

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA

AVANZATA XXIV CICLO

Indirizzo

SISTEMATICA MOLECOLARE



***Ruolo della proteina eif6 nella formazione
dell'occhio nell'organismo modello Xenopus laevis***

Dottoranda

Margherita Tussellino

Tutori

**Proff. Chiara Campanella
e Gaetano Odierna**

Coordinatore

Prof. Luciano Gaudio

Cotutore

Prof. Laura Fucci

INDICE

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1	9
1 <i>Caratteristiche strutturali e genetiche di eIF6</i>	9
2 <i>Localizzazione nella cellula e nelle fasi del ciclo cellulare</i>	12
3 <i>Funzioni nelle cellule di mammifero e di C. elegans</i>	13
3.1 <i>Regolazione della sintesi proteica</i>	14
3.2 <i>Un esempio della regolazione selettiva della traduzione da parte di eIF6: il signalling Wnt e la sintesi proteica di β-Catenina</i>	17
3.3 <i>Livelli di eIF6, dipendenza da fattori di crescita e rapporti con il ciclo cellulare</i>	20
3.4 <i>Regolazione post-trascrizionale mediata dai miRNA</i>	21
4 <i>eIF6 nella tumorigenesi</i>	21
CAPITOLO 2	24
1 <i>eif6 nelle prime fasi di sviluppo di Xenopus laevis</i>	24
2 <i>Espressione di eif6 durante lo sviluppo embrionale di Xenopus laevis</i>	25
3 <i>Funzione anti-apoptotica di eif6</i>	28
4 <i>Ruolo dei fattori IGF nello sviluppo dell'occhio in X. Laevis</i>	32
4.1 <i>gipc2, interagendo con igf-r, è necessario per il signalling di igf nello sviluppo dell'occhio in Xenopus</i>	35
MATERIALI E METODI	39
1 <i>Animali</i>	39
2 <i>Vettori di espressione per microiniezioni</i>	40
2.1 <i>Il vettore pCS2+</i>	40

	Indice
2.2 Il vettore <i>pCS2+MT-GFP</i>	41
3 Clonaggi	42
3.1 Strategia di clonaggio per <i>sema4c</i> e <i>sema4g</i>	42
3.2 PCR preparativa	44
3.3 Reazione di ligasi	45
3.4 Trasformazione	45
3.5 Strategia di clonaggio per <i>sema4b</i>	46
3.6 Clonaggio ribosonde	46
4 Preparazione di cellule batteriche competenti <i>DH5α</i> di <i>E. coli</i>	47
5 Terreno di coltura	47
6 Antibiotici	47
7 Microiniezioni in embrioni di <i>Xenopus laevis</i>	48
7.1 β -GAL staining	51
8 knock-down di <i>eif6</i>	51
9 Trascrizione in vitro	52
10 Animal caps	52
11 Western blotting	53
12 Immunoprecipitazione	55
13 Anticorpi	57
14 Estrazione RNA per RT-PCR e Real-Time PCR	57
14.1 Real-Time PCR	58
15 Fissazione embrioni	60
16 Immunofluorescenza su sezioni	61
17 Ibridazine “in toto”	62
18 Ricerca in banca dati	65
RISULTATI	66
<i>PREMESSE</i>	66
1 Iperespressione di <i>eif6</i> e il fenotipo alterato dell’occhio	66
2 Il ruolo di <i>eif6</i> nella formazione dell’occhio è indipendente dalla sua funzione anti-apoptotica	75

	Indice
<i>3 Il fenotipo oculare non dipende dal sito di fosforilazione Ser 235</i>	78
<i>4 eif6 co-immunoprecipita con igf1r e negli iperespressi di eif6 è attivato il pathway di pi3k</i>	81
<i>5 gipc2 interagisce con eif6 e recupera il fenotipo dell'occhio</i>	85
<i>6 Effetti dell'iperpressione di eif6 sullo sviluppo del rene</i>	90
<i>7 L'iperpressione di eif6 e la riduzione di gipc2 agiscono sui marcatori del pronefro</i>	95
<i>8 gipc2 interagisce con alcune semaforine (4c e 4g) nella formazione dell'occhio</i>	99
<i>9 eif6 potrebbe regolare gipc2 attraverso i miRNA?</i>	102
DISCUSSIONE	103
<i>Il controllo della traduzione di messaggeri da parte di eif6 nell'organogenesi di Xenopus</i>	103
<i>I livelli di espressione di eif6 nello sviluppo embrionale</i>	105
<i>I segnali provenienti da igf e l'interazione con gipc2 nell'organogenesi dell'occhio e del pronefro</i>	106
<i>gipc2 interagisce con altre molecole transmembrana</i>	108
BIBLIOGRAFIA	110

INTRODUZIONE

Varie sono le motivazioni per lo studio della proteina eIF6 (*eukaryotic initiation factor 6*) che svolge complesse ed articolate funzioni cellulari. A questo riguardo ricordo per prima la funzione per cui essa è essenziale alla vita cellulare, quella di partecipare alla biogenesi della subunità ribosomiale 60S (Sanvito et al., 1999; Ceci et al., 2003), funzione conservata dai lieviti all'uomo. In particolare è stato visto che topi transgenici privi di eIF6 muoiono in utero. In topi eIF6^{+/-} è stato poi dimostrato che anche quantità dimezzate di eIF6 sono sufficienti per la biogenesi ribosomiale (Gandin et al., 2008). Il ruolo attualmente più noto di eIF6 è quello di fattore di inizio e regolatore della sintesi proteica. Ceci et al. (2003) hanno infatti dimostrato che eIF6 è legata alla 60S anche nel comparto citoplasmatico, ed impedisce il legame di questa con le subunità 40S, inibendo così la formazione del monosoma 80S e quindi la traduzione. In particolare si è osservata l'implicazione di altre molecole quali la proteina chinasi PKC e il suo recettore RACK1, che si trova sulla subunità ribosomiale 40S. La PKC fosforila eIF6 in Serina 235, causando il suo distacco dalla 60S e permettendo così la traduzione. Nei topi è stato visto che è questa la funzione ad essere alterata nei transgenici eIF6^{+/-} (Gandin et al., 2008). Inoltre, l'attività di regolazione della traduzione di eIF6 sembra essere mirata ad alcune proteine probabilmente in modo diretto, un esempio è la *down-regolazione* di β -catenina (Ji et al, 2008), oppure mediante silenziamento genico post-trascrizionale mediato dai microRNA, in quanto essa è associata al complesso RISC. Quest'ultimo contiene infatti sia la subunità ribosomiale 60S che eIF6, ed inibisce selettivamente la traduzione dei messaggeri Lin14 e Lin 28 in *C.elegans*, senza effetti generali sulla sintesi proteica, bloccando l'attacco o il riciclo dei ribosomi sul

messaggero *target* specifico (Chendrimada et al., 2007). In questo caso eIF6 agirebbe come sequestratore della subunità 60S, favorendo così l'azione dei miRNA sull'mRNA bersaglio, dato che il suo legame alla subunità 60S rende più libero e quindi disponibile il messaggero all'interazione con i miRNA. Nello sviluppo embrionale di *Xenopus*, eif6 agisce come fattore anti-apoptotico a monte di bcl2, la sua azione si esplica mediante la modulazione della traduzione di un fattore "X", di raccordo tra queste due proteine (De Marco et al, 2010a).

Alla luce dei dati sul ruolo di eIF6 nella regolazione della traduzione (Ceci et al., 2003) è stato investigato se, nelle cellule normali, condizioni come la proliferazione cellulare o la transizione in stadi specifici del differenziamento cellulare richiedano un'espressione maggiore di eIF6, in rapporto ad un maggiore necessità di regolazione di sintesi proteica. In *Xenopus*, le funzioni di eif6 sono state indagate attraverso esperimenti di iper-espressione che mostrano che l'aumento sperimentale di tale proteina non è accompagnato da aumento di proliferazione cellulare (De Marco et al., 2010). Negli embrioni w.t. (*wild type*) è stato osservato che eif6 co-localizza con i territori in cui viene rilevata la BrdU, marcatore di proliferazione, indicando che in tal caso vi è una buona correlazione tra proliferazione e maggiore presenza di eif6. Nel mammifero, cellule eIF6^{+/-} sotto determinate condizioni, quali la privazione di siero e successivamente l'aggiunta di siero, rallentano l'ingresso nella fase S del ciclo cellulare (Gandin et al., 2008). Gli esperimenti, condotti nel laboratorio dove ho svolto la mia tesi di dottorato studiano il ruolo di eif6 nello sviluppo embrionale e sono attualmente rivolti alla comprensione del fenotipo anomalo dell'occhio, ottenuto in seguito all'iperpressione di eif6. In realtà negli iperespressi gli embrioni presentano tre tipi di alterazioni dello sviluppo la prima è evidente a st.28 quando questi si presentano

ripiegati a ferro di cavallo ed il lato iniettato è sempre quello più esteso; il secondo fenotipo è dato da un'alterazione dello sviluppo dell'occhio che si nota maggiormente quando l'embrione raggiunge st. 35. L'ultimo fenotipo variante è invece relativo alla formazione di un edema nella porzione antero-ventrale dell'embrione che raggiunge il suo volume maggiore intorno a st. 38. E' da ricordare che *eif6* è particolarmente abbondante in tutto il nevrasso, nell'occhio, nella vescicola otica e nel pronefro a vari stadi di sviluppo durante il normale processo di embriogenesi di *Xenopus* (Vaccaro et al., 2006 a,b). La base della sperimentazione è la microiniezione di mRNA o di oligonucleotidi morfolino così da indurre e studiare i fenotipi ottenuti in seguito a iperespressione e a down-regolazione di proteine coinvolte nella formazione dell'occhio e del pronefro in *Xenopus laevis*. Le microiniezioni sono state effettuate su embrioni allo stadio due cellule, in quanto nell'embrione di *Xenopus* è già determinata la simmetria bilaterale, per cui l'iniezione effettuata in uno dei due blastomeri determina una distribuzione della molecola iniettata solo in metà dell'embrione, in questo modo il lato non iniettato diventa un controllo interno all'esperimento. Viene anche iniettato il messaggero di GFP, ottenuto per retrotrascrizione *in vitro* del vettore pCS2+MT-GFP, che esprime la GFP, proteina dotata di fluorescenza stabile e visibile nei successivi stadi di sviluppo, in modo da identificare il lato e poi i tessuti dove l'mRNA iniettato si distribuisce. E' stato dimostrato che il fenotipo ripiegato è in rapporto con la percentuale di apoptosi a cui sono soggette le cellule del lato sottoposto a microiniezione rispetto a quelle del lato controllo, mostrando che *eif6* è un potente fattore anti-apoptotico nello sviluppo embrionale, anche in accordo con i dati di Sancito et al., 2000 circa la maggiore presenza di *eif6* in cellule tumorali che sfuggono all'apoptosi. I dati in *Xenopus* hanno mostrato mediante iniezione di una forma mutata

in Serina 235 (Ser 235) (Vaccaro et al., 2006 a,b) in uno dei due blastomeri dell'embrione a due cellule che la Serina 235, la stessa da cui dipende la funzione anti-associativa di eIF6 in mammifero, è responsabile del fenotipo ripiegato mostrando che eif6 agisce come fattore anti-apoptotico tramite regolazione della traduzione (De Marco et al. 2010). Il secondo fenotipo che consiste in un ritardo di crescita dell'occhio, è stato il principale oggetto della mia tesi. Ho allora intrapreso uno studio molto articolato, mirato alla comprensione del fenotipo oculare: 1) mi sono avvalsa di marcatori del differenziamento dell'occhio *rax*, *pax6*, *otx2* (*markers* del cervello anteriore e dell'occhio), *six3* (dell'occhio e della parte ventrale del cervello anteriore), *sox2* (un *marker* generale dell'encefalo), *fgf8*, *en2* (*markers* del limite anteriore/medio del cervello) e di *egr* (che marca cervello posteriore e creste neurali). Inoltre, di marcatori della retinogenesi (*rbpms*, *marker* delle c. gangliari; *nrl* che marca i fotorecettori e *otx2* che marca i neuroni bipolari) al fine di comprendere in dettaglio nell'occhio ritardato l'andamento dell'espressione genica regolatrice del differenziamento oculare ed in particolare degli strati di cui è composta la porzione nervosa. 2) Ho dato allora inizio ad una nuova indagine che metterebbe in relazione eif6 con la stimolazione di fattori di crescita igf-like. Infatti la formazione della parte anteriore del tubo neurale ed in particolare dell'occhio è in rapporto con tale *pathway* (Richard-Parpaillon et al, 2002; Pera et al., 2001; Wu et al, 2006). 3) Ho poi investigato se una proteina di recente determinazione, *kermit 2/gipc2*, che è essenziale per il mantenimento della crescita dell'occhio ed è nel *pathway* di IGF (Wu et al, 2006) interagisse con eif6 e accertata l'interazione ho verificato se eif6 avesse influenza sia sul messaggero di *gipc2* che sulla proteina, principalmente attraverso esperimenti di *Real-Time*. 4) Ho verificato se si ottenesse un recupero del fenotipo dell'occhio attraverso la co-iniezione di eif6 e p110*,

subunità costitutivamente attiva di pi3k, ottenendo un parziale recupero del fenotipo variante, suggerendo che il fenotipo sia almeno parzialmente dovuto all'inibizione del pathway pi3k/akt. 5) Nello studiare gli iperespressi eif6 ho notato la presenza del fenotipo, riguardante la formazione dell'edema posto nella zona antero-ventrale degli embrioni. Ho quindi indagato il ruolo di eif6 in questo nuovo fenotipo utilizzando marcatori del pronefro precoce (*lhx1*) e differenziato (nefrina marcatore del glomo, *slc5a9* marcatore del tubulo prossimale, *clcnkb* o *cdh16*, entrambi marcatori di tubuli intermedi, distali e del dotto). 6) Ho verificato l'interazione di eif6 e *gipc2* con *igfr* e se questa avesse a che vedere con la formazione dell'occhio e del rene. 7) Ho ipotizzato un possibile meccanismo, attraverso il quale eif6 possa regolare i livelli di *gipc2*. eif6 potrebbe agire attraverso il meccanismo di silenziamento genico mediato da microRNA (RISC) di cui è una delle componenti, ritengo possibile ciò perché numerosi siti *target* per miRNA sono stati riscontrati sul messaggero di *gipc2*, attraverso la sottomissione della sua 3'UTR in due diverse banche dati. 8) Ho studiato la possibile interazione con molecole mediatrici dell'azione di *gipc2* sull'occhio e sul rene, le semaforine 4c e 4g che sono capaci di legare il dominio PDZ (presente anche in *gipc2*) e in particolare si esprimono sia nell'occhio che nel pronefro. Il lavoro De Marco et al., (2011) citato in questa tesi di dottorato (N. De Marco, M. Tussellino, A. Vitale, C. Campanella, (2011). *Eukaryotic initiation factor 6 (eif6) overexpression affects eye development in Xenopus laevis*) pubblicato su *Differentiation* raccoglie una parte dei dati del mio lavoro di tesi.

CAPITOLO 1

1 Caratteristiche strutturali e genetiche di eIF6

p27^{BBP}/eif6 è una proteina di 245 a.a. e dal peso molecolare di 27 KDa. (Biffo et al, 1997); è evolutivamente conservata, presente dal lievito all'uomo, con un alto grado di identità lungo tutta la sequenza, infatti, la proteina umana mostra il 77% di identità con quella di lievito e l'80% con quella di *D. melanogaster*. Questa proteina deve il suo nome al fatto di essere stata isolata e studiata da due gruppi di ricerca contemporaneamente (Biffo et al., 1997; Si et al., 1997). Questa parte del suo nome “p27^{BBP}” è dovuto alla capacità di interagire con il dominio citoplasmatico della subunità integrinica $\beta 4$ (da qui BBP, beta 4 binding protein), e, insieme alla subunità $\alpha 6$, forma un recettore eterodimerico per la lamina basale dei tessuti epiteliali. È stata isolata attraverso esperimenti in un sistema di doppio ibrido di lievito, dove è stato effettuato uno *screening* di una libreria di cDNA epiteliale con un vettore contenente la coda citoplasmatica di $\beta 4$ (Biffo et al, 1997). La stessa proteina, chiamata più direttamente eIF6 (*eukariotic initiation factor 6*), invece, è stata purificata da un lisato di reticolociti di coniglio, ed è stata chiamata “fattore di inizio della traduzione”, in quanto è in grado di inibire l'associazione tra le subunità ribosomali 40S e 60S (Si et al., 1997). Il clonaggio e il sequenziamento di eIF6 ha indicato, inequivocabilmente, che eIF6 e p27^{BBP} sono la stessa molecola, pertanto la proteina è stata rinominata p27^{BBP}/eIF6, dal gruppo di Biffo. La struttura tridimensionale di eIF6 è unica ed è relativamente rigida; è conosciuta come “*pentain*” (Fig. I), poiché simile ad una stella, con cinque subdomini, quasi identici, α/β che circondano una cavità riempita da 16 molecole d'acqua ben ordinate che hanno un limitato grado di movimento (Groft et al.,

2000). Inoltre, la coda C-terminale, grazie alla sua flessibilità, è stata proposta come una regione candidata alla regolazione della proteina.

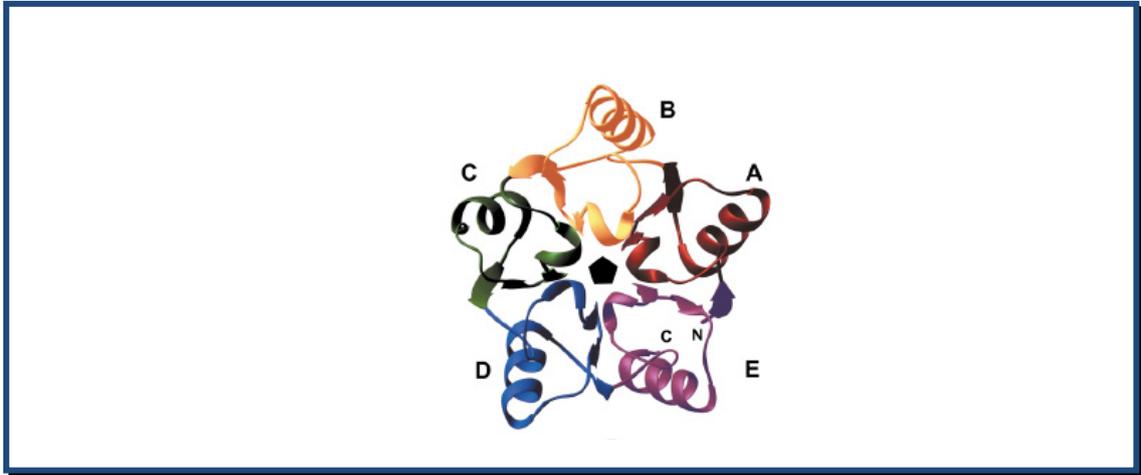


Fig. I. Struttura “*pentein*” di eIF6. Il pentagono nero denota l’asse di pseudo-simmetria dei cinque ripiegamenti, ciascuno è un sub dominio con struttura α/β sono rappresentati con colori diversi.

Il gene codificante eIF6 è stato isolato da linfociti umani attraverso un’analisi di *Southern blot* ed è stato chiamato ITGB4BP. Questo gene ha una lunghezza di 10 kb e comprende sette esoni e sei introni (Donadini *et al.*, 2001). Gli esoni 5, 6 e 7 codificano per il dominio della proteina responsabile del legame all’integrina $\beta 4$ (Biffo *et al.*, 1997). Il terzo introne, quello più lungo, circa 3 kb, contiene cinque sequenze ripetute e conservate Alu-S. L’introne 6 presenta due putative sequenze consenso H/ACA per snoRNA. Queste, nei vertebrati, sono normalmente generate dal processamento degli introni delle proteine nucleolari e sono coinvolte nella pseudouridilazione dell’RNA ribosomale (Weinstein and Steitz, 1999). Tali dati rafforzano il concetto che la regolazione dell’espressione genica di ITGB4BP è coerente con il ruolo di questa proteina nella biogenesi ribosomale, di cui parlerò in seguito. L’organizzazione del promotore di ITGB4BP è tipica di un gene *housekeeping*, poiché manca della sequenza consenso TATA-box per la RNA polimerasi II e presenta molte isole CpG. Inoltre, il

promotore contiene siti di legame consenso per attivatori trascrizionali che regolano la trascrizione di geni richiesti per la crescita e la sopravvivenza cellulare. È stato dimostrato che il gene ITGB4BP, *in vitro*, ha caratteristiche di gene *housekeeping*, mentre, *in vivo*, è finemente regolato (Donadini *et al.*, 2001).

In vitro, linee cellulari trasformate esprimono sempre eIF6; però, i livelli basali sia della proteina che dell'mRNA possono essere regolati in maniera diversa in seguito a differenti stimoli. Esperimenti effettuati su due ceppi cellulari, quali FG2 (*Human Pancreatic Carcinoma Cells*) e HaCaT (*SV40 Immortalized Human Keratinocytes*), hanno reso evidente che nelle diverse linee cellulari l'espressione di eIF6 può essere controllata in modo diverso o, in seguito a trattamento prolungato con droghe, come l'actinomicina D, che blocca la trascrizione e la cicloesimide, che blocca la traduzione, oppure, dopo essere state sottoposte a *heat shock*, che, in genere, porta ad una rapida *down*-regolazione del tasso trascrizionale delle proteine ribosomali, associato con una più breve emi-vita dei trascritti, come è già stato dimostrato in lievito (Li *et al.*, 1999). L'actinomicina D porta ad un blocco della trascrizione e quindi ad una diminuzione dei livelli dell'mRNA in entrambe le linee cellulari, mentre i livelli proteici restano invariati. La cicloesimide, invece, ha un effetto diverso sulle due linee cellulari: porta ad una significativa diminuzione dei livelli proteici nelle cellule HaCaT, mentre i livelli dell'mRNA restano invariati rispetto al controllo. Nelle cellule FG2 sia i livelli della proteina che dell'mRNA non cambiano. In seguito a shock termico, il messaggero di eIF6 è altamente *down*-regolato nelle FG2 e a livello minore nelle HaCaT. Invece, nessuna *down*-regolazione è osservata in un'altra linea cellulare, quale HT29. Sorprendentemente, i livelli della proteina e la sua distribuzione cellulare restano invariati in tutte queste condizioni. Queste osservazioni, unitamente ai dati già posseduti

sul lievito, indicano che il meccanismo di *down*-regolazione della trascrizione ribosomiale può essere evolutivamente conservato. Invece, i livelli della proteina eIF6 sono relativamente stabili in tutte le condizioni (Donadini et al., 2001). *In vivo*, analisi di *Northern Blot* e *Western Blot* su cellule di tessuti umani differenti, hanno evidenziato alti livelli di mRNA in cellule di carcinoma del colon, livelli più bassi in cellule del colon normali e dell'ileo e livelli ancora più bassi nel rene e nel muscolo. Nelle stesse cellule il livello di espressione della proteina è corrispondente a quello del messaggero, indicando che, *in vivo*, alti livelli di mRNA sono relazionabili sempre ad alti livelli di proteina. Inoltre, i livelli dell'mRNA possono essere rapidamente indotti in seguito ad eventi esterni, come la rottura della barriera epiteliale (Wood et al., 1999) o eventi differenziativi, come l'attivazione delle *mast cell* (Cho et al., 1998). Queste stesse analisi sono state effettuate anche su un altro organismo modello come il topo, mostrando gli stessi risultati. Questi dati indicano che, *in vivo*, l'espressione di eIF6 oltre ad avere una espressione ubiquitaria, legata alla sua funzione più importante, quale regolatore della traduzione, di cui parlerò in seguito, presenta anche una espressione cellula-specifica, altamente regolata; ciò fa ipotizzare che il gene disponga di più promotori al fine di poter modulare finemente la propria espressione nei vari tessuti (Donadini et al., 2001).

2 Localizzazione nella cellula e nelle fasi del ciclo cellulare

Nel nucleo, esperimenti di immunofluorescenza, immunocitochimica e microscopia elettronica, hanno mostrato la localizzazione di eIF6 all'interno del nucleolo, notoriamente sede di biogenesi delle subunità ribosomiali. Una frazione della proteina

deve la sua insolubilità all'associazione con la matrice nucleare, in particolare, con i cosiddetti filamenti polimorfi spessi (Sanvito et al., 1999).

Durante le diverse fasi del ciclo cellulare il *pattern* topografico di eIF6 cambia drasticamente; infatti, la localizzazione nucleolare di eIF6 è osservabile, in modo particolare, durante l'interfase, in tutti gli organismi analizzati, da *C. elegans* all'uomo, ed in tutte le linee cellulari, da quelle normali a quelle neoplastiche, ma si suppone che la proteina subisca un processo di redistribuzione durante la mitosi, quando i nucleoli scompaiono. In profase, eIF6 si disperde inizialmente e in seguito si osserva una sua associazione con la periferia dei cromosomi condensati; in metafase, si concentra nella massa centrale della cromatina, formata dai cromosomi condensati sulla piastra metafasica, mantenendo questo stato fino all'anafase ed infine, con l'entrata in telofase e la ricomparsa dell'organizzazione nucleolare, eIF6 si va a riassociare ai nucleoli (Sanvito et al., 1999). La sua localizzazione nucleolare è quindi evolutivamente molto conservata e la vede implicata nella biogenesi ribosomiale e nella regolazione della sintesi proteica (Sanvito et al., 1999; Wood et al., 1999). Nel citoplasma eIF6 è in equilibrio tra un pool solubile ed uno insolubile. In tale sede l'insolubilità di eIF6 è dovuta ad una stretta associazione con i filamenti intermedi del citoscheletro, il che fa ipotizzare, data la sua interazione con il citodominio della subunità integrinica $\beta 4$ (Biffo et al., 1997), che questa proteina funga da ponte tra il citoscheletro, l'integrina e la matrice extracellulare. Come dirò in seguito eif6 è associato al citoscheletro negli oociti di *Xenopus laevis* (Carotenuto et al., 2005). Il pool solubile della proteina è dovuto al suo legame con la subunità ribosomiale 60S matura (Si et al., 1997).

3 Funzioni nelle cellule di mammifero e di *C. elegans*

Come già descritto, questa proteina è stata isolata grazie alla sua interazione con il dominio citoplasmatico della subunità integrinica $\beta 4$ (Biffo et al., 1997). Tale dominio è quello necessario per svolgere le sue funzioni, quali la trasduzione del segnale e la formazione degli emidesmosomi. Queste osservazioni hanno fatto ipotizzare, inizialmente, che eIF6 fungesse da ponte tra citoscheletro-integrina-matrice extracellulare. La localizzazione nucleare di eIF6, dove $\beta 4$ non è presente, l'espressione altamente conservata di questa proteina a partire dal lievito, dove non è stato descritto un omologo di $\beta 4$ e infine, dati che mostrano che eIF6 è espressa anche in tessuti dove $\beta 4$ non è stata ritrovata, indicano che eIF6 abbia una funzione $\beta 4$ -indipendente (Biffo et al., 1997). Infatti, successivamente, sono state dimostrate diverse funzioni che riguardano questa proteina, svolte sia all'interno del nucleo, dove è in parte localizzata, sia nel citoplasma, dove è coinvolta in processi di regolazione post-trascrizionale e traduzionale. Di seguito, cercherò di esporre, brevemente, queste molteplici funzioni.

3.1 Regolazione della sintesi proteica

Analizzando la localizzazione di eIF6 si vede che è associata alla subunità 60S sia nel nucleolo, dove è coinvolta nella biogenesi di tale subunità, che nel citoplasma, dove è implicata nella regolazione dell'inizio della traduzione, mentre non è presente sui polisomi (Sanvito et al., 2002). In particolare, eIF6 è stata inizialmente identificata sulla base della sua attività anti-associativa nelle germe di frumento (Russell & Spremulli, 1979) e nel fegato di vitello (Valenzuela et al, 1982), dove il suo legame alla subunità 60S previene l'associazione con la subunità 40S. Questi primi dati hanno indicato che eIF6 potrebbe essere importante nel mantenere il ribosoma dissociato anche dopo la sua biogenesi o durante il suo riciclo dall'mRNA tradotto, piuttosto che stimolare la sua

dissociazione. Recentemente, è stato mappato il sito di legame di eIF6 alla subunità 60S, presente nell'interfaccia 40S-60S, questo è coerente con l'interpretazione dell'attività anti-associativa di eIF6 (Benelli et al., 2009). Inoltre, studi iniziali avevano messo in evidenza che basse concentrazioni di eIF6 avevano un leggero effetto stimolante sulla traduzione, mentre una più alta concentrazione la inibivano (Russell e Spremulli, 1979). Tutto ciò indica che l'attività anti-associativa di eIF6 deve essere regolata. Tali dati sottolineano l'importanza del rilascio di questa molecola dalla subunità 60S per dare inizio alla sintesi proteica. Le subunità ribosomiali eucariotiche 40S e 60S sono assemblate nei nucleoli e separatamente vengono trasportate nel citoplasma (Aitchison et Rout, 2000), dove si uniscono formando il ribosoma 80S e dando inizio alla traduzione. Successivamente (Ceci et al., 2003) è stato mostrato che il legame di eIF6 con le subunità 60S, impedisce l'assemblaggio del monosoma 80S, e che quindi eIF6 deve essere rilasciata affinché possa formarsi il ribosoma completo e possa aver inizio la traduzione. Analizzando il legame che si viene a creare tra la eIF6 e la subunità 60S, si è scoperto che sono implicate anche altre molecole, in particolare la proteina chinasi C (PKC) e il suo recettore RACK1, *receptors for activated protein kinase C-1*. eIF6 può legare RACK1, e questo legame si ritrova solo nel citoplasma. La PKC attivata e legata a RACK1, fosforila in serina eIF6 causando il suo distacco dalla subunità 60S e permettendo così l'inizio della traduzione (Ceci et al., 2003). Essendo RACK1 localizzato sulle subunità 40S, sui ribosomi 80S e sui polisomi e la PKC presente solo sui polisomi (Ceci et al., 2003), si è giunti alla conclusione che RACK1 e PKC possono essere presenti sui ribosomi in traduzione, laddove eIF6 è assente, probabilmente perché precedentemente rilasciata. In presenza di una bassa attività della PKC, si è visto che la fosforilazione di eIF6 è bassa, ma se l'attività di PKC aumenta, si

osserva, conseguentemente, anche un aumento della fosforilazione di eIF6 e un incremento della formazione di ribosomi 80S. Tutto ciò significa che PKC e RACK1 unitamente a eIF6 sono responsabili della maturazione ribosomale e necessari affinché si abbia la traduzione (Fig. II). Sono stati analizzati diversi mutanti per delezione di eIF6 i quali hanno permesso di individuare nella Serina 235 il sito di fosforilazione responsabile di questa funzione. Questa proteina è necessaria, quindi, per un efficiente inizio della traduzione in vivo. Questo modello manca di una validazione genetica, sebbene è supportato dal fatto che la fosforilazione di eIF6 indotta da PKC può anche essere sostenuta durante lo sviluppo di *Xenopus* (Carotenuto et al., 2005) e RACK1 può regolare la traduzione attraverso il reclutamento di PKC β II (Grosso et al., 2008).

