



Università Politecnica delle Marche

Dipartimento Scienze della vita e dell'ambiente

*Corso di laurea triennale in Scienze biologiche*

***L'AUTOFAGIA È NECESSARIA PER LA RIGENERAZIONE DELLA PINNA CAUDALE DEL PESCE ZEBRA***

***AUTOPHAGY IS REQUIRED FOR ZEBRAFISH CAUDAL FIN REGENERATION***

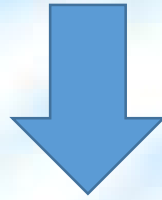
Laureanda  
Chiara Pia Viggiani

Docente Referente  
Chiar.ma Prof.ssa Francesca Maradonna

Sessione autunnale  
Anno Accademico 2019/ 2020

# INTRODUZIONE

*RIGENERAZIONE*: capacità degli organismi pluricellulari di sostituire componenti citoplasmatici danneggiati o malfunzionanti



*AUTOFAGIA*

# SCOPO DEL LAVORO

Importanza dell'*AUTOFAGIA* nella rigenerazione della pinna caudale del Pesce zebra che, inizia da un tessuto altamente proliferativo, tramite differenziazione cellulare:

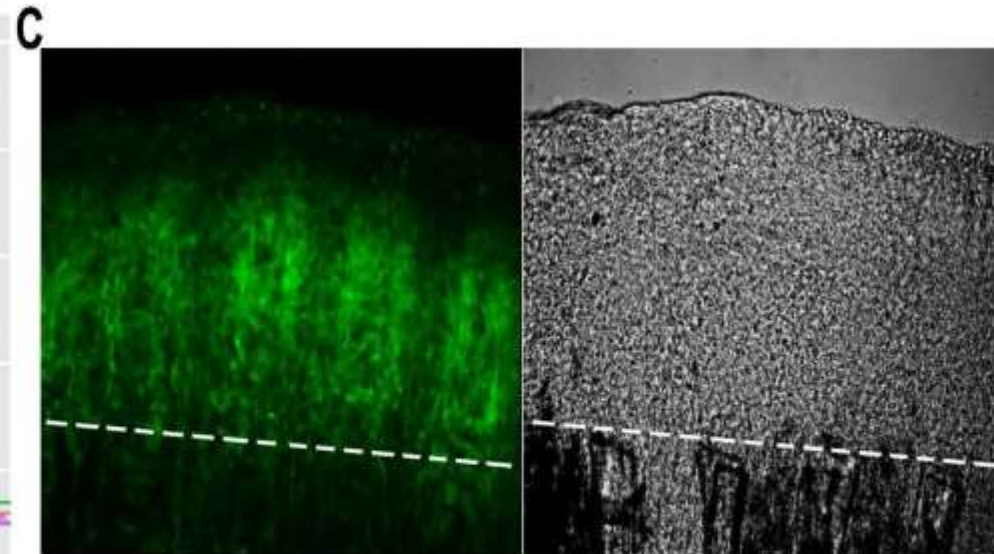
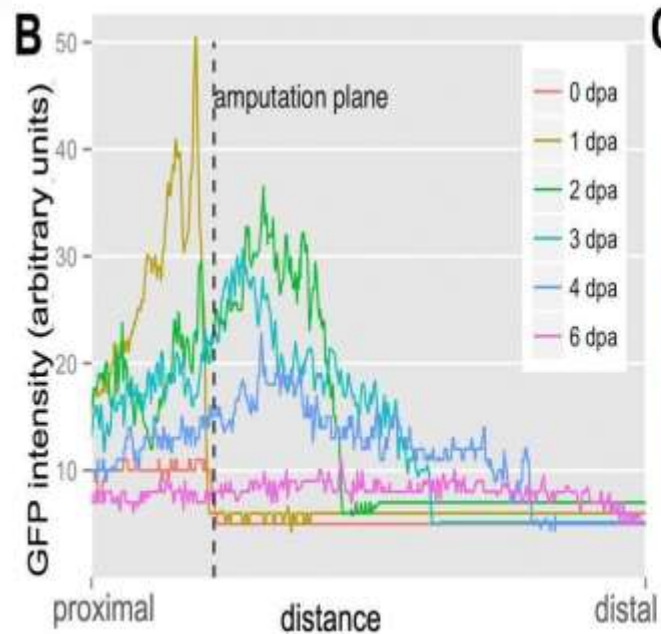
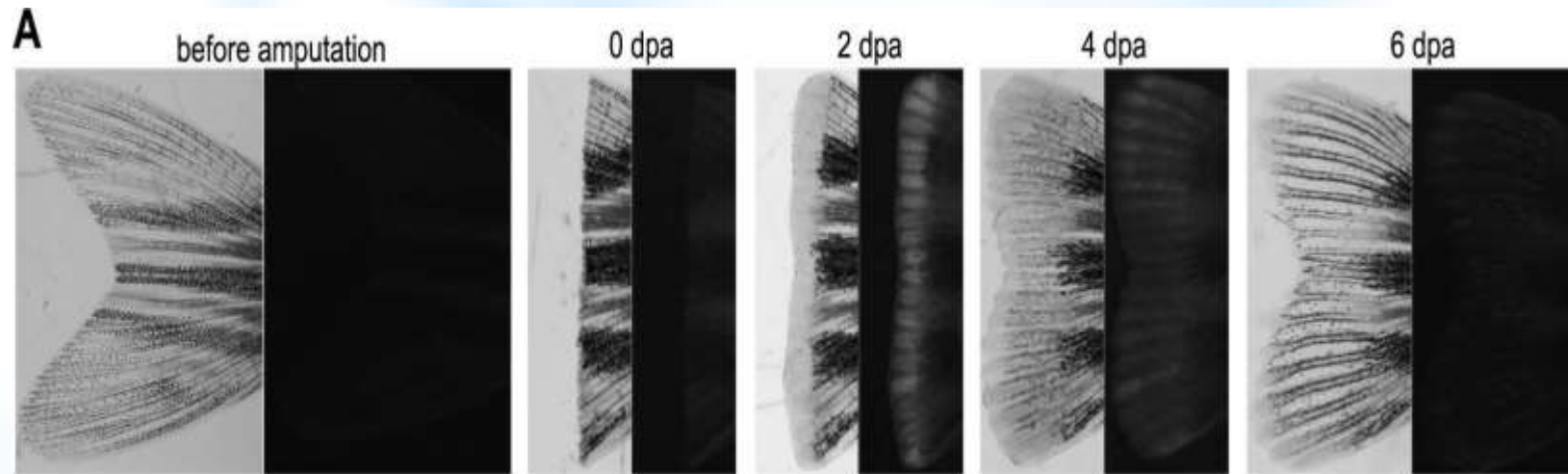


*BLASTEMA*

# MATERIALI E METODI

- Amputazione su pesci di tipo selvatico del ceppo *ekwill* e Zebrafish transgenico di 4-12 mesi di età
- Tessuti della coda fissati in  $\text{OsO}_4$  e incorporati in resina plastica Durcupan
- Sezioni ultrasottili raccolte su griglie rivestite con formvar
- Frammenti di pinne reidratati con diversi lavaggi in miscela di metanolo-PBST
- Kit ApopTag per effettuare la colorazione TUNEL
- Terreno di coltura per le cellule umane HeLa contenente glucosio, siero di vitello fetale inattivato al 10%, gentamicina e G418

