GLI1* e *CYR1* a seguito del trattamento con l'inibitore Forskolina. In particolare le due dosi scelte si sono rivelate significativamente inibitorie nei confronti dell'espressione del gene *GLI1* a 48 ore. L'espressione del gene *CYR1*, invece non sembra essere alterata dal trattamento con Forskolina a nessuna delle due dosi testate.

Esperimenti di inibizione del pathway di SHH in *Danio rerio*

Gli esperimenti di inibizione della via di segnalazione di SHH in *Danio rerio* sono stati condotti con due differenti metodiche: un'inibizione chimica attraverso l'utilizzo di ciclopamina e una inibizione indiretta mediata dalla sovraespressione del gene *lefty1* ottenuta tramite microiniezione del suo mRNA

Il trattamento con ciclopamina è stato effettuato su pool di embrioni alle dosi di 50 e 100 μM per 24 hpf. e l'espressione del gene *cyrr1* è stata valutata in qPCR normalizzandola su due geni *housekeeping* relativamente ad un campione di controllo trattato con DMSO (il solvente della ciclopamina).

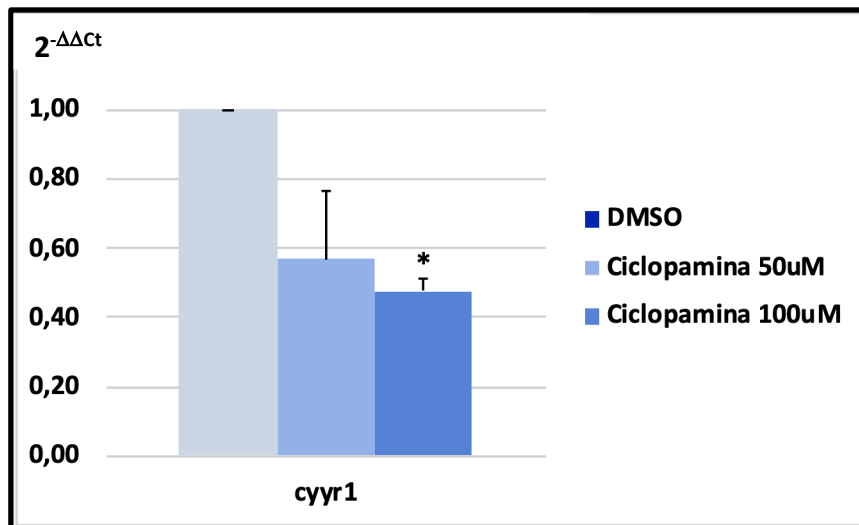


Figura 49. Espressione quantitativa relativa del gene *cyr1* in seguito a trattamento con ciclopamina alla concentrazione 50 e 100 μM normalizzata sui geni *efla* e *slc25a5* ed espressa in termini di *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Il risultato è ottenuto dalla media di due esperimenti indipendenti e la significatività statistica è stata espressa in termini di *p-value* $< 0,05$ ottenuta attraverso il t-test.

I risultati in Figura 49 rappresentano la media di due esperimenti indipendenti e mostrano che l'espressione del gene *cyr1* diminuisce ad entrambe le dosi testate rispetto al controllo trattato con il solvente (DMSO). La significatività statistica è presente solo nei trattati con ciclopamina 100 μM ma l'andamento è molto chiaro anche per la concentrazione 50 μM .

Il secondo sistema utilizzato per abolire il pathway di SHH è stato la microiniezione in embrioni Tg(*shh*:mCherry) del mRNA *lefty1*. La sovraespressione di questo gene infatti, comporta l'abolizione della notocorda e conseguentemente impedisce ad essa di indurre l'attivazione del pathway attraverso la produzione del morfogeno. L'effettiva abolizione del pathway è stata resa evidente dall'utilizzo di una linea di zebrafish che esprime il fluoroforo mCherry in corrispondenza delle aree in cui è attivo il pathway.

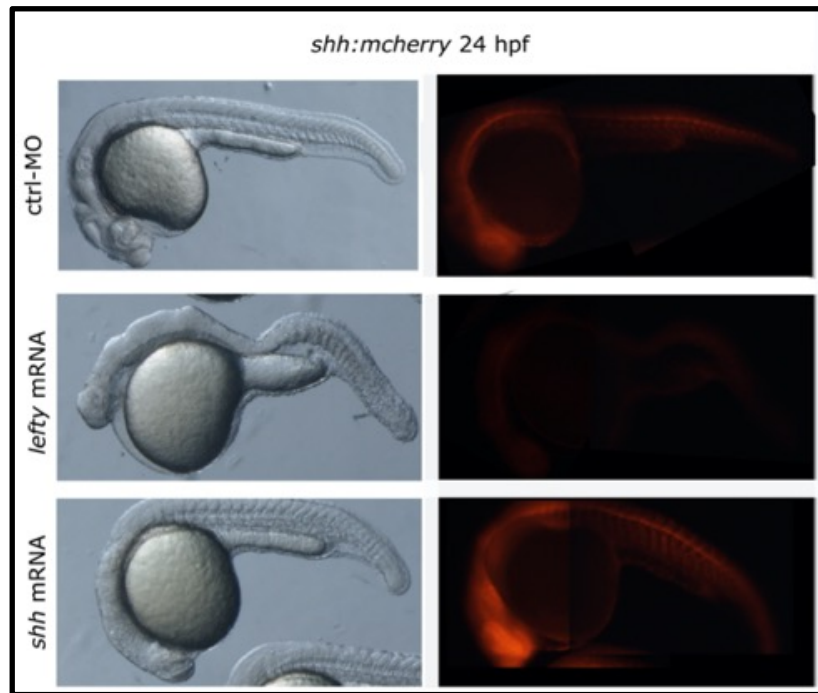


Figura 50. Embrioni della linea zebrafish Tg(*shh*:mCherry) a 24 hpf. In alto embrione controllo non microiniettato (ctrl-MO), in mezzo embrione microiniettato con mRNA *lefty1* (*lefty1* mRNA) e in basso embrione microiniettato con mRNA *shh*. A sinistra immagine ottenuta con microscopia ottica mentre a destra immagine ottenuta con microscopia a fluorescenza al medesimo ingrandimento.

L'immagine in Figura 50 nella quale è presente il sistema da noi utilizzato, mostra come la microiniezione del mRNA *lefty* produca importanti effetti morfologici sull'embrione a livello mesodermico e inoltre abolisce totalmente l'espressione del reporter mCherry. A validazione di questo modello è stato microiniettato il messaggero *shh*, realizzando una iperattivazione del pathway come dimostrato dall'incremento della fluorescenza mCherry nell'embrione in basso. Il grafico riportato in Figura 51 mostra l'analisi di espressione relativa a *cyrr1* e alle miosine *fast* e *slow* nelle tre condizioni. In particolare la sovraespressione del pathway di SHH non sembra incidere significativamente sull'espressione di *cyrr1*, mentre induce un aumento significativo del gene marcatore delle miosine *slow* (*smyhc1*) per contro l'inibizione della via di segnalazione attraverso la sovraespressione di *lefty*, determina una significativa riduzione di tutti i geni analizzati. L'espressione del gene *cyrr1* risulta essere downregolata di circa il 60%.

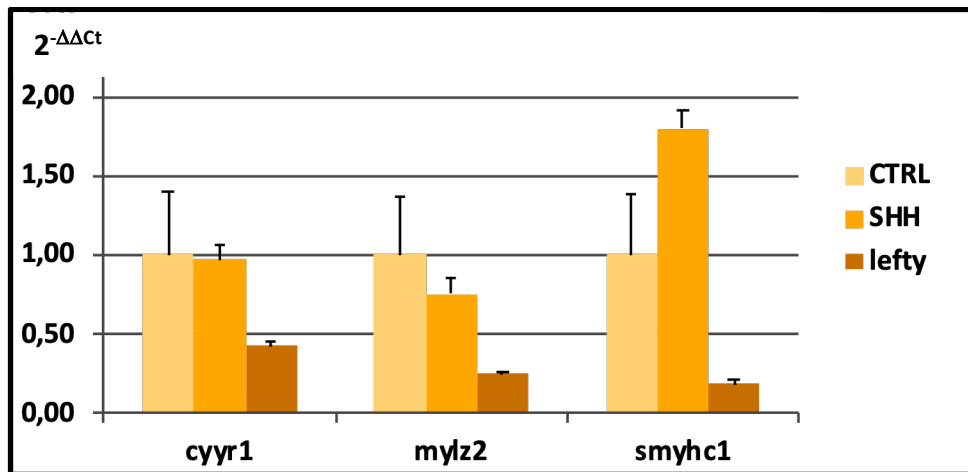


Figura 51. Espressione quantitativa relativa dei geni *cyyr1*, *mylz2* e *smyhc1* in embrioni Tg(*shh*:mCherry) microiniettati con 50 pg mRNA lefty e 100 pg mRNA shh. I dati sono stati normalizzati sull'espressione dei geni *ef1a* e *slc25a5* ed espressi in termini di *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), il campione non microiniettato (CTRL) è posto a 1. Le barre di errore rappresentano l'errore standard (SE) e il grafico mostrato è relativo ad un singolo esperimento.

I risultati fin qui ottenuti in *Danio rerio* hanno mostrato un ruolo importante del pathway di SHH nell'espressione del gene di nostro interesse ma non permettono di stabilire se *cyyr1* abbia un ruolo a monte o a valle della via di segnalazione. Al fine di indagare questo aspetto sono stati condotti esperimenti di co-microiniezione dei due mRNA lefty1 e *cyyr1*.

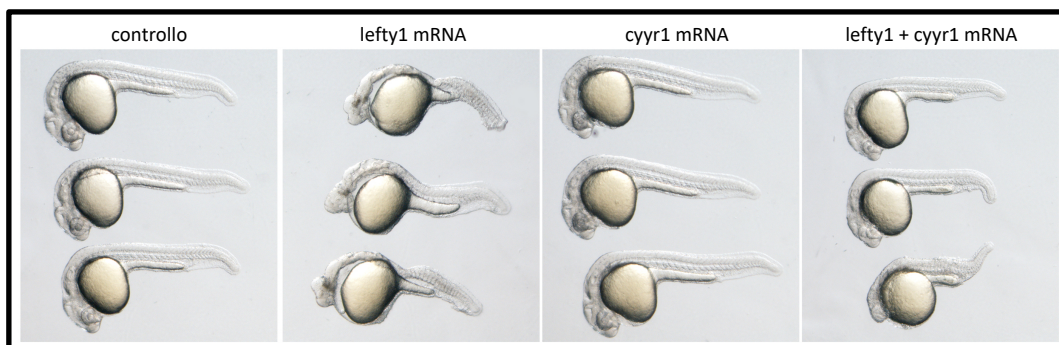


Figura 52. Analisi morfologica di embrioni a 24 hpf, non microiniettati (controllo), microiniettati mRNA lefty1, microiniettati mRNA *cyyr1* e co-microiniettati con entrambi gli mRNA. L'esperimento è stato ripetuto due volte.

L'analisi morfologica dei fenotipi negli embrioni co-microiniettati con entrambi gli mRNA ha evidenziato un dato inatteso, in particolare nel 41% degli embrioni co-microiniettati è stata ottenuta una reversione del fenotipo *lefty*. L'esperimento è stato effettuato in duplicato biologico al fine di valutare la specificità dell'effetto osservato e ottenendo i medesimi risultati con un incremento dei fenotipi *normal* nei co-microiniettati pari a circa il 60% dei microiniettati contro un 40% di embrioni con fenotipo *lefty-like* (dato non mostrato). La parziale reversione fenotipica è stata poi indagata a livello molecolare attraverso esperimenti di Real-time PCR e Western Blot.

L'indagine molecolare in Real-time PCR (Figura 53) è stata condotta sui geni *myod*, *mylz2* e *smyhc1*, la cui espressione è stata normalizzata sui geni *ef1a* e *slc25a5*; i primi due mostrano una significativa reversione parziale di espressione nei co-microiniettati rispetto ai microiniettati *lefty*. Per quanto riguarda invece il gene *smyhc1*, abbiamo riscontrato una completa abolizione della sua espressione nel microiniettato *lefty* mRNA e una tendenza alla reversione, seppur modesta, nei co-microiniettati.