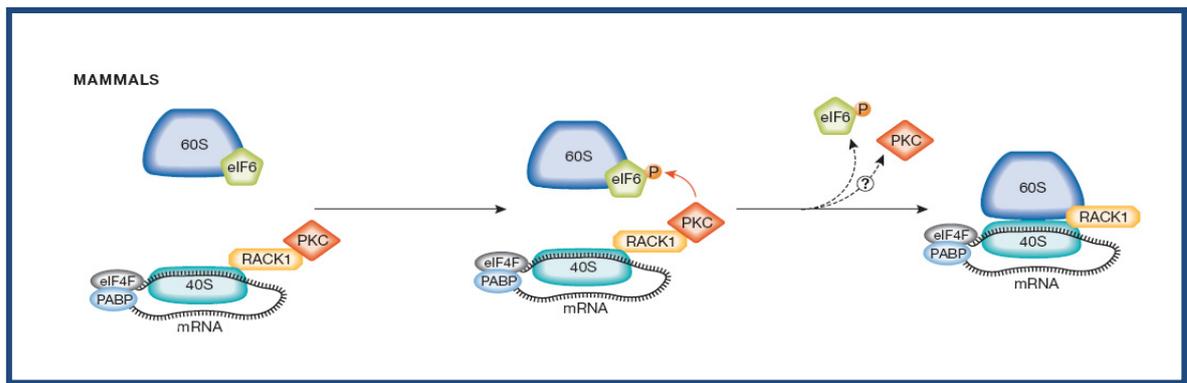


Fig. II. Il rilascio di eIF6 regola l'interazione tra le due subunità ribosomali. Nei mammiferi questo evento è modulato dal complesso RACK1/PKC. PKC è reclutato dalla subunità 40S ad opera di RACK1 e fosforila eIF6 su Ser 235, portando al suo rilascio dalla 60S.

Un altro modello, proposto da Senger et al. (2001), si riferisce al lievito, dove è stato descritto un meccanismo alterativo per il rilascio di eIF6 dalla subunità ribosomale. Un cambiamento allosterico nella subunità 60S, in seguito al legame della proteina Efl1, che ha una similarità con EF2, porterebbe al rilascio di eIF6. Tale meccanismo (Fig. III) di rilascio sembrerebbe regolare la maturazione della subunità 60S piuttosto che la

traduzione degli mRNA. Aspetto particolarmente notevole di questo meccanismo è che Efl1 è largamente associato con i ribosomi e ha attività GTPasica e particolari mutazioni di eIF6 possono sopprimere il grave difetto fenotipico di crescita dovuti alla delezione di Efl1. In seguito a ciò, è stato ipotizzato che cambiamenti allosterici della subunità 60S, mediati da Efl1, possono essere importanti durante il processo di inizio traduzione e non solo di maturazione. Anche in questo caso sono necessarie ulteriori conferme soprattutto di tipo genetico.

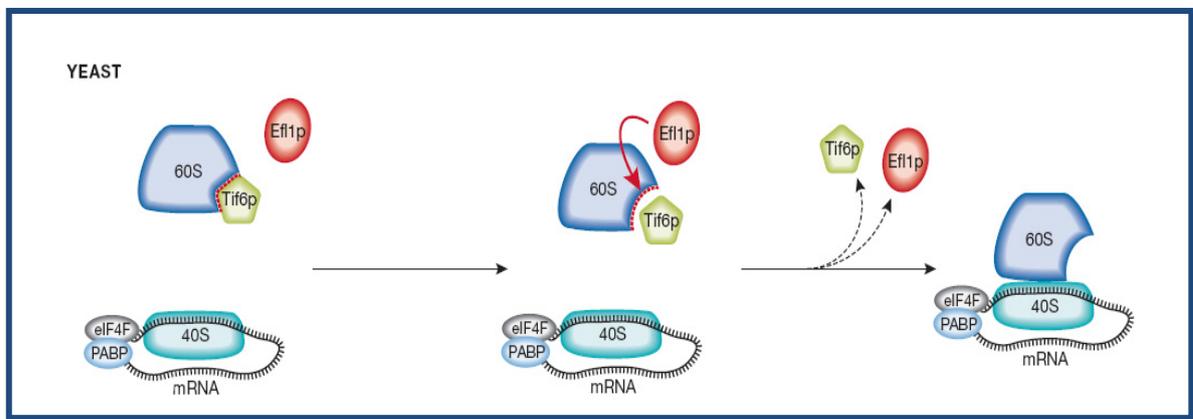


Fig. III. Il rilascio di eIF6 regola l'interazione tra le due subunità ribosomali. Nel lievito un riarrangiamento strutturale della subunità maggiore è mediato dalla proteina Efl1, ciò facilita il rilascio di Tif6p dalla subunità 60S e successivamente è riciclato nel nucleolo.

3.2 Un esempio della regolazione selettiva della traduzione da parte di

eIF6: il signalling Wnt e la sintesi proteica di β -Catenina

eIF6 è fosforilato attraverso RACK1/PKC β II ed è così rilasciato dalla subunità 60S permettendo la formazione del ribosoma 80S e quindi la traduzione (Ceci et al., 2003). Ji et al. (2007) mediante esperimenti di espressione ectopica della proteina di *Drosophila melanogaster*, DeIF6, utilizzando il sistema GAL4-UAS, hanno evidenziato il suo coinvolgimento nella regolazione del pathway Wnt/Wg. La β -catenina è importante

nell'adesione cellulare ed è una molecola chiave nel *signalling* Wnt. In assenza di Wnt, la β -catenina è costitutivamente fosforilata da CK1 e GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) al N-terminale (Rubinfeld *et al.*,1996; Orford *et al.*,1997). Questo si verifica mentre la β -catenina è associata con APC, axina, proteina fosfatasi 2A e β -TrCP. La β -catenina fosforilata è riconosciuta dall'ubiquitina ligasi β -TrCP che guida la sua ubiquitinazione e conseguente degradazione da parte del proteasoma (Hart *et al.*,1999; Kitagawa *et al.*,1999; Winston *et al.*,1999). In presenza del ligando Wnt, che si lega a *frizzled* e altri co-recettori, l'attività di GSK3 β è inibita, ciò permette l'accumulo della forma non fosforilata della β -catenina che trasloca dal citoplasma al nucleo. Essa attiva la trascrizione genica mediante la famiglia dei fattori di trascrizione T-cell (TCF) (Brantjes *et al.*,2002). L'espressione ectopica di DeIF6 nei dischi dell'ala genera un fenotipo *Wingless* identico a quello osservato per geni che interagiscono con Armandillo (l'omologo in *Drosophila* della β -catenina). In particolare l'iperespressione di DeIF6 inibisce il *pathway* Wnt/Wg. Sono stati poi condotti, in lievito, saggi di attività β -gal in cellule contenenti sia il dominio C terminale della β -catenina che il fattore eIF6. Queste cellule hanno mostrato un'attività β -gal marcatamente più alta rispetto ai controlli negativi (cellule contenenti solo il CTD della β -catenina). Questo ha suggerito che eIF6 interagisce con il dominio C terminale della β -catenina. In accordo con un ruolo per eIF6 come inibitore del *signalling* Wnt si è osservato che l'iperespressione di eIF6 causa un decremento dose-dipendente dell'attività del gene reporter che si trova sotto il controllo del complesso β -catenina/ TCF *TOPFLASH*. La co-trasfezione con la β -catenina recupera tale attività, dimostrando che l'effetto inibitorio di eIF6 si esplica a livello di tale proteina. Inoltre è stato evidenziato che, come previsto, è il C terminale di eIF6 ad essere richiesto per inibire la *trans*-attivazione della β -catenina. Questi

esperimenti potrebbero dimostrare che l'effetto inibitorio di eIF6 sul *signalling* Wnt sia dovuto all'inibizione diretta sulla trascrizione mediata dal complesso β -catenina/TCF, impedendo il legame tra questi due fattori. Alternativamente, eIF6 potrebbe interferire con la traduzione della β -catenina o intervenire nella sua degradazione. Al fine di comprendere meglio l'effetto di eIF6, gli autori hanno dapprima studiato la distribuzione di β -catenina ed eIF6 e poi se quest'ultima regoli i livelli proteici di β -catenina. Per questo studio sono state usate cellule SW480, una linea cellulare con la β -catenina endogena stabilizzata, utilizzando eIF6 marcato con un fluoroforo (YFP-eIF6). Le cellule trasfettate con YFP-eIF6 hanno mostrato un abbassamento nei livelli della proteina β -catenina rispetto ai controlli. Quindi eIF6 regola selettivamente i livelli proteici della β -catenina. È stato visto che l'inibitore specifico del proteasoma, MG132, non blocca il decremento della β -catenina nelle cellule SW480 iperesprimenti YFP-eIF6. Ciò ha dimostrato che eIF6 non interviene a livello della degradazione. Inoltre, con esperimenti di *pulse and chase* in cellule CHO (cellule di ovario di criceto cinese) è stato visto che le cellule trasfettate con YFP-eIF6 presentano un minor tasso di incorporazione di amminoacidi radio-marcanti nella β -catenina rispetto al controllo. Questi dati hanno permesso di concludere che eIF6 influenza selettivamente la sintesi proteica della β -catenina. E' stato visto da altri AA che eIF6 regola selettivamente la traduzione di alcuni mRNA. Infatti, Chendrimada *et al.* (2007) hanno osservato che eIF6 è associato con il RISC (*RNA-induced silencing complex*) e reprime specificamente la traduzione di alcuni mRNA in *Caenorhabditis elegans* (LIN-14 e LIN-28) senza un effetto sulla traduzione generale. Il RISC, che contiene la sub unità 60S ed eIF6, inibisce la traduzione bloccando il riciclo del ribosoma. In effetti, diverse sequenze *target* miRNA sono presenti nella 3'UTR della β -catenina sia umana che

murina. Il fatto che eIF6 leghi specificamente il C-terminale della β -catenina, cioè vicino alla 3'UTR, potrebbe far pensare che essa blocchi il riciclo dei ribosomi sul messaggero della β -catenina in traduzione.

3.3 Livelli di eIF6, dipendenza da fattori di crescita e rapporti con il ciclo cellulare

Un ruolo positivo di eIF6 nella traduzione globale è sostenuto anche da risultati ottenuti in topi *knockout*. Topi nulli eIF6 hanno una letalità embrionale prima dell'impianto; topi eterozigoti, che hanno il 50% della proteina eIF6, sono vitali e indistinguibili dai *wild-type* fino al 30° giorno dopo la nascita; mentre, al terzo mese hanno un peso corporeo minore rispetto ai selvatici. La riduzione di eIF6 avviene solo nel *pool* citoplasmatico, mentre i livelli nucleari sono normali. La riduzione del peso corporeo dei topi eterozigoti è dovuto alla riduzione del numero di cellule di specifici organi, quali fegato e tessuto adiposo, indicando difetti nella capacità proliferativa di questi tipi cellulari. Epatociti, adipociti e fibroblasti da cellule con eIF6 eterozigote mostrano una ritardata progressione dalla fase G1 a S, ma sono normali nella dimensione e hanno una normale senescenza e apoptosi. Quindi, sembra che l'aploinsufficienza di eIF6 potrebbe regolare la traduzione di specifici mRNA coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, ciò è inaspettato considerando che la regolazione della disponibilità della subunità 60S potrebbe non interferire con la selezione di mRNA. Il fegato di topi eIF6^{+/-} presentano un accumulo del complesso 80S inattivo, accompagnato da una diminuzione dei polisomi. Gli epatociti derivanti da tale fegato hanno un normale livello basale di traduzione, ma non possono *up*-regolare tale processo in risposta all'insulina. L'indebolita traduzione in risposta a stimolazione insulinica è stata osservata anche in

fibroblasti primari e adipociti, dimostrando che la delezione di eIF6 altera la traduzione in differenti tipi cellulari. Questi dati mostrano che eIF6 può essere un fattore limitante per la traduzione *in vivo* e può diventare un fattore di inizio della traduzione stimolato a valle dell'insulina e dei fattori di crescita. Quindi, è stato proposto che eIF6 è il primo "eIF", associato con la subunità 60S, a regolare la traduzione in risposta a segnali extracellulari. (Gandin et al., 2008).

3.4 Regolazione post-trascrizionale mediata dai miRNA

Recentemente è stato ipotizzato un ruolo della eIF6 anche nel silenziamento genico post-trascrizionale mediato dai microRNA, in quanto essa è associata al complesso RISC, complesso che contiene sia la subunità ribosomiale 60S che il fattore eIF6, ed inibisce selettivamente la traduzione dei messaggeri *Lin14* e *Lin 28* in *C. elegans*, senza effetti generali sulla sintesi proteica, bloccando l'attacco o il riciclo dei ribosomi sul messaggero *target* specifico (Chendrimada et al., 2007). In questo caso eIF6 agirebbe come sequestratore della subunità 60S, favorendo così l'azione dei miRNA sull'mRNA bersaglio.

4 eIF6 nella tumorigenesi

Numerosi dati sono a sostegno dell'ipotesi che eIF6 abbia un ruolo nella tumorigenesi; infatti, questa molecola è iperespressa nelle cellule del cancro, come quello del colon (Sanvito et al., 2000) e nella leucemia aggressiva (Harris et al., 2004). eIF6 è una proteina espressa ubiquitariamente, ma più alti livelli sono stati trovati nell'epitelio in rinnovamento, come quello della mucosa intestinale; mentre, le cellule commissionate per l'apoptosi, come le quelle che si trovano nei villi intestinali, presentano una sua

diminuzione. Di recente, in *X. laevis*, è stato dimostrato questo ruolo anti-apoptotico di eIF6 (De Marco et al., 2010). Le procedure diagnostiche dei tumori comprendono analisi delle alterazioni morfologiche delle cellule coinvolte, come, ad esempio, cambiamenti nucleari, incluso alterazioni nelle dimensioni e nella forma del nucleo, allargamento dei nucleoli e una anormale distribuzione eterocromatinica. Questi cambiamenti nucleari riflettono una relazione tra matrice extracellulare, adesione cellulare, citoscheletro e matrice nucleare, che sono un ampio *network* di eventi che controllano l'espressione genica e contribuiscono all'evoluzione del cancro. Data la localizzazione nucleare di eIF6 e il suo putativo ruolo nell'adesione cellulare, attraverso l'interazione con la subunità integrinica $\beta 4$, è stato assunto che eIF6 potrebbe rappresentare un legame tra l'ambiente delle cellule epiteliali, come la membrana basale, e il macchinario nucleare che controlla l'assemblaggio ribosomale, questa connessione potrebbe essere alterata nella neoplasia colon-rettale, dove le cellule trasformate perdono la loro relazione con l'ambiente e simultaneamente proliferano e migrano. È stato messo in evidenza, attraverso analisi immunoistochimiche, che nelle neoplasie colon-rettali la frazione di eIF6 associato alla matrice nucleare aumenta. Inoltre, analisi biochimiche evidenziano un incremento progressivo dei livelli di eIF6 dalle cellule epiteliali del colon normale a quelle dell'adenoma fino al carcinoma. Un'ulteriore analisi, quale quella per *Northern blotting*, dimostra che l'aumento dei livelli proteici di eIF6 nelle neoplasie è dovuta ad una *up*-regolazione del messaggero e non ad una amplificazione del suo gene (Sanvito et al., 2000). L'aumento dell'espressione della eIF6 è uno dei primi eventi che si verificano all'inizio della trasformazione di un fenotipo benigno in uno maligno. Quindi, la valutazione della presenza di eIF6 può diventare un mezzo diagnostico supplementare e potente, in

particolare per la scoperta di micrometastasi (Sanvito et al., 1999). L'aumento della eIF6 sia nel tumore al colon-retto che in altri tipi di tumori dello stesso tessuto, può essere interpretato come una conseguenza dell'aumento della sintesi proteica durante la rapida proliferazione cellulare; ciò dipende dal citato ruolo che eIF6 ha durante l'assemblaggio ribosomale; oppure, un'altra potenziale possibilità è quella che eIF6 può essere coinvolta nella protezione delle cellule tumorali colon-rettali dalla apoptosi. Molto probabilmente, questa proteina è coinvolta nei processi che governano la crescita cellulare e l'evoluzione del cancro; per questo si è pensato di utilizzarla come marcatore utile per scopi diagnostici. Recentemente, Gandin et al. (2008) hanno avvalorato l'ipotesi di un ruolo diretto di eIF6 nella tumorigenesi. Infatti, fibroblasti embrionali di topo (MEFs) aploinsufficienti per eIF6 sono maggiormente resistenti alla trasformazione tumorale effettuata attraverso l'infezione con vettori retrovirali codificanti il dominante-negativo di p53 e H-ras^{V12} o Myc e H-ras^{V12} (Gandin et al., 2008).

CAPITOLO 2

1 eif6 nelle prime fasi di sviluppo di Xenopus laevis

In accordo con Ceci et al., (2003) la fosforilazione di eIF6 ha un importante ruolo nella regolazione della sintesi proteica. Di conseguenza, nell'embriogenesi ci si aspetta una maggiore espressione e maggiori modifiche post-traduzionali di eif6, dovute ad un aumento della regolazione della sintesi proteica durante la proliferazione cellulare e il differenziamento tissutale. I dati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca (Vaccaro et al., 2006; De Marco et al., 2010) sul pattern di espressione della proteina e del messaggero di eif6, durante lo sviluppo embrionale, sono in accordo con queste aspettative. La sequenza aminoacidica dedotta della eif6 di *Xenopus* è altamente conservata negli organismi viventi ed in particolare presenta il 92% di identità con quella dei mammiferi (*Homo sapiens* e *Mus musculus*). In tutti gli organismi in cui eIF6 è stata isolata, l'omologia interessa tutta la sequenza, ma l'identità è minore nella regione C-terminale ed è maggiore in quella N-terminale (Biffo et al., 1997). eif6 presenta un potenziale dominio transmembrana nella regione N-terminale (posizione 21-40) e due potenziali siti di fosforilazione in serina da parte della PKC: la Ser in posizione 235, che si ritrova anche nella eIF6 dei mammiferi, e quella in posizione 91 che invece è tipica di *Xenopus*. Questi dati risultano particolarmente interessanti messi in relazione al fatto che, in questa specie, durante la maturazione oocitaria compare una nuova forma di eif6 di 29kDa che molto probabilmente è fosforilata in serina (Carotenuto et al., 2005). La presenza di due potenziali siti di fosforilazione potrebbe portare all'ipotesi che, in *Xenopus*, ci sia una regolazione più articolata dell'attività di eif6 rispetto a quella ritrovata nei mammiferi, dove eIF6 ostacola l'associazione impropria delle subunità 40S

e 60S e la fosforilazione PKC-dipendente porta alla formazione del monosoma 80S e quindi, all'inizio della sintesi proteica (Ceci et al., 2003). Analisi di RT-PCR e *Western blots* hanno mostrato che il messaggero di eif6 e la sua proteina, sia nella forma di 27 kDa che in quella fosforilata di 29 kDa, sono presenti durante tutto lo sviluppo, dalla prima segmentazione allo stadio di girino (Carotenuto et al., 2005).

2 Espressione di eif6 durante lo sviluppo embrionale di Xenopus laevis

Il *pattern* d'espressione di eif6 negli embrioni è stato studiato mediante immunofluorescenza ed ibridazioni *in situ*, usando inoltre le sonde otx2 e rax per ibridazioni doppie, allo scopo di marcare l'espressione più anteriore di eif6. rax controlla la proliferazione e la neurogenesi e alla fine della gastrulazione è espresso nel piano neurale anteriore, in particolare, in territori destinati a dare origine alla retina, al diencefalo e a parte del telencefalo. otx2 è espresso nel neuroectoderma anteriore e represso nella zona di espressione di rax. La doppia ibridazione *in situ* con rax e eif6 ha mostrato il sovrapporsi dei *riboprobes* in particolare nella regione dell'occhio, contrassegnato con una chiara espressione di rax. La doppia ibridazione *in situ* con otx2 e eif6 ha mostrato il sovrapporsi delle sonde attorno al campo dell'occhio. Nello stadio 12.5 il segnale è stato trovato nella piastra neurale, in particolare nella regione più anteriore. Negli stadi 14 e 19 la proteina è localizzata a livello della piastra neurale e delle pliche che iniziano il processo di chiusura che porterà alla formazione del tubo neurale, da cui si differenzieranno l'encefalo ed il midollo allungato. In questi stadi la localizzazione cellulare della proteina sembra essere prevalentemente nucleare. Nello stadio 19, inoltre, risultano positive all'esposizione all'anticorpo le creste neurali e le pareti del canale ependimale in formazione che costituisce l'epitelio germinativo del

tessuto nervoso che si sta generando. Con il proseguire dello sviluppo, eif6 è espressa lungo l'asse neurale dell'embrione. Allo stadio 23 il prosencefalo si suddivide in telencefalo e diencefalo dal quale si estenderanno, successivamente, le vescicole ottiche. In questo stadio e in quello successivo, stadio 24, sia il messaggero che la proteina si ritrovano nelle regioni dalle quale si sta sviluppando il cervello, in particolare, si evidenzia una marcatura diffusa del telencefalo e del diencefalo che diventa più evidente sulle pareti del terzo ventricolo, negli abbozzi dell'occhio, nelle vescicole ottiche e olfattive, così come nei somiti. A partire da questo stadio, l'mRNA di eif6 è costantemente localizzato nell'epidermide durante il suo differenziamento. eif6 si localizza nella testa anche successivamente, nello stadio 32 e 35-36, osservando dorsalmente l'embrione, l'ibridazione diventa evidente nel prosencefalo, nel mesencefalo e nel telencefalo e un forte segnale è presente posteriormente al mesencefalo (MHB *midbrain-hindbrain boundary*); il segnale decresce gradualmente nel rombencefalo ed è assente nel midollo spinale, mentre è ancora presente nei somiti. Allo stadio 41 si osserva una debole localizzazione nel tronco; mentre, nella testa una forte ibridazione è limitata alla regione più anteriore dove la sonda marca il prosencefalo e il mesencefalo, così come la regione della faringe e gli archi branchiali. Allo stadio 45, l'ibridazione, ancora forte nel prosencefalo, è presente solo debolmente nella regione MHB ed assente nel telencefalo. La marcatura è particolarmente evidente intorno al cristallino, nelle vescicole olfattive, negli archi branchiali e nei miotomi. Riferendoci, in particolare, allo sviluppo dell'occhio notiamo che allo stadio 32 non si può ancora parlare di occhio, in quanto si ha la struttura a forma di ferro di cavallo corrispondente al calice ottico. Qui la zona di crescita del cristallino risulta molto marcata con anti-eIF6, così come la zona marginale ciliare, una regione in attiva

proliferazione, da dove migreranno le cellule che formeranno i vari strati della retina (GCL, INL e ONL). Durante gli stadi 35-36 e 37-38 il cristallino diventa sempre più esteso e la positività continua ad essere evidente nella sua zona di crescita, così come nella zona marginale ciliare. Le fibre mature del cristallino praticamente non contengono eif6, mentre gli strati retinici ben differenziati, che si osservano negli stadi 41 e 45, in particolare l'ONL, risultano positivi. È interessante notare che la proteina si localizza anche nella coroide e nella cornea dove ci sono cellule in attiva proliferazione. Nello sviluppo della ghiandola del cemento l'ibridazione è evidente in tutta la regione della ghiandola, in particolare nei margini laterali; allo stadio 19 e 24 la proteina è localizzata a livello dell'epitelio che circonda la ghiandola e successivamente, allo stadio 35-36, quando la ghiandola è all'apice del suo sviluppo, risulta diffusa in tutto l'organo di adesione. La positività viene mantenuta sino allo stadio 45, quando la ghiandola è quasi del tutto regredita riducendosi ad un sottile strato di cellule. In definitiva, durante l'embriogenesi di *Xenopus* c'è una precoce espressione di eif6 nella piastra neurale inclusa l'area telencefalica e diencefalica e in particolare nella regione dell'occhio. Durante l'embriogenesi, si assiste ad una progressiva modulazione e regionalizzazione di eif6 nello sviluppo dei derivati del neuroectoderma e del mesoderma dorsale, ad esempio nel cervello, negli organi di senso, nell'epidermide, nei somiti e nella ghiandola del cemento. Ci sono alcune caratteristiche di particolare interesse, come un elevato livello di espressione della eif6 nella regione MHB. Nei vertebrati questa zona è un importante *signalling center* per il modellamento del mesencefalo e del telencefalo anteriore, e per la formazione e il mantenimento della stessa regione MHB. Sembra che in questa regione, durante l'embriogenesi e in particolare allo stadio 35-41, ci sia un'attiva proliferazione che necessita di una

maggior regolazione della sintesi proteica, il che potrebbe spiegare il livello di espressione di eif6 descritto. Conformemente, sembra che l'espressione di eif6 diminuisca allo stadio 45, quando è avvenuta la maggior parte della proliferazione cellulare del mesencefalo e del telencefalo ed il modellamento. Al contrario, a questo stadio, nel prosencefalo l'espressione di eif6 è ancora alta, probabilmente in accordo con la formazione degli emisferi cerebrali che comincia allo stadio 43. Inoltre, l'espressione di eif6 interessa l'intero territorio neuroectodermico e, in particolare, è sempre presente nella regione dell'occhio a partire dalla sua precoce formazione fino al differenziamento della retina e del cristallino. L'espressione precoce di eif6 nella regione dell'occhio è coerente con la presenza, nella stessa regione, di alcune attività geniche relative alla proliferazione, inclusa quella di *rax*, di cui si è dimostrata la co-localizzazione con eif6. Di conseguenza, eif6 può essere inclusa tra i geni attivi durante la formazione della retina e del cristallino. In conclusione, questo studio mostra che l'espressione di eif6 è modulata durante l'embriogenesi e preliminarmente suggerisce che questa proteina potrebbe essere inclusa tra i *markers* di regioni in attiva proliferazione (Vaccaro et al., 2006). Infatti, microiniettando gli embrioni con Bromodeossiridina (BrdU), un intercalante del DNA che viene incorporato dalle cellule in mitosi, è stato dimostrato che eif6 è maggiormente presente nelle regioni in attiva divisione (De Marco et al., 2010).

3 Funzione anti-apoptotica di eif6

I dati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato un ruolo di questa proteina nella protezione dall'apoptosi durante lo sviluppo di *X. laevis* a monte di Bcl-2 (De Marco et al., 2009); sostenendo, quindi, le ipotesi fatte da Sanvito et al. (2000) sui

tessuti neoplastici, di cui ho parlato nel capitolo I. L'iperespressione di eif6, in un blastomero di un embrione allo stadio di due cellule, porta ad un embrione curvato, allo stadio 28, sul lato opposto al sito di iniezione. Tale fenotipo si osserva solo quando l'aumento proteico è indotto in un solo lato dell'embrione, infatti, non si osserva quando l'iniezione viene effettuata precedentemente alla chiusura del primo solco di segmentazione, portando, quindi, ad un aumento della proteina in tutto l'embrione e non solo in un unico lato. La conta dei nuclei sul lato iniettato rispetto al lato controllo, non iniettato, mostrano un aumento del numero di cellule lì dove c'è una iperespressione della proteina. L'incremento del numero di cellule non è dovuto ad un aumento della proliferazione cellulare nel lato iniettato, come dimostrato da esperimenti di immunofluorescenza usando anticorpo contro il fosfoistone 3 (pH3), ma è dovuto ad una diminuzione delle cellule apoptotiche, messe in evidenza attraverso la reazione TUNEL. Questa ipotesi di una funzione anti-apoptotica è stata ulteriormente avvalorata da *western blots* che permette di analizzare lo stato di attivazione della caspasi 3 e della poly (ADP-ribose) polimerasi (PARP1). Durante l'apoptosi sia la caspasi 3 che PARP1 vanno incontro a taglio proteolitico: la caspasi 3, che ha un peso molecolare di 32kDa, produce un peptide attivo di 18kDa, mentre PARP1, con un Mr di 116 kDa, produce un peptide di 85kDa. Gli embrioni iniettati, rispetto a quelli controllo, mostrano una diminuzione dei livelli di caspasi 3 attiva ed una maggiore quantità di PARP1 non tagliata. Inoltre, è stato anche dimostrato che eif6 *down*-regola l'apoptosi in maniera indipendente dal ciclo cellulare, infatti, gli embrioni iniettati sono stati trattati con idrossiurea e apidicolina (HUA), che inibisce la sintesi del DNA prima della fase S del ciclo cellulare. Nonostante la diminuzione delle cellule in proliferazione, sul lato iniettato è stata osservata una diminuzione delle cellule apoptotiche, quindi, in tale

esperimento, eif6 continua ad agire come fattore anti-apoptotico. Oltre ad esperimenti di *gain-of-function* sono stati effettuati esperimenti di *loss-of-function*, utilizzando un oligonucleotide morfolino per eif6, allo scopo di saggiare gli effetti ottenuti da una *down* regolazione della proteina. In un blastomero di un embrione allo stadio di due cellule è stato iniettato il morfolino di eif6; gli embrioni allo stadio 28 presentano un fenotipo opposto, ovvero, embrioni ricurvi dal lato opposto a quello ottenuto con l'iperespressione. Inoltre, i saggi TUNEL evidenziano un maggior numero di cellule apoptotiche nel lato iniettato con morfolino rispetto al controllo. Naturalmente, l'iniezione di morfolino *mispaired* non porta al fenotipo ricurvo che è stato osservato con il morfolino di eif6. Successivamente, è stato dimostrato che il sito importante per la funzione anti-apoptotica di eif6 è la S235 e non la S91, dimostrando, quindi, che questa funzione è connessa con il ruolo di regolazione della traduzione osservato nei mammiferi (Ceci et al., 2003). Infatti, l'iniezione della forma mutata S235A di eif6 non porta al fenotipo ripiegato, che invece si osserva con l'iniezione della forma mutata S91 di eif6. Esperimenti TUNEL effettuati sia su embrioni iperesprimenti eif6-S235A sia su embrioni iperesprimenti eif6-S91A evidenziano, nel primo caso un uguale numero di nuclei apoptotici tra il lato iniettato e quello controllo, nel secondo caso un minor numero di nuclei apoptotici nel lato iniettato rispetto a quello controllo. Anche in questo caso, gli embrioni iniettati con la forma mutata S235A e quelli iniettati con la forma mutata S91 sono stati utilizzati in esperimenti di *western blots* per saggiare la quantità di caspasi 3 attiva e di PARP1 sottoposto a taglio proteolitico. Nel primo caso non sono state osservate differenze rispetto ad embrioni non iniettati, nel secondo caso, invece, è stato osservato una diminuzione dei livelli di questi due partners apoptotici, indicando, quindi, che per questa funzione è importante il residuo di serina in posizione 235 e non

quello in posizione 91. Infine, è stato dimostrato che eif6 svolge questa funzione anti-apoptotica agendo a monte di bcl-2/bax. Sia bcl-2 che bax sono proteine che fanno parte del meccanismo apoptotico, bcl-2 agendo come fattore anti-apoptotico, bax, invece, come fattore pro-apoptotico sebbene, la decisione di andare incontro a morte cellulare programmata dipende da un equilibrio tra tutte le proteine coinvolte nell' apoptosi. In *Xenopus laevis* l'iniezione dell'mRNA di bcl-2 inibisce drammaticamente l'apoptosi, mentre l'iniezione dell'mRNA di bax la promuove moderatamente. È stata effettuata la microiniezione dell'mRNA di bcl-2 in un blastomero di un embrione allo stadio di due cellule, allo stadio 28 questi embrioni mostrano lo stesso fenotipo ripiegato osservato con l'iperespressione di eif6. Saggi TUNEL mostrano una diminuzione dei nuclei apoptotici nel lato che iperesprime bcl-2, mentre l'immunofluorescenza con anti-pH3 e la conta dei nuclei mitotici dimostra che la proliferazione cellulare non è alterata. *Western blots* sono stati effettuati per saggiare se eif6 altera i livelli endogeni di bcl-2 e bax, paragonandoli con quelli di embrioni non iniettati. Embrioni che iperesprimono bcl-2 mostrano un aumento dei livelli proteici di bcl-2 ma non di eif6; mentre embrioni che iperesprimono eif6 mostrano un aumento dei livelli proteici di bcl-2, ma non di bax; al contrario gli embrioni iniettati con morfolino- eif6 mostrano un aumento dei livelli di bax, ma non di bcl-2. Inoltre, attraverso RT-PCR sono stati analizzati anche i livelli dei trascritti di queste due componenti del macchinario apoptotico, per osservare se c'è una variazione anche a livello dell'espressione genica. Embrioni che iperesprimono la nostra proteina mostrano un aumento dei livelli del trascritto di bcl-2, ma non di bax, mentre embrioni iniettati con morfolino presentano un aumento dei livelli del trascritto di bax, ma non di bcl-2. Sono stati effettuati esperimenti di recupero del fenotipo indotto da eif6 microiniettando, insieme all'mRNA di eif6, l'mRNA di bax. Gli embrioni non

mostrano la morfologia ripiegata ed una piccola percentuale (2-3%) mostra un fenotipo ripiegato opposto al sito di iniezione. Tale risultato è opposto a quello ottenuto con l'iperpressione di bcl-2, ma è identico a quello ottenuto con la *down*-regolazione. Esperimenti TUNEL e la conta dei nuclei apoptotici mostrano che la co-iniezione dell'mRNA di bax e eif6 revertono l'inibizione della apoptosi prodotta dalla sola iniezione di eif6, in quanto, il numero delle cellule apoptotiche è maggiore nel lato iniettato rispetto a quello controllo. Infine, la co-iniezione dell'mRNA di bax e della forma mutata S235A di eif6 mostra un aumento degli embrioni con fenotipo simmetricamente opposto a quello ottenuto con la sola iperpressione di eif6, indicando, ulteriormente, l'importanza di questo residuo di serina per la funzione anti-apoptotica. Concludendo, eif6 sembra essere parte di un meccanismo che agisce sulla traduzione e cambia la morte cellulare in sopravvivenza cellulare, regolando, così, il processo apoptotico durante il normale sviluppo, dando via, quindi, ad una nuova interpretazione per la sua maggiore presenza nello sviluppo embrionale.