# RISULTATI



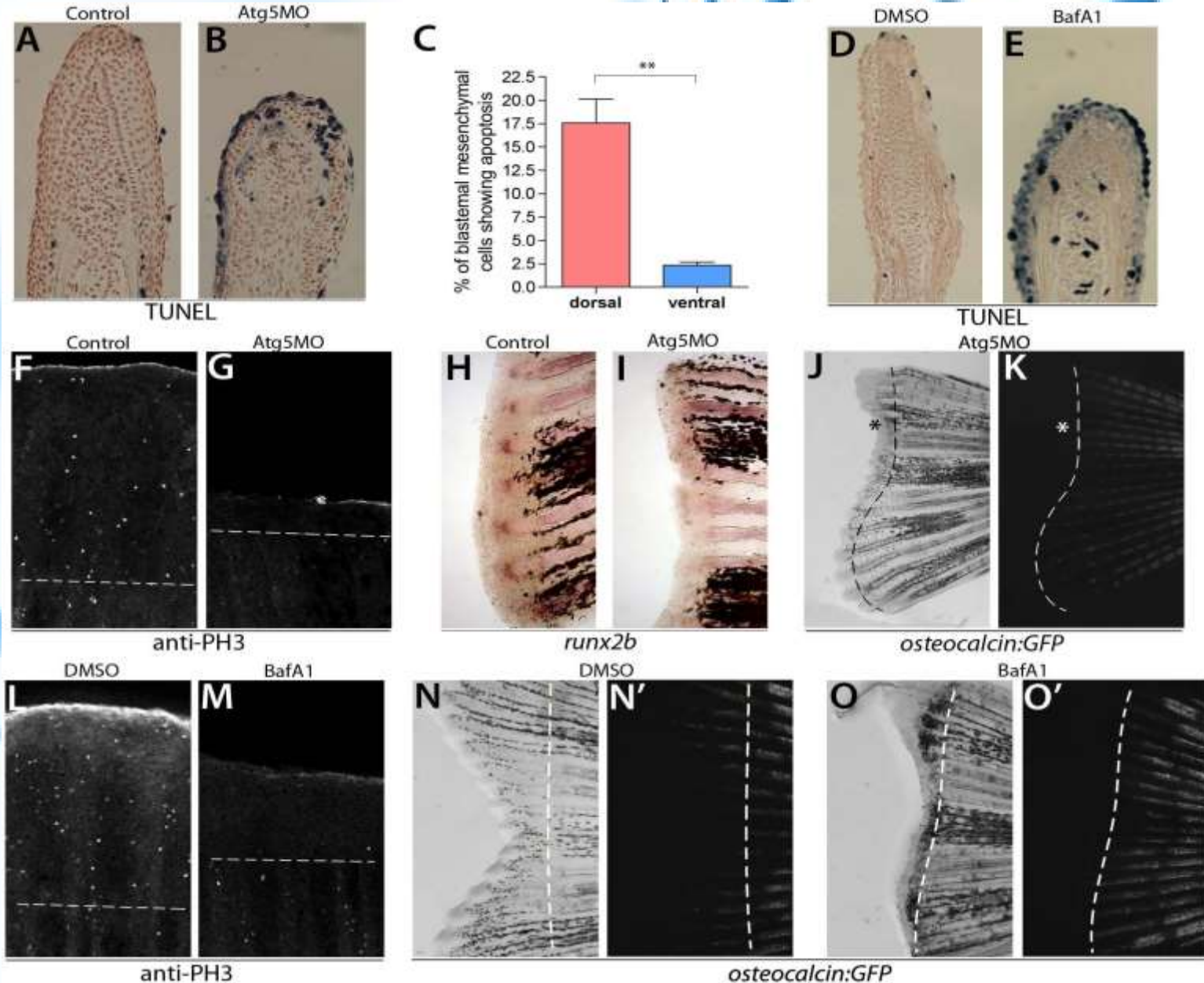
Cellule di nuova  
differenziazione nella  
pinna caudale dello  
Zebrafish *GFP-Lc3*.