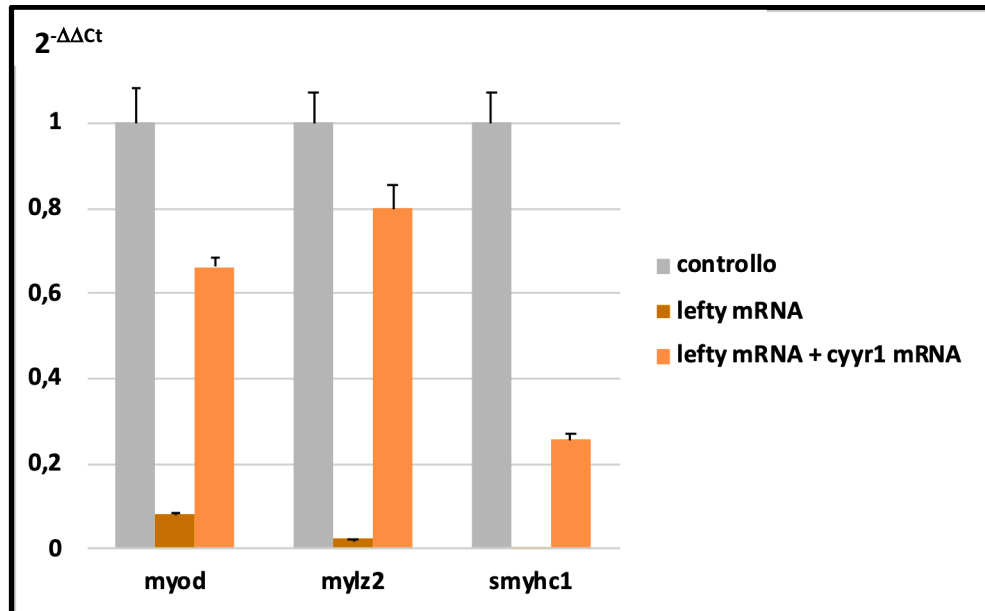


Figura 53. Espressione quantitativa relativa dei geni *myoD*, *mylz2* e *smyhc1* in embrioni Tg(*shh*:mCherry) microiniettati con 50 pg mRNA *lefty* e co-microiniettati 100 pg mRNA *cyyr1* e 50 pg mRNA *lefty1*. I dati sono espressi in *fold change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) utilizzando come campione di controllo l'espressione degli embrioni non microiniettati.

L'analisi molecolare in Western Blot è stata effettuata sulle proteine delle miosine *fast* e delle miosine *slow* negli stessi embrioni microiniettati con solo mRNA *lefty1* o co-microiniettata insieme all'mRNA *cyrr1*. La banda relativa alla proteina vinculina è stata utilizzata come riferimento per normalizzare i dati.

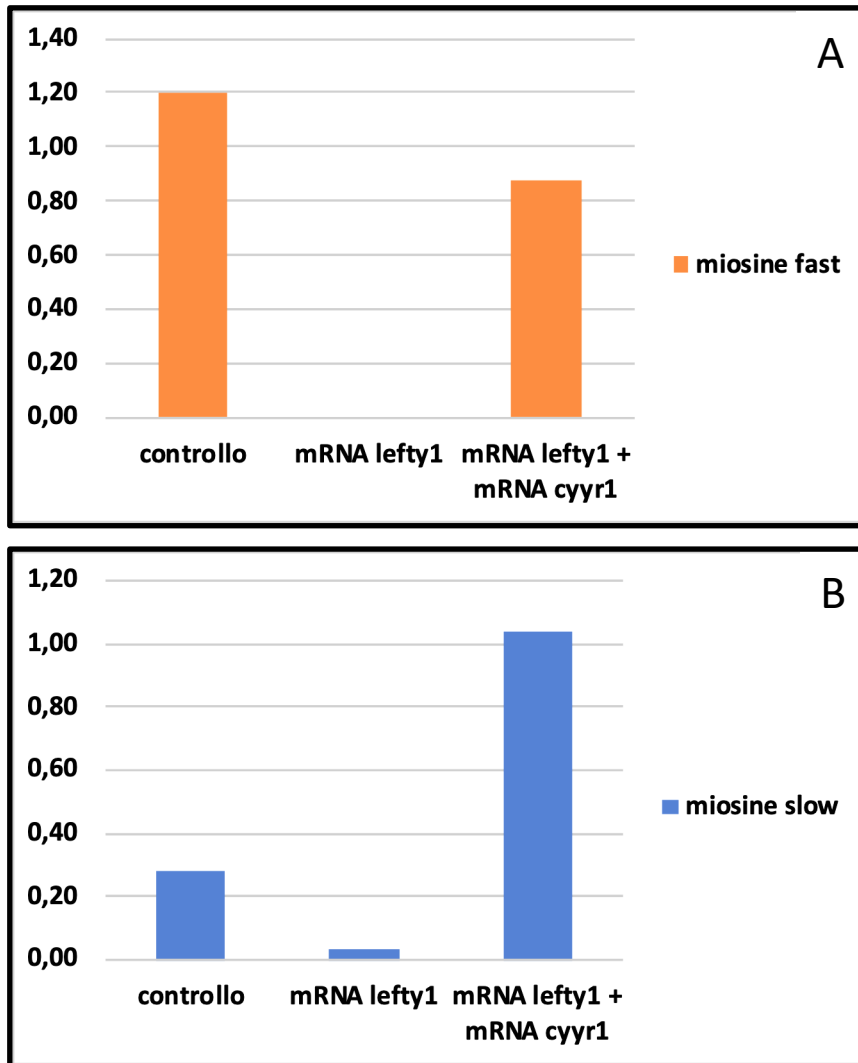


Figura 54. Grafici relativi all'analisi densitometrica delle miosine *fast* (Pannello A) e miosine *slow* (Pannello B) normalizzata sulla banda della Vinculina nel medesimo campione biologico. I grafici mostrati sono relativi ad un singolo esperimento.

I grafici in Figura 54 mostrano entrambi una importante riduzione delle miosine sia *fast* che *slow* in seguito alla microiniezione del mRNA *lefty1*, riduzione che viene revertita dalla co-microiniezione dell'mRNA *cyrr1* nello stesso contesto di sovraespressione di *lefty1*. La reversione ottenuta è maggiore nelle miosine delle fibre *slow* rispetto a quelle *fast*.

Summary dei Risultati della PARTE II

L'induzione del differenziamento nelle linee cellulari di rhabdomyosarcoma per 9 giorni in terreno HS 2% comporta un incremento dell'espressione del gene e della proteina nella linea cellulare RD/12, mentre la linea cellulare RD/18 mantiene una espressione invariata. In *Danio rerio* l'alterazione del dosaggio genico attraverso MO *cyr1* incrementa le miosine totali, in particolare un'analisi in grado di distinguere le tipologie di miosine mostra che l'inibizione del gene comporta un incremento delle miosine delle fibre *fast* e un decremento delle miosine delle fibre *slow*.

L'espressione del gene *CYYR1* nella linea RH30 è modulata da inibitori del pathway di SHH che agiscono a livello recettoriale (esperimenti condotti con il SAG), ma non direttamente sul fattore trascrizionale GLI1 (esperimenti condotti con la Forskolina). Esperimenti di inibizione in *Danio rerio* mostrano che anche in questo sistema un inibitore che agisce a livello recettoriale sul pathway decrementa l'espressione del gene *cyr1*. Risultati simili si sono ottenuti inibendo la via di segnalazione in modo indiretto con la sovraespressione del gene *lefty1*. Il gene *cyr1* reverte parzialmente, sia a livello morfologico che molecolare, il fenotipo dato dalla sovraespressione del gene *lefty1*.

PARTE III

Esperimenti di localizzazione e co-localizzazione dei prodotti proteici *cyyr1* e *lefty1*

Il lavoro mostrato in questa sezione è stato svolto durante il mio periodo di 4 mesi all'estero presso il laboratorio diretto dalla Prof.ssa Karuna Sampath dell'Università di Warwick (UK). La Prof.ssa Karuna Sampath è una delle massime esperte della via di segnalazione di Nodal in *Danio rerio*, ed è stata coinvolta in questo progetto in quanto il prodotto proteico del gene *lefty1* che, come abbiamo visto precedentemente, abroga la formazione della notocorda e quindi il rilascio di SHH, determina questi effetti agendo primariamente come inibitore del pathway di Nodal.

Il lavoro ha avuto due obiettivi principali, studiare la localizzazione della proteina *cyyr1* valutandone la dinamica molecolare e mettere a punto esperimenti di co-localizzazione delle proteine *lefty-mCherry* e *cyyr1-GFP* al fine di comprenderne la possibile interazione diretta ipotizzata.

Materiali e metodi

Amplificazione e purificazione di vettori di espressione ricombinanti

In questa sezione sono stati impiegati alcuni costrutti molecolari precedentemente ottenuti dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Flavia Frabetti insieme ad altri già presenti nel laboratorio della Prof.ssa Karuna Sampath. In tabella sono riassunti i principali costrutti utilizzati:

- pCSII-*lefty1*: vettore di espressione pCSII contenente CDS del gene *lefty1*;
- pCSII-*lefty1-mCherry*: vettore di espressione pCSII contenente CDS del gene *lefty1* privata del codone di STOP in frame con la CDS mCherry;
- pCSII-*cyyr1*: vettore di espressione pCSII contenente CDS del gene *cyyr1*;
- pCSII-*cyyr1-GFP*: vettore di espressione pCSII contenente CDS del gene *cyyr1* privata del codone di STOP in frame con la CDS GFP;
- *cyyr1*ΔTM-GFP: vettore di espressione pCSII contenente CDS del gene *cyyr1* privata del tratto predetto essere transmembrana (TM) e del codone di STOP in frame con la CDS GFP.;
- pCSII-*actvr2b-mCherry*: vettore di espressione pCSII contenente CDS del gene *actvr2b* privato del codone di STOP in frame con la CDS mCherry.

Cellule batteriche di *E. coli* chimicamente competenti (KIT One Shot TOP10 competent cells, Invitrogen) sono state trasformate con i plasmidi contenenti i diversi costrutti elencati in precedenza. Il protocollo di trasformazione ha previsto uno shock termico di 30" a 42°C seguito da un rapido raffreddamento in ghiaccio. Le cellule sono poi state risospese in 250 mL di terreno liquido SOC (Tryptone 2%, Estratto di Lievito 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂·6H₂O 10 mM, Glucosio 20 mM) e poste in incubatore con agitatore a 37°C per 1 ora. Dopo l'incubazione le cellule sono state piastrate su terreno LB-Agar (Luria-Bertani) addizionato di ampicillina e poste in incubatore 37°C O/N. Il giorno successivo una singola colonia è stata prelevata con un puntale sterile e inoculata in coltura liquida in 2 mL di LB addizionato di ampicillina e incubata a 37°C O/N. Al termine dell'incubazione O/N gli inoculi sono stati centrifugati e lisati secondo protocollo Miniprep Quiagen per il recupero del DNA plasmidico che è stato successivamente valutato al Nanodrop e in gel di agarosio 1%. Successivamente i plasmidi sono stati digeriti con l'enzima di restrizione Not1 ed è stata effettuata la trascrizione in vitro come già descritto nei "Materiali e metodi" della PARTE I.

Microscopia confocale e live-imaging

Processamento degli embrioni: gli embrioni di *Danio rerio* posti in incubatore a 28.5 °C sono stati recuperati a circa 3.5 ore di sviluppo e selezionati sulla base della intensità di fluorescenza microscopicamente rilevato. Gli embrioni selezionati sono stati posti in una nuova piastra di Petri rivestita sul fondo con agar a basso punto di fusione (*low melting agar*) disciolto in acqua isosmotica (*egg water*). Successivamente gli embrioni selezionati vengono decorionati manualmente, con l'ausilio di apposite pinze, allo stereomicroscopio utilizzando la minor quantità di luce possibile per non danneggiare il fluoroforo.

Allestimento dei preparati: al centro di una apposita piastra per microscopia confocale viene posizionata una goccia di low melting agar 0,4% in *egg water*. Successivamente si preleva l'embrione decorionato con l'utilizzo di una pipetta Pasteur a pressione costante e si posiziona all'interno della goccia. Rapidamente, con l'ausilio di una bacchetta di vetro con un cilio come punta, si cerca di posizionare l'embrione in modo tale che il polo animale sia rivolto verso il basso. Dopo aver orientato l'embrione in modo corretto si lascia solidificare l'agar e poi si riempie la piastra con soluzione Danieul. L'embrione così montato può rimanere vitale per diverse ore.

Sono stati utilizzati per l'acquisizione delle immagini e dei *time-lapse* due microscopi confocali qui di seguito dettagliati.

- Il microscopio confocale a disco rotante con Sistema di imaging Andor Revolution XD dotato di un obiettivo 100x (immersione in olio, 1.45NA, Nikon Plan Apo lambda), un'unità confocale Yokogawa CSU-X1, un rivelatore (detector) EMCCD Andor iXON e software di acquisizione Andor IQ;
- Il microscopio Zeiss LSM710/880 equipaggiato con obiettivo 100× (immersione in olio, 1.4-NA, apochromat) o 60× (immersione in olio, 1.4-NA, plan apochromat) con software di acquisizione Zen (ZEISS), sistema a disco rotante (CSU-X1; Yokogawa Electric Corporation), una telecamera Andor iXon Ultra EMCCD, l'unità Andor FRAPPA

Risultati

Esperimenti di localizzazione cellulare e studi di dinamica molecolare

Le predizioni di localizzazione cellulare del prodotto proteico del gene *cyyr1* presenti nei database online identificano un α -elica transmembrana e predicono una localizzazione a livello della membrana cellulare. Al fine di valutare la sua reale localizzazione sono stati condotti esperimenti di microiniezione del mRNA chimerico *cyyr1*-GFP, per verificare che non vi fossero artefatti sono stati analizzati anche embrioni non microiniettati e embrioni microiniettati con l'mRNA chimerico *cyyr1* Δ TM-GFP, delete del tratto trans-membrana. In Figura 55 sono riportate alcune delle immagini ottenute tramite microscopia confocale.