4 Ruolo dei fattori IGF nello sviluppo dell'occhio in X. laevis

I fattori di crescita simili all'insulina (IGFs) sono dei mitogeni ben conosciuti, sia *in vivo* che *in vitro*, mentre le loro funzioni nel differenziamento cellulare devono ancora essere identificate. Gli esperimenti di mutazioni nulle di IGFs usando topi transgenici riferiscono che il *pathway* IGF è importante soprattutto per controllare la crescita intrauterina. Infatti, topi carenti sia di IGF1 che di IGF2 mostrano un significativo ritardo nella crescita e alla fine della gestazione presentano un peso che è circa il 60% del peso normale. L'inattivazione dei recettori di IGF1 genera un egual fenotipo molto più grave, questi topi hanno, infatti, un peso pari al 45% di quello normale. Topi doppi

mutanti per IGF-1R e IGF1 presentano lo stesso fenotipo dei topi mutanti nulli IGF1-R, dimostrando che è il recettore a mediare tutti gli effetti di IGF1 sulla crescita fetale. Al contrario, topi doppi mutanti IGF2/IGF1-R hanno un ritardo nella crescita più accentuato rispetto ai topi *knockout* IGF1-R, suggerendo che IGF2 agisce attraverso un altro recettore in aggiunta a IGF1-R. Ulteriori studi, dove sono stati effettuati incroci tra vari topi mutanti nulli, hanno suggerito che è il recettore dell'insulina a mediare gli effetti di IGF2 sullo sviluppo embrionale e può parzialmente compensare l'assenza di IGF1-R (Louvi et. al., 1997). Questi studi genetici in topo dimostrano l'importanza del segnale IGF nella crescita prenatale e sottolineano anche l'alto grado di complessità e ridondanza di questo sistema nei mammiferi. Inoltre, gli IGFs sono anche capaci di promuovere, *in vitro*, il differenziamento di varie linee cellulari, come neuroni, cellule ematopoietiche, mioblasti e osteoblasti. D'altro canto però, *in vivo*, non sono stati trovati difetti di differenziamento in topi nulli per le differenti componenti del sistema IGF; ciò è dovuto alla elevata ridondanza di questo sistema di segnalazione che limita l'impiego di tale sistema modello nel delucidare tutte le funzioni del segnale IGF, soprattutto per investigare un suo potenziale ruolo nello sviluppo embrionale precoce. Utilizzando come sistema modello *X. laevis* è stato dimostrato, attraverso esperimenti di *gain* e di *loss of function*, un nuovo ruolo del *pathway* igf nel regolare la formazione della testa negli embrioni (Pera et al, 2001; Richard-Parpaillon et al, 2002). Esperimenti di RT-PCR hanno mostrato che IGF1 è presente maternamente ed è localizzato sia dorsalmente che ventralmente durante la neurulazione, mentre IGF2 è espresso dallo zigote; *igf1r* è anch'esso di provenienza materna e l'espressione persiste durante tutto lo sviluppo (Richard-Parpaillon et al, 2002). Gli esperimenti di ibridazione *in toto* hanno permesso di osservare che dopo la gastrulazione IGF1-R è presente nella parte dorsale e

soprattutto nella parte anteriore dell'embrione ed il trascritto non è presente ventralmente. Con il proseguire della neurulazione *igfl1* è espresso nella regione della testa ed in particolare nell'area del primordio della ghiandola del cemento. È presente anche nel mesoderma cefalico, ma non è presente nel tubo neurale e nella parte più ventrale. Dallo stadio di bottone caudale l'mRNA di *igfl1* è presente solo anteriormente, nella testa e nella parte più rostrale del tubo neurale. Successivamente, è stato evidenziato, attraverso esperimenti di iperespressione dell'mRNA di *igf*, che questo fattore proteico accresce la formazione di strutture neurali anteriori ed induce fenotipi che sono molto dipendenti dal sito di iniezione. Infatti, l'iniezione dell'mRNA di *igfl1* nei blastomeri dorsali allo stadio di 4 cellule porta ad un accrescimento delle strutture della testa ed, in particolare, porta a fenotipi anormali per quanto riguarda l'occhio, ovvero, si può sia osservare un sostanziale accrescimento dell'occhio alle spese dei tessuti circostanti, sia la formazione di occhi ectopici o strutture simili all'occhio. Le analisi istologiche degli occhi ectopici hanno messo in evidenza una morfologia della retina normale con cellule ben differenziate, inclusi fotorecettori distinti morfologicamente; in qualche caso questa retina ectopica è associata con la lente. Gli embrioni iperespressanti *igfl1* sono stati utilizzati per ibridazioni *in toto* allo scopo di analizzare l'espressioni di geni importanti per la formazione di strutture anteriori. Questi geni sono NCAM, un marker pan-neurale, *otx2*, un gene *homeobox* essenziale per lo sviluppo della testa che è normalmente espresso nel cervello anteriore e nell'occhio in sviluppo e *pax6*, un *marker* dell'occhio. Si è osservato che l'iperespressione di *igfl1* porta ad un allargamento dell'espressione di questi tre geni, avvalorando, ulteriormente, la tesi che il *signalling* di *igf* promuove la formazione delle strutture della testa, ed in particolare quelle di origine neurale. Al contrario, l'iniezione

di mRNA di *igf1* nei blastomeri ventrali allo stadio di 4 cellule non induce la formazione di occhi ectopici, ma porta ad un allargamento o alla formazione ectopica della ghiandola del cemento. La distruzione della funzione di *igf1r*, attraverso la microiniezione di morfolino-*igfr*, che blocca la sua traduzione, blocca la formazione della testa. L'iniezione di *moigf*, in uno dei due blastomeri dorsali, porta ad embrioni posteriorizzanti. Tale fenotipo è simile a quello ottenuto con l'over-espressione di *Wnt-8* che porta alla deplezione delle strutture anteriori e alla mancanza degli occhi. Tale fenotipo è recuperato iniettando mRNA di *igf1r*, dimostrando che il segnale IGF è richiesto per il normale sviluppo della testa (Richard-Parpaillon et al, 2002). Il *pathway* conosciuto del *signalling* di *igf*, che è stato dimostrato controllare la proliferazione cellulare, non ne spiega il ruolo nella formazione della testa.

4.1 gipc2, interagendo con igf-r, è necessario per il signalling di igf nello sviluppo dell'occhio in Xenopus

In *Xenopus laevis*, è stato trovato da Wu et al. (2006) l'omologo della proteina *gipc* di mammifero (*GAIP interacting protein, C terminus*) (72% di identità). *kermit/gipc* è una proteina contenente il dominio PDZ ed è stata inizialmente identificata per la sua capacità di interagire con *RGS-GAIP (regulator of G protein signalling-GTPase activating protein for Gai)*. *kermit* è stata identificata come proteina interagente con numerose proteine di membrana, come *igf1r* ed il recettore *frizzled 3*. Essa è infatti necessaria per l'induzione delle creste neurali in espianti ectodermici dipendenti dall'azione di quest'ultimo. Infatti *down-regolando kermit*, mediante l'impiego dell'oligonucleotide antisense morfolino, è stato osservato il blocco dell'induzione delle creste neurali in espianti ectodermici ma non nell'embrione intero. Questo ha portato gli

AA ad ipotizzare l'esistenza di un'attività compensatoria o ridondante nell'embrione intero. Ciò ha condotto all'identificazione di un secondo *kermit* (*kermit 2/gipc2*) in *Xenopus* che ha il 67% di identità con *kermit 1*. Wu et al. (2006) hanno mostrato che *gipc2* è coinvolto nel *signalling igf* funzionando a livello del recettore per *igf1*. Dapprima, mediante esperimenti di RT-PCR è stato analizzato il *pattern* di espressione di *gipc2* nello sviluppo embrionale di *Xenopus*. Il gene è espresso sia maternamente in quanto è stata vista la sua presenza in embrione a 4 blastomeri, che nelle fasi iniziali di sviluppo dell'embrione. È ubiquitariamente espresso fino a metà neurula, dopodiché, con il proseguire della neurulazione, la sua espressione è ristretta alla regione anteriore dell'embrione. Con esperimenti di ibridazione *in situ whole mount* su embrioni a stadio 20 è stato evidenziato che *gipc2* si esprime soprattutto nella regione presuntiva dell'occhio e anche ai margini della placca neurale e a livello della ghiandola del cemento. La *down-regolazione* di *gipc2*, ottenuta mediante l'iniezione dell'oligonucleotide antisense morfolino, causa una formazione ridotta dell'occhio negli embrioni iniettati, mentre l'iperespressione di *gipc2* non comporta nessun difetto evidente nello sviluppo dell'embrione, indicando che l'aumento dei livelli di *gipc2* non interferisce con il corretto sviluppo dell'embrione. La co-iniezione di *gipc2* morfolino e *gipc2* mRNA mancante della sequenza target del morfolino, ha portato allo sviluppo di embrioni con un fenotipo dell'occhio parzialmente o completamente recuperato dimostrando che la formazione ridotta dell'occhio è specificamente dovuta alla perdita di *gipc2*. È stato allora ipotizzato che *gipc2* potesse interferire con la determinazione generale della dorsalità ed è stato mostrato che la perdita di *gipc2* non disturba la specificazione dorsale precoce. Infatti è stata saggiata allo stadio di gastrula precoce l'espressione di geni organizzatori della dorsalità quali *chordin* e *gooseoid*, mediante

ibridazione *in situ whole-mount*. È stato visto che la riduzione di *gipc2* non influenza l'espressione di tali geni. È stata esaminata poi l'espressione di *markers*, quali *bfl1* (marcatore del proencefalo) e *pax6* (marcatore del proencefalo e dell'occhio) e *otx2* (marcatore del proencefalo, occhio e mesencefalo anteriore), allo stadio di neurula. È stato evidenziato che la riduzione di *gipc2* non influenza l'espressione di *bfl1*, inoltre l'espressione di *pax6* e *otx2* è ridotta solo nella regione presuntiva dell'occhio. In accordo con un fenotipo occhio specifico, l'espressione di *markers* specifici dell'occhio, quali *rax* e *Xath5* è fortemente ridotta in embrioni mancanti di *gipc2* allo stadio 20, ma non allo stadio 16. Questo dimostra che *gipc2* è necessario per il mantenimento e non per l'inizio della formazione dell'occhio. Studi di Pera et al., 2001; Richard-Parpaillon et al., 2002 hanno mostrato che l'iperespressione di IGF1 causa la formazione di occhi ectopici. Negli esperimenti di Wu et al., 2006 è stato mostrato che co-immunoprecipitando *igf1r* con *gipc2*-GFP, *gipc2* e *igf1r* interagiscono fisicamente. L'interazione funzionale di questi due fattori è stata poi dimostrata dal fenotipo aggravato che presentano gli embrioni co-iniettati con *gipc2* morfolino e il dominante negativo del recettore *igf*, che inibisce il *signalling* di IGF1. La coiniezione del mRNA di *igf1* e *gipc2* morfolino ha dimostrato che *gipc2* è necessario per la formazione dell'occhio indotta da *igf1* in *Xenopus*. Infatti negli embrioni co-iniettati si ha un'inibizione del fenotipo da iperespressione di *igf1*, con la presenza di occhi piccoli o assenza di occhi. I principali *pathways* attivati da IGF/IGFR sono PI3K/AKT e MAPK (Oldham e Hafen, 2003). Per capire in quale dei due *pathways* intervenisse *gipc2* degli ovociti stadio VI sono stati iniettati con *kemit2*-morfolino e coltivati per 48 ore, per abbassare i livelli di *gipc2* endogeno, dopodiché sono stati esposti alla proteina *igf1* per 30 minuti oppure *overnight*. I livelli di *akt* fosforilata e *mapk* fosforilata sono stati poi

saggiati mediante *western blot*. È stato osservato che la riduzione di *gipc2* blocca la fosforilazione/attivazione di akt indotta dall'esposizione a lungo termine di *igf1*, mentre non influenza quella indotta dall'esposizione a breve termine, né la fosforilazione delle *mapk*. Questo dato è stato osservato anche per espianti ectodermici trattati allo stesso modo. Gli espianti sono usati in quanto permettono di avere un arricchimento delle componenti proteiche d'interesse eliminando l'interferenza della vitellogenina che si ha usando l'embrione intero. Si può dire quindi che *gipc2* è necessario per il mantenimento dell'attivazione di akt indotta da *igf1*, ma non per avviare il *signalling* e che non è coinvolto nell'attivazione di *mapk*. Dal momento che la deplezione di *kermit 2* inibisce la attivazione per fosforilazione di akt indotta da *igf1*, gli AA hanno voluto studiare la rilevanza fisiologica di questa inibizione mediante recupero dell'effetto dell'iniezione di *gipc2* morfolino. Il recupero è stato attuato mediante co-iniezione di *gipc2* morfolino con *p110**, la sub unità catalitica di *pi3k*, costitutivamente attiva che ha portato allo sviluppo di embrioni con un ripristino morfologico dell'occhio e un recupero parziale dell'espressione del *marker* dell'occhio *rax*. Questi risultati di ripristino suggeriscono che il fenotipo da perdita di funzione di *gipc2* sia almeno parzialmente dovuto all'inibizione del *pathway pi3k/akt*. Gli AA concludono che siccome *gipc2* funziona a valle del ligando *igf1* ed a monte di *pi3k* ed è associata fisicamente con *igf1r*, esso probabilmente regola il *signalling igf* attraverso la modulazione del recettore. *gipc2* potrebbe regolare la stabilità, l'attività o la localizzazione sub-cellulare del recettore. Un possibile ruolo di *gipc2* nella regolazione della stabilità complessiva o dell'attività di *igf1r* è smentito dal fatto che esso non riduce i livelli di *igf1r* e non influenza la fosforilazione delle *mapk* indotta da *igf*

MATERIALI E METODI

1 Animali

Per ottenere gli stadi embrionali oggetto della mia tesi sono state effettuate delle fecondazioni in vitro. A tale scopo sono stati utilizzati individui adulti di *Xenopus laevis* forniti dalla ditta “Nasco” (*Fort Atkinsons, Wisconsin, USA*). Essi sono stati allevati e utilizzati, secondo le linee guida e le politiche dettate dall’ *Animal Welfare Ufficiale* all’ Università di Napoli, in accordo con le regole internazionali. Per ottenere le uova è necessario iniettare 500 UI di Gonasi HP (AMSA) nel sacco linfatico dorsale di una femmina. Diciotto ore dopo l’iniezione si ottengono le uova, per spremitura dell’animale nella parte inferiore della pancia. I testicoli vengono prelevati dai maschi e sono ottenuti attraverso il sacrificio di quest’ultimi; questi organi vengono mantenuti in una soluzione di Ringer FS (100mM NaCl, 1,8mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 5mM Hepes). Gli spermatozoi sono ottenuti per sminuzzamento di un pezzettino di testicolo in Ringer 1/10. Una goccia della soluzione, che si ottiene in questo modo, viene prelevata ed analizzata al microscopio per verificare la motilità degli spermatozoi. Se questi ultimi sono effettivamente mobili, una piccola quantità della soluzione, contenente gli spermatozoi, viene messa in contatto con le uova vergini. Le uova vengono lasciate insieme agli spermatozoi per 10 minuti, trascorso questo tempo si aggiunge la soluzione di Ringer 1/10. Se la fecondazione è avvenuta si osserva una rotazione dell’uovo; essi, infatti, si dispongono con l’emisfero vegetativo, più pesante perché ricco di vitello, verso il basso; mentre osserveremo l’emisfero animale, che presenta una pigmentazione bruna, rivolto verso l’alto; gli embrioni si sviluppano alla temperatura di circa 19°C fino a che non si raggiunge lo stadio di sviluppo di interesse.

Questa procedura della fecondazione (prelievo delle uova dalla femmina, sminuzzamento di un pezzo di testicolo, contatto tra i gameti per 10 minuti, aggiunta di Ringer 1/10) viene ripetuta ogni 30 minuti circa su aliquote di un centinaio di uova, in questo modo si riescono ad avere numerosi embrioni allo stadio di due cellule su cui lavorare per la microiniezione. Gli embrioni, utilizzati e quelli non trattati, si fanno sviluppare fino allo stadio desiderato, valutato secondo i criteri di Nieuwkoop e Faber (1967).

2 Vettori di espressione per microiniezioni

2.1 Il vettore pCS2+

E' un vettore di 4000bp costruito da Turner e Rupp (1996) e progettato per l'espressione di proteine in embrioni di *Xenopus laevis*.

Contiene:

- Un “*polylinker*”, cioè un sito in cui sono presenti sequenze riconosciute da vari enzimi di restrizione e, in particolare, tra quelle utilizzate durante i miei esperimenti, i siti per gli enzimi EcoRI, Xba I e Xho I.
- Un promotore di *Citomegalovirus*, che consente la trascrizione costitutiva in cellule eucariotiche dei geni che si trovano a valle dello stesso promotore.
- una sequenza di poliadenilazione di SV40;
- un SP6 *promoter*, che permette la trascrizione *in vitro* dell'mRNA senso dell'inserto di interesse;
- un T7 *promoter*, che permette la sintesi *in vitro* dell'mRNA antisenso;

- un'origine di replicazione batterica ColE1 ori, in grado di guidare la replicazione del vettore all'interno delle cellule batteriche;
- un gene per la resistenza all'ampicillina (amp), in grado di conferire, alle cellule batteriche che contengono questo plasmide, la resistenza a tale antibiotico (Fig. IV).

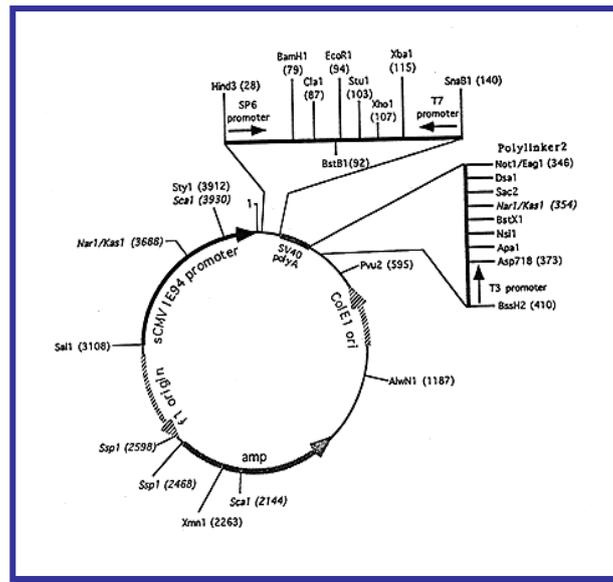


Fig. IV. Rappresentazione schematica del vettore pCS2+

Oltre al vettore pCS2+ è stata utilizzata anche una sua variante, il vettore pCS2+MT di cui parlerò in seguito.

2.2 Il vettore pCS2+MT-GFP

È un vettore di 5104bp ingegnerizzato nel laboratorio del Prof. M. Klymkowsky presso l'University of Colorado, Boulder, U.S.A contenente una GFP caratterizzata da una mutazione della Serina in posizione 65 in Treonina che rende il vettore più efficiente nello *Xenopus* (Fig. V).

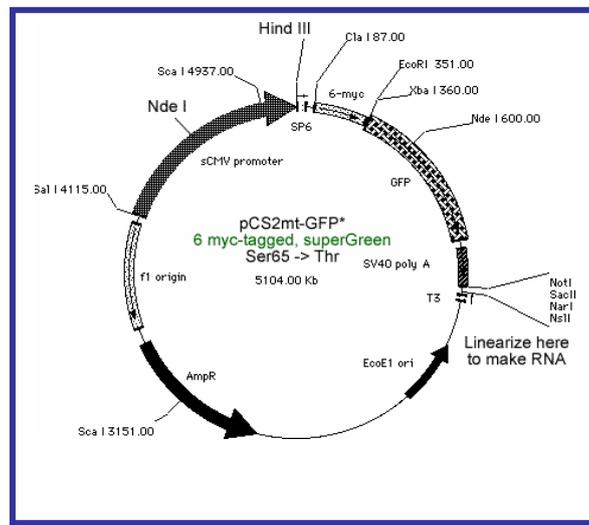


Fig. V. Rappresentazione schematica del vettore pCS2+MT-GFP

3 Clonaggi

3.1 Strategia di clonaggio per sema 4c e 4g

Le sequenze geniche codificanti sema 4c e sema 4g sono state estratte dai vettori sema4c-pCS2+ e sema4g-pCMV-SPORT6 (gentilmente donati da A. Borchers, Università di Gottingen, Germania) e sono state clonate nel vettore pCS2+MT, vettore adatto alla microiniezione in organismi eucariotici e in particolare in *Xenopus laevis*. Inoltre pCS2+MT contiene una sequenza myc a valle della quale le due sequenze (sema 4c e sema 4g *full lenght*) sono state inserite, ottenendo, al momento dell'espressione all'interno dell'organismo in cui viene utilizzato, un prodotto di fusione, proteina-tagmyc. L'ottenimento di un prodotto di fusione è necessario in quanto in commercio non sono reperibili anticorpi anti-sema4c e 4g per *Xenopus laevis*, in questo modo le due proteine possono essere riconosciute con un anticorpo anti-myc. Il clonaggio è stato effettuato utilizzando come metodica la PCR, poiché non c'era compatibilità tra i siti

per gli enzimi di restrizione presenti nei vettori sema4c-pCS2+ e sema4g-pCMV-SPORT6 e quelli posseduti dal vettore pCS2+MT. I *primers* sono stati disegnati a mano, in maniera da estrarre l'intera sequenza codificante le due semaforine, comprensive dalla 5'UTR alla 3'UTR per sema 4g e la CDS fino alla sequenza di Stop per sema 4c. Per favorire la reazione di ligasi tra il vettore, in cui si intende clonare e l'inserito da inserire, a tutte e quattro le sequenze dei *primers* sono state aggiunte, all'estremità 5', sequenze per gli enzimi di restrizione Xho I (Roche) (per il *primer forward*) e Xba I (Roche) (per il *primer reverse*) e due nucleotidi aggiuntivi per ciascuna sequenza nel caso di sema 4g. Lo stesso è avvenuto per i *primers* per estrarre sema 4c. I siti per gli enzimi inseriti a livello dei primers in questo caso sono stati: Eco RI (Invitrogen) (per il *primer forward*) e Xba I (Roche) (per il *primer reverse*). I nucleotidi aggiuntivi serviranno per favorire la successiva digestione, dei frammenti da clonare, con gli enzimi Xho e Xba I (per sema 4G) ed Eco RI e Xba I (per sema 4c). Anche il vettore pCS2+MT possiede i siti per gli stessi enzimi di restrizione.

<i>Primers</i> sema 4g	<i>direzione (5'→3')</i>	nt	Tm	Enzima aggiunto	nt aggiunti per migliorare il taglio
<i>Forward</i>	ATCTCGAGCCGGGAGCTGGAGG	24	74°C	Xho CTCGAG	AT
<i>Reverse</i>	AGTCTAGACTACACAGAACTTTCATC	26	72°C	Xba TCTAGA	AG

<i>Primers sema 4c</i>	<i>direzione (5'->3')</i>	<i>nt</i>	<i>Tm</i>	<i>Enzima aggiunto</i>	<i>nt aggiunti per migliorare il taglio</i>
<i>Forward</i>	ACGAATTCATGTTTCCCAGCTGCTTC	26	76°C	EcoR I GAATTC	AC
<i>Reverse</i>	AGTCTAGATCAAACAGATGATTCTTC	26	68°C	Xba TCTAGA	AG

3.2 *PCR preparativa*

Reazione di PCR preparativa per amplificazione sequenze da clonare: 35 µL H₂O, 10 µL buffer 2X, 1.5 µL MgSO₂ (1.5 mM), 0.5µL *forward* (0.1 mM), 0.5µL *reverse* (0.1 mM), 1.5µL dNTP (3 mM), 0.5µL campione (30ng) 0,5 µL Pfx (invitrogen). Gli amplimeri ottenuti sono stati purificati col kit PCR *PURIFICATION* (invitrogen) e sottoposti a doppia digestione con gli enzimi di restrizione Xho e XbaI, così come il vettore pCS2+MT. Reazione di digestione del vettore pCS2+MT: pCS2+MT 4.0 µL (2µg), Xho 1.0 µL, XbaI 1.0 µL, buffer 10X 2.0 µL e H₂O 12.0 µL. Il tutto posto in reazione per 4h a 37°C. Reazione di digestione delle reazioni di PCR: prodotto di PCR 35 µL, Xho 1.0 µL, XbaI 1.0 µL, buffer 10X 5.0 µL e H₂O 8 µL. Lasciato a reagire per 6h a 37°C. Tutti e tre i prodotti di digestione sono stati purificati col kit PCR *PURIFICATION* (invitrogen). In questa maniera le estremità dei frammenti purificati sono state rese compatibili con quelle del vettore di espressione pCS2+MT sottoposto al medesimo trattamento.

3.3 Reazione di ligasi

A questo punto è stato possibile eseguire la reazione di ligasi tra il vettore pCS2+MT e i due frammenti genici. Per ogni clonaggio è stata effettuata la medesima reazione di ligasi, dato che il vettore era lo stesso e le sequenze degli inserti hanno lunghezze simili. Sono stati usati diversi rapporti molari tra vettore e inserti. I rapporti vettore/inserto utilizzati sono: 1:0 (vettore 50ng, buffer 10X 1 µL, inserto 0ng T4 (Invitrogen) 1 µL e H₂O 7µL), 1:2 (vettore 50ng, buffer 10X 1 µL, inserto 58ng, T4 1 µL e H₂O 6.5µL) e 1:6 (vettore 50ng, buffer 10X 1 µL, inserto 174ng, T4 1 µL e H₂O 5.5µL). Tutte sono state poste a 16°C O.N. Successivamente 2 µL di ogni reazione sono stati trasformati in cellule di *E.coli* del ceppo DH5α competenti

3.4 Trasformazione

200 µL di soluzione contenenti cellule del ceppo DH5α di *E. coli*, chimicamente competenti, sono state trasformate utilizzando 2 µL di ogni reazione di ligasi e poste in ghiaccio per 60 minuti alla fine dei quali sono state incubate a 42°C per 2 minuti e subito rimesse in ghiaccio per 5'. In seguito vengono diluite attraverso l'aggiunta di 800µL e poste in agitazione a 170 rpm per 1h a 37°C. Il tutto viene centrifugato per 3 minuti a 5000 rpm. Dopo aver eliminato 900µL di surnatante, il sedimento ottenuto è stato risospeso nel volume rimanente (circa 100 µL) e piastrato su LB-agar in presenza di ampicillina 100µg/ml. Le singole colonie ottenute sono state selezionate mediante PCR (utilizzando come *primers* le sequenze realizzate per l'estrazione dei frammenti) e i cloni ipoteticamente positivi sono stati sottoposti a minipreparazione utilizzando il kit *PURE PLASMID ISOLATION* (ROCHE). 150ng di ogni clone sono stati inviati e sequenziati presso la ditta *PRIMM* con risultato positivo.

3.5 Strategia di clonaggio per sema 4b

Le sequenze geniche codificanti sema 4b in pCMV-Sport6 (gentilmente donati da *Annette Borchers*) sono state clonate nel vettore pCS2+MT. Il clonaggio è stato effettuato per digestione in quanto l'inserto e il vettore avevano siti per enzimi di restrizione comuni e non interne al frammento da clonare. Quindi il vettore sema 4b in pCMV-Sport6 è stato digerito con Eco RI (Invitrogen) e XbaI, altrettanto il vettore PCS2+MT. Reazione di digestione sema 4b in pCMV-Sport6 per estrazione del frammento sema 4b: H₂O 6.0 µL, EcoR I 1.0 µL, XbaI 1.0 µL, buffer 10X 2.0 µL e sema4b-pCMV-Sport6 10.0 µL (2µg). In reazione per 4h a 37°C. Reazione di digestione PCS2+MT: PCS2+MT 4.0 µL (2µg), Xho 1.0 µL, XbaI 1.0 µL, buffer 10X 2.0 µL e H₂O 12.0 µL. In reazione per 4h a 37°C. Entrambe i prodotti vengono purificati col kit PCR *PURIFICATION* (Invitrogen). La reazione di ligasi fino al buon esito del clonaggio avvengono come già descritto in precedenza. Tutte le PCR, le digestioni e le purificazioni sono verificate su gel d'agarosio allo 0.8% in TBE e caricando i marcatori di peso molecolare (Biolab).

3.6 Clonaggio ribosonde

Per effettuare le ibridazioni *in situ* e poter apprezzare la localizzazione di gipc2 è stata costruita una coppia di *primers* (gli stessi realizzati per le RT-PCR) utilizzata per l'estrazione di un frammento di 500bp, di gipc2, dal vettore pCS2-GFP-gipc2. Il frammento è stato clonato nel vettore pCRII utilizzando il kit di clonaggio *TACLONING DUAL PROMOTER* (Invitrogen). Avvenuto il clonaggio si è proceduto alla digestione di quest'ultimo con l'enzima di restrizione Bam HI, il vettore digerito è stato purificato e la *riboprobe* è stata ottenuta per trascrizione *in vitro* utilizzando il kit RNA

labeling (SP6/T7) (ROCHE), e nello specifico la trascrittasi T7.