# RISULTATI

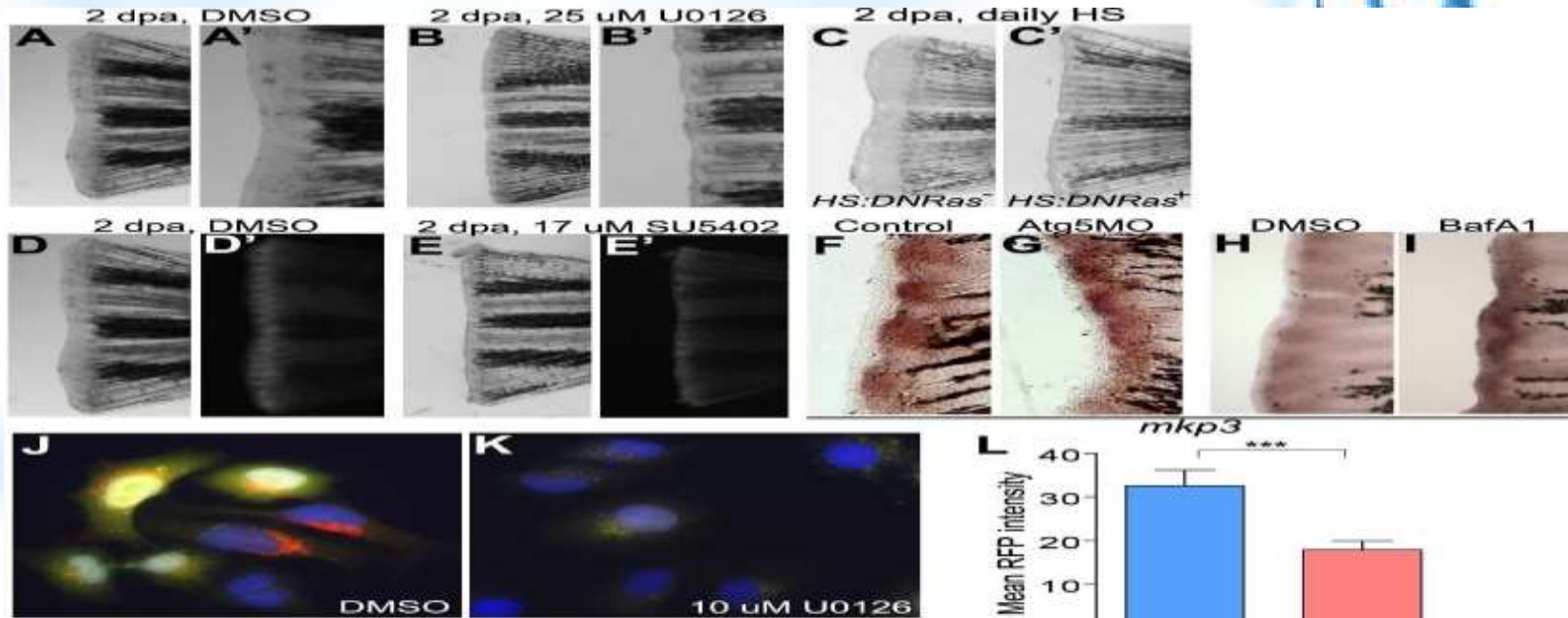
Inibitori dell'autofagia Atg5MO e  
Bafilomicina A<sub>1</sub>



- Riduzione della capacità proliferativa del blastema
- Aumento di cellule apoptotiche
- Mancata espressione di marcatori: *runx2b* e *osteocalcina*