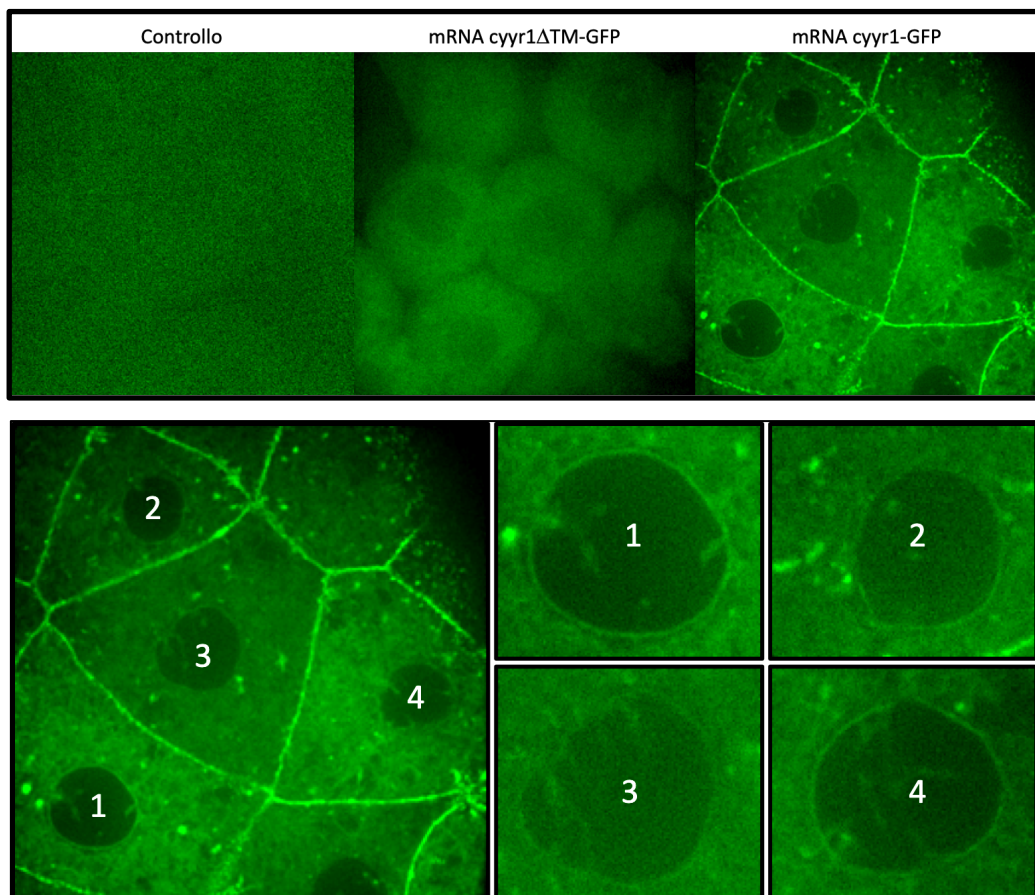


Figura 55. Immagini campione di microscopia confocale ingrandimento 100X di embrioni a 5 hpf. A sinistra embrione non microiniettato (controllo), al centro microiniettato con mRNA *cyyr1* Δ TM-GFP e a destra microiniettato con mRNA *cyyr1*-

GFP. Nelle immagini riportate in basso dettaglio dei nuclei nel microiniettato mRNA *cyvr1*-GFP.

Le immagini ottenute al microscopio confocale ad ingrandimento 100X in embrioni vitali, mostrano che la fluorescenza del microiniettato con mRNA *cyvr1* Δ TM-GFP è a livello citosolico, mentre l'embrione microiniettato con mRNA *cyvr1*-GFP presenta fluorescenza a livello della membrana plasmatica, della membrana nucleare e in vescicole citosoliche. L'acquisizione delle immagini è stata realizzata monitorando 45 piani focali distanti 0,3 μ m l'uno dall'altro; l'analisi dei singoli piani focali ha permesso inoltre di osservare che il prodotto proteico del gene *cyvr1* localizza a livello di tutto l'involucro nucleare. Al fine di valutare la specifica localizzazione a livello della membrana nucleare e verificare che non si trattasse di un artefatto dato dalla sovraespressione di questo mRNA, è stato messo a punto un esperimento di co-microiniezione dell'mRNA *cyvr1*-GFP insieme all'mRNA del recettore 2 per l'activina con tag mCherry (*actvr2*-mCherry), il cui prodotto proteico localizza a livello della membrana cellulare.

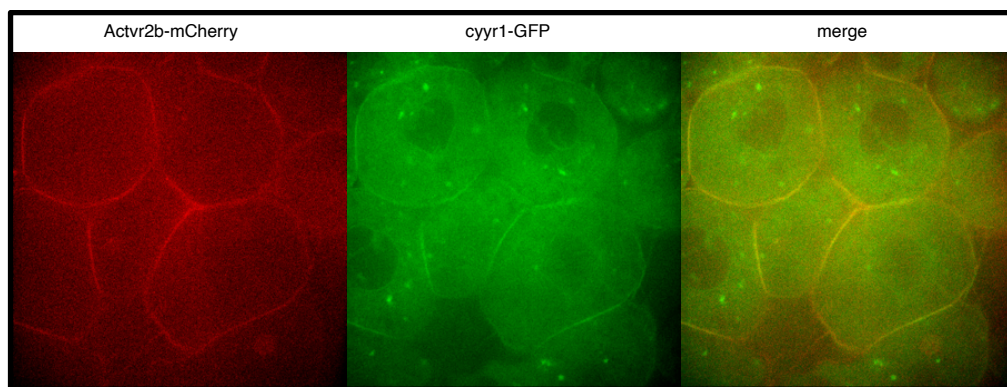


Figura 56. Immagini campione di microscopia confocale ingrandimento 100X di embrioni a 5 hpf. A sinistra *actvr2b*-mCherry (eccitazione 561nm), al centro *cyvr1*-GFP (eccitazione 488nm) e a destra la sovrapposizione dei due segnali (*merge*).

Gli esperimenti di co-localizzazione della proteina *actvr2b*-mCherry e *cyvr1*-GFP mostrano che mentre la prima è presente solo a livello della membrana plasmatica, *cyvr1*-GFP è presente in modo specifico non solo nel plasmalemma, ma anche a livello dell'involucro nucleare e di alcune vescicole.

Oltre all'acquisizione di immagini per esperimenti di localizzazione sono anche stati registrati filmati di circa 40 minuti al fine di tracciare i movimenti delle vescicole, in particolare sono stati acquisiti 35 piani per uno spessore complessivo di 10,2 μm totali. La difficoltà principale in questi esperimenti è stata la scelta del piano focale di studio perché le vescicole che si vogliono analizzare, muovendosi all'interno di uno spazio tridimensionale, possono uscire dal piano focale e ritornare sullo stesso a distanza anche di 4 o 5 frame. Inoltre le acquisizioni non possono essere effettuate a tempi troppo ravvicinate in quanto si rischia di danneggiare il fluoroforo eccitato (fenomeno del *bleaching*). I filmati sono stati analizzati con il *plugin* TrackMate per il *software imagej* che permette di tracciare percorsi di aree fluorescenti precedentemente impostate tra frame differenti. Le impostazioni utilizzate sono state quelle consigliate dal *plugin* durante l'avvio del programma con la valutazione dell'area minima di fluorescenza da rilevare, utile a identificare le singole vescicole.

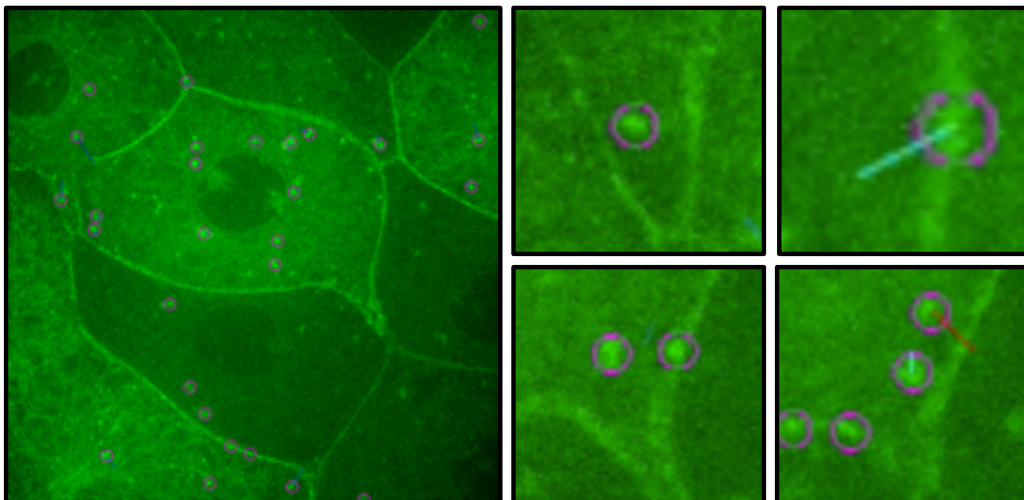


Figura 57. Immagini campione di microscopia confocale ingrandimento 100X di un embrione a 5,5 hpf. In viola sono indicate le vescicole riconosciute dal plugin TrackMate, la linea azzurra (nei due ingrandimenti in alto a destra) e la linea rossa (nei due ingrandimenti in basso a destra) indicano il movimento delle vescicole.

Il risultato di queste analisi ha mostrato che alcune vescicole si muovono dal citosol verso la membrana cellulare, mentre altre originano dalla membrana cellulare dirigendosi all'interno del citoplasma.

Al fine di effettuare studi di dinamica molecolare e determinare il coefficiente di diffusione della proteina *cyrr1* nelle membrane cellulari, sono stati messi a punto esperimenti di FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Questi esperimenti consistono nel selezionare un'area all'interno di un campione che esprime fluorescenza, sovraeccitarla (*photobleaching*) attraverso un opportuno settaggio del laser per fare in modo che la fluorescenza sia spenta dalla degradazione fotochimica dei fluorofori e misurare successivamente il tempo che impiega l'area a recuperare la fluorescenza iniziale (prima del *photobleaching*). L'andamento temporale di questo recupero fornisce informazioni sul comportamento diffusionale dei componenti marcati con i fluorofori che possono essere estratti ed analizzati utilizzando un modello matematico che tiene conto del volume e della geometria dell'area di *photobleaching*.

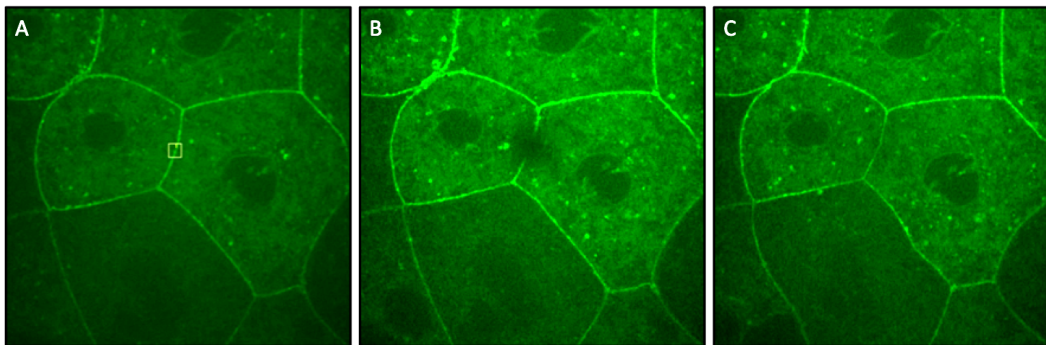


Figura 58. Immagini campione di microscopia confocale ingrandimento 100X di un embrione a 5,5 hpf, in particolare tre frame relativi ad un esperimento di FRAP. Pannello A: area selezionata di *photobleaching*; Pannello B: istante del *photobleaching*; Pannello C: recupero della fluorescenza nell'area soggetta a *photobleaching*.