4 Preparazione di cellule batteriche competenti DH5α di E. coli

Per la preparazione di cellule batteriche chimicamente competenti, una colonia di cellule è stata trasferita, dopo una notte di crescita a 37°C, su terreno solido in 5 mL di terreno liquido e lasciata in agitazione a 37°C fino ad un OD_{600nm} pari a 0,6. Le cellule sono state centrifugate per 5 minuti a 3500 rpm a 4°C ed il sedimento è stato risospeso in 5 mL di una soluzione di cloruro di magnesio 100 mM freddo e incubato in ghiaccio per 60 minuti. Infine, dopo un'ulteriore centrifugazione il sedimento cellulare è stato risospeso in 3 mL di cloruro di calcio 85 mM contenente glicerolo al 15%. Dopo tale procedura sono state preparate aliquote di 100 µL di sospensione cellulare conservate a -80°C. Tutte le operazioni sono state condotte in condizioni di sterilità.

5 Terreno di coltura

Ho usato il terreno LB (Luria-Bertani). Il mezzo di coltura liquido è stato preparato sciogliendo in acqua: 1% triptone, 1% NaCl e 0.5% di estratto di lievito. Mentre il terreno solido è stato ottenuto dal mezzo liquido mediante l'aggiunta di agar alla concentrazione finale di 1,5% quale agente gelificante (Sambrook, et al., 1982).

6 Antibiotici

L'ampicillina (Sigma Aldrich, Milano, Italia) è stata usata ad una concentrazione finale nei mezzi di coltura di 100 µg/mL. La gentamicina (Fermentas) è stata usata ad una concentrazione finale di 50 µg/mL in MMR 0.7%.

7 *Microiniezioni in embrioni di Xenopus laevis*

Le microiniezioni (Fig. VI) vengono eseguite con un microiniettore Drummond Nanoject II, che consente l'iniezione di volumi compresi tra 2.3 nl e 73.6 nl ad incrementi discreti. L'iniettore è montato su un micromanipolatore Narishige che ne permette lo spostamento macrometrico nelle tre dimensioni e di un movimento micrometrico controllato idraulicamente lungo una direzione predefinita. L'iniezione viene seguita mediante osservazione con uno stereomicroscopio. Gli aghi sono preparati con un *puller* per tiratura a caldo a partire da capillari nanoject del diametro di 0.53mm forniti da Drummond: la loro "bontà" è controllata allo stereomicroscopio. Prima di essere montati sul microiniettore gli aghi sono riempiti di olio minerale con una siringa. Il caricamento degli aghi con la soluzione da iniettare è eseguito dal microiniettore stesso: alla soluzione da iniettare viene aggiunto il rosso fenolo, un colorante vitale, utile per seguire sia il caricamento dell'ago che la microiniezione. Al momento della microiniezione gli embrioni vengono trasferiti in una piastra Petri del diametro di 5 cm, sul fondo della quale è fissata una reticella metallica, con maglie di 1 mm, che ne limita gli spostamenti. Le gelatine che circondano l'embrione devono essere eliminate per favorire la penetrazione dell'ago. La degelatinazione avviene mettendo in agitazione gli embrioni prescelti per la microiniezione con Ringer FS a pH 9 contenente β -mercaptoetanolo 0,314%, la soluzione viene allontanata lavando ripetutamente gli embrioni con Ringer1/10. Gli embrioni sono pronti ad essere microiniettati in uno dei blastomeri dello stadio a due cellule. Dopo la microiniezione, gli embrioni sono allevati in una soluzione di 3% Ficoll in Ringer che consente di contenere un eventuale fuoriuscita di citoplasma dovuto all'iniezione e fornisce un maggior sostegno all'embrione degelatinato. In *Xenopus laevis* il primo solco di segmentazione determina

la simmetria bilaterale dell'embrione, pertanto, definisce il futuro lato destro e sinistro, quindi, la microiniezione in un blastomero di un embrione formato da due cellule riguarderà o il lato destro o quello sinistro e l'altro lato fungerà da controllo interno dell'esperimento.

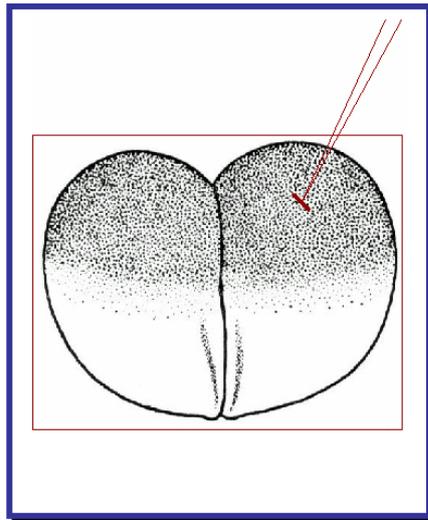


Fig. VI. Rappresentazione grafica della microiniezione del vettore in un embrione di *Xenopus laevis* allo stadio di due cellule.

Per gli esperimenti di questa tesi è stato iniettato un volume di 4,6 nl contenente diverse soluzioni a seconda dell'esperimento da eseguire. Ogni miscela contiene il messaggero di GFP, per seguire la discendenza cellulare del blastomero iniettato in embrioni vivi e la β -galattosidasi per mostrare il lato iniettato anche successivamente alla procedura di ibridazione. La fluorescenza emessa dalla GFP e la colorazione dovuta alla β -galattosidasi sono controllate attraverso l'impiego di uno stereomicroscopio a fluorescenza Leica MZ16F, invece la β -galattosidasi è resa visibile in seguito a colorazione.

Di seguito elenco le miscele utilizzate per la microiniezione dei vari mRNA impiegati:

- 300pg GFP 400pg β -GAL (per embrioni controllo)
- 100pg eif6 300pg GFP 400pg β -GAL (per iperespressione)

- 200pg eif6 300pg GFP 400pg β -GAL (per iperespressione)
- 300pg eif6 300pg GFP 400pg β -GAL (per iperespressione)
- 400pg eif6 300pg GFP 400pg β -GAL (per iperespressione)
 - 1ng gipc2 GFP 400pg β -GAL (per iperespressione)
- 7,5ng mo-eif6 300pg GFP 400pg β -GAL (per knock-down)
- 40ng mo-gipc2 GFP 400pg β -GAL (per knock-down)
- 400pg eif6 1ng p110* 300pg GFP 400pg β -GAL (per recupero fenotipo)
- 400pg eif6 1ng gipc2 300pg GFP 400pg β -GAL (per recupero fenotipo)
- 10ng moSema4C GFP 400pg β -GAL (per knock-down)
- 10ng moSema4G GFP 400pg β -GAL (per knock-down)

7.1 β -GAL staining

Ogni miscela utilizzata per la microiniezione di embrioni contiene 400pg di β -galattosidasi. Gli embrioni iniettati vengono selezionati ad un determinato stadio e prima di essere sottoposti a metodiche di ibridazione *in situ* viene effettuato il β -GAL staining che consente di identificare le parti dell'embrione interessate dalla microiniezione. Questa è una colorazione permanente, resistente anche a numerosi lavaggi. Gli embrioni vengono fissati per 30' in MEMFA e lavati rapidamente per tre volte in PBS, sono quindi posti in una soluzione composta da: $K_4Fe(CN)_6$ 5mM, $K_3Fe(CN)_6$ 5mM, Magenta gal 1.0 mg/mL, $MgCl_2$ 2mM in PBS il tutto è messo a 37°C al buio fino alla formazione del prodotto di reazione visibile, color magenta, tra l'enzima e la miscela substrato. Gli embrioni vengono nuovamente lavati in PBS e lasciati altri 30' in MEMFA, infine vengono disidratati con passaggi in etanolo 50%, 75% e infine 100% e conservati fino al momento dell'impiego.

8 *knock-down di eif6*

Data la difficoltà di ottenere uno *Xenopus laevis* in cui indurre silenziamento genico mediante trans-genesi ho utilizzato una serie di oligonucleotidi morfolino inducendo un parziale silenziamento. Esperimenti di *down*-regolazione della proteina eif6 sono stati effettuati micro-iniettando, in un blastomero di un embrione allo stadio di due cellule, morfolino-eif6 (7.5 ng) insieme all'mRNA della GFP (300 pg) e ad 400pg di β -galattosidasi. Come controllo negativo è stato iniettato un morfolino *mispaired* (7,5 ng), in modo da poter riconoscere gli effetti specifici dell'iniezione dell'oligonucleotide sperimentale; lo stesso ho fatto iniettando il morfolino-gipc2, gentilmente donatoci dal prof. Klein dell'University of Pennsylvania e per sema 4c e sema 4g.

morfolino	sequenza	ditta
eif6	5'-GCGGACGGCCATGTTGGCTTCTTAG-3'	Gene Tools LLC, Philomath, OR, USA
<i>mispaired eif6</i>	5'-GCcGACcGCCATcTTGcCTTCTaAG-3'	Gene Tools LLC, Philomath, OR, USA
<i>gipc2</i>	5'-AGAGGCATCTTTCTTTCAGCGAAGG-3'	Gene Tools LLC, Philomath, OR, USA
<i>mispaired gipc2</i>	5'-TCTTAACCCCAATCCGACAGGCAT-3'	Gene Tools LLC, Philomath, OR, USA
<i>sema4g</i>	5'-TTGTAAGAATCCCCAGTTTTCCAGA-3'	Gene Tools LLC, Philomath, OR, USA
<i>sema4c</i>	5'-AGCTGGGAAACATTGCCACGACGTT-3'	Gene Tools LLC, Philomath, OR, USA

9 Trascrizione in vitro

Gli mRNA da iniettare sono stati ottenuti mediante trascrizione in vitro usando il kit mMESSAGE (Ambion). Ho digerito i vettori pCS2+ con NotI. Ho purificato il linearizzato con fenolo/cloroformio, l'ho precipitato in etanolo e risospeso in H₂O sterile. Per effettuare la reazione di trascrizione ho utilizzato 1 µg di plasmide linearizzato ed ho aggiunto tutto il necessario: 6 µL tot di DNA in H₂O sterile, 10 µL dNTPCAP 2X, 2µl di tampone di trascrizione 10X, 2 µl Sp6 RNA polimerasi. Tutti i reagenti devono vengono maneggiati con guanti sterili e tenuti in ghiaccio. La reazione si svolge per 2 ore a 37°C al termine delle due ore ho aggiunto 20U di DNAsi (enzima che elimina il vettore digerito utilizzato come stampo) per 20 minuti a 37°C. La soluzione è purificata da frammenti di DNA e elementi della reazione attraverso caricamento su colonnina cromatografia di gel filtrazione contenente resina G50 (*mini Quick spin RNA; Roche*), e mediante centrifugazione a 3500 rpm per 4 min l'mRNA è separato dal resto della miscela. La concentrazione dell'mRNA è ricavata mediante lettura spettrofotometrica effettuata al nanodrop (*Thermo Scientific*).

10 Animal caps

In una blastula avanzata di *X. laevis* si possono distinguere la calotta animale, la base vegetativa e, una posizione intermedia tra le due, la zona marginale che si involge. In particolare la calotta animale corrisponde al tetto del blastocele e comprende, allo stadio 9, il territorio dell'ectoderma destinato a dare sia l'epidermide di rivestimento sia il neuroectoderma dal quale si formerà il sistema nervoso. Essendo interessati al *pathway* di igf che controlla la formazione sia dell'occhio che del rene e in maniera generale la formazione della parte anteriore dell'embrione di *Xenopus laevis*, ho effettuato espianti

della calotta animale in maniera da arricchire i fattori presenti nelle zone di interesse. Gli espianti ectodermici o “*animal cap*” sono effettuati in piastre Petri ricoperte con gel di agarosio all’1%, contenenti MMR 0,7% (NaCl 100mM, KCl 1.8mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 2mM, Hepes 5mM e H₂O; pH 7.4) e gentamicina (50µg/ml). Il gel di agarosio non permette ai tessuti embrionali, che risultano essere molto appiccicosi, di rimanere adesi al fondo della piastra. Invece la gentamicina è un antibiotico capace di ostacolare la crescita sia di batteri Gramm positivi che negativi, proteggendo quindi gli espianti da eventuali infezioni esterne.

Gli *animal cap* sono stati eseguiti a stadio di blastula tardiva (stadio 9) e coltivati, nelle stesse piastre dove viene effettuato l’espianto fino allo stadio. La microdissezione della calotta animale viene effettuata con delle pinzette molto appuntite: si rimuove l’involucro vitellino, così da favorire il taglio della calotta animale che viene lasciata in piastra, mentre le parti residue dell’embrione vengono allontanate. È necessario rimuovere eventuali cellule vegetative aderenti al *cap*. In pochi minuti l’*animal cap* si arrotonderà su se stessa fino a formare una struttura sferica. Per favorire questo processo è necessario rallentare il normale sviluppo embrionale, abbassando la temperatura esterna fino a 16°C. Gli *animal caps* così ottenuti vengono fatti crescere per diverse ore oppure anche per una notte finché non raggiungono lo stadio di interesse che si valuta guardando lo sviluppo di embrioni “gemelli”.

11 Western blotting

Come campioni per effettuare i Western blottings ho utilizzato sia *animal caps* allo stadio 20 (neurula tardiva) che embrioni interi. Quando i campioni erano l’estrazione delle proteine in essi contenute sono state effettuate in *lysis buffer* (TRIS 20mM pH7.5,

NaCl 140mM, glicerolo 10%, DTT 1mM, sodio vanadato 2mM, NaF 25mM, Nonidet 1%, e gli inibitori delle proteasi (Sigma): 2mM TAME (N-tosyl-arginina-metil estere), 5mg/ml SBTI (*trypsin inhibitor from Soybean*), 5µ/ml aprotinina e 10µM E64 (trans-epoxysuccinil-leucilammide-3-metilbutano), tampone che preserva le fosforilazioni. Nel caso invece di estratti da embrioni interi, la loro omogeneizzazione è avvenuta in HEPES buffer a pH 7,5 (0,9M glicerolo, 0,02% NaN₃, 1mM ATP, 1mM DTT, 25mM HEPES) e inibitori nelle stesse proporzioni usate per gli estratti precedenti. In ogni caso i campioni sono sottoposti a tre centrifugazioni a 13000 rpm (rivoluzioni per minuto) per 30 minuti a 4°C e ad ogni passaggio viene prelevato il sovrantante contenente la frazione proteica. Le centrifugate ci aiutano ad allontanare la frazione insolubile (costituita da particolati e pezzi di membrana) e la porzione dei globuli di vitello, (non presente negli *animal cap*). Successivamente è stata determinata la concentrazione delle proteine totali estratte con il metodo BCA (Pierce, Rockford, IL). In seguito i campioni sono stati bolliti in *sample buffer* riducente contenente 50mM Tris-HCl pH 6.8, 69mM SDS, 0,028mM blu di bromofenolo, 1mM DTT (ditiotreitolo) e β-mercaptoetanololo al 5%. 40γ di ogni campione, viene caricato su gel al 10% in condizioni denaturanti, SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), utilizzando come riferimento una miscela di proteine a peso molecolare noto (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA). L'elettroforesi delle proteine è stata eseguita secondo il metodo di Laemmli (1970). Il *Western blotting* è stato eseguito su membrana di nitrocellulosa Protran (Schleicher and Schuell). Il gel e il foglio di nitrocellulosa vengono racchiusi da fogli di carta da filtro, impregnati precedentemente dalla soluzione di trasferimento (TRIS 0.02M, glicina 0.13M e metanolo in percentuale variabile a seconda del peso molecolare della proteina da rilevare), il tutto è tenuto insieme due lastrine in plastica, e

posto in una cameretta da trasferimento. Viene applicato un campo elettrico, attraverso l'impiego di un trasformatore ottenendo il trasferimento delle proteine dal gel al foglio di nitrocellulosa in questo modo si ottiene un'impronta fedele delle bande proteiche contenute nel gel. Il trasferimento è stato effettuato per circa 2h a 400mA a 4°C. L'efficienza del trasferimento è stata valutata colorando il foglio di nitrocellulosa con Ponceau S (Sigma) il cui legame, alle proteine presenti sul filtro, è labile e che quindi può essere allontanato semplicemente con acqua prima di procedere con i lavaggi successivi, il gel corrispondente viene colorato con Coomassie Brilliant Blue (Biorad) alla concentrazione finale dello 0,1% in 20% etanolo. La nitrocellulosa (NC) è incubata con 3% BSA (albumina di siero bovino) in TBS (TRIS 10mM, NaCl 154mM e H₂O; pH 7.4) per 2h a 37°C, affinché i siti di legame aspecifici per le proteine siano bloccati. Dopo abbondanti lavaggi in TBS la NC, precedentemente tagliata, in maniera tale da poter avere sullo stesso filtro la reazione con diversi anticorpi, è incubata con anticorpo primario per due ore a temperatura ambiente oppure per tutta la notte a 4°C a seconda dell'anticorpo utilizzato. Per eliminare l'anticorpo che non si è legato alle proteine sul filtro, effettuo una serie di lavaggi con 0.1% triton in TBS soluzione che poi conterrà l'anticorpo secondario che a seconda dei casi sarà anti-*mouse* o anti-*rabbit* coniugato a per ossidasi di rafano esso reagirà per 1h a temperatura ambiente. Dopo abbondanti lavaggi è effettuata la rivelazione per chemiluminescenza mediante incubazione con ECL (PIERCE).

12 Immunoprecipitazione

È una metodica che consente di isolare una proteina di interesse da un estratto proteico. Embrioni di *Xenopus*, iniettati con il trascritto di *kermi-2/GFP*, sono stati omogenati in

tampone HB a pH 7,5 (0,9M glicerolo, 0,02% NaN₃, 1mM ATP, 1mM DTT, 25mM HEPES) contenente i seguenti inibitori proteasici (Sigma): 2mM TAME, 5mg/ml SBTI, 5μ/ml aprotinina e 10μM E64. I campioni sono stati centrifugati a 13000 rpm per 45 minuti a 4°C. In un'aliquota dell'estratto proteico, così ottenuto, è stato aggiunto l'anticorpo anti-eIF6 (1μL), per isolare la proteina eif6 e le componenti ad essa legate dal resto della soluzione; analogamente in un'altra aliquota è stato aggiunto l'anticorpo anti-GFP (2μL) per il riconoscimento della proteina gipc2-GFP; in entrambi i casi si porta a un volume di 200μL con il tampone. I due lisati sono stati incubati per 2h a 4°C per consentire la formazione del complesso antigene-anticorpo. In seguito si prelevano 100 μl di Proteina A legata a palline di sefarosio (*beads*) e si centrifugano per 5' a 5000 giri a temperatura ambiente. La proteina A serve a rimuovere dalla soluzione il complesso antigene anticorpo ed adsorbirla sulle palline. Successivamente le *beads* vengono aggiunte all'*ependorf* contenente il campione, si pone in agitazione per 1-1-30 h a 4°C. Il campione viene centrifugato per 5' a 5000 giri a 4°C in modo che le *beads*, insieme al complesso antigene-anticorpo, precipitino sul fondo dell'*ependorf*; Una volta eliminato il sopranatante vengono aggiunti 300 μl di tampone. Si pone il campione sulla giostrina per 5' a 5000 giri e successivamente si effettuano degli sciacqui in tampone in modo che tutto ciò che non si è legato possa essere eliminato. Si aggiunge, poi, *sample buffer* e si lascia bollire per 5'. È stata eseguita una corsa elettroforetica dei campioni di IP con i due anticorpi, utilizzando un gel di poliacrilammide 10%. Si effettua poi un *western blot* con gli anticorpi primari anti-eIF6, anti-GFP, anti-tubulina monoclonale (1:500). La rivelazione in questo caso è stata effettuata mediante reazione colorimetrica con il substrato della fosfatasi alcalina (NBT-BCP), quindi l'anticorpo secondario utilizzato è stato l'anti-*rabbit* coniugato alla

fosfatasi alcalina (1:30.000) per l'anti-GFP e anti-eIF6; anti-*mouse* (1:7500) per l'anti-tubulina.

13 Anticorpi

Gli anticorpi da me utilizzati sono stati:

- Rabbit anti-Eif6 gentilmente donato dal prof. S. Biffo, DIBIT, San Raffaele, Milano
- Rabbit anti-GFP (Santa Cruz)
- Mouse anti-tubulina (Sigma)
- Goat anti-mouse IgG-Alkaline Phosphatase (Sigma)
- BODIPY FL goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes)
- Texas red goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes)
- Mouse anti- β -catenina (Santa Cruz)
- HRP goat anti-rabbit (Pierce)
- HRP goat anti-mouse (Pierce)
- Mouse anti-AKT (Cell Signaling)
- Rabbit anti-p-AKT (Santa Cruise)
- Rabbit anti-MAPKs (Invitrogen)
- Rabbit anti-p-MAPKs (Invitrogen)
- Rabbit anti-Bcl2 (Santa Cruise)
- Rabbit anti-Bax (Calbiochem)

14 Estrazione RNA per RT-PCR e Real-Time PCR

L'RNA totale è stato estratto da embrioni allo stadio 19 usando il *Tri-Reagent* (Sigma) in base alle indicazioni del fornitore. L'*RT* è stata effettuata usando il Kit *SuperScript*

VILO cDNA Syntesis (Invitrogen) in un apparecchio Gene-Amp PCR System 2400 (Applied Biosystem Branchburg, NJ, USA). La RT-PCR è una variante della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) che abbina l'azione della trascrittasi inversa con l'amplificazione per PCR. La trascrittasi inversa è un enzima in grado di retrotrascrivere RNA in cDNA. In questo modo, a partire dalle molecole di RNA estratto dalle cellule da studiare si sintetizza cDNA usando come innesco oligo (dT) che appaiandosi con le code poliadenilate degli RNA messaggeri ne favoriscono la retrotrascrizione, oppure random hexamers che si appaiano in modo casuale con i vari RNA presenti.

I *primers* utilizzati per le RT-PCR sono in tabella:

gipc2	Forward	ATGCCTCTGGGATTGCGCGTAAAG
	Reverse	TTAACTTTGTCAATCGTGCTCTC
β-catenina	Forward	AGATGCAGCAACTAAACAGGA
	Reverse	GTACTGCATTTTGAGCCATCT
hsth4	Forward	CGGGATAACATTCAGGGTA
	Reverse	TCCATGGCGGTAAGTCTC

14.1 Real-Time PCR

La real-time PCR, denominata “PCR quantitativa” permette di determinare in tempo reale la quantità di DNA amplificato utilizzando tecniche di fluorescenza capaci di permettere di monitorare l'andamento dell'amplificazione. La fluorescenza è data da un agente intercalante *Syber green* che si intercala tra le coppie di basi ed emette luce verde quando è eccitato ad una certa lunghezza d'onda. La fluorescenza emessa è

proporzionale alla quantità di prodotto che si accumula e viene captata da un rilevatore e trasmessa ad un computer. In questo modo si riesce a quantificare il cDNA di partenza. La *Real-Time PCR* è una metodica da noi applicata per studiare le variazioni di espressione in campioni iniettati (eif6, gipc2) e iniettati controllo (GFP). In questo caso è stata valutata l'espressione di eif6 nei mogipc2 e viceversa utilizzando quale normalizzatore il messaggero odc. I *primers* per la *Real-Time PCR* sono stati costruiti senza l'impiego di software informatici:

Primers eif6	Sequence (5'→3')	Lunghezza	Tm	GC%
Forward	ATGACTACGTGGCTCTTG TG	20	60	50.00%
Reverse	GACCTGAAGCAGAGAAGACA	20	60	50.00%
Lunghezza amplificato	206			

Primers gipc2	Sequence (5'→3')	Lunghezza	Tm	GC%
Forward	TGCCACTGTAGAAGAAATG	19	54	42.00%
Reverse	CTCCCCAGACATCAAAGACA	20	60	50.00%
Lunghezza amplificato	221			

Primers odc	Sequence (5'->3')	Lunghezza	Tm	GC%
Forward	GTGGCAAGGAATCACCCGAA	20	62	55%
Reverse	TCAAAGACACATCGTGCATC	20	58	45%
Lunghezza amplificato	236			

Le reazioni sono state effettuate in tre diluizioni e ognuna in triplicato.

15 Fissazione embrioni

Gli embrioni utilizzati per immunofluorescenza su sezione sono stati fissati con formalina 4% in PBS (*Phosphate Buffer Saline*: 0.154M NaCl, 0.014M KH₂PO₄, 0.053M Na₂HPO₄, pH 7.2-7.4) a 4°C con tempi di fissazione diversi in base allo stadio dell'embrione. In particolare, dallo stadio 3 allo stadio 32 il tempo richiesto è 1h e 15'; dallo stadio 32 allo stadio 40 è di 1h e 30'; dallo stadio 40 in poi è di 2h. Successivamente ho effettuato due lavaggi con PBS ed uno in metanolo 100%, infine, gli embrioni sono stati conservati in metanolo a -20°C. I campioni utilizzati per ibridazione "in toto" sono stati fissati in MEMFA (100mM MOPS, 2mM EGTA, 1 mM MgSO₄, formalina 4%), per un tempo diverso a seconda dello stadio di sviluppo: 1h e 15' per gli embrioni fino a stadio 14, 1h e 30' per gli embrioni fino a stadio 24, 2h per embrioni stadio 32-45. Trascorso il tempo di fissazione gli embrioni sono stati sottoposti a passaggi di disidratazione e conservati in etanolo assoluto a -20°C.

16 Immunofluorescenza su sezioni

Gli embrioni precedentemente fissati con formalina 4% in PBS e conservati in metanolo a -20°C , sono stati poi lavati in PBS 1X e lasciati sempre in PBS 1X per circa 30'; dopodichè sono stati trasferiti in Killik, resina di contenimento dell'embrione, a temperatura ambiente per 30'. Successivamente il campione è stato orientato in base alle nostre esigenze in apposite cellette contenente Killik, trasferito nel criostato, dove è stato messo a raffreddare per circa 40' ed infine, una volta pronto il pezzo, è stato possibile procedere al taglio al criostato, tarato ad una temperatura di -30°C , effettuando delle fette dello spessore di circa $7\ \mu\text{m}$ che sono state poste su vetrini Super Frost e lasciate asciugare per circa 1h e 30'; si è poi passati alla colorazione. Spesso sezioni alternate sono state sistemate su 2 vetrini in parallelo. I vetrini sono stati lavati in PBS per 5'; per bloccare le aspecificità le sezioni sono state incubate con 3% *normal goat serum* per 20' e in seguito con anti-p27^{BBP}/eIF6 (1:500) o anti-GFP (1:500) diluiti in una soluzione di 0.5% BSA, 0.1% TritonX-100 in PBS, o.n. a 4° . L'anticorpo primario è stato allontanato facendo lavaggi di 10 min in PBS. Per l'immunofluorescenza le sezioni sono state incubate con l'anticorpo secondario anti-rabbit IgG coniugato a BODIPY-FL (1:200) o Texas red (1:200) per 45 min a temperatura ambiente. Successivamente le sezioni sono state trattate con DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole, SIGMA) (1:1000) per 10 min, al fine di marcare i nuclei delle cellule. I vetrini sono stati ancora lavati in PBS per 10 min e poi montati con glicerolo:PBS (9:1). Le sezioni sono state quindi osservate al microscopio a fluorescenza Leica CTR 6500 UV collegato a PC con scheda di acquisizione di immagini.

17 Ibridazione “in toto”

Le *riboprobes* antisenso sono state sintetizzate mediante trascrizione in vitro.

Sonda	Enzima di restrizione	RNA polimerasi
<i>otx2</i>	EcoRI	Sp6
<i>pax 6</i>	EcoRI	Sp6
<i>rax1</i>	BamHI	T7
<i>six3</i>	Nco I	T7
<i>sox2</i>	Xba I	T7
<i>fgf8</i>	Xba I	T3
<i>en2</i>	Xba I	T3
<i>egr2</i>	EcoR I	T7
<i>gipc2</i>	BamHI	T7
<i>rbpms</i>	BamHI	T7
<i>lhx1</i>	Xba I	Sp6
<i>myod 1</i>	Bam H1	Sp6
<i>nr-1</i>	EcoRV	Sp6
<i>clcnkb</i>	EcoRI	T7
<i>cdh16</i>	Apa I	Sp6
<i>scl5a9</i>	Sall	T7
<i>nphs1</i>	EcoR I	T7

I plasmidi sono stati linearizzati con gli enzimi di restrizione e purificati mediante estrazione in fenolo-cloroformio e precipitati in 2 volumi di etanolo assoluto tutto la notte a -20°C. È stata poi effettuata una centrifugazione a 13000 rpm per circa 10 minuti ed il pellet ottenuto è stato lavato due o tre volte in etanolo 70% freddo. Il DNA plasmidico è stato risospeso in 10µL di H₂O sterile. 1 µL del vettore digerito è stato quantizzato al nanodrop e 150ng sono controllati su gel d'agarosio allo 0.8% in TBE. Per effettuare la reazione di trascrizione in vitro mediante il kit DIG-RNA labeling SP6-T7 (Roche) è stato utilizzato 1 µg di plasmide linearizzato ed è stato aggiunto tutto il necessario: 13 µl tot di DNA in H₂O DEPC, 2 µl dNTP mix 10X, 2 µl tampone di trascrizione 10X, 1 µl inibitori delle RNAsi, 2 µl RNA polimerasi. Tutti i reagenti devono essere maneggiati con guanti sterili e devono essere tenuti in ghiaccio. Si lascia procedere la reazione per 2 ore a 37°C. Nella miscela di NTP è presente UTP marcato con digossigenina; si ha in questo modo la sintesi di sonde marcate. Al termine della reazione di polimerizzazione sono state aggiunte 20U di DNAsi (per eliminare lo stampo) per 15 minuti a 37°C. La reazione è stata poi bloccata con EDTA (acido tetraetilendiamminico) a pH 8.00 alla concentrazione finale di 20mM. Il volume è stato portato a 70µl con H₂O DEPC ed è stato poi caricato su una colonnina cromatografia di gel filtrazione contenente resina G50 (colonnine mini Quick spin RNA della ditta Roche), per separare le ribosonde dal resto della soluzione. Dopo centrifuga a 3500 rpm per 4 minuti, l'eluato contenente le ribosonde è stato conservato in una provetta sterile a -20°C. L'avvenuta trascrizione e marcatura delle sonde è stata controllata su gel di agarosio al 1% in TBE a pH 7.5 e la quantizzazione del marcato è stata verificata al spettrofotometro NanoDrop 1000 Thermo Scientific, utilizzando il programma ND-1000 V3.6. Per gli esperimenti di ibridazione *in toto* è stata utilizzata la procedura

secondo Harland (1991) con piccole modifiche. Gli embrioni sono stati fissati in MEMFA come già descritto precedentemente. Al termine della fissazione, sono stati reidratati, lavati in PBTw (0,1% Tween-20 in PBS pH7,4), trattati con 10µg/ml di proteinasi K (SIGMA) per 20 minuti a temperatura ambiente. Gli embrioni sono stati poi brevemente trattati con 0,1 M trietanolamina e con 0,1 M trietanolamina e anidride acetica e, dopo vari lavaggi in PBTw, sono stati post-fissati con paraformaldeide al 4% in PBTw per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo un'altra serie di lavaggi in PBTw, gli embrioni sono stati preibridati per un tempo compreso tra 1 ora e 30 min. e 5 ore a 60°C nella miscela d'ibridazione contenente 50% formammide, 5XSSC (sodio salino citrato), 2 µg /ml tRNA, 100µg/ml eparina, 1X *denaturant solution*, 0,1% Tween-20, 0,1% CHAPS, 10mM EDTA. Successivamente alla stessa mix è stata aggiunta una quantità di sonda antisenso tale da avere una concentrazione finale di 1µg/ml; per ogni sonda utilizzata è stata posta in una miscela di reazione fatta bollire per 3' allo scopo di eliminare le strutture secondarie dell'mRNA e poi bloccata in ghiaccio. Ciascuna soluzione è stata aggiunta ai corrispettivi embrioni posti in *vials* (tubi di vetro sterili) e si è lasciato il tutto a 60°C per l'intera notte. Gli embrioni sono stati lavati in condizioni di alta stringenza in 2XSSC e 0,2XSSC a 60°C. Successivamente sono stati trattati con RNase A 20µg/ml in 2XSSC per 30 minuti a 37°C e poi sono stati incubati in una *blocking solution* formata da 2%BM blocking reagent (ROCHE) in MBT (100 mM di acido maleico, 150mM NaCl, pH7,5). In questa soluzione è stato diluito (1:2000) l'anticorpo anti-digoxigenina coniugato a fosfatasi alcalina (ROCHE) e gli embrioni sono stati incubati O.N. a 4°C. Il giorno dopo gli embrioni sono stati lavati per 5 ore in MBT 1X a temperatura ambiente e incubati per 20 minuti in 0,1% Tween-20 e 0,5mg/ml levamisole. La colorazione è stata effettuata

utilizzando BM purple (ROCHE) con l'aggiunta di 0,1% Tween-20 e 0,5 mg/ml levamisole a temperatura ambiente per alcune ore, fino a che la colorazione era soddisfacente. A questo punto si blocca la colorazione con MEMFA 1X. Gli embrioni sono stati poi depigmentati (*bleaching*) in 0,5XSSC, 5% formammide e 2% H₂O₂ alla luce per circa 2 ore. I campioni sono stati osservati e fotografati con stereomicroscopio Leica MZ16F.