# RISULTATI



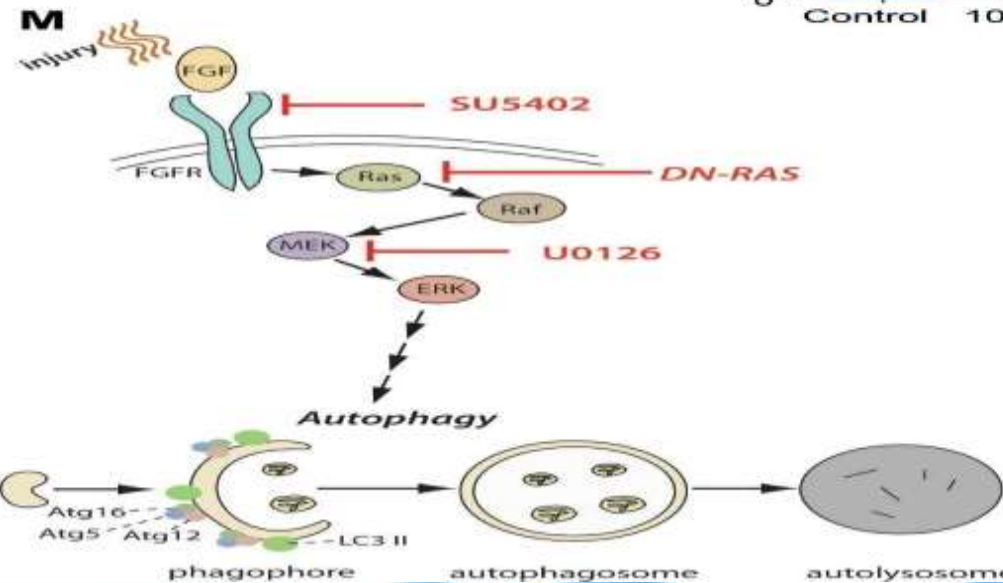
Inibitore della segnalazione

Ras-Mapk/ Erk *U0126*



Downregolazione del processo

autofagico



Inibitore del recettore Fgf

*SU5402*



Livelli basali di fluorescenza

nei blastemi GFP-Lc3

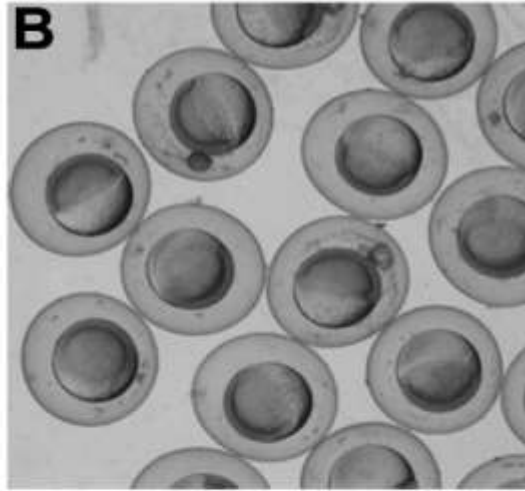
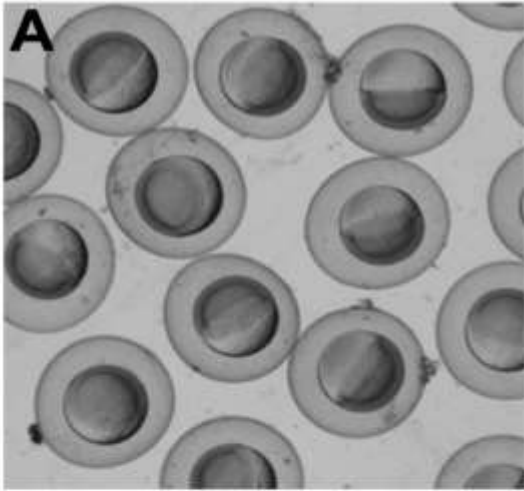
# RISULTATI

cntrl

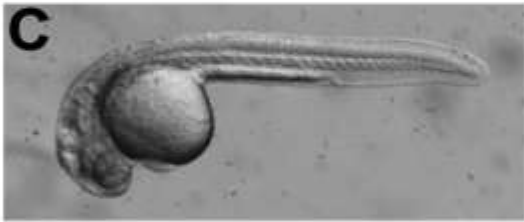
1nl 250uM atg5MO

20mM Baf

50% epiboly



1 dpf



2 dpf



Iniezione MO



- Fenotipo notochord ondulato o piegato
- Tronchi ricci corti ed edemi cardiaci occasionali