Le condizioni impostate per la registrazione del filmato sono state: un unico piano focale con acquisizioni ogni 200 ms per 2', le aree di *photobleaching* per ogni embrione sono state 4. Le analisi di questi esperimenti sono ancora in corso, ma i primi risultati ottenuti con il plugin SimFRAP del software imageJ hanno evidenziato un coefficiente di diffusione medio di $0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Analisi della reversione fenotipica delle proteine con tag ed esperimenti di co-localizzazione in *Danio rerio*

Gli mRNA chimerici *lefty1-mCherry* e *cyrr1-GFP*, una volta tradotti nel contesto cellulare, danno origine a due proteine con tag fluorescente le cui lunghezze d'onda di eccitazione sono rispettivamente 561 nm e 488 nm. Al fine di valutare se questi tag fluorescenti interferissero con la reversione fenotipica, osservata nella PARTE II, sono state messe a punto co-microiniezioni di entrambi i messaggeri a diverse concentrazioni valutando la numerosità e la gravità dei fenotipi ottenuti.

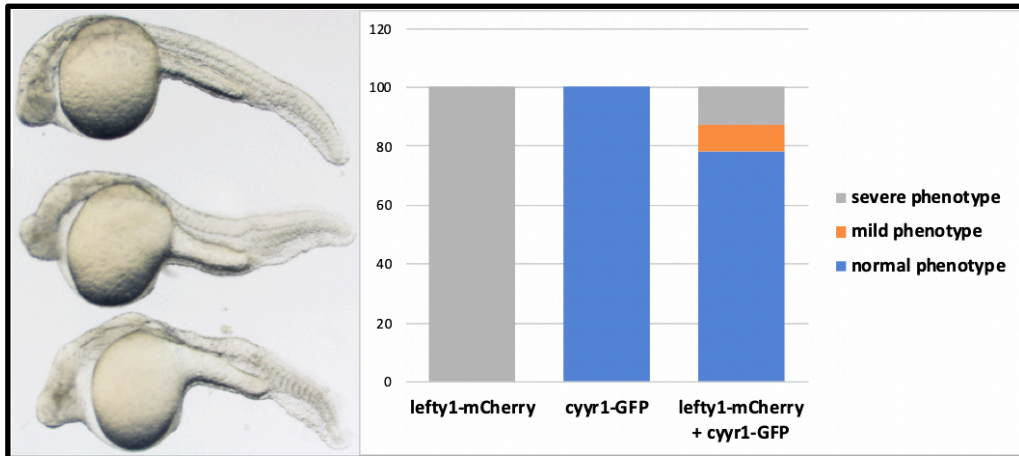


Figura 59. Analisi morfologica dei fenotipi evidenziati ed indicati come *normal* (sinistra in alto), *mild* (sinistra al centro) e *severe* (sinistra in basso) nei co-microiniettati con entrambi gli mRNA chimerici. A destra analisi percentuale dei fenotipi ottenuti nei microiniettati *lefty1-mCherry*, mRNA *cyrr1-GFP* e co-microiniettati con entrambi gli mRNA.

La classificazione dei fenotipi in *normal*, *mild* e *severe* è basata sulla compromissione a livello cefalico e del mesoderma; in particolare i fenotipi *normal* sono indistinguibili dal controllo non microiniettato (non riportato in figura), i *mild* hanno una compromissione a livello cefalico e limitata del mesoderma, mentre i *severe* hanno una compromissione importante sia cefalica che del mesoderma. L'analisi quantitativa percentuale evidenzia che la microiniezione di 10 pg mRNA *lefty-mCherry* induce fenotipi severe nel 100% dei casi, 100 pg di mRNA *cyrr1-GFP* non inducono alcun fenotipo mentre la co-microiniezione dei due messaggeri induce 12% di fenotipi *severe*, 9% fenotipi *mild* e 79% di fenotipi *normal*.

Dopo aver verificato che i tag mCherry e GFP non interferivano con la reversione dei fenotipi, si sono cercate le condizioni migliori per verificare una possibile co-localizzazione delle due proteine. In particolare, dato che la proteina *lefty-1* viene secreta all'esterno della cellula, mentre la proteina *cyrr1* localizza in membrana, è stato necessario verificare con diversi esperimenti lo stadio embrionale più adeguato per apprezzare la localizzazione. Lo stadio embrionale che meglio ha permesso di rilevare la fluorescenza di entrambe le proteine, è stato le 4 hpf con la microiniezione di 25 pg di ognuno dei due messaggeri chimerici.

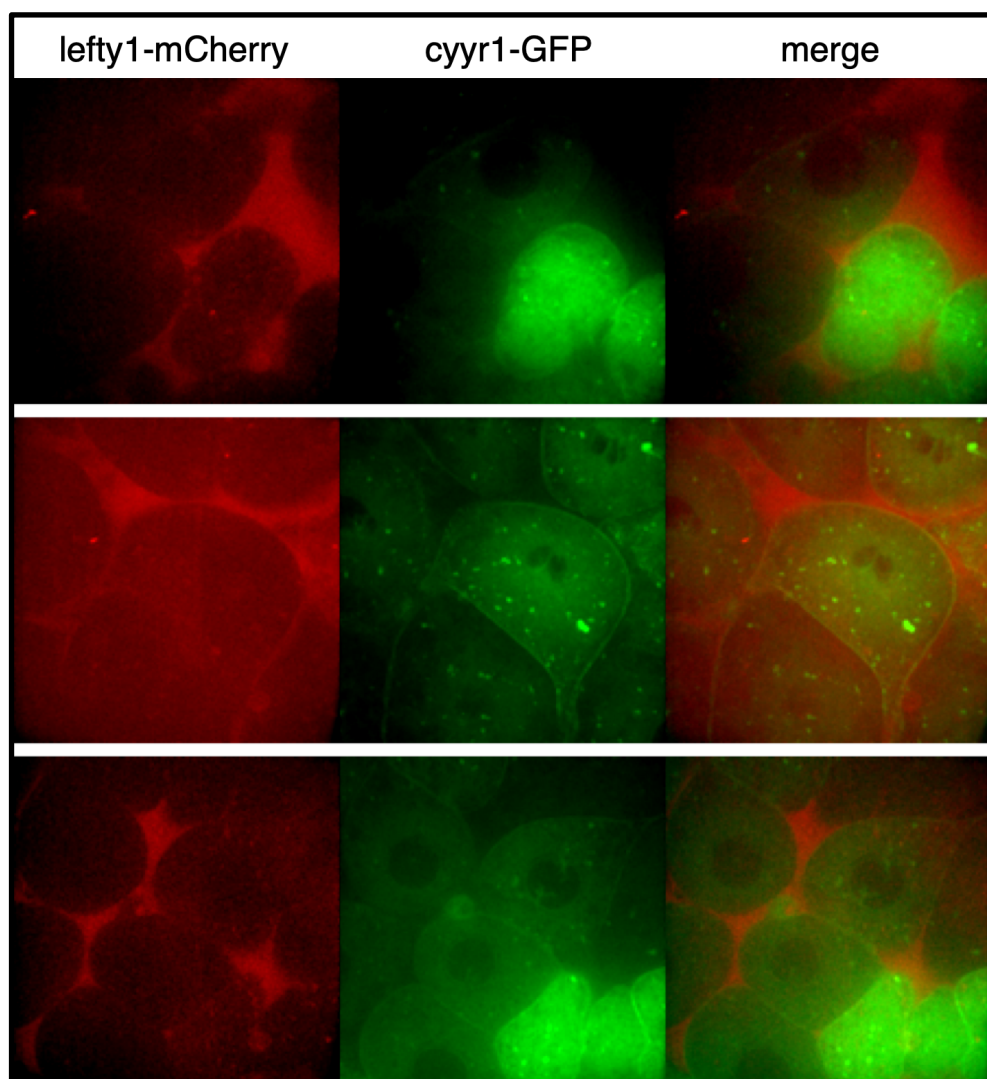


Figura 60. Immagini campione di microscopia confocale in 3 diversi embrioni ingrandimento 100X di embrioni a 4 hpf. A sinistra *lefty1*-mCherry (eccitazione 561nm), al centro *cyrr1*-GFP (eccitazione 488nm) e a destra la sovrapposizione dei due segnali (*merge*).

Le immagini in Figura 60 mostrano la localizzazione della proteina lefty1-mCherry nello spazio extracellulare e la proteina cyyr1-GFP a livello delle membrane cellulari, involucri nucleari e vescicole. Lo studio quantitativo della co-localizzazione, dato dalla sommatoria delle aree di fluorescenza sovrapposta, è attualmente in atto.

Summary dei Risultati della PARTE III

Gli esperimenti effettuati durante il mio periodo all'estero di 4 mesi nel laboratorio della Prof.ssa Karuna Sampath hanno confermato la reversione fenotipica osservata in precedenza nella PARTE II dei risultati. La possibile interazione tra le due proteine *cyrr1* e *lefty* è stata indagata attraverso esperimenti di co-localizzazione di messaggeri chimerici *cyrr1*-GFP e *lefty*-mCherry. I dati di questa parte sono ancora in analisi al fine di valutare se le due proteine co-localizzano.

In aggiunta è stata dimostrata la localizzazione cellulare del prodotto proteico del gene *cyrr1* in membrana cellulare, a livello dell'involucro nucleare e in alcune vescicole. Quest'ultime sono state studiate in *live-imaging* sono stati osservati movimenti che dimostrano una bidirezionalità citosol-membrana cellulare. Attraverso esperimenti di FRAP è stato possibile determinare per la prima volta il coefficiente di diffusibilità all'interno della membrana plasmatica della proteina *cyrr1*.

PARTE IV

Generazione di una linea mutante per il gene *cyrr1* in *Danio rerio* con la metodica CRISPR/Cas9: analisi fenotipica morfologica e molecolare

Gli obiettivi principali di questa sezione sono stati due: la generazione della linea mutante *cyrr1* e la valutazione del fenotipo dei mutanti attraverso una iniziale caratterizzazione morfologica e molecolare.

Materiali e metodi

In questa sezione sono state utilizzate alcune delle tecniche già illustrate in precedenza come l'ibridazione in situ (WISH), l'immunofluorescenza (IF), la Real-time PCR e il Western Blot, associate allo studio dei pesci mutanti generati secondo il protocollo che viene dettagliato di seguito.

Generazione della linea mutante per il gene *cyrr1*

La produzione della linea mutante *cyrr1* ha richiesto l'approvazione del progetto da parte del comitato etico e del Ministero della Salute in quanto le linee mutanti dovevano necessariamente superare il 5 giorno di vita. Il progetto n 253/2018, di cui la Prof.ssa Flavia Frabetti è responsabile, è stato approvato in data 30/03/2018.

La generazione di questa linea di seguito illustrata è stata effettuata presso l'IFOM di Milano (oggi Cogentech), in collaborazione con il Dr. Gianluca Deflorian.

Circa 100 embrioni di linea AB fecondati allo stadio di due cellule sono stati microiniettati con due RNA guida indicati con l'acronimo gRNAs (che specificano la regione bersaglio del gene *cyrr1*) e la ribonucleoproteina Cas9 (alla concentrazione di 1 µg/µL). La strategia adottata è stata quella di poter operare una delezione dell'intera regione compresa tra le sequenze di RNA progettate, sequenza corrispondente al gene *cyrr1*. Gli embrioni così ottenuti sono stati lasciati crescere prima in piastre di Petri e successivamente in vasche da 0.5, 1 e 5 litri fino al raggiungimento della maturità sessuale (3 mesi). Passati i 3 mesi sono stati allestiti degli incroci fra gli individui mosaico (microiniettati) e dei pesci AB (*outcross*), al fine di selezionare gli individui in grado di trasmettere la mutazione. Dagli embrioni ottenuti da questi accoppiamenti è stato estratto il DNA genomico, successivamente testato con una PCR specifica per la mutazione.

Non tutte le mutazioni ottenute da questa procedura sono identiche infatti il processo che ripara il danno al DNA causato dal complesso gRNA/Cas9 non utilizza un DNA da copia per ricomporre i frammenti di DNA mancanti e genera dunque alleli diversi fra loro (*non-homologous recombination*). Al fine di selezionare le sole mutazioni utili sono state effettuate delle PCR con primer a monte e a valle delle sequenze dei gRNAs; i prodotti di queste reazioni sono poi stati sequenziati per verificare il tipo di mutazione. Al termine della procedura si sono ottenuti e genotipizzati una ventina di eterozigoti stabili; l'*intercross* tra gli eterozigoti ha portato alla produzione degli omozigoti secondo la proporzione mendelliana del 25%. Gli omozigoti così ottenuti sono stati nuovamente incrociati e i nuovi omozigoti sono stati definiti M/Z *cyrr1^{-/-}* (*maternal/zigotic mutant*) in quanto sono completamente assenti sia mRNA materni dovuti ad una possibile deposizione del trascritto all'interno dell'ovulo sia mRNA zigotici.

Risultati

I pesci genotipizzati come omozigoti *cyyr1^{-/-}* non hanno manifestato letalità embrionale anche se lo sviluppo complessivo dell'animale risulta essere rallentato; l'analisi morfologica ha evidenziato tuttavia anomalie cardiache e diencefalo prominente, in Figura 61 si riportano, a titolo esemplificativo, due esemplari, le frecce indicano i punti di attenzione nel confronto tra l'esemplare AB in alto e il mutante in basso.