18 Ricerca in banca dati

La ricerca bibliografica e gli allineamenti di sequenze sono state effettuate utilizzando il sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Inoltre, è stata svolta una duplice ricerca in banca dati utilizzando come programmi miRBase (Griffiths-Jones S et al., 2008) e miRanda (www.microrna.org). Entrambe sono delle banche dati di miRNA che attraverso i loro sistemi algoritmici riescono, data una sequenza, a ipotizzare se questa possa essere bersaglio di miRNA. La sequenza oggetto della mia ricerca è stata la 3'UTR di *gipc2*. Dapprima l'ho inserita in miRBase ottenendo un elenco di svariati miRNA che potessero avere *gipc2* come bersaglio. Per verificare ulteriormente se i miRNA ipotizzati da questo *data base* potessero avere un legame efficiente con *gipc2* ho utilizzato il programma miRanda, dove il raffronto viene fatto inserendo sia la sequenza della 3'UTR in esame che ogni singolo miRNA che si vuole rapportare ad essa. Molti miRNA vengono confermati e tra questi diversi sono, da letteratura, presenti nell'occhio, nel rene o in entrambe.

RISULTATI

PREMESSE

Nella mia tesi di dottorato ho studiato l'effetto della iperespressione e della perdita di funzione di *eif6* in due organi, l'occhio e il pronefro. Dal momento che in tali organi viene espressa la proteina *gipc2*, importante stazione di modulazione di segnali fondamentali per il differenziamento, la tesi ha approfondito il ruolo di *gipc2* in questi due organi, e il rapporto tra *gipc2* ed *eif6*. Ho mostrato poi che *eif6* interagisce con *igfr*, come del resto anche *gipc2*, modulando la risposta intracellulare a fattori di crescita *ifg-like*, in accordo con dati precedenti (Gandin et al., 2008) e con il fatto che gli *igfr* sono attivi sia nella organogenesi dell'occhio che probabilmente in quella del pronefro. Inizio con la descrizione dei dati riguardanti il fenotipo dell'occhio, per proseguire con quelli riguardanti il pronefro.

1 Iperespressione di eif6 e il fenotipo alterato dell'occhio

Va subito precisato che l'mRNA di *eif6* e la sua corrispondente proteina sono costantemente presenti nel campo dell'occhio durante la sua morfogenesi così come nel neuroectoderma (Vaccaro et al., 2006; De Marco et al., 2010b). A seguito di microiniezione di *eif6* in embrioni stadio 2 è stato visto che *eif6* interferisce con la formazione dell'occhio e più precisamente allo stadio 35 l'occhio del lato iniettato mostra una morfogenesi alterata, anche se allo stadio 42, questo recupera, suggerendo che il fenotipo variante dell'occhio sia dovuto ad un ritardo nella morfogenesi dell'organo, sostenuto fin quando la diluizione dell'mRNA di *eif6* non raggiunge livelli estremi durante l'embriogenesi. Ho allora studiato in dettaglio il fenotipo dell'occhio

negli iperespressi *eif6* e per prima cosa ho iniettato dosi crescenti dell'mRNA di *eif6* (da 100 pg a 400 pg), insieme con 300 pg dell'mRNA di *GFP* e/o di β -galattosidasi (400pg), in un blastomero di embrioni a 2 cellule di *X. Laevis*. Il lato non iniettato può essere considerato come ottimo controllo dei miei esperimenti dal momento che il primo piano di divisione coincide con l'asse di simmetria bilaterale e quindi divide l'embrione in due metà simmetriche. Allo stadio 35 gli embrioni iniettati con dosi elevate di mRNA (400 pg di mRNA di *eif6*) mostrano un'elevata percentuale (70%,n=98) di ritardo dello sviluppo dell'occhio nel lato corrispondente al blastomero iniettato. Gli occhi che ne risultano sono di dimensione ridotte o appaiono apparentemente assenti (Fig. 1a-1f). Gli embrioni iniettati con 100 pg di mRNA, hanno il 50% (n=90) di occhi ridotti. Chiamerò per comodità il ritardo oculare riscontrato a seguito di iniezione di *eif6* "fenotipo oculare". Gli embrioni iniettati anche con 400-700 pg dell'mRNA di *GFP* non hanno mostrato alcun difetto oculare (Fig. 1g and 1h). Allo stadio 42, quando la retina è matura, l'occhio del lato iniettato con *eif6* appare morfologicamente simile a quello del lato controllo (Fig. 1i and 1j). In *Xenopus*, i processi che regolano la sequenza di eventi morfogenetici dell'organogenesi dell'occhio, iniziano allo stadio di gastrula e di neurula precoce. La retinogenesi ha inizio intorno a st.24 e si completa allo stadio 45. Allo stadio 28 si ha un' invaginazione marginale dello strato della retina che si estende intorno alla vescicola ottica. Allo stadio 32, è chiaramente visibile il calice ottico a forma di ferro di cavallo. Allo stadio 37-38 i nuclei iniziano a disporsi in tre strati nella parte nervosa della retina, come in tutti i vertebrati. Il differenziamento delle cellule visive si completa a stadio 45. La retina matura è formata da tre strati cellulari distinti: lo strato esterno nucleare (ONL), lo strato interno nucleare (INL) e lo strato delle cellule gangliari (GCL). Si può

considerare *nrl* come il marker dell' ONL, *otx2* come quello dell' INL e *rbpms* come il marker del GCL. Nei tre strati si distinguono sette tipi cellulari che vengono sempre generati in un preciso *timing*: le cellule gangliari si differenziano per prime, seguite dai coni, dalle cellule amacrine, dai bastoncelli, dalle cellule bipolari e, infine, dalle cellule della glia di *Müller*. I progenitori retinici sono multipotenti a differenti stadi di sviluppo e la decisione su quale destino cellulare intraprendere può verificarsi durante o dopo l'ultima divisione mitotica, così che due cellule figlie di un certo progenitore possono intraprendere destini diversi (Turner e Cepko, 1987). Quindi mi sono chiesta se nel fenotipo oculare causato dall'iperespressione di mRNA-eIF6, ci fossero anche delle variazioni sul *timing* di formazione della retina. Ho quindi verificato attraverso esperimenti di ibridazione *in toto*, se gli embrioni che iperesprimono *eif6* presentino anche un'alterazione nei tempi della retinogenesi. Ho ibridato embrioni st.35 dal momento che lo stadio 35 presenta il fenotipo oculare più evidente e la retina è a buon punto della sua formazione, in particolare lo strato GCL è in fase differenziativa e lo strato INL incomincia a segregare nella parte centrale della retina (v. Decembrini et al., 2006). Dal momento che occorre studiare l'andamento del processo differenziativo della retina, ho eseguito ibridazioni *in situ* su sezioni congelate di iperespressi di *eif6*, e ho utilizzato markers precoci del campo dell'occhio e dell'encefalo (*pax6*) e markers di differenziamento della retina quali *otx2*, *rbpms*. Mentre *pax6* è distribuito omogeneamente negli abbozzi dell'occhio di ambedue i lati dell'embrione (Fig. 1k and 1l), *otx2* e *rbpms* si localizzano come atteso nel lato non iniettato dell'embrione (Fig. 1m and 1n), mentre nel lato iniettato i markers sono poco presenti o non sono ancora comparsi. Lo strato della retina pigmentata (RPE) è evidente in ambedue i lati dell'embrione. Inoltre, ho eseguito ibridazione *in situ* su sezioni, impiegando i marcatori

cerebrali *pax6* (espresso nel cervello e nell'occhio) in sezioni della parte anteriore e media del cervello, e *egr2* (cervello posteriore e creste neurali) a livello del cervello posteriore. I dati indicano che il cervello è morfologicamente normale negli iperespressi di *eif6* (Fig. 1o and 1p). Posso quindi ipotizzare che anche i casi in cui l'occhio non sembra essere presente nel lato iniettato negli embrioni interi, possono essere considerati come casi di forte ritardo di formazione dell'occhio, dal momento che nel lato iniettato ho mostrato un *timing* rallentato ma non alterato della comparsa dei marcatori. Ho anche fatto ibridazioni *in situ* con *rbpms*, *otx2*, *nrl* per essere sicura che nell'occhio del lato sperimentale in cui avviene un apparente recupero allo stadio 42, ci fosse anche una corretta stratificazione della retina. I dati mostrano che in effetti la retina ha una normale stratificazione in ambedue il lato iniettato e in quello controllo che hanno identico *pattern* di ibridazione *in situ* (Fig.1q-1t).

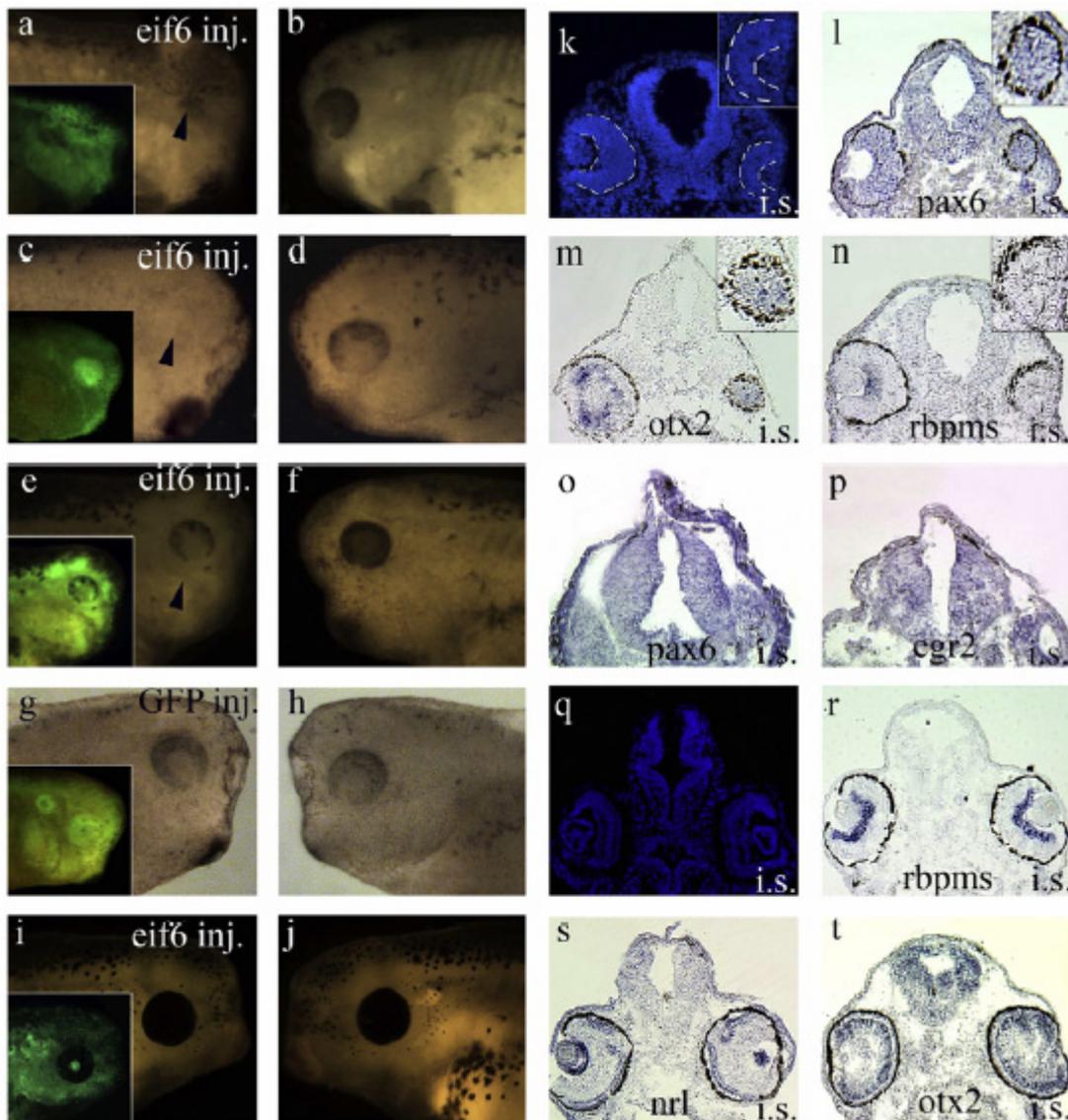


Fig. 1. Effetti dell'iperespressione di eif6 sulla formazione dell'occhio. (a-f) embrioni iniettati in un blastomero allo stadio di due cellule con 400pg di eif6 mRNA e 300pg GFP mRNA e raccolti allo stadio 35. I lati iniettati (a,c,e) mostrano un fenotipo dell'occhio alterato rispetto al lato non iniettato (b,d,f). (g) Il lato iniettato di embrioni ipesprimenti la sola GFP, non mostra alcuna differenza con il lato non iniettato (h): non si ha alcun effetto sullo sviluppo dell'occhio. (i) embrione st 42, iniettato con eif6 non presenta alcuna differenza rispetto al lato non iniettato (j). Negli inserti è mostrata la fluorescenza del lato iniettato. (k-p) sezioni del criostato di embrioni stadio 35. gli embrioni mostrano un occhio ridotto nel lato iniettato. Nei riquadri c'è l'ingrandimento della sezione dell'occhio ridotto k-n. (k) colorazione con DAPI. Le linee tratteggiate bianche indicano il confine dell'intero spessore della retina neurale. Il marcatore dell'occhio pax6 (l) è presente in entrambi gli occhi iniettato e non-iniettato. Tuttavia i marcatori a livello della retina mostrano una differenza tra l'occhio iniettato e il non-iniettato. Infatti, nell'occhio piccolo iniettato otx2 (m) è diffuso e non localizzato nella parte centrale della retina come in un occhio non iniettato. rbpms, (n) è evidente solo nel lato non-iniettato. Le strutture dell'encefalo sono morfologicamente normali, prosencefalo (o) e mesencefalo (l) sono state marcate con pax6, il romboencefalo (p) è stato marcato da egr2. (q) - (t) sezioni al criostato di embrioni iniettati eif6, stadio 42. (q) la colorazione con DAPI mostra una stratificazione normale della retina negli occhi iniettati rispetto al controllo. (r-t) ibridazione *in situ* con rbpms, nrl, markers dello strato esterno nucleare e Otx2, non hanno mostrato alcuna differenza tra occhio iniettato e non-iniettato, indicando che la retina recupera una struttura simile alla retina di embrioni controllo. Legenda: i.s: lato iniettato con eif6.

Per caratterizzare ulteriormente il fenotipo oculare e per essere sicura che l'alterazione da me studiata riguardasse l'occhio e nessuna altra parte dell'encefalo, ho utilizzato in *whole mounts* di embrioni allo stadio 19, in cui è ben presente il campo dell'occhio, *rax*, *pax6*, *otx2* (*markers* del cervello anteriore e dell'occhio), *six3* (dell'occhio e della parte ventrale del cervello anteriore), *sox2* (un marker per tutto l'encefalo in generale), *fgf8*, *en2* (*markers* del limite del cervello anteriore/medio) e infine *egr*, utilizzando la β -galattosidasi come tracciante (Fig. 2b and 2d) per comprendere se l'RNA iniettato fosse presente nel lato iniettato e non solo nell'occhio. Nel lato iniettato l'espressione di *rax* (75%, n=80 Fig. 2b) è risultata essere molto ridotta nel campo dell'occhio del lato sperimentale, se rapportata a quella del lato non iniettato, in accordo con il fenotipo dell'occhio allo stadio 35 nel lato iniettato con *eif6*. Inoltre l'espressione di *pax6* (70%, n=80 Fig. 2d), *otx2* (65% n=60 Fig. 2f) e *six3* (71%, n=30 Fig. 2h) sono risultate essere ridotte nel dominio presuntivo dell'occhio, contrariamente alle regioni del prosencefalo e del midollo spinale che invece non subiscono variazioni nei due lati (Fig. 2). Inoltre, studiando anche l'espressione dei *markers* neurali specifici *sox2* (n=30 Fig. 2j), *fgf8* (n=30 Fig. 2l), *en2* (n=30 Fig. 2n) e *egr2* (n=30 Fig. 2p) non ho riscontrato alcuna differenza tra il lato iniettato e quello non iniettato, per cui posso concludere che contrariamente all'occhio, altre regione neurali non risentono dell'iniezione di *eif6*. Occorreva approfondire a questo punto la funzione di *eif6* nell'occhio mediante esperimenti di *loss-of-function*. Ho allora iniettato in un blastomero di embrioni allo stadio 2 con morfolino di *eif6* (7.5 ng, n=60) o con *mispaiored* morfolino come controllo (7.5 ng n=60) insieme con mRNA di *GFP* (200 pg). La *downregolazione* di *eif6* è stata monitorata mediante immunofluorescenza (Fig. 3a and 3b) o con western blotting, impiegando anticorpi anti-Eif6 (Fig. 3d). Con mia sorpresa, l'iniezione di morfolino di

eif6 non ha causato nessun difetto nell'occhio (Fig. 3e and 3f), ed a riprova che comunque l'inezione del morfolino era andata a buon fine, l'embrione risultava avere curvature opposte a quelle che avvengono dopo iniezione con eif6, a causa di un aumento di apoptosi nel lato iniettato (dati non mostrati e Fig. 3c), in accordo con nostri dati precedenti (De Marco et al., 2010a). Inoltre, come atteso, l'espressione di rax (n=40), pax6 (n=40) e otx2 (n=40) non sono risultate cambiate nel lato iniettato con morfolino eif6, rispetto al lato non iniettato (Fig. 3i-3n).

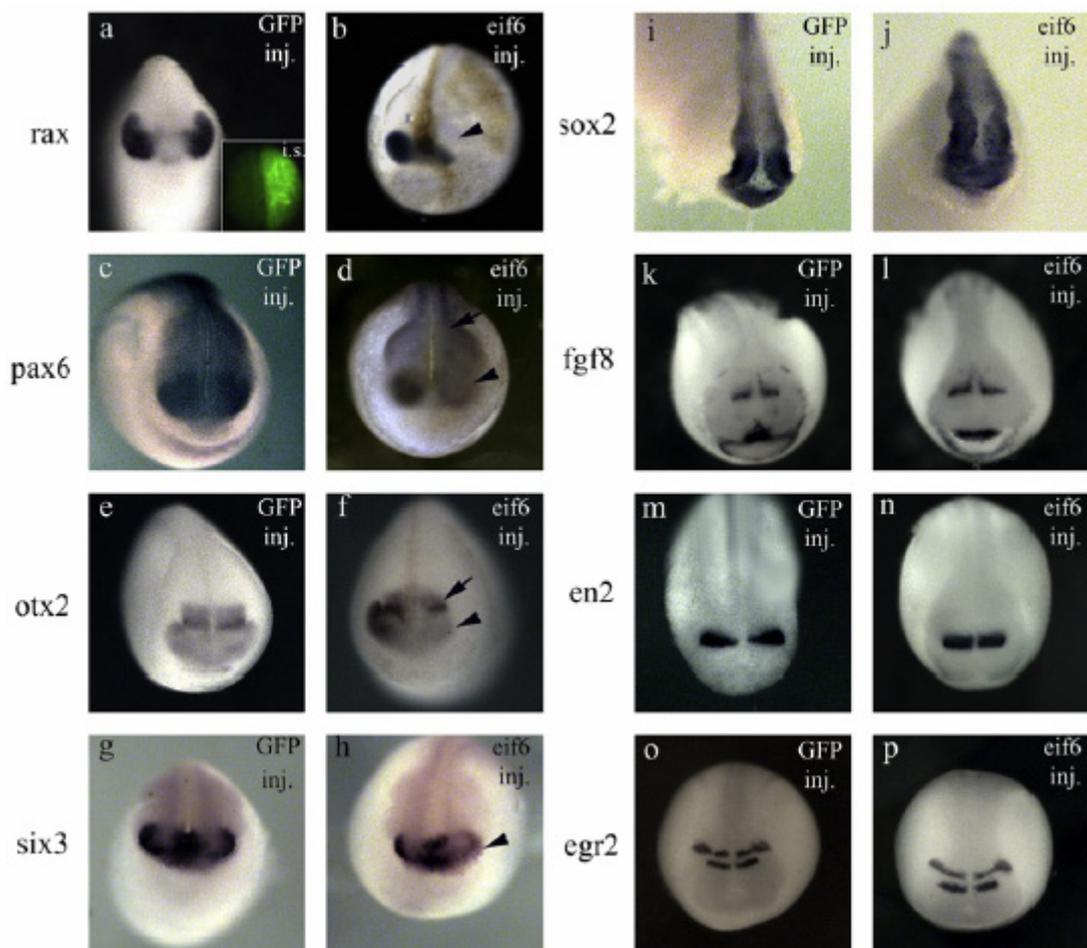


Fig. 2. L'iperespressione di eif6 inibisce specificamente lo sviluppo dell'occhio. (a)–(j) Embrioni iniettati con (400 pg), β gal (400 pg) e GFP (400 pg) in un singolo blastomero allo stadio 2 cellule e fissati allo stadio di neurula. Ibridazione *in situ whole mount* effettuata utilizzando i *markers*: rax (a), (b), pax6 (c), (d), otx2 (e), (f), six3 (g),(h) and sox2 (i), (j), fgf8 (k), (l), en2 (m), (n) egr2 (o), (p). Iniettati GFP hanno uguale espressione nel lato iniettato e nel controllo interno dei *markers*: rax (a), pax6 (c), otx2 (e), six3 (g), sox2 (i), fgf8 (k), en2 (m) e egr2(o). Nel piccolo riquadro (a) si nota la fluorescenza diffusa data dalla GFP nel lato iniettato di un embrione intero (i.s.) allo stadio di neurula. L'iper-espressione di eif6 riduce specificamente: rax (b), pax6 (d), otx2 (f) e six3 (h) espressione della zona presuntiva di formazione dell'occhio (testa di freccia), mentre l'espressione di alcuni *markers* neurali non dà variazioni (freccia). (j) Nessuna differenza è stata riscontrata nei *markers* neurali specifici: sox2, fgf8, en2, egr2, nel lato iniettato rispetto a quello controllo.

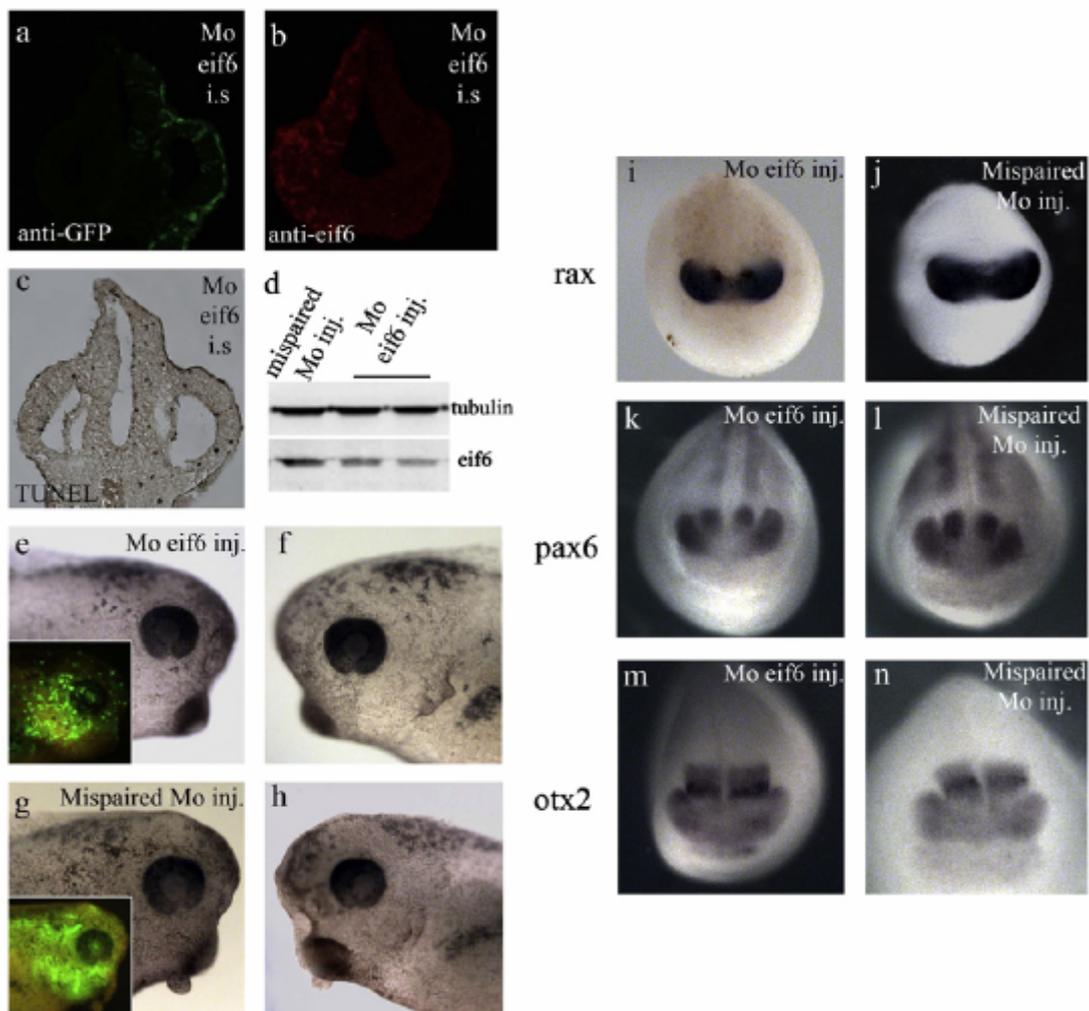


Fig. 3. Effetti della down-regolazione di eif6. (a), (b) Serie di sezioni alternate di embrioni iniettati con morfolino-eif6, fissati a stadio 28 and embrione iniettato GFP colorati con anti-GFP, con anticorpi anti-eif6 e saggio TUNEL. I bassi livelli di eif6 marcato (b) si notano nel lato iniettato (i.s.) marcato dalla GFP (a). un aumento dei nuclei apoptotici è evidente nel lato iniettato (c). (d) *Western blotting* con anticorpo anti-eif6 indica che il livello della proteina eif6 negli embrioni iniettati morfolino-eif6 è minore rispetto agli embrioni iniettati con morfolino-*mispaired*. Tre gruppi di embrioni iniettati sono usati per il *blot*. La normalizzazione è stata effettuata con anticorpo anti-tubulina. (e)–(h) Lato sperimentale e controllo dello stesso embrione iniettato con morfolino-eif6 (e), (f) o con morfolino-*mispaired* controllo (g), (h) in un singolo blastomero allo stadio 2 cellule e fissati a stadio 35. Non ci sono evidenti differenze nell'occhio tra il lato iniettato (e), (g) marcato con la fluorescenza della GFP (nel riquadro) e il lato non iniettato (f), (h). (i)–(n) ibridazione *in situ* su embrioni iniettati con morfolino-eif6 (i, k, m) o morfolino-*mispaired* (j, l, n), fissati allo stadio di neurula. L'espressione dei *markers* anteriori rax (i), (j), pax6 (k), (l) and otx2 (m), (n) non variano in seguito alla diminuzione di eif6.

Questi esperimenti hanno mostrato che *eif6* esercita la sua azione su di un organo specifico di provenienza cerebrale, in accordo con dati precedenti che mostrano che l'azione di *eif6* nel regolare la traduzione è selettiva in quanto riguarda specifici mRNA (Ji et al, 2008; De Marco et al., 2010). I dati hanno inoltre mostrato che mentre l'iperespressione di *eif6* rallenta la morfogenesi dell'occhio, la *down*regolazione di *eif6* non produce il fenotipo oculare permettendo di ipotizzare che mentre livelli di *eif6* al di sotto di quello fisiologico sono compatibili con lo sviluppo normale dell'occhio, livelli al di sopra di questa soglia inducono le anomalie oculari descritte. Quindi i livelli di *eif6* appaiono essere altamente regolati durante lo sviluppo ed importanti per la corretta formazione dell'occhio. Nei paragrafi successivi sarà affrontato lo studio delle molecole che regolano o che sono regolate da *eif6* durante la morfogenesi oculare.

2 Il ruolo di eif6 nella formazione dell'occhio è indipendente dalla sua funzione anti-apoptotica

In un lavoro precedente, è stato mostrato che negli iperespressori di *eif6*, avviene una riduzione dell'apoptosi. In particolare la diminuzione si verifica anche nell'occhio (De Marco et al., 2010a). E' da ricordare che l'apoptosi è fisiologicamente presente durante lo sviluppo embrionale ed è indispensabile per una corretta morfogenesi. Ho allora ipotizzato che la diminuzione di apoptosi potesse causare il difetto dell'occhio dovuto all'iperespressione di *eif6*. Dal momento che *eif6* è un fattore anti-apoptotico che agisce a monte di *bcl2* (De Marco et al., 2010a), ho iniettato 300 pg di *bcl2*, insieme a 300pg of mRNA di *GFP*, in un blastomero di un embrione allo stadio di due cellule. La iperespressione di *bcl2* è stata confermata mediante western blot (Fig. 4a). Gli embrioni iniettati con *bcl2*-injected hanno mostrato il fenotipo ripiegato, dal momento

che il lato con meno apoptosi contiene più cellule rispetto al lato non iniettato, come mostrato in precedenza (De Marco et al, 2010a) ed a conferma di ciò mostra una diminuzione della reazione di TUNEL nel lato iniettato, occhio compreso (Fig. 4b and 4c). Per controllare l'andamento della morfogenesi dell'occhio negli iperespressori di *bcl2*, ho eseguito ibridazioni *in situ whole mounts* allo stadio di neurula, usando i marcatori dell'occhio, *rax* (n=40), *pax6* (n=40) e *otx2* (n=40). Essi sono espressi in egual modo nella parte iniettata così come in quella non iniettata e infatti gli iperesprimenti *bcl2* hanno allo stadio 35 occhi normali (Fig. 4d-4i e dati non mostrati). Questi dati mostrano che il ritardo nella morfogenesi dell'occhio causata dalla iperespressione di *eif6* non appare essere collegata con la azione anti-apoptotica esercitata da *eif6* a monte di *bcl2* (De Marco et al., 2010a).

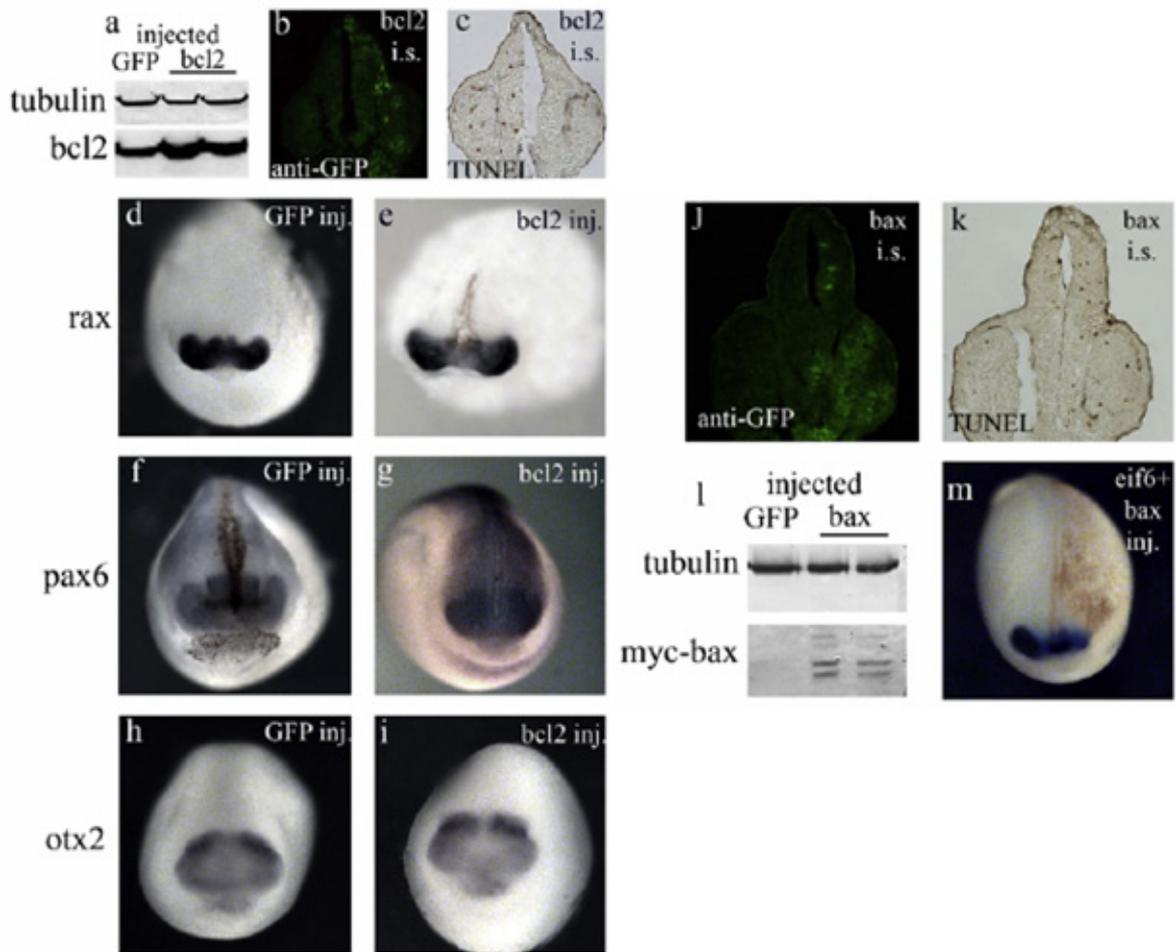


Fig. 4. la riduzione dell'apoptosi non è coinvolta nel difetto oculare. Gli embrioni sono stati iniettati con bcl-2 (300 pg) e GFP (200 pg) o GFP (400 pg) da solo in un singolo blastomero allo stadio 2. (a) *Western blotting* con anticorpo anti-bcl-2 indica un'abbondante presenza della proteina negli embrioni iniettati con bcl-2 rispetto agli embrioni iniettati con GFP. Due gruppi di embrioni iniettati con bcl-2 sono stati usati nel *blot*. La normalizzazione è stata effettuata utilizzando un anticorpo anti- α -tubulina. Immunofluorescenza con GFP (b) e saggio TUNEL (c) sulle sezioni di embrioni iniettati con bcl-2. il lato iniettato, marcato dalla fluorescenza della GFP, mostra pochi nuclei apoptotici se comparato con il lato controllo. Allo stadio di neurula è stata effettuata una ibridazione *in situ whole mount* utilizzando come marcatori: rax (d), (e), pax6 (f), (g) e otx2 (h), (i). L'iperespressione di bc-l2 non porta alla riduzione né di rax (e), né di pax6 (g) o otx2 (i), la loro espressione, nel lato iniettato, è paragonabile al lato controllo. (j)–(l) gli embrioni sono stati iniettati con myc-bax (1 ng) e GFP (200 pg). Il lato iniettato, marcato dalla GFP (j) mostra un incremento di nuclei positivi al saggio TUNEL (k). *Western blotting* con anticorpo anti-myc indica la presenza di bax esogeno nel lato iniettato dell'embrione (l). gli embrioni co-iniettati con bax-eif6 non recuperano la normale espressione di rax (m).

3 Il fenotipo oculare non dipende dal sito di fosforilazione Ser235

Come ho riferito nell'introduzione, Eif6 ha un importante ruolo nella regolazione della traduzione a partire da specifici messaggeri, come mostrato in cellule murine (v. Gandin et al., 2008). Infatti la traduzione avviene quando eIF6 è rilasciata dalla subunità ribosomale 60S a seguito della fosforilazione in Ser235 mediante il *pathway* RACK1–PKC. eIF6 mutata in S235A non può quindi essere fosforilata (Ceci et al., 2003). In *Xenopus*, la Ser235 è presente (Vaccaro et al., 2006 a,b) e può essere ragionevolmente considerato il bersaglio della fosforilazione da parte di PKC, fosforilazione che permette l'inizio della traduzione, come mostrato nei mammiferi (Ceci et al., 2003). Dati precedenti hanno mostrato che Ser235 è infatti necessaria all'espletamento della funzione apoptotica di eif6, mostrando che *eif6* agisce come regolatore della sintesi delle proteine che sono coinvolte nell'apoptosi (De Marco et al., 2010a). Tuttavia, in *Xenopus* non è stata mai studiata direttamente l'attività di eif6 nel regolare la traduzione via fosforilazione da pkc (v. Carotenuto et al., 2005). Ho allora eseguito un esperimento ispirato al fatto che in cellule di mammifero eIF6 inibisce la traduzione di β -catenina (Ji et al., 2008). In effetti, ho constatato che lo stesso si verifica per la β -catenina in *Xenopus* e che Ser235 è necessaria per la traduzione di questa proteina (Fig. 5a and 5b). Eppure nel caso del fenotipo oculare dovuto all'iperespressione di eif6, ho verificato che gli embrioni iniettati con mRNA di *S235A*, mostravano ritardo nella formazione dell'occhio allo stadio di girino, esattamente come avviene negli embrioni iniettati con eif6 (Fig. 5c-5h). Infatti, il 70% di embrioni iniettati con 400pg di *S235A* (n= 55) e 45% di quelli iniettati con 100pg di *S235A* (n=98) avevano fenotipo oculare che comunque recupera allo stadio 42. Ho poi osservato una riduzione dell'espressione di *rax* (n=50), *pax6* (n=50) e *otx2* (n=50) nel lato iniettato osservato allo stadio di neurula (Fig. 5i-5n),

in accordo con i dati mostrati nella Figura 1 degli embrioni iniettati con eif6. Essi indicano che il sito di fosforilazione di pkc non è coinvolto nella produzione del fenotipo oculare, suggerendo che nello *Xenopus* eif6 agisce anche mediante meccanismi che non hanno a che fare con il controllo dell'associazione tra le subunità ribosomali 60S e 40S (Ceci et al., 2003).

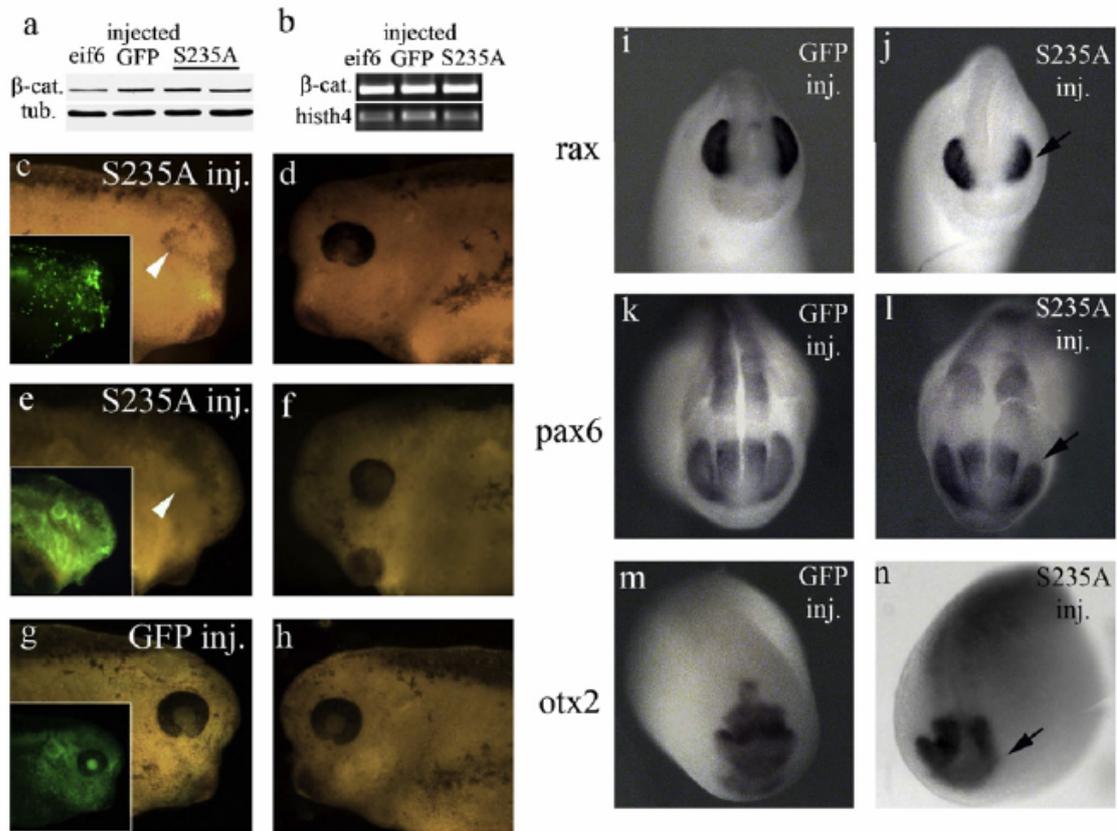


Fig. 5. Effetti dell'iper-espressione del mutante S235A. Gli embrioni iniettati con la forma mutata in S235 di eif6 (300 pg) e GFP (200 pg) o GFP da sola (400 pg) in un singolo blastomero allo stadio 2 e fissati a stadio 35 (a-h) o allo stadio di neurula (i-n). (a) *Western blot* effettuato utilizzando anticorpo anti-β-catenina, su embrioni iniettati eif6 o con la sola GFP e due gruppi di embrioni iniettati con S235A. Un decremento dei livelli della β-catenina è stato riscontrato solo negli iper-espressi eif6. Per la normalizzazione è stato utilizzato l'anticorpo anti-tubulina. (b) Analisi di RT-PCR mostrano che i livelli del messaggero codificante la β-catenina non variano né negli iper-espressi eif6 né negli iper-espressi S235A paragonati agli embrioni iniettati con GFP. La normalizzazione è stata effettuata utilizzando i *primers* per histh4. (c-h) Immagini dei due lati di uno stesso embrione (c e d; e e f; g e h) a stadio 35. gli iperespressi S235A mostrano una riduzione delle dimensioni dell'occhio (testa di freccia) del lato iniettato (c), (e), marcato dalla fluorescenza di GFP (osservabile nel riquadro), comparato al proprio lato non iniettato (rispettivamente d, f). (g), (h) iniettati con la sola GFP (fluorescenza nel riquadro della figura e) non hanno variazioni nello sviluppo dell'occhio. (i-n) Ibridazione *in situ* su embrione intero, utilizzando come *markers*: rax (i), (j), pax6 (k), (l) e otx2 (m), (n) su embrioni iniettati GFP (i, k, m) o iperespressi S235A (j, l, n) allo stadio di neurula. L'espressione dei marcatori dell'occhio rax (j), pax6 (l) e otx2 (n) è ridotta nel campo dell'occhio (freccia) del lato iniettato di iperespressi S235A.

4 eif6 co-immunoprecipita con igfir e negli iperespressi di eif6 è attivato il pathway di pi3k

La prima fase di questa parte sperimentale è consistita nell'investigare se eif6 interagisce con igf1r e se tale proteina sia implicata nel *signalling* di igf e nell'induzione dell'occhio. Come prevedibile eif6 esiste sia in uno stato fosforilato che in uno non fosforilato, con peso molecolare rispettivamente di 29kDa e di 27 kDa (Carotenuto et al., 2005), ambedue riconosciuti dall'anticorpo anti-Eif6 donatoci dai Proff PC Marchisio e S.Biffo. Ho eseguito esperimenti di immunoprecipitazione ed ho constatato che le due isoforme di eif6 co-immunoprecipitano con igf1r, proteina di 95 kDa (Fig.6), suggerendo che eif6 interagisce fisicamente con igf1r. E' noto che ligandi di igf1r stimolano l'attività tirosin kinasica delle sue subunità, portando all'attivazione di due principali *pathways*, quello di Ras-Raf-MAPK e quello di PI3K (Jones and Clemmons, 1995), fosforilando siti associati con questa attivazione (Payne et al., 1991; Alessi et al., 1996). Ho allora iniettato in un blastomero dello stadio a due cellule mRNA di eif6 e GFP oppure la sola GFP per eseguire successivamente degli opportuni *western blotting* al fine di verificare quale di questi due *pathways* fosse attivo negli iperespressi. Dal momento che è nelle calotte animali allo stadio 9, fine blastula, che si concentrano elevati livelli endogeni di fosforilazione/attivazione di segnali provenienti dall'attivazione di igfr (Wu et al., 2006), ho dissezionato le *animal caps* allo stadio 9 (di embrioni iniettati con eif6 o con la sola GFP) e le ho lasciate in coltura fino a quando embrioni gemelli hanno raggiunto lo stadio 20. *Western-blotting* con anticorpi anti-pmapks/mapks e anticorpi pakt/akt, hanno mostrato una diminuzione della forma fosforilata di akt negli iperespressi di eif6 in rapporto ai controlli, mentre invece i livelli di pmapks erano identici negli iperespressi così come nei relativi controlli (Fig 6b,c).

Esperimenti in cui ho utilizzato gli *animal caps* coltivati per 2-3 ore fino allo stadio 10, non hanno mostrato differenze rispetto ai controlli nella fosforilazione di akt (dati non mostrati). Per verificare se il ritardo nella formazione dell'occhio negli iperesprimenti eif6 fosse correlato con una diminuzione della fosforilazione di akt, ho usato una forma costitutivamente attiva di pi3k, la subunità p110*, che agisce a monte di akt ed a valle di igflr. p110* è capace di indurre un aumento di fosforilazione di akt nei lisati delle *animal caps* (Fig 7a). Embrioni co-iniettati con eif6 and p110* hanno mostrato una leggera diminuzione dell'espressione del marcatore del campo dell'occhio *rax*, molto inferiore a quanto si osserva nel campo dell'occhio degli iperespressi di eif6 (Fig. 7b). Sicchè, p110* recupera in parte il fenotipo oculare e ciò suggerisce che il fenotipo è almeno parzialmente dovuto all'inibizione del pathway della kinasi pi3/akt. Dunque eif6 viene regolata dal signalling di igf, mediante il ramo pi3k/akt e tale regolazione è almeno in parte necessaria per ottenere una corretta formazione dell'occhio. E' interessante sottolineare che questo signalling non è attivo prima dello stadio 10.

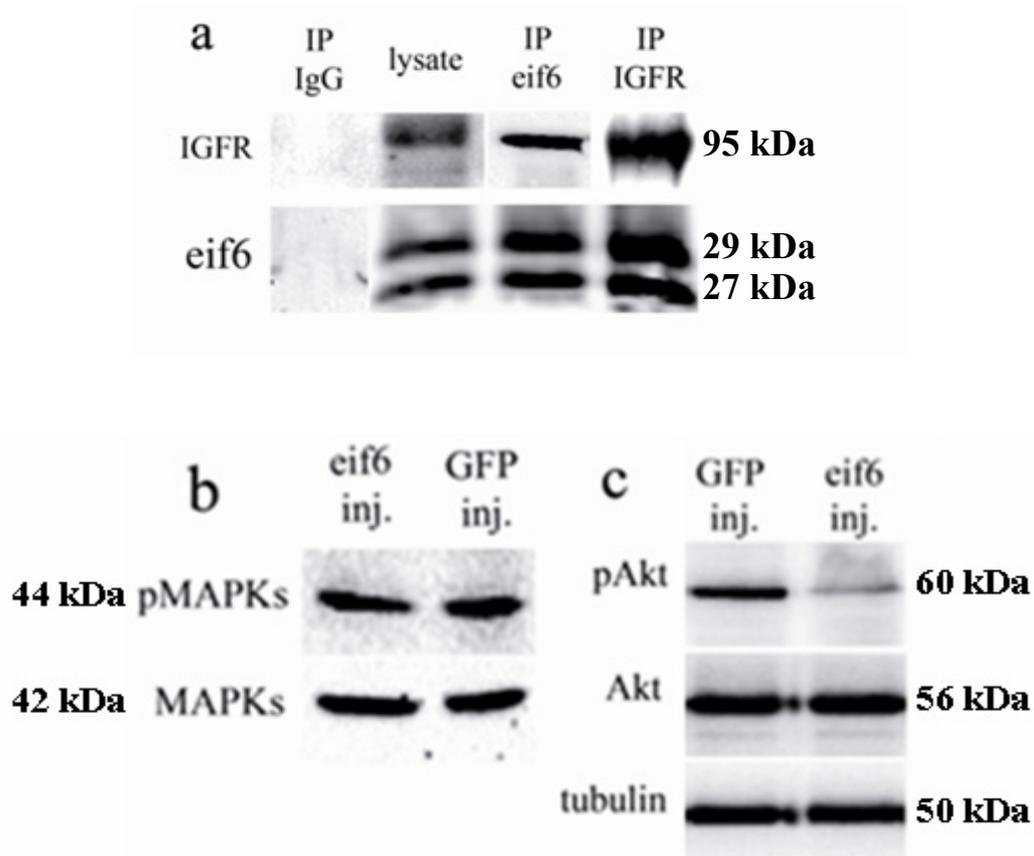


Fig. 6. Immunoprecipitazione e western blotting per comprendere su quale ramo del signalling di igf agisca eif6. (a) Esperimenti effettuati utilizzando embrioni *wild type*. Le immunoprecipitazioni sono state effettuate utilizzando anti-eIF6 come anticorpo per immuno-precipitare e l'anticorpo anti-igfr per rivelare la presenza di igfr e viceversa. Le due proteine co-immunoprecipitano. Le due bande per il campione eif6 sono dovute alla rivelazione sia della forma fosforilata che della forma non fosforilata. (b,c) *Western blotting* su campioni di *animal caps* derivanti da iniettati in uno solo dei blastomeri, allo stadio 2 cellule o con eif6 o con la sola GFP. (b) Blot rivelato con anti-MAPKs e anti-pMAPKs. Non si osservano variazioni nella forma fosforilata, e non, nel campione da iperespressi eif6 rispetto al controllo di iniettati-GFP. (c) *Western blotting* su embrioni iperespressanti eif6 e sul controllo da iniettati-GFP, rivelato con anticorpi anti-AKT, anti-p-AKT e utilizzando l'anti-tubulina come normalizzatore. In questo caso si osserva nei campioni di iper-espressi eif6 una forte riduzione della forma fosforilata di AKT.

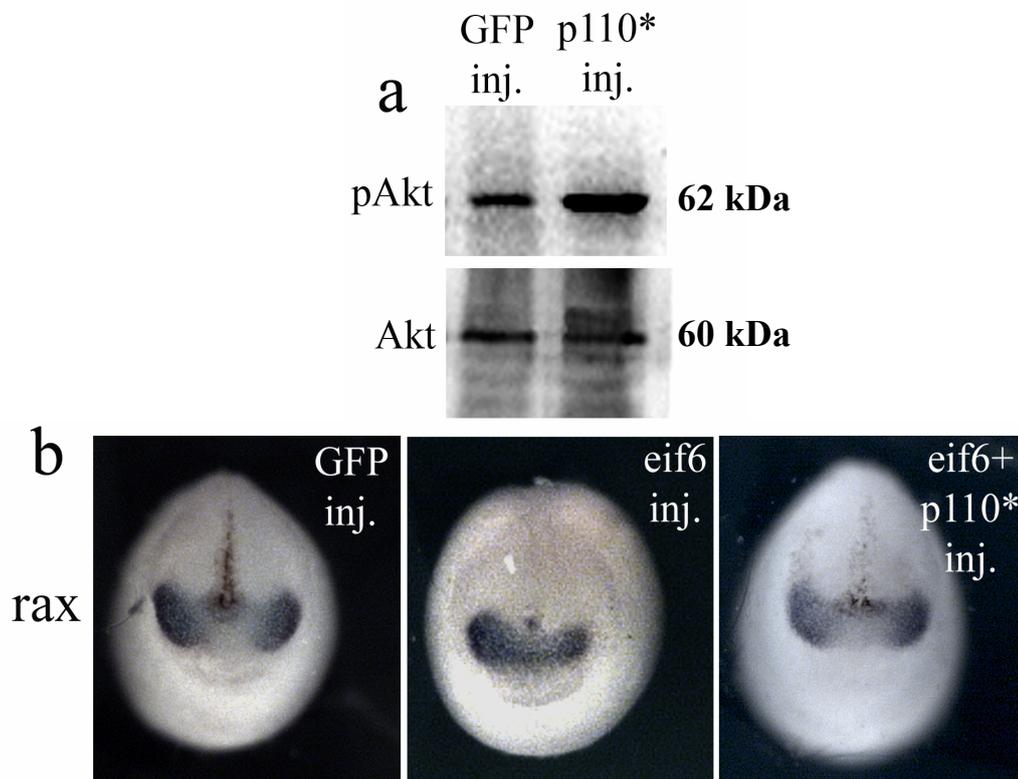


Fig. 7. Aumento di pAKT in seguito a iniezione di p110* e recupero parziale del fenotipo indotto da eif6 da parte di p110* (a) Western blotting su *animal caps* da embrioni controllo iniettati con GFP e da embrioni iniettati con p110*, rivelando con anticorpi anti-AKT e anti-pAKT. Si può notare un aumento della forma fosforilata di Akt nel campione derivante da embrioni iperesprimenti la forma costitutivamente espressa di pi3k. (b) Ibridazione *in situ whole mount* su embrioni iniettati con la sola GFP o con eif6 o co-iniettati con eif6-p110*, in un unico blastomero allo stadio2. Gli embrioni sono stati fissati a stadio di neurula e ibridati utilizzando il *marker rax*. L'embrione iniettato con GFP presenta la stessa intensità d'ibridazione tra lato iniettato e lato controllo. L'iniettato eif6 ha una riduzione notevole di *rax* nel lato iniettato rispetto al controllo interno e infine l'embrione co-iniettato eif6-p110* presenta una lieve differenza del *marker rax* ai due lati dell'embrione, il che porta a supporre un recupero del fenotipo indotto, da eif6, da parte di p110*.

5 gipc2 interagisce con eif6 e recupera il fenotipo dell'occhio

Dal momento che i dati da me riportati mostrano che la proteina eif6 co-immunoprecipita con igf1r, ho rivolto la mia attenzione a gipc2, una gipc (GAIP *interacting protein, C terminus*), detta anche *Kermit 2*, anch'essa interagisce con igfr ed è necessaria alla formazione dell'occhio. E' particolarmente interessante il fatto che i morfanti di gipc2 abbiano un fenotipo oculare molto simile a quello descritto per gli iperespressi di eif6 (De Marco et al., 2011; Wu et al., 2006). Le proteine gipc legano non solo igfr, ma anche molti altri tipi di molecole implicate nel signalling cellulare, incluso le semaforine M e F (Wang et al., 1999). In *Xenopus* gipc2 agisce a valle di igf nella formazione dell'occhio ed è fondamentale non per attivare, ma per mantenere l'attivazione di akt indotta da igf, indirizzandola specificamente alla morfogenesi dell'occhio (Wu et al., 2006). Questa interazione sembra richiedere il dominio PDZ di gipc (Booth et al., 2002). Il primo esperimento eseguito è stata una co-immunoprecipitazione gipc2-GFP/eif6. Dal momento che non esistono anticorpi anti-gipc2 specifici per *Xenopus*, ho utilizzato proteine derivate da embrioni iniettati con messaggero gipc2 derivante da un vettore con costruito gipc2-GFP *in frame*. E' stato allora possibile utilizzare anticorpi anti-GFP per rivelare gipc2. Inoltre ho preferito effettuare questo esperimento su *animal caps* e non su campioni interi, in quanto è in tali territori che si forma l'occhio e quindi il segnale dell' igf endogeno e delle molecole con esso interagenti è ivi localizzato. I risultati indicano che eif6 e gipc2 interagiscono fisicamente (Fig. 8). Successivamente sono state eseguite ibridazioni *in situ whole-mount* usando RNA anti-senso di gipc2 su neurule di iperespressi di eif6, S235A o GFP. Mentre in embrioni iniettati con GFP la intensità e il pattern dell'ibridazione è risultata essere identica in ambedue i lati (nella parte anteriore e dorsale dell'embrione),

sia negli embrioni iniettati con *eif6* che in quelli iniettati con S235A, *gipc2* è molto meno espressa nel lato iniettato rispetto al lato non iniettato e questa differenza è ben evidente nel campo dell'occhio (Fig. 9a). Questi dati suggeriscono che *eif6* possa regolare negativamente la traduzione dell' mRNA di *gipc2* e che la fosforilazione di *eif6* in S235 attuata da *pkc* non è coinvolta in questo processo, in accordo con i dati che hanno mostrato che il fenotipo oculare non è correlabile con l'azione di *eif6* sulla traduzione mediata dalla fosforilazione di PKC sulla serina 235 di *eif6*. L'analisi mediante *Real-Time PCR* su RNA di campioni iniettati con concentrazioni crescenti di mRNA di *eif6* mostra che in effetti *eif6* abbassa i livelli di espressione di *gipc2* in modo dose-dipendente (Fig. 9g). Questi dati indicano che l'espressione di *eif6* regola negativamente l'espressione di *gipc2*. La *Real-Time PCR* effettuate su RNA di morfanti di *eif6* mostrano invece un aumento minore di *gipc2* (Fig. 9h). Per rendere più fruibile questo risultato andrebbero iniettate dosi più alte di morfolino, ma ciò è sconsigliabile dal momento che *eif6* è necessaria alla vita cellulare e perché è noto che elevate quantità di morfolino possono portare ad aspecificità (Heasman, 2002). Successivamente ho effettuato una co-iniezione con mRNA di *eif6* e di *gipc2* per investigare se *gipc2* è in grado di recuperare il fenotipo oculare da iperespressione di *eif6*. Ho effettuato sulle neurale derivanti da tale co-iniezione ibridazioni *in situ whole mount* utilizzando *rax*, marcatore del campo dell'occhio come anche *pax6* e *otx2* marcatori dell'occhio e del cervello anteriore. In effetti, ho potuto riscontrare che a seguito di questa co-iniezione si verifica un recupero parziale (*pax6* e *otx2*) o totale (*rax*) della marcatura e quindi del campo dell'occhio (Fig. 10). Ciò porta a concludere che l'effetto dell'iperespressione di *eif6* può essere bilanciato dall'introduzione di *gipc2* per ottenere una appropriata formazione dell'occhio.

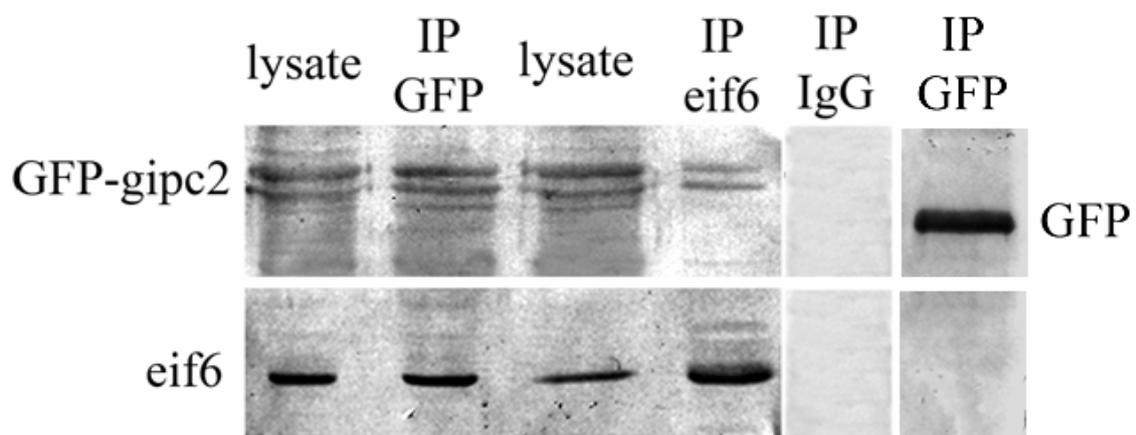


Fig. 8. Interazione proteica tra eif6 e gipc2. Immunoprecipitazione effettuata su estratti proteici da embrioni iniettati con GFP-gipc2 (*gipc2 in frame* con GFP). Le immuno-precipitazioni sono state effettuate utilizzando anti-eIF6 come anticorpo per immuno-precipitare e per rivelare la presenza di gipc2 l'anticorpo anti-GFP e viceversa. Le due proteine co-immunoprecipitano. Viene usato l'anticorpo anti-GFP per mancanza di anti-gipc2, ragion per cui non si usano come controllo embrioni wild type ma iper-espressi GFP-gipc2.