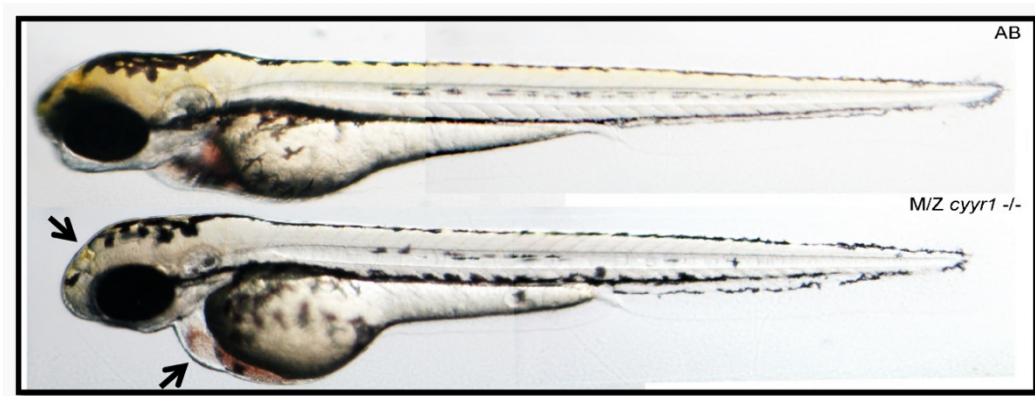


Figura 61. Immagini morfologiche di embrioni a 48 hpf. In alto embrione *wild type* (AB), in basso mutante M/Z *cyyr1^{-/-}* (*maternal/zygotic mutant*). Le frecce indicano il diencefalo prominente e l'anomalia cardiaca presente nel mutante.

Lo studio morfologico è stato associato ad analisi molecolari, in particolare il primo approccio utilizzato è stata l'ibridazione in situ effettuata in embrioni allo stadio di somitogenesi, 24 e 48 hpf. Le sonde per i geni *myoD* (marcatore dei primordi dei somiti) e *krox20* (marcatore specifico dei rombomeri 2 e 5) sono state impiegate negli embrioni allo stadio di somitogenesi (Figura 62, pannelli A e A'). Negli embrioni a 24 hpf sono stati studiati invece *MyoG*, *ckm1a* (creatina muscolare espressa nelle fibre fast) e *smyhc1* (marcatore delle fibre slow). Il 100% degli embrioni allo stadio di somitogenesi ha manifestato il pattern di marcatura evidenziabile negli embrioni rappresentativi in Figura 62 mentre il 60% degli embrioni a 24 hpf ha evidenziato marcature simili a quelle degli embrioni rappresentativi mostrati in Figura 62 pannelli B, C e D.

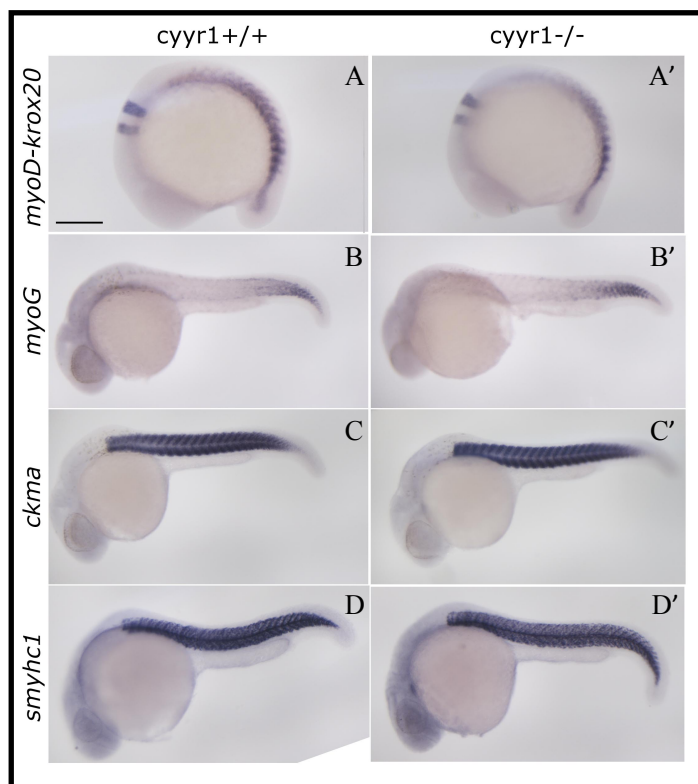


Figura 62. ISH di embrioni di zebrafish AB ($cyyr1^{+/+}$) e mutanti $cyyr1^{-/-}$ allo stadio di somitogenesi (Pannelli A) e 24 hpf (Pannelli B, C e D).

Nello specifico le ibridazioni in situ effettuate per i geni *myoD-Krox20*, *myoG* e *ckm1a* non mostrano differenze significative tra gli embrioni $cyyr1^{-/-}$ e gli embrioni *wild type* (AB) sia allo stadio di somitogenesi che a 24 hpf durante la miogenesi primaria. L'unico gene che risulta essere diversamente espresso è il marcatore delle miosine slow (*smyhc1*) che a 24 hpf risulta essere meno espresso nei mutanti rispetto agli AB. Questo decremento di espressione è stato successivamente confermato anche dallo studio della miogenesi secondaria a 48 hpf (Figura 63).

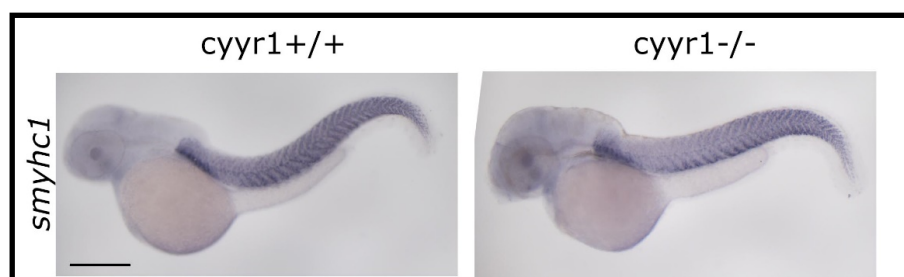


Figura 63. ISH per il gene *smyhc1*, a sinistra zebrafish AB ($cyyr1^{+/+}$) e a destra mutante $cyyr1^{-/-}$ in embrioni a 48 hpf di sviluppo.

A completamento dei risultati ottenuti attraverso le ISH è stata effettuata un'analisi molecolare in qPCR in embrioni allo stadio di somitogenesi e a 48 hpf. L'espressione genica è stata normalizzata sui geni housekeeping *slc25a5* ed *ef1a* ed espressa relativamente al campione di controllo rappresentato da embrioni AB allo stesso stadio embrionale, le elaborazioni relative all'analisi di campioni allo stadio di somitogenesi e 48 hpf sono riportate rispettivamente in Figura 64 e in Figura 65.

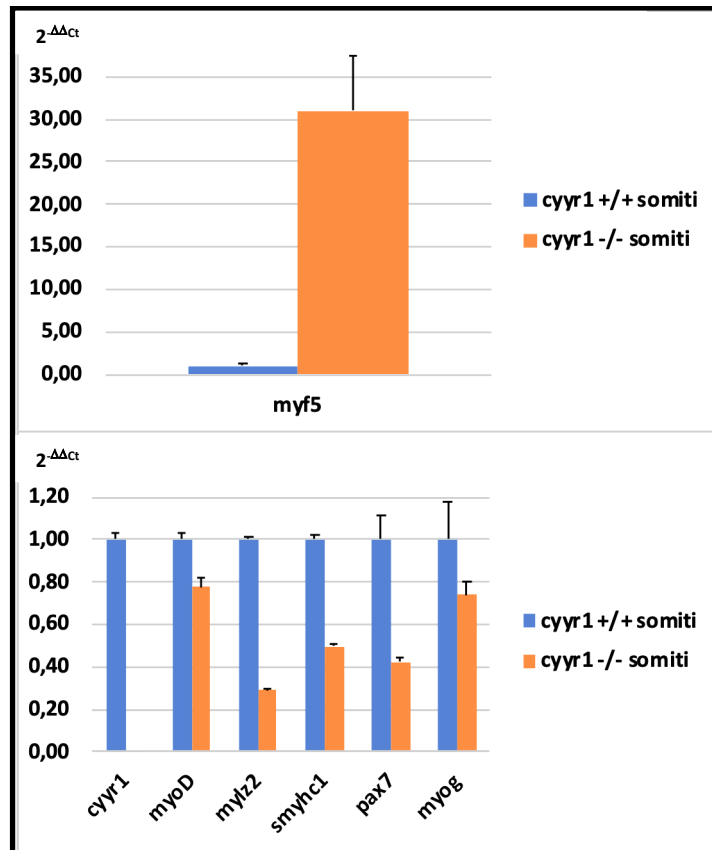


Figura 64. Analisi dell'espressione quantitativa relativa dei geni *cyyr1*, *myoD*, *myl2*, *smyhc1*, *pax7* e *myog* in embrioni mutanti *cyyr1^{-/-}* allo stadio di somitogenesi relativamente al controllo *wild type* (*cyyr1^{+/+}*) posto a 1. Il *fold change* è espresso in termini di $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e l'espressione è normalizzata sui geni *housekeeping* *ef1a* e *slc25a5*. Le barre di errore rappresentano gli errori standard (SE) di triplicati tecnici di un singolo esperimento.

L'analisi dei dati di qPCR relativi allo stadio di somitogenesi evidenzia una riduzione importante di tutti i marcatori miogenetici testati nei mutanti *cyyr1^{-/-}* ad eccezione del fattore trascrizionale *myf5* la cui espressione aumenta notevolmente

rispetto al relativo controllo (*cyrr1^{+/+}*). L'assenza totale del trascritto *cyrr1* nel mutante conferma la delezione del gene a livello genomico.

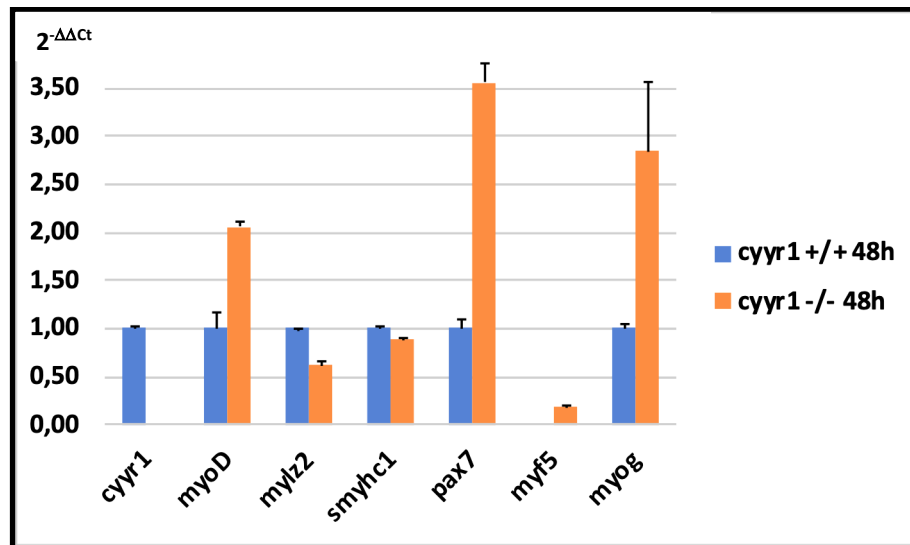


Figura 65. Analisi dell'espressione quantitativa relativa dei geni *cyrr1*, *myoD*, *mylz2*, *smyhc1*, *pax7* e *myog* in embrioni mutanti *cyrr1^{-/-}* a 48 hpf relativamente al controllo *wild type* (*cyrr1^{+/+}*) posto a 1. Il *fold change* è espresso in termini di $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e l'espressione è normalizzata sui geni *housekeeping efla* e *slc25a5*. Le barre di errore rappresentano gli errori standard (SE) di triplicati tecnici di un singolo esperimento.

I mutanti *cyrr1^{-/-}* a 48 hpf evidenziano un incremento di espressione dei fattori trascrizionali *myoD*, *pax7*, *myf5* e *myog* mentre i geni marcatori delle miosine *fast* e *slow* mantengono una espressione ridotta rispetto al controllo.