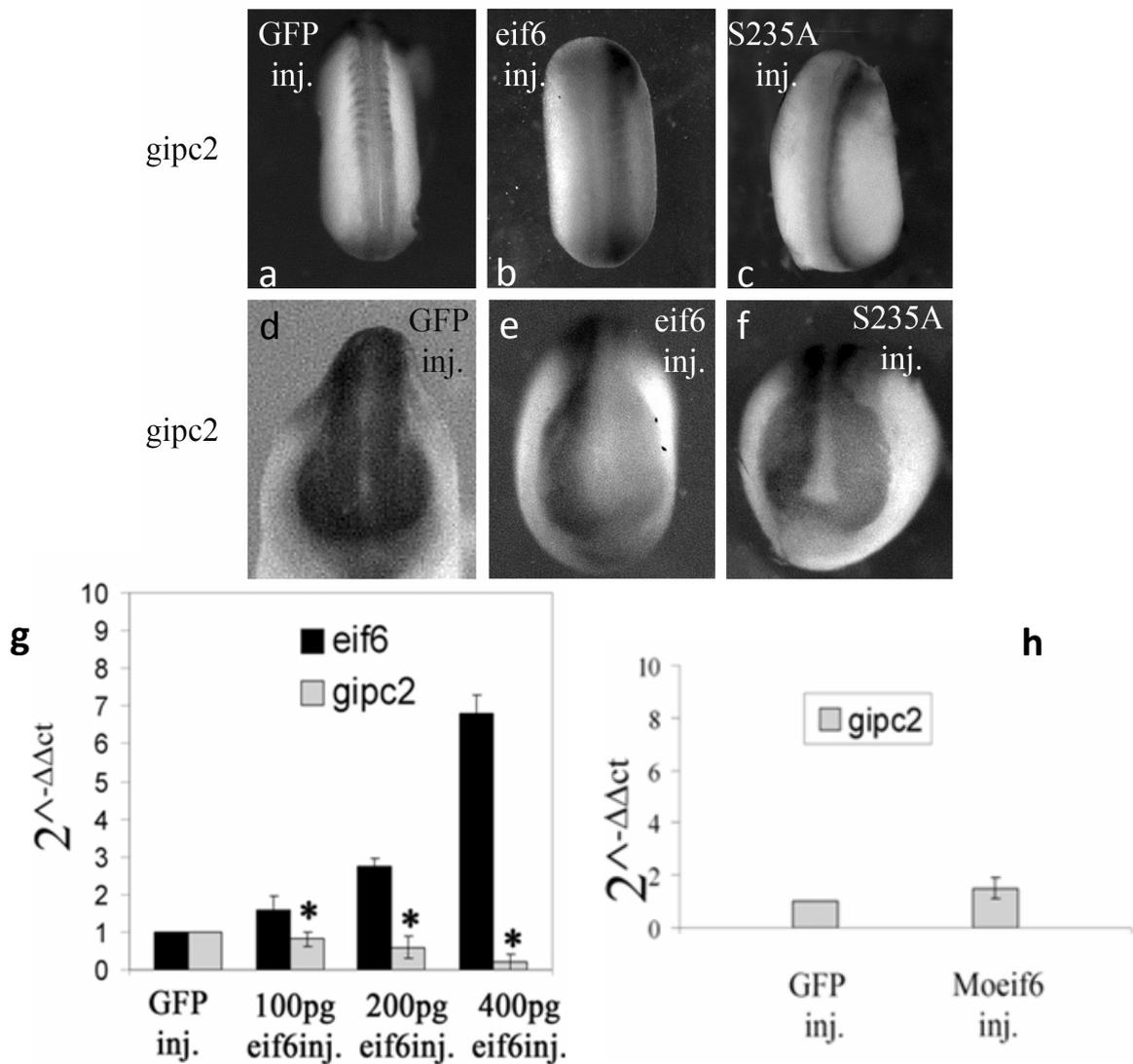


Fig. 9. Effetti dell'iper-espressione di eif6 sull'espressione di gipc2. (a-f) embrioni iniettati in un blastomero allo stadio di due cellule con la sola GFP (a,d) o con eif6 mRNA (b,e) o con S235AmRNA (c,f) e raccolti allo stadio di neurula. I lati iniettati (a,c,e,f) mostrano una marcatura di gipc2 inferiore rispetto al lato non iniettato. (a e d). Il lato iniettato di embrioni iper-esprimenti la sola GFP, non mostra alcuna differenza con il lato non iniettato. (g-h) mostrano gli effetti dell'iper-espressione di dosi crescenti di eif6 sull'espressione del messaggero di gipc2.

(g) *Real-Time PCR*. Il primo grafico riguarda la valutazione della variazione di espressione del messaggero di gipc2 in RNA estratti da embrioni iniettati, in un singolo blastomero allo stadio 2, con quantità crescenti di eif6. Come normalizzatore è stato utilizzato il messaggero del gene *odc* e per ottenere i livelli basali delle espressioni dei vari messaggeri le *Real-Time PCR* sono state effettuate anche su iniettati GFP. L'espressione di gipc2 sembra subire un decremento sempre maggiore al crescere della quantità di eif6 utilizzata. (h) Il secondo grafico riguarda l'analisi dell'espressione di gipc2 in campioni iniettati con morfolino-eif6, sempre rapportati agli iniettati-GFP e come normalizzatore è stato usato *odc*. In questo caso si riscontra un lieve aumento di gipc2.

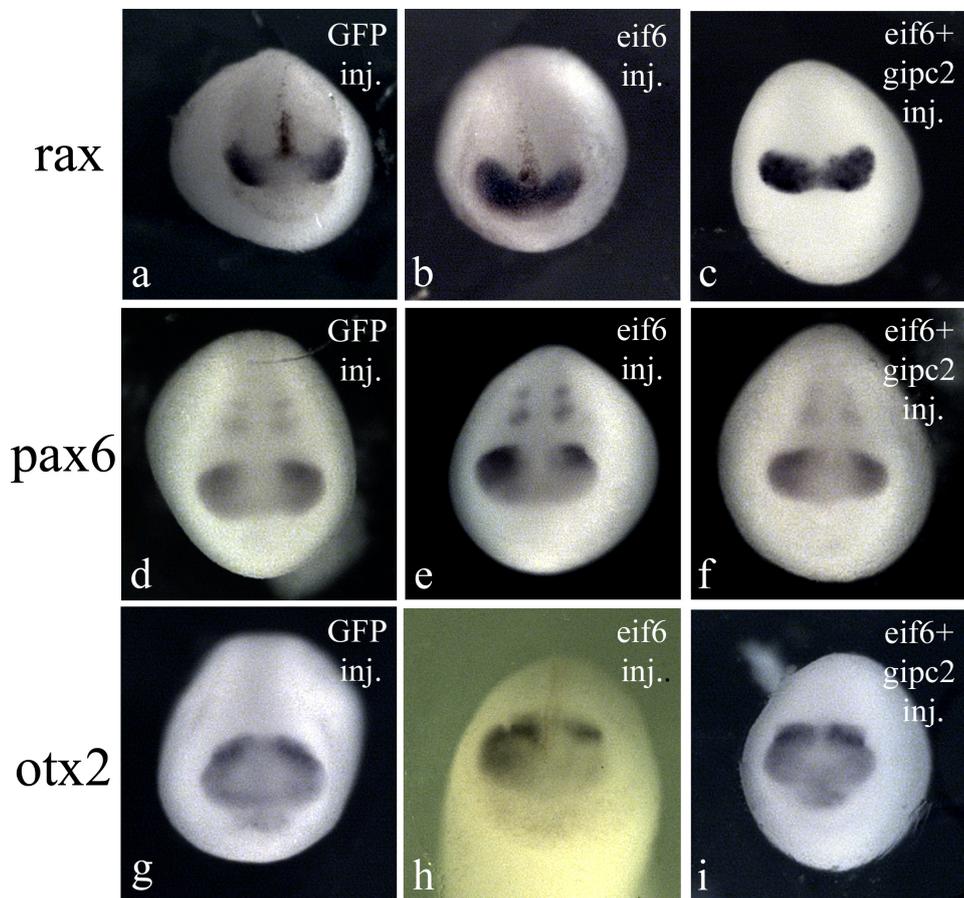


Fig. 10. (a)–(i) Embrioni iniettati con GFP (300pg) o con eif6 (400 pg), o con eif6 (400 pg) e gipc2 (40ng) in un singolo blastomero allo stadio 2 cellule e fissati allo stadio di neurula. Ibridazione *in situ whole mount* effettuata utilizzando i *markers*: rax (a-c), pax6 (d-f) e otx2 (g-i). Gli iniettati GFP hanno uguale espressione nel lato iniettato e nel controllo interno dei *markers*: rax (a), pax6 (d) e otx2 (g). L'iperespressione di eif6 riduce specificamente: rax (b), pax6 (e) e otx2 (h) nella zona presuntiva di formazione dell'occhio. I co-iniettati eif6-gipc2 hanno uguale espressione nel lato iniettato e nel controllo interno di tutti e tre i *markers* e ciò è indice del completo recupero, del fenotipo indotto da eif6, da parte di gipc2.

6 Effetti dell'iper-espressione di eif6 sullo sviluppo del rene

Il pronefro è un nefrone non integrato che si forma dal mesoderma intermedio. E' un organo pari costituito da tre porzioni principali: glomo, tubuli e dotto. Il glomo è l'unità di filtrazione vascolarizzata: esso si proietta all'interno dello spazio celomatico, dove si realizza la filtrazione del sangue (Drummond et al., 2003). La camera di filtrazione del pronefro è il nefrocele, inizialmente contiguo al celoma. Successivamente nefrocele e celoma si separano in due cavità distinte. Il mesoderma splancnico circonda il glomo (Vize et al., 1997). Tre nefrostomi ciliati a forma di imbuto si aprono nel celoma e dirigono i rifiuti dal celoma verso i tubuli collettori che portano ad un tubulo comune e quest'ultimo si unisce al dotto pronefrico, che si apre all'esterno tramite la cloaca.

Lavori precedenti hanno mostrato che eif6 è molto espresso non solo nell'occhio e nel nevrasso, ma anche nel pronefro (Vaccaro et al., 2006). In accordo con ciò, ibridazioni *in situ whole mount* effettuate su embrioni a st. 38, utilizzando come *riboprobes* eif6 mostrano la sua localizzazione anche a livello del pronefro. (Fig.11 a). Allo stesso modo, l'immunolocalizzazione con anti-eif6 individua i tubuli e il dotto (Fig. 11 b,c). Gli embrioni iniettati con mRNA-eif6 invece (400 pg; n= 91) mostrano un edema nella regione antero-ventrale. Come accennato in precedenza, la maggior parte degli embrioni iniettati con eif6 mostrano infatti, a partire dallo st. 32, un edema posizionato nella zona anteriore-ventrale. Questo fenotipo è presente nella quasi totalità degli embrioni che presentano il ritardo di formazione dell'occhio ma si può riscontrare anche come unica variante successiva all'iper-espressione di eif6. L'edema è probabilmente causato da difetti nella funzione osmoregulatoria del pronefro. Ho quindi studiato la morfologia del pronefro negli iperespressi di eif6 ed ho visto che l'edema compare a partire proprio da st. 32, quando il pronefro inizia a funzionare e diviene particolarmente evidente a st. 38.

Nelle sezioni istologiche ho notato che vi è una forte riduzione dei tubuli del pronefro nel lato iniettato. L'edema si trova solo nel lato iniettato e mostra che il mesoderma splancnico, che delimita il nefrocele, non circonda il glomo come nel lato non iniettato, dal momento che l'edema è cresciuto nel nefrocele ampliandone i limiti (Fig. 11 e). Nei morfanti di *eif6* il pronefro del lato iniettato non mostra alterazioni (Fig. 11 f, g). Come ho descritto nei precedenti paragrafi, Wu et al. (2006) hanno mostrato che i morfanti *gipc2* hanno un fenotipo oculare molto simile a quello riscontrato negli iperespressi di *eif6* e facendo riferimento agli esperimenti citati precedentemente che mostrano che *eif6* interagisce con *gipc2* e ne regola l'espressione, ho studiato l'interazione di queste due proteine nella morfogenesi del rene. Successivamente ho eseguito esperimenti che potessero mettere in luce se, anche per la formazione del pronefro, tali proteine possano agire lungo il pathway di igf. In effetti, a seguito dell'iniezione del morfolino di *gipc2* (40ng = 82) (Figure 13), gli embrioni presentano allo stadio 32 un edema indistinguibile da quello ottenuto in seguito all'iperespressione di *eif6*, edema che risulta essere assente negli iniettati con morfolino-mismatch-*gipc2* (Fig 12d). Gli iperespressi *gipc2*, invece mostrano sia nel lato iniettato che in quello controllo lo stesso *pattern* d'ibridazione (dati non mostrati e vedi Wu et al, 2006). In precedenza è stato già mostrato, in *X. laevis*, che il residuo in S235 di *eif6* è necessario affinché avvenga la sua fosforilazione da parte di *pkc*, cosicchè *eif6* possa agire sia come regolatore della traduzione che come fattore anti-apoptotico, ma questo residuo non risulta essere richiesto per lo sviluppo dell'occhio (De Marco et al., 2010; De Marco et al., 2011). Eseguendo iniezioni con mRNA-*eif6*-S235A, gli embrioni mostrano l'edema e la riduzione del pronefro anche in questo caso (Fig.11 h,i), indicando che la fosforilazione di *eif6* in Ser235 non è necessaria per produrre uno sviluppo anomalo del pronefro. Questi risultati mi

permettono di ipotizzare che il fenotipo aberrante del rene, prodotto dall'iperespressione di eif6, non sia direttamente legato agli effetti della regolazione da pkc di eif6 similmente a quello che ho descritto per il fenotipo dell'occhio negli iper-espressi di eif6 (De Marco et al., 2011).

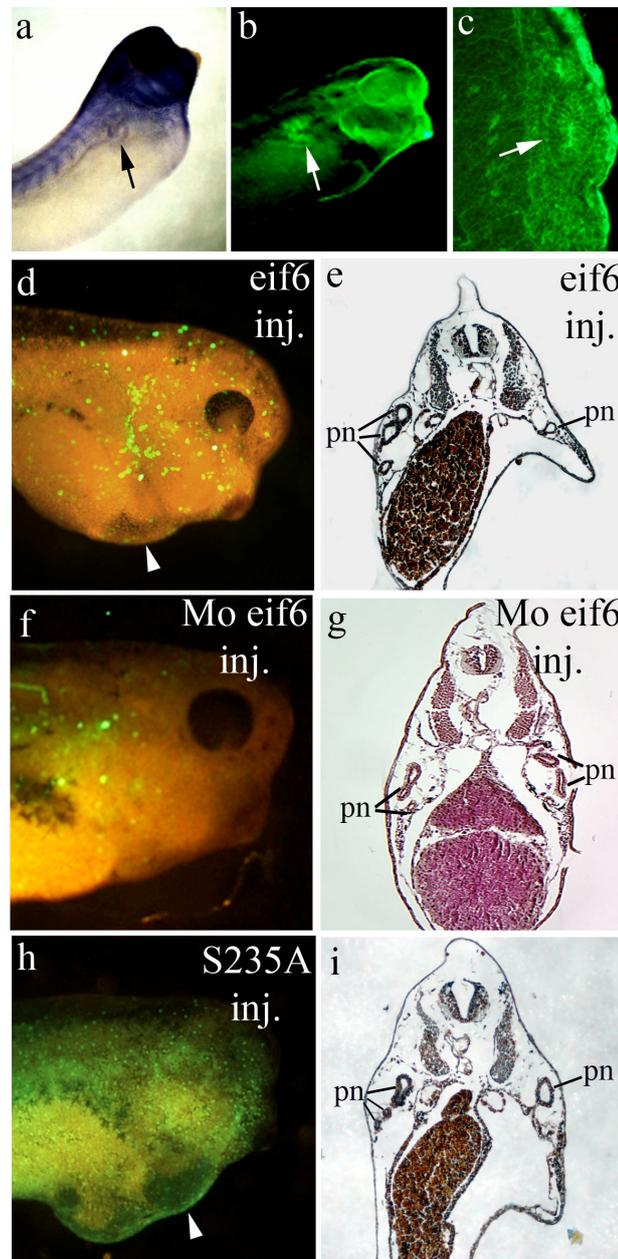


Fig. 11. (a-c): eif6 mRNA e proteine sono espressi nel pronefro (freccia) di st 38 *Xenopus laevis* embrioni. (a) ibridazione in situ su embrioni interi effettuata con il riboprobe eif6. (b,c) Immunofluorescenza su embrione intero (b) e su sezione (c) con anticorpo anti-eIF6. d: edema in evidenza (testa di freccia) su embrione iniettato con 400 pg di mRNA-eif6 e 300 pg di mRNA-GFP in un singolo blastomero dello stadio a due cellule e fissati a st 38. (e): sezione istologica di embrioni iniettati trattata con ematossilina-eosina, in essa è evidente una riduzione dei tubuli pronefrici. Si nota che il mesoderma splancnico che delimita il nefrocele non circonda il glomo, come nel lato non iniettato, dal momento che l'eha espanso il nefrocele. f: embrione a st. 38 iniettato con morfolino-eif6. g: una sezione dello stesso embrione marcata con ematossilina-eosina. La diminuzione di eif6 non produce l'edema. h,i: embrione, iniettato con 400 pg di mRNA-S235A e 300 pg di mRNA GFP, presenta l'edema. h,i: la riduzione del pronefro è evidente nella sezione istologica dell'embrione mostrato in h. legenda: pn= pronefro.

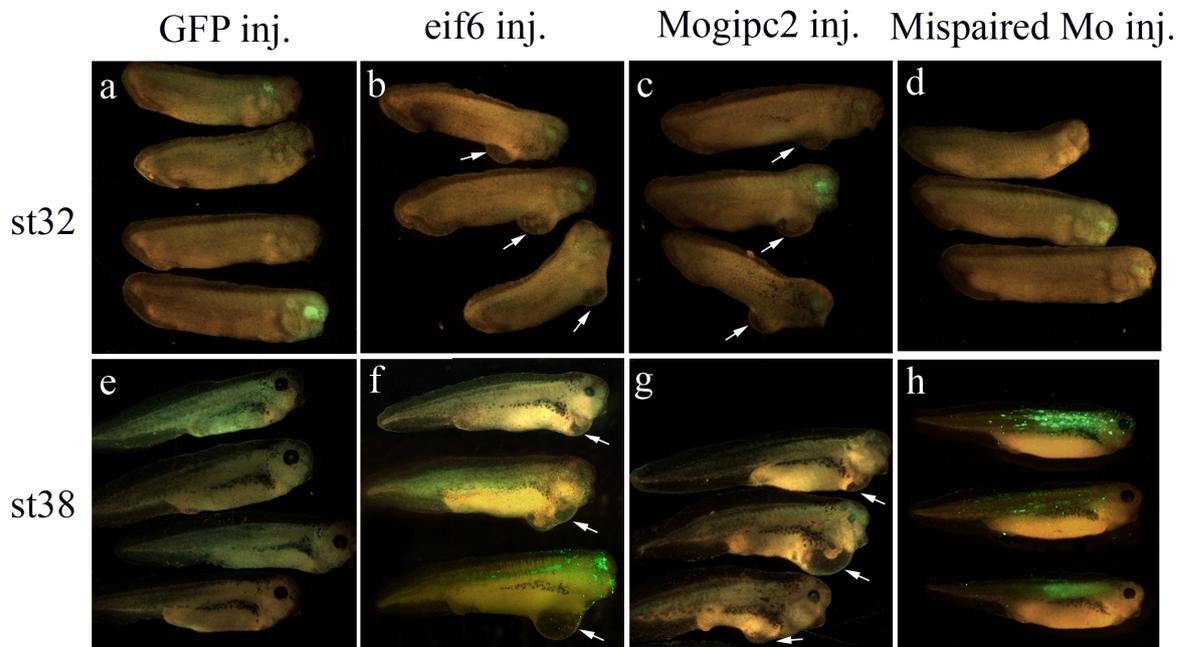


Fig. 12. Embrioni iniettati con la sola GFP (400 pg) o con eif6 (400pg) o con mo-gipc2 (40ng) o con mo-mispaired (40ng) in un singolo blastomero allo stadio 2 e fotografati a stadio 32 e 38. Gli embrioni iperesprimenti eif6 e i morfanti gipc2 presentano fenotipi molto simili, con Riduzione o ritardo di formazione dell'occhio e edema antero-ventrale (b,c,f,g). (d,h) Embrioni Iniettati con mo-mispaired con fenotipo indistinguibile da quello di embrioni controllo iniettati con la sola GFP.

7 L'iperespressione di eif6 e la riduzione di gipc2 agiscono sui marcatori del pronefro

La prima indicazione istologica dello sviluppo del pronefro in *Xenopus laevis* si osserva allo stadio 21 quando le cellule iniziano a condensare lontano dal mesoderma intermedio sotto i somiti dal 3 al 5. Queste cellule formeranno il corpo principale del pronefro. Quasi contemporaneamente si verifica una condensazione simile al di sotto dei somiti che vanno dal 5 al 7, che poi darà origine al dotto pronefrico. Il primordio di queste due strutture si fonde e il corpo del pronefro forma un lume e, quindi questi iniziano a estendersi mentre il dotto migra gradualmente, dove si fonderà con il diverticolo rettale e così si aprirà nella cloaca. (Vize et al., 1995). Ho eseguito un'ibridazione *in situ* su embrioni iperesprimenti eif6 a st. 22 usando *lhx1*, marcatore del mesoderma precoce del pronefro in sviluppo (Agrawal et al., 2009). L'ibridazione mostra che il primordio del pronefro dal lato iniettato è notevolmente meno esteso rispetto al lato non iniettato (Fig. 13 a,b). Come previsto, nei morfanti-gipc2, il lato iniettato presenta poche evidenze del mesoderma intermedio iniziale (Fig.13c). Che questo fenotipo non riguarda il mesoderma parassiale, è mostrato in Figura 13 d-f, dove gli embrioni sono stati fissati a st. 25/26 e ibridati con *myod1*: il lato iniettato e il lato controllo presentano infatti lo stesso *pattern* d'ibridazione e questo si verifica sia negli iper-espressi eif6 che nei morfanti-gipc2.

Il pronefro è organizzato lungo il suo asse prossimale-distale in un modo molto simile al nefrone metanefrico, permettendo così l'uso di marcatori molecolari del differenziamento terminale per l'identificazione dei suoi vari segmenti (Zhou e Vize, 2004) e quindi, nel caso della mia ricerca, per approfondire su quale porzione del pronefro agisce l'iperespressione di eif6. Usando come marcatore del glomo la nefrina,

(Naylor e Jones, 2009), si può notare che a st. 38 gli iniettati eif6 mostrano una riduzione della distribuzione della sua marcatura sul lato iniettato rispetto al controllo interno (Fig. 14 a-c'). Il marcatore del tubulo prossimale *slc5a9* (Zhou e Vize, 2004) dimostra che questa regione è parzialmente influenzata dalla iperespressione di eif6 (Fig. 14 d-e'), così come dalla riduzione di espressione di *gipc2* (Fig. 14 f-f'). Le ibridazione *in situ*, su embrione intero, effettuate utilizzando come *riboprobes* *clcnkb* o *cdh16*, entrambi marcatori di tubuli intermedi e distali e del dotto (Vize, 2003), mostrano inoltre che nel lato dell'embrione microiniettato con mRNA-eif6 il pronefro è decisamente meno sviluppato rispetto al lato non iniettato (Fig. 14 g-l'). Quindi posso concludere che l'iperespressione di eif6 causa una regressione delle porzioni principali del pronefro. (Fig 14 b,e,h e k). Gli stessi risultati sono stati ottenuti negli embrioni iniettati col morfolino-*gipc2* (Fig 14 c,f,i e l). Come ho detto in precedenza, *gipc2* si lega a *igfr* e porta all'attivazione del *pathway* della tirosin kinasi *pi3k/akt*, e la stessa eif6 si trova in questo *pathway* nella morfogenesi dell'occhio. Al fine di vedere se il fenotipo del pronefro causato dall'iperespressione di eif6 fosse correlato ad una diminuzione della fosforilazione/attivazione di *akt*, anche in questo caso ho coiniettato gli embrioni con eif6 e *p110**. Come risultato ho ottenuto un parziale recupero del fenotipo del pronefro, permettendo di ipotizzare che il *signalling* *igf/pi3k/Akt* sia necessario per la corretta morfogenesi del pronefro (65% n=28, Fig.14 m-m'), così come ho mostrato per l'occhio.

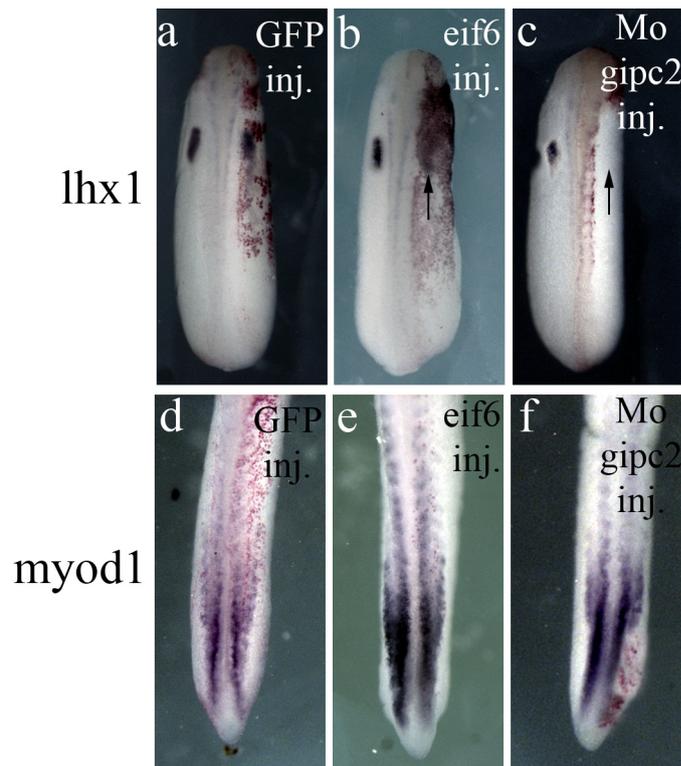


Fig. 13. Espressione dei marcatori del mesoderma intermedio e parassiale. Ibridazione *in situ whole mount* utilizzando i *markers*: *lhx1* (a-c) e *myod1* (d-f) su embrioni iniettati con la sola GFP (a,d) o con eif6 (b,e) o con mo-gipc2 (c,f). Gli iniettati GFP hanno uguale espressione dei *markers* sia nel lato iniettato che nel lato controllo (a,d). Gli embrioni iniettati con eif6 (b,e) e mo-gipc2 (c,f) hanno una forte riduzione della marcatura di *lhx1* (b,c) rispetto al controllo interno, mentre non si osservano variazioni nell'espressione del marcatore *myod1*(e,f).

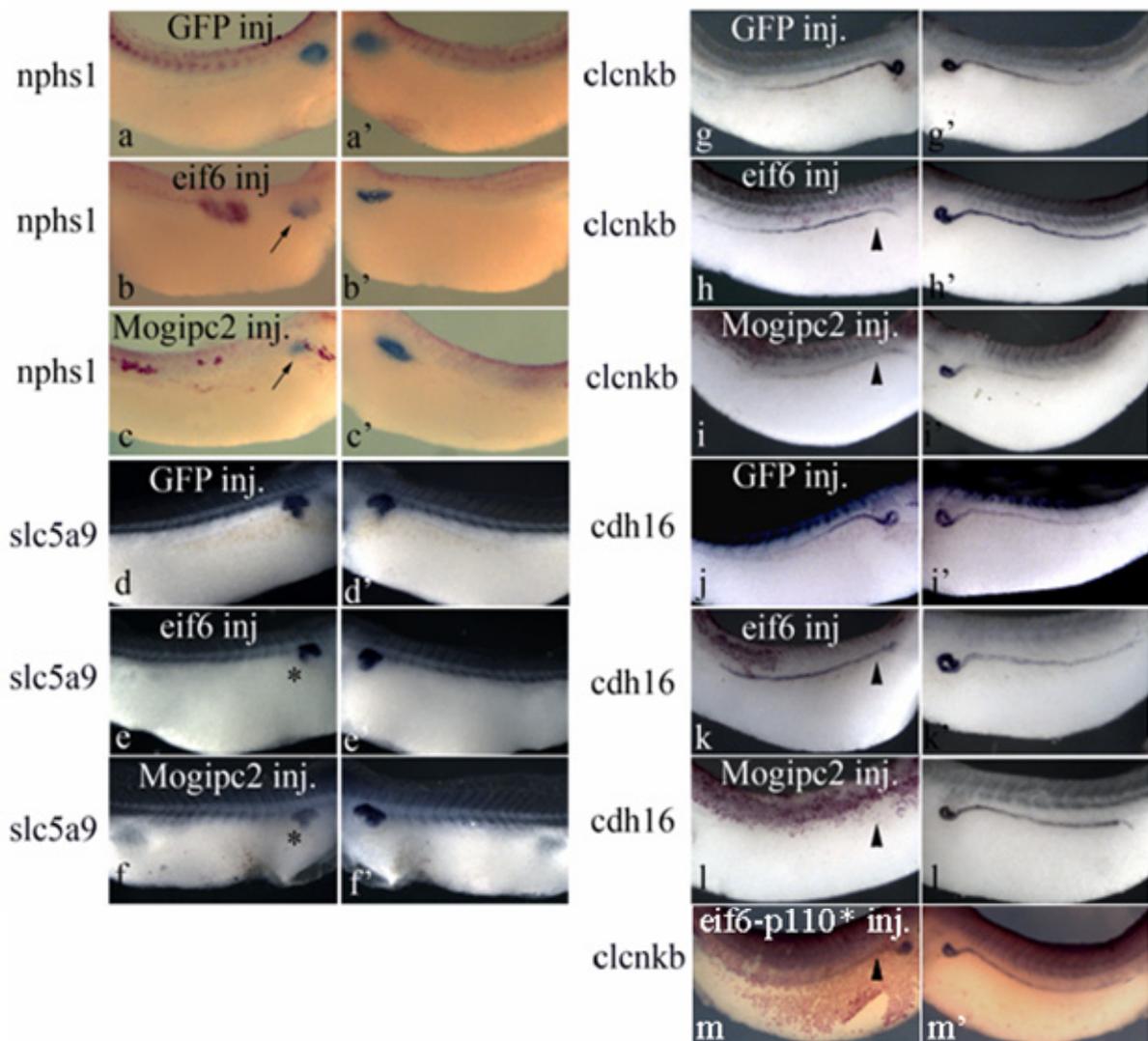


Fig. 14. Espressione dei marcatori del pronefro differenziato. Ibridazione *in situ whole mount* su embrioni iniettati con la sola GFP o con *eif6* o con *mo-gipc2*, o con *eif6-p110**, in un unico blastomero allo stadio 2. Gli embrioni sono stati fissati a stadio 38 e ibridati utilizzando i *markers*: *nphs1* (a-c'), *slc5a9* (d-f'), *clcnkb* (g-i', m-m') e *cdh16* (j-l'). Gli iniettati GFP hanno uguale espressione di tutti i *markers* sia nel lato iniettato che nel lato controllo (a,a',d,d',g,g',j,j'). Gli embrioni iniettati con *eif6* (b,e,h e k) e *mo-gipc2* (c,f,i,l) hanno una forte riduzione dei vari marcatori, sia del glomo (freccia) che del tubulo e del dotto pronefrico (punta di freccia o asterisco), dal lato iniettato rispetto al lato controllo (b',e',h' e k', per gli iniettati *eif6* e c',f',i',l' per i morfanti-*gipc2*). Gli embrioni iniettati con *eif6-p110** mostrano una marcatura molto simile, sia del tubulo che del dotto del pronefrico, nel lato iniettato rispetto a quello controllo (m-m').