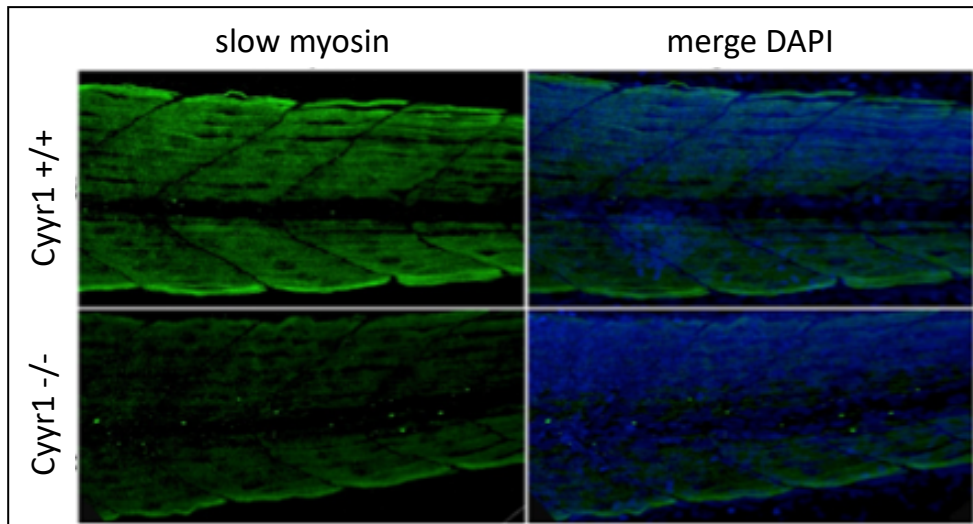


Figura 66. Immagini (ingrandimento 80X) relative ad immunofluorescenza per le *slow myosin* (in verde) su embrioni a 72 hpf, in alto controllo *wild type* (*cyyr1^{+/+}*) e *cyyr1^{-/-}* in basso. I nuclei sono stati marcati con il colorante DAPI (blu).

L'immunofluorescenza effettuata sulle miosine *slow* in embrioni a 3 giorni mostra una riduzione della fluorescenza nel mutante *cyyr1^{-/-}* rispetto all'embrione di controllo in linea con i dati ottenuti attraverso l'approccio dell'ISH e in qPCR.

Summary dei Risultati della PARTE IV

Grazie alla collaborazione con il Dr. Gianluca Deflorian e al supporto tecnico della Prof.ssa Anna Silvia Pistocchi è stato generato il mutante del gene *cyrr1* in *Danio rerio* con la completa delezione del locus genico. Le prime analisi molecolari condotte in Real-time PCR sugli stadi embrionali di somitogenesi e 48 hpf dimostrano che nel mutante vi sono importanti disregolazioni dei fattori trascrizionali che intervengono nel differenziamento miogenico. Un approccio integrato di ISH, immunofluorescenza e qPCR mostra una netta riduzione delle fibre *slow* nel mutante. L'espressione delle fibre *fast*, indagata solo in qPCR, mostra una importante riduzione.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel 2002 il Laboratorio di Genomica del Dipartimento di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata dell'Università di Bologna ha identificato, in una regione predetta come desertica del cromosoma 21 umano, il gene *CYYRI* (cysteine and tyrosine-rich protein 1) [3]. Il locus genico mappa sul braccio lungo del cromosoma, occupando una regione fisica di circa 107 kb pari allo 0,3% del cromosoma. A livello evolutivo il locus genico risulta essere specifico dei vertebrati permettendo di studiarne la sua funzione in organismi modello quali *Mus musculus* e *Danio rerio*. In particolare il Laboratorio di Post-genomica, nel quale ho svolto la mia attività di ricerca in questi tre anni, si avvale del modello animale *Danio rerio* per studi di genomica funzionale; in questo modello il gene *cyrr1* è stato clonato ed è stata studiata la sua espressione durante lo sviluppo embrionale. La caratteristica di essere un gene presente esclusivamente nei vertebrati, insieme al fatto che la proteina predetta per l'isoforma di riferimento non ha similarità con altre proteine note, rendono *CYYRI* un locus interessante da studiare.

Nel 2014 il gruppo di ricerca diretto dalla Prof.ssa Flavia Frabetti ha pubblicato un articolo [6] che descrive il locus umano come un sistema multitrascritto del quale, oltre all'isoforma di riferimento, fanno parte altre sei isoforme di splicing alternativo e un trascritto in antisenso appartenente alla famiglia dei ncRNA indicato con il simbolo *CYYRI-ASI*. Lo studio ha consentito di caratterizzare l'espressione del locus in diversi tessuti umani e in alcune linee cellulari, primarie e tumorali, mostrando che l'isoforma di riferimento è altamente espressa in cuore, cervello e pancreas. La linea cellulare che più esprimeva il locus, a fronte di tante altre analizzate e risultate negative, era una linea di osteosarcoma umano (U2OS).

Negli anni successivi, la mia tesi di Laurea Magistrale, ha dimostrato che il gene si esprime in modo eterogeneo in diverse linee cellulari di tumori pediatrici come i medulloblastomi e i rhabdomyosarcomi, in quest'ultimi per alcune linee, l'espressione del locus è relativamente elevata e risulta quantitativamente confrontabile alla espressione di geni costitutivamente espressi.

Alcuni dati raccolti da articoli e banche dati online (CCLE, Geo Profile) hanno indirizzato la ricerca allo studio del locus genico in rapporto al pathway di SHH. In questo contesto il lavoro di *Xu et al.*, del 2006 [35] è stato decisivo in quanto ha messo in rilievo la possibile regolazione del gene *cyrr1* in *Danio rerio* da parte del fattore trascrizionale gli1, fattore notoriamente attivato dalla via morfogenetica.

I due modelli che in parallelo e in modo complementare ci hanno permesso di caratterizzare la regolazione e il ruolo funzionale del locus genico di nostro interesse

sono stati quindi: il modello animale *Danio rerio* e linee cellulari di rhabdomyosarcoma umano, gentilmente concesse dal Prof. Pierluigi Lollini del DIMES dell'Università di Bologna. La scelta di questo modello cellulare è sembrata la migliore in ragione di risultati da noi raccolti che indicano una modulazione della espressione del *locus* genico in diverse linee di rhabdomyosarcoma. Inoltre dati di letteratura individuano nell'alterazione della segnalazione di HH, in biopsie tumorali e in linee cellulari di rhabdomyosarcoma, un potenziale ruolo della via di segnalazione relativamente alla capacità metastatica e alla incapacità differenziativa in senso miogenico [65]-[67].

La caratterizzazione funzionale del gene è stata condotta inizialmente con l'approccio classico di *Reverse genetics* in *Danio rerio*, ovvero sono stati messi a punto esperimenti di alterazione del dosaggio genico di *cyrr1* al fine di valutare i possibili fenotipi derivanti. Una metodica consolidata in zebrafish è la microiniezione di mRNA e di oligonucleotidi morfolinici antisenso (Morfolino - MO), in embrioni a stadi molto precoci al fine di ottenere una alterazione della espressione genica, sebbene transiente, a livello di tutto l'embrione. In particolare sono stati utilizzati l'mRNA di *cyrr1* trascritto *in vitro* e due morfolini, il primo in grado di legare per complementarità l'intorno del codone di inizio (MO-ATG) e il secondo la prima giunzione di splicing (MO-E111). Gli esperimenti presentati nella "PARTE I" dei risultati hanno dimostrato che il *knockdown* del gene *cyrr1* comporta a 24 e 48 hpf alterazioni morfologiche significative a livello del sistema nervoso centrale, del cuore e del tessuto muscolare. Inoltre l'inibizione del gene sembra rallentare la deposizione dei neuromasti della linea laterale posteriore, i quali presentano una riduzione della componente cellulare ciliata. La validità del sistema di inibizione genica utilizzato è stato confermato dalla parziale reversione fenotipica ottenuta con la co-microiniezione di MO e *cyrr1* mRNA (rescue).

Si sottolinea che le alterazioni fenotipiche descritte nei morfanti per *cyrr1* relativamente all'ontogenesi del sistema nervoso, nella formazione ed organizzazione della muscolatura e nell'assetto cardiaco, risultano particolarmente interessanti se poste in rapporto alle note alterazioni di individui con sindrome di Down che, sebbene caratterizzata da un'estesa variabilità fenotipica, presenta tipicamente disabilità cognitiva, ipotonia muscolare alla nascita e frequenti gravi malformazioni congenite cardiache (da Omim # 190685 - Down Syndrome).

A differenza dei morfanti, la overespressione del gene ottenuta attraverso la microiniezione del mRNA di *cyrr1* trascritto *in vitro* non sembra alterare lo sviluppo embrionale in modo evidente.

Risultati simili sono stati ottenuti nella tesi di dottorato della *Dr.ssa Sarah McGuire Edie* che, nei suoi esperimenti tesi ad indagare quali geni del cromosoma 21 umano se overespressi in *Danio rerio* alterino lo sviluppo embrionale, mostra come la microiniezione del trascritto *CYYR1* umano non comporti alterazioni evidenti dell'embriogenesi [73]. Tuttavia un dato interessante emerso dallo studio del fenotipo muscolare, sia in esperimenti di immunofluorescenza che nelle colorazioni delle sezioni di tronco con ematossilina/eosina, evidenzia che l'overespressione di *cyrr1* disarticola le fibre muscolari. In aggiunta a questo risultato, i dati di western blot nei risultati "PARTE II" mostrano che la overespressione del gene *cyrr1* comporta una riduzione generale delle miosine e in particolar modo delle miosine delle fibre slow. Recentemente importanti riduzioni delle fibre muscolari slow sono state dimostrate nel modello murino di sindrome di Down Ts1Cje [74].

Il fenotipo osservato a livello del tessuto muscolare nei morfanti è stato quindi indagato in modo approfondito a livello molecolare attraverso approcci di qPCR e western blot. L'analisi trascrittomico ha dimostrato che inibire l'espressione del gene comporta un significativo incremento del fattore trascrizionale *myod* (marcatore precoce di differenziamento miogenico) e dei geni delle miosine slow (*smyhc1*) e fast (*mylz2*) considerate marcatori terminali di differenziamento miogenico. Inoltre gli esperimenti di western blot hanno confermato un aumento delle miosine totali, mettendo in rilievo una diversa regolazione delle due tipologie di miosine; infatti mentre le miosine fast aumentano, le miosine slow subiscono un importante decremento.

Parallelamente allo studio nel modello animale *Danio rerio*, si è intrapresa una caratterizzazione molecolare in linee cellulari al fine di verificare se l'induzione del differenziamento miogenico comportasse cambiamenti nell'espressione del locus genico di nostro interesse. Lo studio di espressione genica è quindi stato esteso a due differenti modelli cellulari che hanno permesso il confronto tra un modello di miogenesi normale (linea primaria di mioblasti murini C2C12) ed un modello di miogenesi compromessa a diversi livelli (linee cellulari di rhabdomiosarcoma umano). L'induzione del differenziamento nella linea cellulare C2C12 conferma una probabile relazione tra il gene *Cyrr1* e la miogenesi, infatti sia ad un giorno che a nove giorni di coltura in terreno differenziativo (2% *horse serum*), l'espressione del gene cala mentre, come atteso, aumenta l'espressione di fattori trascrizionali quali *Myod* e *Myog*.

Il modello delle linee cellulari di rhabdomyosarcoma necessita di essere contestualizzato infatti le linee cellulari da noi utilizzate sono state scelte in base a una diversa capacità differenziativa terminale oltre che in base ad un diverso livello di espressione globale del locus genico in esame, da noi dimostrato.

Più specificamente, la linea cellulare RH30, non è in grado di differenziare e mostra elevati livelli di espressione del locus genico. Questa linea è stata cimentata in esperimenti di differenziamento, con una valutazione della espressione genica sia in momenti precoci della induzione differenziativa, ovvero entro le prime 24 ore, sia in momenti tardivi (9 giorni), quando di norma è completamente raggiunto l'eventuale differenziamento terminale osservabile microscopicamente con la comparsa di lunghi miotubi contrattili. In entrambi gli esperimenti non si evidenziano variazioni significative di espressione del gene *CYYRI*, così come per il marker di differenziamento tardivo *MYOG*. I livelli del trascritto di *MYOD* risultano essere significativamente aumentati nell'esperimento di differenziamento a nove giorni, ma questo aumento non è accompagnato né dalla formazione di miotubi in coltura, né dall'aumento di espressione di marcatori più tardivi come il gene *MYOG*.

Le linee cellulari RD/12 e RD/18 possiedono uno stesso contesto genomico in quanto due differenti subcloni della medesima linea cellulare RD, ma capacità differenziative completamente differenti [75], [76], in particolare la linea cellulare RD/12 non è in grado di differenziare, mentre la linea cellulare RD/18 riesce a differenziare formando miotubi in coltura. Un'altra differenza tra queste due linee è l'espressione del locus *CYYRI* che risulta essere in condizioni di coltura normali, relativamente più bassa nella linea RD/12 rispetto alla linea RD/18, da notare che entrambe le linee cellulari esprimono in generale il locus genico molto meno rispetto alla linea cellulare RH30. Le cellule RD/12 e RD/18 sono state sottoposte ad esperimenti di differenziamento tardivo (9 giorni) e sono state valutate sia in qPCR che in western blot. La linea cellulare RD/12 mostra un aumento significativo dell'espressione del locus confermato dal dato ottenuto sulla proteina e contestualmente un decremento significativo del fattore trascrizionale *MYOG* marker dell'incapacità differenziativa miogenica di queste cellule. La linea cellulare RD/18, indotta al differenziamento, mostra al nono giorno un aumento significativo dell'espressione di *MYOG* in linea con la residua capacità differenziativa, mentre l'espressione del gene

CYYRI rimane sostanzialmente invariata rispetto a cellule non indotte al differenziamento e coltivate in terreno al 10% di FBS.