8 gipc2 interagisce con alcune semaforine (4c e 4g) nella formazione dell'occhio

gipc2 interagisce con numerose proteine, molte delle quali sono proteine di membrana, come per esempio le semaforine-SemF e Sema 4C (Wang et al.,1999). Tra le semaforine studiate in *Xenopus*, la sema4C è espressa nell'occhio e in altri organi tra cui il pronefro, mentre solo una, la semaforina 4G viene espressa principalmente nell'occhio e nel pronefro, sebbene una certa espressione si verifichi anche nella vescicola otica. Ambedue le semaforine sono trans-membrana ed hanno il *consensus binding site* per il dominio PDZ di *gipc2* (Koestner et al., 2008). Come descriverò di seguito, in *Xenopus*, gli iperespressi di *eif6* hanno un difetto nella formazione del pronefro. Inoltre *gipc2* e *igf1r* sono espressi nel pronefro (Wu et al, 2006; Groigno et al.,1999) e i morfanti di *gipc2* hanno un pronefro anomalo. Sembrerebbe quindi che gli stretti rapporti esistenti in questi organi tra *igf signalling*, *eif6* e *gipc2* abbiano rilevanza per il loro sviluppo. La mia ricerca ha potuto approfondire solo in parte il rapporto tra sema 4c/sema 4g e lo sviluppo dell'occhio. Ho iniziato con esperimenti di *loss-of-function*. Embrioni iniettati con morfolino di sema 4g (10 ng, n= 30; 20 ng, n =30) hanno gravi difetti dello sviluppo dell'occhio, come mostrato nella figura 15 (embrioni a stadio 32 e 38), e anche nel pronefro. Embrioni iniettati con morfolino di sema 4c hanno anch'essi riduzione dell'occhio, ma le variazioni fenotipiche complessive sono più marcate dal momento che la dimensione corporea è molto ridotta (Fig. 15c,f). Ibridazioni in situ whole mount allo stadio 20 eseguite su morfanti di sema 4g e usando *rax* e *pax* quali RNA antisenso, indicano entrambe che il campo dell'occhio è fortemente ridotto nel lato iniettato (Fig. 15 i-j). Nel caso dei morfanti di sema 4c, il campo dell'occhio è solo parzialmente ridotto (Fig. 15 k,l). Per verificare se le

semaforine 4c e 4g interagissero a livello proteico con *gipc2* ho progettato esperimenti di transfezione in cellule 293T. Ho dunque effettuato il clonaggio nel vettore di espressione PCS2+MT, di tre semaforine: le sema 4c, 4g e 4b. Ho scelto la sema 4b perchè ha localizzazione diversa dalle prime due e non possiede il sito di legame per il dominio PDZ di *gipc2*, così da poterla usare quale controllo negativo. Il vettore PCS2+MT porta all'espressione di proteine con una sequenza *myc* in *frame*. Ciò permetterà di rivelare le semaforine con anticorpo anti-*myc*, condizione necessaria dal momento che in commercio non esiste un anticorpo capace di riconoscere le Semaforine 4 di *Xenopus laevis*. Per comprendere se le semaforine interagissero con *gipc2* attraverso il PDZ *domain* utilizzerò due vettori contenenti *gipc2*-wt e *gipc2*-mutata perché priva del sito PDZ, gentilmente forniti dal Dr. Marsden della University of Waterloo, Canada. L'esperimento di trasfezione e immunoprecipitazione sarà condotta in collaborazione con il prof. Luca Tamagnone dell'Università di Torino. Da esperimenti preliminari sembrerebbe che entrambe le sema 4c e 4g interagiscono solo con *gipc2*-wt e non con la sua forma mutata, ipotizzando che le semaforine 4c e 4g si leghino a *gipc2* e che il legame sia proprio dovuto all'interazione con il dominio PDZ. I risultati ottenuti, sebbene abbiano bisogno di ulteriore sperimentazione, suggeriscono che *gipc2* interagisca con sema 4c e sema 4g e che queste due semaforine siano essenziale per la corretta morfogenesi dell'occhio e probabilmente del pronefro.

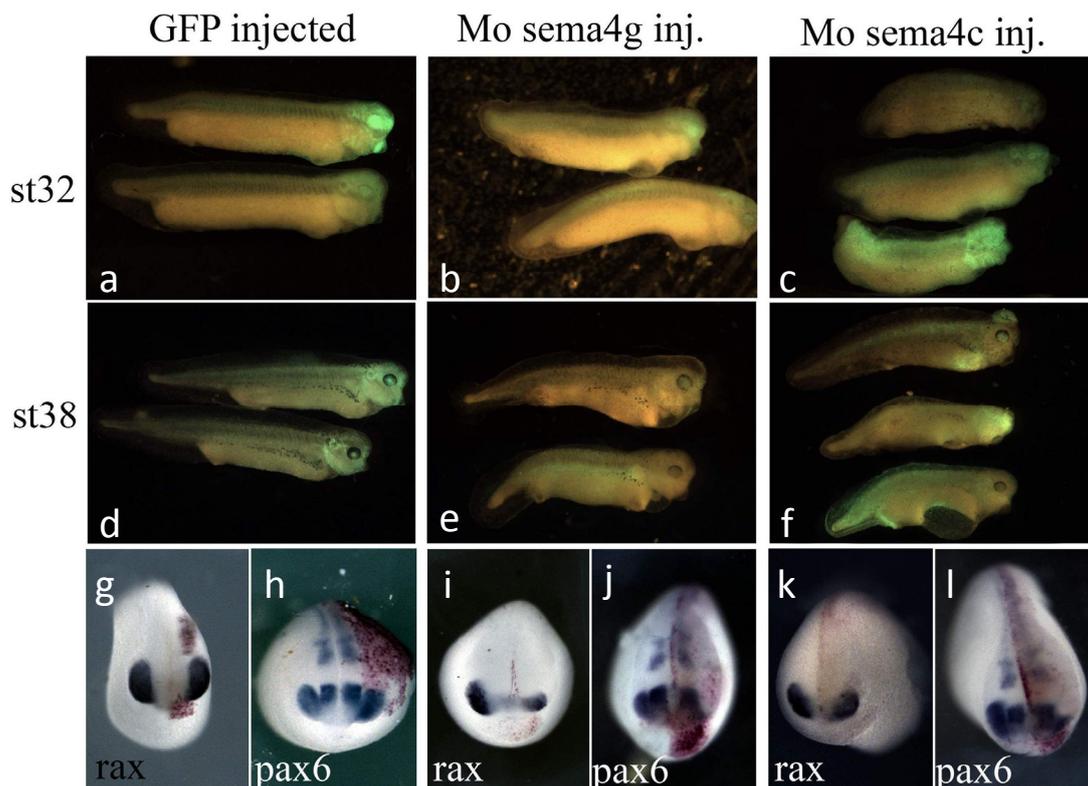


Fig. 15 (a-f) Embrioni iniettati GFP (400 pg) da sola o mo-sema4g (20ng) o mo-sema4c (20ng) in un singolo blastomero allo stadio 2 e fotografati a stadio 32 (a-c) e a stadio 38 (d-f). Gli embrioni iniettati GFP non mostrano alterazioni fenotipiche (a,d). Gli embrioni iniettati mo-sema4g mostrano occhio ridotto e edema nella zona antero-ventrale (b,e). Gli embrioni iniettati con mo-sema4c hanno il fenotipo oculare, l'edema ventrale e lunghezza ridotta (c,f). (g-l) Ibridazione *in situ whole mount* effettuata utilizzando i *markers*: *rax* (g,i,k) e *pax6* (h,j,l). Iniettati GFP hanno uguale espressione nel lato iniettato e nel controllo interno dei *markers* (g,h). Gli embrioni iniettati con mo-sema4g (i,j) hanno una forte riduzione dei due *markers* nel lato iniettato rispetto al controllo interno, invece gli iniettati mo-sema4c (k,l) hanno una riduzione più lieve dei marcatori nel lato iniettato rispetto al lato non iniettato.

9 eif6 potrebbe regolare gipc2 attraverso i miRNA?

eif6 sembra regolare il messaggero di gipc2. Dato che la sua azione più conosciuta, quale regolatore della traduzione dipendente dalla fosforilazione da parte di pkc, non ha a che fare con la sua funzione su gipc2 ed essendo noto che eif6 sia una componente del RISC (Chendrimada et al. 2007), ho ipotizzato che la regolazione di eif6 su gipc2 si potesse esplicare nel RISC. Ho quindi verificato la presenza di siti d'interazione con i miRNA sulla 3'UTR di gipc2. A tale scopo ho inserito la sequenza sia nel programma miRBase (Griffiths-Jones S et al., 2008) che in miRanda (www.microrna.org), ho incrociato i dati rilevati e avuto i miRNA riscontrati con entrambe i programmi:

miR-441a, miR-1183, miR-144*, miR-3524, miR-3576, miR-228, miR-304, miR-4083-3p, miR3637, miR-1823, miR-471-3p, miR-UL36*, miR1853-5p, miR-885, miR-3041, miR-548f, miR2119, miR-4194-3p, miR837-5p, miR-467c, miR-1612, miR-3033, miR-181b-2*, miR-539*, miR-16c, miR-539-3p, miR-1422k-3p, miR-153*, miR-467e*, miR-467c*, miR-669b*, miR-669m-3p, miR-532-5p, miR-190, miR-190, miR-3525, miR-539, miR-1818, miR837-5p, miR-548g, miR-96b*, miR-190b*, miR-1760, miR-722. Molti miRNA vengono confermati e tra questi diversi sono, da letteratura, presenti nell'occhio, nel rene o in entrambe. Un esempio è il miR30 (Agrawal R. et al., 2009) che si sa essere fondamentale per la formazione del pronefro in *Xenopus laevis* e il miR467e* presente nell'occhio di topo, il miR-532-5p coinvolto nel cancro del rene e nel retinoblastoma in uomo (Dave S. B. Hoon et al 2011).

DISCUSSIONE

Il controllo della traduzione di messaggeri da parte di eif6 nell'organogenesi di Xenopus

Il controllo della traduzione di proteine specifiche è fondamentale per la graduale restrizione della potenzialità e l'avvio al differenziamento terminale durante lo sviluppo embrionale. La mia ricerca è partita da questa considerazione ed ha riguardato il ruolo del fattore eucariotico di inizio della traduzione, eif6. Essa si è basata principalmente su esperimenti di *gain-of-function* e di *loss-of-function*, che mi hanno permesso di individuare, in particolare, fenotipi alterati negli iperespressi di eif6, riguarda l'occhio e il pronefro. Il motivo di base che ha ispirato la mia ricerca su eif6 è che esso regola la traduzione di mRNA specifici a seguito di stimolazione da parte di fattori di crescita. Nei mammiferi tale regolazione è principalmente basata nell'impedire che le subunità ribosomali interagiscano in assenza di fosforilazione effettuata da PKC. Come spiegato in precedenza eif6 mutata in Ser235A non può quindi essere fosforilata (Ceci et al., 2003). Nello *Xenopus* Carotenuto et al. (2005) hanno mostrato che eif6 viene fosforilata durante la oogenesi a seguito della cascata di fosforilazioni che portano alla maturazione dell'ooocita, per cui esistono due forme di eif6, una fosforilata e l'altra no di diverso peso molecolare nell'ooocita maturo. Queste due forme coesistono durante lo sviluppo embrionale e quando legate alla 60S sono in parte immobilizzate dal citoscheletro citocheratinico. Vaccaro et al. (2006 a, b) hanno poi messo in luce che nello *Xenopus* il sito Ser235 in eif6 è conservato. Nel mio lavoro di tesi ho mostrato che, anche in *Xenopus*, Ser235 di eif6 è il sito potenziale di fosforilazione da parte di pkc. Ho infatti eseguito un esperimento ispirato al fatto che in cellule di mammifero eif6

inibisce specificamente la traduzione di β -catenina (Ji et al., 2008). Ho constatato che lo stesso si verifica per la β -catenina in *Xenopus* e che Ser235 è necessaria per la traduzione di questa proteina. In un lavoro precedente è stato inoltre dimostrato che Ser235 è necessaria all'espletamento della funzione apoptotica di eif6, mostrando in particolare che *eif6* agisce come regolatore della sintesi delle proteine che sono coinvolte nell'apoptosi (De Marco et al., 2010a). E' interessante ricordare qui che dati sperimentali esposti nella mia tesi hanno evidenziato che l'apoptosi non è responsabile del fenotipo oculare in esame. Nel caso del fenotipo oculare dovuto all'iperpressione di eif6, ho invece verificato che gli embrioni iniettati con mRNA di S235A, presentano il fenotipo oculare allo stadio di girino, esattamente come avviene negli embrioni iniettati con eif6. Similmente ho potuto constatare per il fenotipo alterato del pronefro dovuto ad iperpressione di eif6 che: esso si ritrova anche in embrioni iniettati con la forma di eif6 mutata in S235. In letteratura è noto che nel RISC, macchinario molecolare capace di reprimere la traduzione in base all'azione dei miRNA, è presente sia eIF6 sia la subunità ribosomale 60 S ed in tal modo, secondo Chendrimada et al. (2007) eIF6 può inibire la traduzione bloccando il riciclo dei ribosomi su specifici mRNA bersaglio. Tuttavia, secondo Eulalio et al., (2008), eIF6 non sarebbe affatto necessaria per la inibizione della traduzione basata sull'azione dei mi-RNA. Nel mio lavoro di tesi ho mostrato che eif6 modula la traduzione dell'mRNA di *gipc2*. Ho quindi ipotizzato che l'attività di eif6 su *gipc2* si possa esplicare attraverso il RISC mediante l'azione di mi-RNA, come ipotizzato da Chendrimada et al. (2007). Un'analisi informatica mi permette di sostenere questa ipotesi. Infatti *gipc2* ha diversi siti bersaglio per differenti miRNAs. Le analisi della 3' UTR di *gipc2* attraverso i programmi miRBase (www.mirbase.org) e miRanda (www.microrna.org) riscontrano siti di legame

per miRNA implicati nello sviluppo del rene e/o dell'occhio. Un esempio è il miR30 (Agrawal R. et al., 2009) che sembra regolare lo sviluppo del pronefro in *Xenopus* e il miR467a implicati nello sviluppo dell'occhio in topo (Karali et al., 2010). Questo studio quindi potrebbe confermare che la specificità di azione di eif6 nei riguardi di ben precisi mRNA sia basata sulla presenza, in questi ultimi, di siti di legame per miRNA. Studi futuri dovranno dimostrare la validità di questa ipotesi.

I livelli di espressione di eif6 nello sviluppo embrionale

Un punto fondamentale mostrato dalla mia ricerca è che mentre elevati livelli di eif6 agiscono sfavorevolmente nello sviluppo, la sua parziale deplezione non vi arreca alcun danno. D'altro canto è noto che, per *eIF6*, anche nel topo si hanno effetti tessuto-specifici e dose-dipendenti, ma in direzione inversa, dal momento che è stato dimostrato che topi *eIF6*^{+/-}, dove si riscontra il 50% circa di diminuzione della proteina in tutti i tessuti, presentano effetti tessuto specifici i.e., riduzione della massa corporea e blocco della transizione G1/S solo nel fegato e nel tessuto adiposo (Gandin et al., 2008). Nel mio lavoro di tesi ho iniettato dosi crescenti di mRNA di eif6 ed ho ottenuto percentuali maggiori del fenotipo oculare con dosi di 400 pg rispetto a quando iniettato con 100pg, mentre dosi standard di morfolino, 7.5ng, producono un fenotipo normale. Simili risultati si sono ottenuti per quanto riguarda il pronefro. Sembra quindi che nello *Xenopus* i livelli di eif6 al di sotto di una soglia fisiologica siano sufficienti per la corretta tempistica di sviluppo dell'occhio e per ottenere un pronefro normale, mentre livelli superiori a questo valore inducano le anomalie osservate. I livelli di eif6 appaiono allora essere altamente regolati durante l'embriogenesi per ottenere uno sviluppo corretto. La modulazione del livello fisiologico di eif6 potrebbe partire da fattori di

crescita igf-like. E' noto che il segnale Igf modula la formazione dell'occhio (Richard-Parpaillon et al., 2002; Pera et al., 2001; Wu et al., 2006) e recettori per igf sembrerebbero essere attivi anche nel pronefro (Groigno et al 1999). D'altra parte ho mostrato che eif6 modula segnali che partono dai recettori igfr, in particolare eif6 modula l'espressione di gipc2. Potrebbe essere questa stessa proteina ad agire, grazie ad un *loop* regolativo, sui livelli di eif6 mantenendoli nel *range* fisiologico. Futuri esperimenti saranno rivolti allo studio di tale ipotetica regolazione.

I segnali provenienti da igf e l'interazione con gipc2 nell'organogenesi dell'occhio e del pronefro

La realizzazione di un organo quale l'occhio o il pronefro è materia estremamente complessa e sicuramente sono molti gli stimoli che concorrono a queste finalità. Gli esperimenti di co-immunoprecipitazione con anticorpi anti-Eif6 e anticorpi che riconoscono indirettamente igfr1 hanno mostrato che eif6 interagisce con igfr e successivamente l'impiego di anticorpi contro le forme fosforilate e non di akt e di mapk mi hanno permesso di concludere che la iperspressione di eif6 regola negativamente la fosforilazione di akt e non di mapk. Quindi eif6 è attivo lungo il ramo pi3k/akt di igfr per partecipare alla corretta formazione dell'occhio, come anche mostrato dagli esperimenti di recupero del fenotipo oculare mediante co-iniezione di eif6 e di p110*, la subunità costitutivamente attiva di pi3k. Ciò è in pieno accordo con il fatto che igf è necessaria e sufficiente per la formazione delle strutture embrionali anteriori occhio incluso (Pera et al., 2001 and Richard Parpaillon et al., 2002). Inoltre, visto che la diminuzione di p-akt negli embrioni iniettati con eif6 si verifica solo in embrioni che hanno superato lo stadio 10, posso dire che eif6 è attivo nel mantenere non

nel provocare il segnale di igf necessario alla formazione di quest'organo. Ho poi mostrato che eif6 interagisce con gipc2, proteina necessaria alla formazione dell'occhio in *Xenopus laevis* (Wu et al., 2006). I morfanti di gipc2 hanno un fenotipo molto simile a quello degli iperespressi di eif6. gipc2 interagisce con igfr ed è fondamentale per lo sviluppo igf-dipendente dell'occhio, ma evidentemente in direzione opposta a eif6 perchè sono i suoi morfanti e non gli iperespressi ad avere occhi rudimentali. Anche gipc2 partecipa al segnale pi3k-akt a valle di igf, e anch'essa è importante per il mantenimento non per iniziare il *signalling* (v. Wu et al., 2006). Quindi eif6 e gipc2 interagiscono per convogliare l'attivazione del segnale igf alla formazione dell'occhio. Come accennavo in precedenza le due proteine probabilmente agiscono mantenendo i loro livelli a valori costanti. Al momento posso solo affermare però che gli esperimenti da me effettuati di *Real-Time PCR* e quelli di recupero del fenotipo oculare mediante co-iniezione di gipc2/eif6 mostrano, che eif6 regola i livelli di gipc2 in un modo dose-dipendente. Nel complesso, la capacità di eif6 di abbassare i livelli di gipc2 suggerisce che per avere la formazione di un occhio normale la proteina gipc2 non debba diminuire al di sotto di una concentrazione soglia e che, reciprocamente, eif6 non debba superare una concentrazione soglia (vedi De Marco et al., 2011). Quindi il ritardo della formazione dell'occhio causato da iperespressione di eif6 è dovuto alla capacità di questa proteina di abbassare i livelli di gipc2. Gli esperimenti condotti sul pronefro indicano che la iperespressione di eif6 produce un fenotipo aberrante del pronefro accompagnato dalla formazione di un edema ventrale-anteriore che è la spia del malfunzionamento pronefrico. Il pronefro degli iperespressi presenta sia il glomo che i tubuli e il canale collettore severamente ridotti. Ho potuto mostrare ciò mediante l'impiego di mRNA antisense specifici per i tre principali costituenti del pronefro.

Anche in questo caso gli embrioni iniettati con morfolino di *eif6* non differiscono dagli embrioni w.t., come accennato. D'altro canto ho mostrato in modo assolutamente sovrapponibile a quanto mostrato per il fenotipo oculare, che i morfanti di *gipc2* hanno un forte difetto nella formazione del pronefro, mentre gli iperespressi *gipc2* hanno un pronefro normale. Quindi, come già menzionato, nel caso dell'occhio, per avere una corretta formazione del pronefro i livelli di espressione di *gipc2* devono essere al di sopra di un valore soglia, per altro assai simile a quello necessario al corretto *timing* della formazione dell'occhio. Anche in questo caso embrioni co-iniettati con morfolino di *gipc2* e *p110** recuperano il fenotipo difettoso del pronefro, mostrando che alla formazione del pronefro concorre lo stesso tipo di segnale che parte da *igfr* per la formazione dell'occhio. Dal momento che due organi, l'occhio e il pronefro sono regolati dall'interazione di *eif6* e di *gipc2* lungo il pathway di *pi3k/akt*, si potrebbe supporre che questa interazione sia attiva anche nella determinazione di altri organi dello *Xenopus*. Mettendo a confronto i pattern di espressione di *eif6* e di *gipc2*, si può ipotizzare che questo potrebbe essere il caso, per esempio, della vescicola otica (Vaccaro et al., 2006; Wu et al, 2006).

gipc2 interagisce con altre molecole transmembrana

Un punto estremamente importante, a mio avviso, è che *eif6* interagisca proprio con *gipc2* che è un formidabile centro di smistamento di segnali ad altri *signalling pathways*. Tale proteina lega non solo *igfr*, e tipicamente RDGS-GAIP (De Vries et al.,1998, Booth et al., 2002), ma anche svariati recettori di membrane incluso alcune semaforine di tipo 4 (Wang et al.,1999). E' lecito ipotizzare che *eif6* regoli i livelli di *gipc2* che portano di conseguenza all'attivazione di *signalling* a valle, specifici a

seconda dell'organo. Koestner et al. (2008) definendo l'espressione di 13 semaforine nello sviluppo di *Xenopus laevis*, hanno mostrato che sema4c è espressa nell'occhio e nel pronefro oltre che in svariati altri organi mentre la sema 4g è espressa solo nell'occhio, il pronefro e il placode otico. Esperimenti in via di completamento e in collaborazione con il gruppo del Prof. Tamagnone dell'Università di Torino hanno mostrato che ambedue queste semaforine interagiscono con gipc2, ma non con la forma mutata di gipc2 che manca del dominio PDZ specifico per il legame con le semaforine in questione. Embrioni iniettati con morfolino di sema4g hanno gravi difetti dello sviluppo dell'occhio e anche nel pronefro. Embrioni iniettati con morfolino di sema4c hanno anch'essi riduzione dell'occhio, ma le variazioni fenotipiche complessive sono più marcate dal momento che la dimensione corporea è molto ridotta. Studi futuri dovranno definire le basi molecolari e il significato di questa interazione.

BIBLIOGRAFIA

R. Agrawal, U. Tran, O. Wessely (2009). *The miR-30 miRNA family regulates Xenopus pronephros development and targets the transcription factor Xlim1/Lhx1*. *Development*. 2009 Dec;136(23):3927-36.

J. D. Aitchisona, M. P. Routh (2000). *The Road to Ribosomes Filling Potholes in the Export Pathway*. Published November 27, 2000 // JCB vol. 151 no. 5 F23-F26.

D. Benelli, S. Marzi, C. Mancone, T. Alonzi, A. la Teana, P. Londei (2009). *Function and ribosomal localization of aIF6, a translational regulator shared by archaea and eukarya*. *Nucleic Acids Research*, 2009, Vol. 37, No. 1.

S. Biffo, F. Sanvito, S. Costa, L. Preve, R. Pignatelli, L. Spinardi and P. C. Marchisio (1997). *Isolation of a Novel $\beta 4$ Integrin-binding Protein ($p27^{BBP}$) Highly Expressed in Epithelial Cells*. *The journal of biological chemistry*. Vol 272, pp.30314-30321.

R. A. Booth, C. Cummings, M. Tiberi, and X. J. Liu (2002). *GIPC Participates in G Protein Signalling Downstream of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*. *The Journal Of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 8, Issue of February 22, pp. 6719–6725, 2002.

R. Carotenuto, N. De Marco, S. Biffo, M. Wilding, M. C. Vaccaro, P.C. Marchisio, T. Capriglione, G. L. Russo and C. Campanella (2005). *Phosphorylation of*

p27^{BBP}/eIF6 and its association with the cytoskeleton are developmentally regulated in Xenopus oogenesis. CMLS. Vol 62, pp 1641-1652.

M. Ceci, C. Gaviraghi, C. Gorrini, L.A. Sala, N. Offenhauser, P. C. Marchisio and S. Biffo (2003). *Release of eIF6 (p27^{BBP}) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly*. Nature. Vol 426, pp 579-584.

T. P. Chendrimada, K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli and Ramin Shiekhattar (2007). *MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6*. Nature. Vol 447, pp 823-828.

S. Decembrini, M. Andreazzoli, R. Vignali, G. Barsacchi, F. Cremisi (2006). *Timing the Generation of Distinct Retinal Cells by Homeobox Proteins*. September 2006 | Volume 4 | Issue 9 | e272.

Drummond et Majumdar (2003). *The kidney: from normal developmental of congenital disease*. Capitolo 5 di: The pronephric glomus and vasculature. Editori Vize et al., A.P.

N. De Marco, L. Iannone, R. Carotenuto, S. Biffo, A. Vitale and C. Campanella (2010). *p27^{BBP}/eIF6 acts as an anti-apoptotic factor upstream of Bcl-2 during Xenopus laevis development*. Cell death and Differentiation. 17: 360-72.

N. De Marco, M. Tussellino, A. Vitale, C. Campanella (2011) *Eukaryotic initiation factor 6 (eif6) overexpression affects eye development in Xenopus laevis*. *Differentiation* 82: (2011) 108–115

A. Donadini, A. Giodini, F. Sanvito, P.C. Marchisio and S. Biffo (2001). *The human ITGB4BP gene is constitutively expressed in vitro, but highly modulated in vivo*. *Gene*. Vol 266, pp 34-43.

V. Gandin, A. Miluzio, A.M. Barbieri, A. Beugnet, H. Kiyokawa, P.C. Marchisio and S. Biffo (2008). *Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation*. *Nature*. Vol455, pp 684-688.

J. Heasman (2002). *Morpholino oligos: making sense of antisense?*. *Developmental biology*. Vol 243, pp. 209-214.

D. S. B. Hoon et al 2011, M. Kitago (2011). *Use of runx3 and miR-532-5p as cancer markers and therapeutic targets* . Patent Application Publication Jun. 30, 2011.

S. Grosso, V Volta, L. A. Sala*, M. Vietri, P. C. Marchisio, D. Rons and S. Biffo (2008). *PKC β II modulates translation independently from mTOR and through RACK1*. *Biochem. J.* (2008) **415**, 77–85 (Printed in Great Britain).

R. W. Naylor and Elizabeth A. Jones. *Notch activates Wnt-4 signalling to control*

medio-lateral patterning of the pronephros. *Development* 136, 3585-3595 (2009)
doi:10.1242/dev.042606

Y. Ji, S. Shah, K. Soanes, MN Islam, B. Hoxter, S. Biffo, T. Heslip and S. Byers. (2008). *Eukaryotic initiation factor 6 selectively regulates Wnt signalling and β -catenin protein synthesis*. *Oncogene*. pp 1-8.

L.R. Parpaillon, C. Héligon, F. Chesnel, D. Boujard and A. Philpott (2002). *The IGF pathway regulates head formation by inhibiting Wnt signalling in Xenopus*. *Developmental biology*. Vol 244, pp 407-417.

E.M. Pera, O. Wessely, S.Y. Li and E.M De Robertis (2001). *Neural and Head induction by insulin-like growth factor signals*. *Developmental cell*. Vol 1, pp 655-665.

B. Senger, D. L.J. La fontaine, J-S. Graindorge, O. Gadal, A. Camasses, A. Sanni, J-M. Garnier, M. Breitenbach, E. Hurt and F. Fasiolo. *The Nucle(ol)ar Tif6p and Efl1p Are Required for a Late Cytoplasmic Step of Ribosome Synthesis*. *Molecular Cell*, Vol. 8, 1363–1373, December, 2001, Cell Press.

F. Sanvito, S. Piatti, A. Villa, M. Bossi, G. Lucchini, P. C. Marchisio and S. Biffo (1999). *The B4 Integrin Interactor P27^{BBP}/eIF6 Is An Essential Nuclear Matrix Protein Involved In 60S Ribosomal Subunit Assembly*. *The journal of cell biology*. Vol 144, pp 823-837.

F. Sanvito, F. Vivoli, S. Gambini, G. Santambrogio, M. Catena, E. Vitale, F. Veglia, A. Donadini, S. Biffo and P.C. Marchisio (2000). *Expression of a highly conserved protein, p27^{BBP}, during progression of human colorectal cancer.* Cancer research. Vol 60, pp. 510-516

K. Si, J. Chaudhuri, J. Chevesich and U. Maitra (1997). *Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding translation initiation factor 6.* Biochemistry. Vol 94, pp 14285-14290.

M. C. Vaccaro, M. Cuccaro, N. De Marco, and C. Campanella (2006). *Expression of p27^{BBP}/eIF6 is highly modulated during Xenopus laevis embryogenesis.* Molecular reproduction and development. Vol.73, pp 482-490.

DM Valenzuela, A Chaudhuri, U Maitra (1982). *Eukaryotic ribosomal subunit anti-association activity of calf liver is contained in a single polypeptide chain protein of Mr = 25,500 (eukaryotic initiation factor 6).* J Biol Chem. 1982 Jul 10;257(13):7712-9.

P. D. Vize, D. W. Seufert, T. J. Carroll, J. B. Wallingford (1997). *Model Systems for the Study of Kidney Development: Use of the Pronephros in the Analysis of Organ Induction and Patterning.* Volume 188, Issue 2, 15 August 1997, Pages 189-204.

Li-H. Wang, R. G. Kalb, and S. M. Strittmatter (1999). *A PDZ Protein Regulates the Distribution of the Transmembrane Semaphorin, M-SemF.* The Journal of Biological Chemistry. Vol. 274, No. 20, Issue of May 14, pp. 14137–14146, 1999.

J. Wu, M. O'Donnell, A.D. Gitler and P.S. Klein (2006). *Kermit 2/XGIPC, an IGF1 receptor interacting protein, is required for IGF signalling in Xenopus eye development*. *Development*. Vol 133, pp 3651-3660.

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

Citati ma non letti:

Clemmons et al., 1995, **Groigno** et al., 1999, **Hart** et al., 1999, **Kitagawa** et al., 1999, **Li** et al., 1999, **Olden e Hafen** et al., 2003, **Orford** et al., 1997, **Roft** et al., 2000, **Rubinfield** et al., 1996, **Russell e Spremulli**, 1979, **Weinstein and Steiz**, 1999, **Winston** et al., 1999, **Wood** et al., 1999.