I dati ottenuti nelle linee cellulari e nel modello animale sulla miogenesi sembrano avvallare l'ipotesi che il gene *CYYRI* abbia un ruolo importante durante questo processo o ne regoli, almeno in parte, il buon esito. A completamento di questa parte sono in atto esperimenti di downregolazione dell'espressione genica nelle linee cellulari di rhabdomyosarcoma attraverso l'utilizzo di siRNA. L'inibizione del gene e la successiva indagine molecolare dei marcatori miogenici permetterà di completare il parallelo tra i due modelli utilizzati e chiarire meglio il ruolo funzionale del locus genico *CYYRI* durante la miogenesi in modelli cellulari umani.

Un secondo importante punto di questo lavoro di tesi è stato chiarire se vi è una relazione tra l'espressione del pathway di SHH e l'espressione del gene di nostro interesse. A tal fine sono stati impiegati diversi sistemi per inibire il pathway nella linea cellulare RH30 e nel modello animale *Danio rerio*. Nella linea RH30 sono stati messi a punto esperimenti di inibizione con SAG e Forskolina, il primo agisce direttamente a livello del recettore SMO mentre il secondo agisce direttamente sul fattore trascrizionale GLI1. I risultati ottenuti mostrano chiaramente che il SAG downregola il pathway già dopo 6 ore dall'inizio del trattamento, questo comporta una riduzione dell'espressione di *GLI1* e di *CYYRI*, mentre la Forskolina, che ha tempi di azione più lunghi, downregola l'espressione di *GLI1* come dimostrato in letteratura, ma non di *CYYRI*. Parallelamente alla linea cellulare abbiamo messo a punto inibizioni della via di segnalazione in *Danio rerio* attraverso un trattamento con ciclopamina e la overespressione del gene *lefty1* che abolisce la formazione della notocorda e di conseguenza inibisce il pathway di SHH, da essa fondamentalmente prodotto. Entrambi i sistemi utilizzati mostrano un calo significativo dell'espressione del gene *cyyr1* supportando il dato ottenuto nella linea cellulare RH30 trattata con SAG. La mancata inibizione del gene *CYYRI* nella linea cellulare RH30 trattata con Forskolina può essere imputata ad una via non canonica di attivazione del pathway SMO-dipendente, che recentemente è stata caratterizzata come tipica cellule endoteliali [25], [77] e nei processi di migrazione dei fibroblasti [78]. In accordo con questa ipotesi diversi dati presenti in letteratura indicano il gene *CYYRI* come specifico marcatore differenziativo in cellule endoteliali di diversi tessuti e organi [20], [22].

Un risultato interessante ed inatteso, ottenuto in questa fase del lavoro, è stato la reversione parziale del fenotipo grave osservabile in seguito alla overespressione dell'mRNA di *lefty1* (utilizzato per inibire il pathway di SHH), ad opera del mRNA *cyrr1*. La reversione è stata indagata e confermata a livello molecolare in qPCR e in western blot, utilizzando come marcatori geni legati alla miogenesi.

I risultati di questi esperimenti hanno permesso di stringere una collaborazione con la Prof.ssa Karuna Sampath della Università di Warwick, la quale studia da diversi anni tutti i geni riguardanti il pathway di *Nodal* e i meccanismi che li regolano in *Danio rerio*, tra cui il gene *lefty1* [79]–[82]. Durante il mio periodo presso il suo laboratorio ho collezionato diversi dati tesi a caratterizzare meglio il prodotto proteico del gene *cyrr1*. Gli esperimenti di localizzazione con un costrutto chimerico con un tag GFP hanno mostrato che la proteina localizza a livello della membrana cellulare, nell'involucro nucleare e in alcune vescicole. La specificità di questa localizzazione è stata validata dal confronto con un'altra proteina a singola α -elica transmembrana quale *actvr2b*. Attraverso esperimenti di *live imaging* è stato possibile valutare le direzioni del trasporto vescicolare di vescicole esprimenti *cyrr1*-GFP dimostrando la bidirezionalità citosol-membrana cellulare. Inoltre gli esperimenti di FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) hanno permesso di stimare, seppur in modo preliminare, il coefficiente di diffusione della proteina a livello della membrana cellulare. Sono stati quindi collezionati diversi dati utili a determinare la co-localizzazione tra la proteina chimerica di membrana *cyrr1*-GFP e la proteina chimerica secreta nello spazio extracellulare *lefty1*-mCherry. Questi risultati necessitano di ulteriori prove sperimentali di carattere biochimico, quali la immunoprecipitazione di una delle due proteine ai fini di dimostrare dal punto di vista fisico, le supposte interazioni molecolari.

L'ultima parte affrontata nel presente lavoro di tesi riguarda invece la generazione e la caratterizzazione di una linea mutante di *Danio rerio* *cyrr1*^{-/-} attraverso l'utilizzo della tecnologia CRISPR/Cas9. Questo progetto di cui è responsabile la Prof.ssa Flavia Frabetti è stato svolto in collaborazione con Dr. Gianluca Deflorian e la Prof.ssa Anna Silvia Pistocchi dell'Università di Milano con protocollo autorizzato n° 253/2018.

I risultati di qPCR effettuati negli embrioni *wild type* e nei mutanti *cyrr1*^{-/-} evidenziano che il mutante, durante lo stadio embrionale di somitogenesi presenta una riduzione dei fattori trascrizionali *myog*, *myod*, *pax7* e dei marcatori terminali delle miosine *fast* e *slow*.

L'unico gene che invece mostra una significativa upregolazione nel mutante è il fattore trascrizionale *myf5*, il primo dei fattori miogenetici espressi durante l'embriogenesi. Il gene *myf5* è altamente espresso nelle cellule satelliti e nei mioblasti in proliferazione che lentamente, con il proseguire del loro differenziamento, riducono l'espressione di questo gene [83]. L'aumento significativo di *myf5* nel mutante induce a pensare che vi sia un meccanismo compensatorio ovvero che l'incapacità a portare avanti il differenziamento miogenico comporti un aumento del numero di mioblasti dovuta all'azione di questo gene. In accordo con quanto ipotizzato anche l'analisi in qPCR effettuata a 48 hpf dimostra un importante incremento, rispetto al controllo *wild type*, dell'espressione dei fattori trascrizionali *myoD*, *pax7* e *myog*, ma una riduzione dei marcatori terminali di differenziamento delle miosine *slow* e *fast*.

I fenotipi ottenuti dal knockdown (morfanti) e dal knockout (mutanti M/Z *cyrr1*^{-/-}) del gene mostrano tuttavia delle differenze importanti per quanto riguarda il tessuto muscolare. Infatti mentre nel morfante si osserva a 24 e 48 hpf una apparente ipertrofia delle fibre muscolari, confermata sia da dati di Real-time PCR (marcatori miogenici) che da esperimenti di Western blot (miosine *slow* e *fast*), il mutante M/Z *cyrr1*^{-/-} mostra nello stadio di somitogenesi una diminuzione dei marcatori miogenici seguita a 48 hpf da una importante riduzione delle miosine *slow* ma un contestuale aumento dei trascritti di diversi marcatori miogenici tra cui *myoD* e *myog* che in somitogenesi avevano subito una forte riduzione. Le differenze fenotipiche riscontrate nei nostri esperimenti tra i knockdown (morfanti) e i knockout (mutanti) sono in linea con quanto sta emergendo in letteratura per diversi organismi modello. L'ipotesi alla base di questo fenomeno consisterebbe nel fatto che quando si producono mutazioni, delezioni e inserzioni a livello del DNA, si induce anche un meccanismo di compensazione genomica che porta all'attivazione della trascrizione di geni con funzioni simili a quelle del gene mutato. La compensazione genomica a seguito della mutazione di un gene è stata osservata in *Danio rerio* [74], in *Mus musculus* [75]-[76] e in cellule umane [77][78]. Il meccanismo con cui avviene questo fenomeno trasversale non è ancora del tutto chiaro ma alcuni articoli hanno mostrato il coinvolgimento dei complessi rimodellatori della cromatina indotti della trascrizione di geni mutati [79].

I risultati ottenuti con il duplice approccio dei MO e del mutante *cyrr1^{-/-}* e raccolti in questo lavoro di tesi confermano un importante ruolo dell'orologio del gene *CYYR1* durante il processo miogenico. Il dosaggio di questo gene sembra essere infatti strettamente legato al raggiungimento di un differenziamento terminale sia nel modello animale *Danio rerio* che nelle linee cellulari di rhabdomiosarcoma da noi utilizzate.

BIBLIOGRAFIA

- [1] T. L. Edison, "Functional genomics of cancer," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 18, no. 3, pp. 251–256, 2008.
- [2] D. Patterson, "Molecular genetic analysis of Down syndrome," *Human Genetics*. 2009.
- [3] L. Vitale *et al.*, "Cysteine and tyrosine-rich 1 (CYYR1), a novel unpredicted gene on human chromosome 21 (21q21.2), encodes a cysteine and tyrosine-rich protein and defines a new family of highly conserved vertebrate-specific genes," *Gene*, 2002.
- [4] L. Vitale *et al.*, "Sequence, 'subtle' alternative splicing and expression of the CYYR1 (cysteine/tyrosine-rich 1) mRNA in human neuroendocrine tumors," *BMC Cancer*, 2007.
- [5] J. Pei and N. V. Grishin, "Unexpected diversity in Shisa-like proteins suggests the importance of their roles as transmembrane adaptors," *Cell. Signal.*, 2012.
- [6] R. Casadei *et al.*, "Characterization of human gene locus CYYR1: A complex multi-transcript system," *Mol. Biol. Rep.*, 2014.
- [7] F. Pizzetti, "Approcci di genomica per la caratterizzazione del locus umano CYYR1," Università di Bologna, 2015.
- [8] G. B. Carballo, J. R. Honorato, G. P. F. De Lopes, and T. C. L. D. S. E. Spohr, "A highlight on Sonic hedgehog pathway," *Cell Communication and Signaling*. 2018.
- [9] S. Blotta *et al.*, "Canonical and noncanonical hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma," *Blood*, 2012.
- [10] E. Gluenz, J. L. Höög, A. E. Smith, H. R. Dawe, M. K. Shaw, and K. Gull, "Beyond 9+0: Noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans," *FASEB Journal*. 2010.
- [11] L. Grisanti, E. Revenkova, R. E. Gordon, and C. Iomini, "Primary cilia maintain corneal epithelial homeostasis by regulation of the Notch signaling pathway," *Dev.*, 2016.
- [12] R. Rohatgi, L. Milenkovic, and M. P. Scott, "Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium," *Science (80-.)*, 2007.
- [13] H. L. May-Simera and M. W. Kelley, "Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton," *Cilia*. 2012.
- [14] G. Regl *et al.*, "Human GLI2 and GLI1 are part of a positive feedback mechanism in Basal Cell Carcinoma," *Oncogene*, 2002.

- [15] D. J. Robbins, D. L. Fei, and N. A. Riobo, "The hedgehog signal transduction network," *Science Signaling*, 2012.
- [16] E. Staub, "An interferon response gene expression signature is activated in a subset of medulloblastomas," *Transl. Oncol.*, 2012.
- [17] M. Kool *et al.*, "Molecular subgroups of medulloblastoma: An international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas," *Acta Neuropathol.*, 2012.
- [18] H. Weishaupt *et al.*, "Batch-normalization of cerebellar and medulloblastoma gene expression datasets utilizing empirically defined negative control genes," *Bioinformatics*, 2019.
- [19] M. D. Carkett, "Comparative analysis of Sonic Hedgehog signalling and the response to Sonic Hedgehog signalling in vertebrate forelimbs and hindlimbs," MRC Francis Crick Institute, London, 2015.
- [20] Z. Chng *et al.*, "High Throughput Gene Expression Analysis Identifies Reliable Expression Markers of Human Corneal Endothelial Cells," *PLoS One*, 2013.
- [21] *et al.* Audrey C.A. Cleuren, Martijn A. van der Ent, "The in vivo endothelial cell transcriptome is highly heterogeneous across vascular beds." Preprint version, 2019.
- [22] T. Xie *et al.*, "Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis," *Cell Rep.*, 2018.
- [23] S. Fuchs, E. Dohle, and C. J. Kirkpatrick, "Sonic Hedgehog-Mediated Synergistic Effects Guiding Angiogenesis and Osteogenesis," in *Vitamins and Hormones*, 2012.
- [24] A. R. MacKie *et al.*, "Sonic hedgehog-modified human CD34+ cells preserve cardiac function after acute myocardial infarction," *Circ. Res.*, 2012.
- [25] P. Chinchilla, L. Xiao, M. G. Kazanietz, and N. A. Riobo, "Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways," *Cell Cycle*, 2010.
- [26] Q. Yao *et al.*, "Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation," *Blood*, 2014.
- [27] G. Straface *et al.*, "Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration," *J. Cell. Mol. Med.*, 2009.
- [28] K. Kanaya *et al.*, "Sonic Hedgehog signaling regulates vascular differentiation and function in human CD34 positive cells. Vasculogenic CD34 + cells with

- Sonic Hedgehog,” *Stem Cell Res.*, 2015.
- [29] R. Gupta, A. R. Mackie, S. Misener, L. Liu, D. W. Losordo, and R. Kishore, “Endothelial smoothed-dependent hedgehog signaling is not required for sonic hedgehog induced angiogenesis or ischemic tissue repair,” *Laboratory Investigation*. 2018.
- [30] R. Dahm and R. Geisler, “Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species,” *Marine Biotechnology*. 2006.
- [31] J. R. Meyers, “Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism,” *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.*, 2018.
- [32] W. B. Barbazuk *et al.*, “The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes [1],” *Genome Research*. 2000.
- [33] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling, “Stages of embryonic development of the zebrafish,” *Dev. Dyn.*, 1995.
- [34] R. Casadei *et al.*, “Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish,” *Gene Expr. Patterns*, 2011.
- [35] J. Xu *et al.*, “Genomewide expression profiling in the zebrafish embryo identifies target genes regulated by Hedgehog signaling during vertebrate development,” *Genetics*, 2006.
- [36] S. Ruijtenberg and S. van den Heuvel, “Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression,” *Cell Cycle*. 2016.
- [37] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*. 2011.
- [38] C. Kandoth *et al.*, “Mutational landscape and significance across 12 major cancer types,” *Nature*, 2013.
- [39] G. Rossi and G. Messina, “Comparative myogenesis in teleosts and mammals,” *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014.
- [40] Z. Armato, Banni, Baroni, Bodo Lumare, Bressan, Buscemi, Caramelli Ceccoli, Ciccarelli Priori, Cimini, Dal Prà, De Pol, Galdieri, Gerbino, Marotta, Narducci, Ricci, Romagnoli, Sica, Vannucchi, *Embriologia umana*. 2012.
- [41] F. Hernandez-Torres, L. Rodríguez-Outeiriño, D. Franco, and A. E. Aranega, “Pitx2 in embryonic and adult myogenesis,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017.
- [42] E. E. Kopantseva and A. V. Belyavsky, “Key regulators of skeletal myogenesis,”

Molekuliarnaia biologii. 2016.

- [43] M.-C. Sincennes, C. E. Brun, and M. A. Rudnicki, "Concise Review: Epigenetic Regulation of Myogenesis in Health and Disease," *Stem Cells Transl. Med.*, 2016.
- [44] C. G. Crist, D. Montarras, and M. Buckingham, "Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules," *Cell Stem Cell*, 2012.
- [45] D. Gurevich, A. Siegel, and P. D. Currie, "Skeletal myogenesis in the zebrafish and its implications for muscle disease modelling," *Results Probl. Cell Differ.*, 2014.
- [46] P. W. Ingham and H. R. Kim, "Hedgehog signalling and the specification of muscle cell identity in the Zebrafish embryo," *Experimental Cell Research*. 2005.
- [47] C. De Giovanni, L. Landuzzi, G. Nicoletti, P. L. Lollini, and P. Nanni, "Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma," *Future Oncology*. 2009.
- [48] A. Ferrari *et al.*, "Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1," *Cancer*, 2007.
- [49] L. Sung, J. R. Anderson, C. Arndt, R. B. Raney, W. H. Meyer, and A. S. Pappo, "Neurofibromatosis in children with rhabdomyosarcoma: A report from the intergroup rhabdomyosarcoma study IV," *J. Pediatr.*, 2004.
- [50] L. Diller, E. Sexsmith, A. Gottlieb, F. P. Li, and D. Malkin, "Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma," *J. Clin. Invest.*, 1995.
- [51] A. C. Smith *et al.*, "Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome," *Pediatr. Dev. Pathol.*, 2001.
- [52] A. L. Hartley, J. M. Birch, H. B. Marsden, M. Harris, and V. Blair, "Neurofibromatosis in children with soft tissue sarcoma," *Pediatr. Hematol. Oncol.*, 1988.
- [53] P. Yang *et al.*, "Association of childhood rhabdomyosarcoma with neurofibromatosis type i and birth defects," *Genet. Epidemiol.*, 1995.
- [54] L. Doros *et al.*, "DICER1 Mutations in embryonal rhabdomyosarcomas from children with and without familial PPB-tumor predisposition syndrome," *Pediatr. Blood Cancer*, 2012.
- [55] C. P. Kratz, S. Rapisuwon, H. Reed, H. Hasle, and P. S. Rosenberg, "Cancer in Noonan, Costello, cardiofaciocutaneous and LEOPARD syndromes," *Am. J.*

- Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.*, 2011.
- [56] A. L. Estep, W. E. Tidyman, M. A. Teitell, P. D. Cotter, and K. A. Rauen, "HRAS mutations in Costello syndrome: Detection of constitutional activating mutations in codon 12 and 13 and loss of wild-type allele in malignancy," *Am. J. Med. Genet.*, 2006.
- [57] C. Shuman and R. Weksberg, "Beckwith-Wiedemann Syndrome," in *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 2013.
- [58] P. H. B. Sorensen *et al.*, "PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: A report from the Children's Oncology Group," *J. Clin. Oncol.*, 2002.
- [59] C. Keller and D. C. Guttridge, "Mechanisms of impaired differentiation in rhabdomyosarcoma," *FEBS Journal*. 2013.
- [60] S. X. Skapek *et al.*, "Rhabdomyosarcoma," *PRIMER*, vol. 3, pp. 14–16, 2019.
- [61] A. D. Marshall and G. C. Grosveld, "Alveolar rhabdomyosarcoma - The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis," *Skeletal Muscle*. 2012.
- [62] R. J. Davis and F. G. Barr, "Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997.
- [63] D. M. Parham and F. G. Barr, "Classification of Rhabdomyosarcoma and its molecular basis," *Advances in Anatomic Pathology*. 2013.
- [64] R. Saab, S. L. Spunt, and S. X. Skapek, *Myogenesis and Rhabdomyosarcoma: The Jekyll and Hyde of Skeletal Muscle*. 2011.
- [65] P. Ragazzini *et al.*, "Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma," *Histol. Histopathol.*, 2004.
- [66] J. G. Pressey, J. R. Anderson, D. K. Crossman, J. C. Lynch, and F. G. Barr, "Hedgehog pathway activity in pediatric embryonal rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma: A report from the Children's Oncology Group," *Pediatr. Blood Cancer*, 2011.
- [67] A. Zibat *et al.*, "Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma," *Oncogene*, 2010.
- [68] T. Oue, S. Uehara, H. Yamanaka, M. Nomura, and N. Usui, "Hedgehog signal

- inhibitors suppress the invasion of human rhabdomyosarcoma cells,” *Pediatr. Surg. Int.*, 2013.
- [69] E. Charytonowicz, C. Cordon-Cardo, I. Matushansky, and M. Ziman, “Alveolar rhabdomyosarcoma: Is the cell of origin a mesenchymal stem cell?,” *Cancer Letters*. 2009.
- [70] N. J. Sebire and M. Malone, “Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas,” *Journal of Clinical Pathology*. 2003.
- [71] M. Westerfield, “The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition,” *Univ. Oregon Press. Eugene*, 2007.
- [72] D. Yaffe and O. Saxel, “Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle,” *Nature*, 1977.
- [73] A. R. P. Hinson, R. Jones, L. E. Lisa, B. C. Belyea, F. G. Barr, and C. M. Linardic, “Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: Utility and pitfalls,” *Front. Oncol.*, 2013.
- [74] A. Rossi *et al.*, “Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns,” *Nature*, 2015.
- [75] J. A. Williams *et al.*, “Chronic deletion and acute knockdown of Parkin have differential responses to acetaminophen-induced mitophagy and liver injury in mice,” *J. Biol. Chem.*, 2015.
- [76] T. Ma, B. Yang, A. Gillespie, E. J. Carlson, C. J. Epstein, and A. S. Verkman, “Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4,” *J. Clin. Invest.*, 1997.
- [77] A. Lin, C. J. Giuliano, N. M. Sayles, and J. M. Sheltzer, “CRISPR/Cas9 mutagenesis invalidates a putative cancer dependency targeted in on-going clinical trials,” *Elife*, 2017.
- [78] A. Caceres, S. Potrebic, and K. S. Kosik, “The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons,” *J. Neurosci.*, 1991.
- [79] Z. Ma *et al.*, “PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components,” *Nature*. 2019.

APPENDICE A

Homo sapiens

<i>Gene</i>		Sequenza	Regione riconosciuta	<i>T_{annealing}</i>	Amplicone
<i>ACTIN</i>	<i>Forward</i>	AGACCTGTACGCCAACACAGT	E5	60.0	140 bp
	<i>Reverse</i>	AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	E6		
<i>B2M</i>	<i>Forward</i>	GCGGGCATTCTGAAGCTGACAGCA	E1	75.0	153 bp
	<i>Reverse</i>	CTTCCATTCTCTGCTGGATGACG	E2	67.0	
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i>	CAACGACCACTTTGTCAAGC	E8	55.0	214 bp
	<i>Reverse</i>	CTGTGAGGAGGGGAGATTCA	E9	57.0	
<i>TBP</i>	<i>Forward</i>	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	E5	59.0	132 bp
	<i>Reverse</i>	CACATCACAGCTCCCCACCA	E6		
<i>MYOD1</i>	<i>Forward</i>	CTCCGACGGCATGATGGACT	E1/E2	59.0	90 bp
	<i>Reverse</i>	CTGGGCGCCTCGTTGTAGTA	E2		
<i>MYOG</i>	<i>Forward</i>	TGCCATCCAGTACATCGAGC	E1	57.0	190 bp
	<i>Reverse</i>	CAGATGATCCCCTGGGTTGG	E2/E3	59.0	
<i>GLI1</i>	<i>Forward</i>	Biorad Custom		60.0	
	<i>Reverse</i>				
<i>CYYRI</i>	<i>Forward</i>	Biorad Custom		60.0	
	<i>Reverse</i>				

Mus Musculus

<i>Gene</i>		Sequenza	Regione riconosciuta	<i>T annealing</i>	Amplicone
<i>Gapdh</i>	<i>Forward</i>	GCTCACTGGCATGGCCTTC	E6	57,0	101 bp
	<i>Reverse</i>	CCTTCTTGATGTCATCATACTTGGC	E7	67,0	
<i>Tbp</i>	<i>Forward</i>	CCCTTGACCCTTCACCAATGAC	E3	65,0	109 bp
	<i>Reverse</i>	TCACGGTAGATACAATATTTGAAGCTG	E3/E4	71,0	
<i>Myod</i>	<i>Forward</i>	GCCGCCTGAGCAAAGTGAATG	E1	61,0	191 bp
	<i>Reverse</i>	CAGCGGTCCAGGTGCGTAGAAG		67,0	
<i>Myf4</i>	<i>Forward</i>	TGTTTGAAAGCTGCCGTCTGA	E3	59,0	61 bp
	<i>Reverse</i>	CCTGCCTGTTCCCGGTATC		57,0	
<i>Cypr11</i>	<i>Forward</i>	Biorad Custom		60.0	
	<i>Reverse</i>				

Danio rerio

<i>Gene</i>		Sequenza	Regione riconosciuta	<i>T annealing</i>	Amplicone
<i>cyrl</i>	<i>Forward</i>	GATGTGCTGTCAGGAACGGCTATC	E3	69.0	134 bp
	<i>Reverse</i>	CTGAAAACCTCCGACTCTGGACCCGC		75.0	
<i>efla</i>	<i>Forward</i>	CTGTACCTGTGGGTCGTGTGGAGACTG	E6	81.0	263 bp
	<i>Reverse</i>	G TTCAGGATGATGACCTGAGCG	E7	63.0	
<i>mylz2</i>	<i>Forward</i>	CCACTCAGTGCACAGGTT	E6	51,0	80 bp
	<i>Reverse</i>	AACATTGCCAGCCACATCT	E7		
<i>myoD</i>	<i>Forward</i>	ATGACACACCAAATGCTGACG	E2/E3	57,0	166 bp
	<i>Reverse</i>	GATCCCTCATGCGGAGAACA	E3	57,0	
<i>slc25a5</i>	<i>Forward</i>	CTGCCCGATCCCAAGAACAC	E3	59.0	177 bp
	<i>Reverse</i>	CTTCCTCCAGCAGTCAATTGTGCC	E4	69.0	
<i>smyhc</i>	<i>Forward</i>	TGCCAAGACCATCAGAAATG	E6	53.0	67 bp
	<i>Reverse</i>	CACACCAAAGTGAATTCGGATA	E7	57.0	