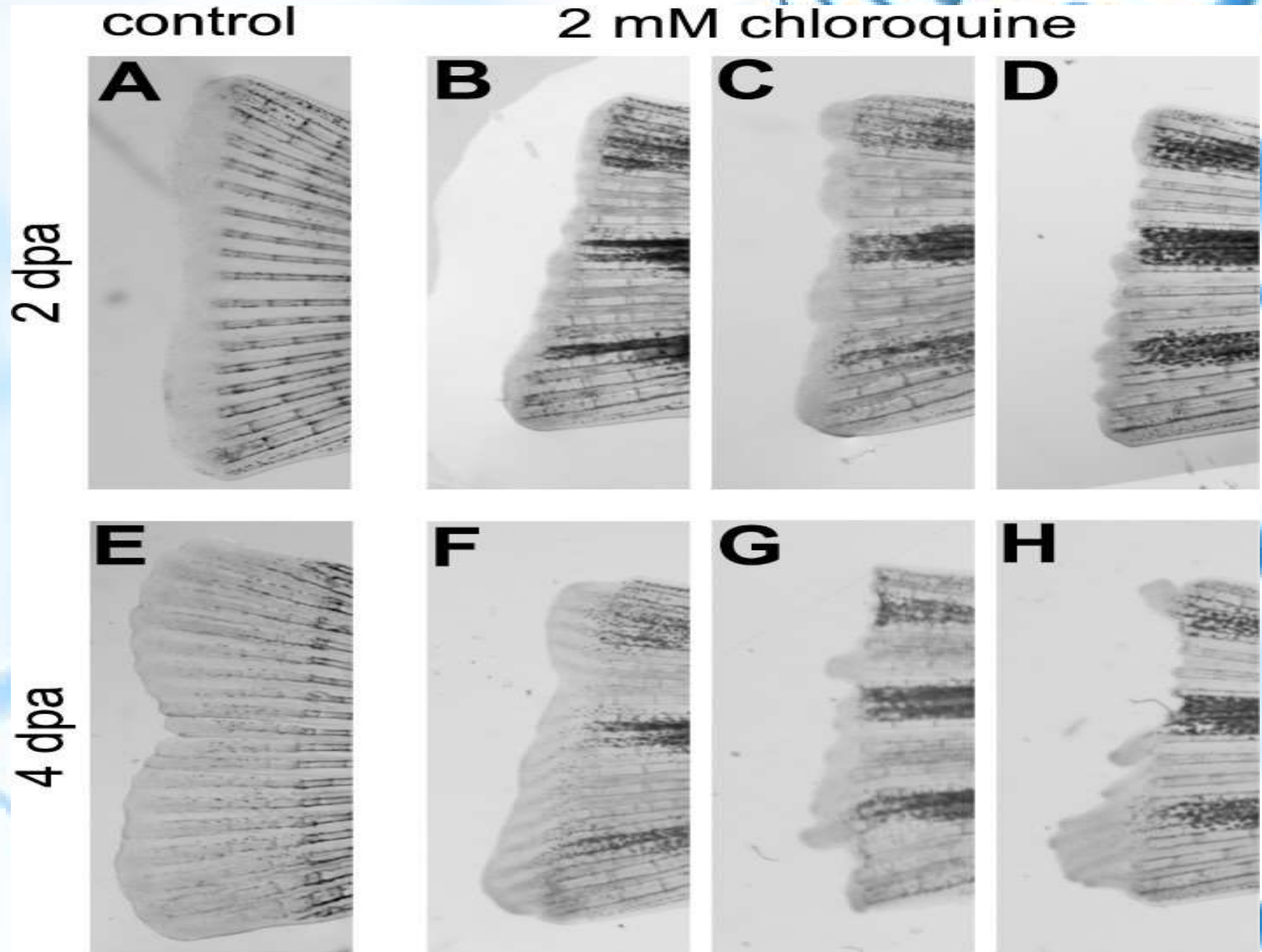


# RISULTATI

Trattamento con  
cloroquina



Riduzione della  
rigenerazione della  
pinna caudale

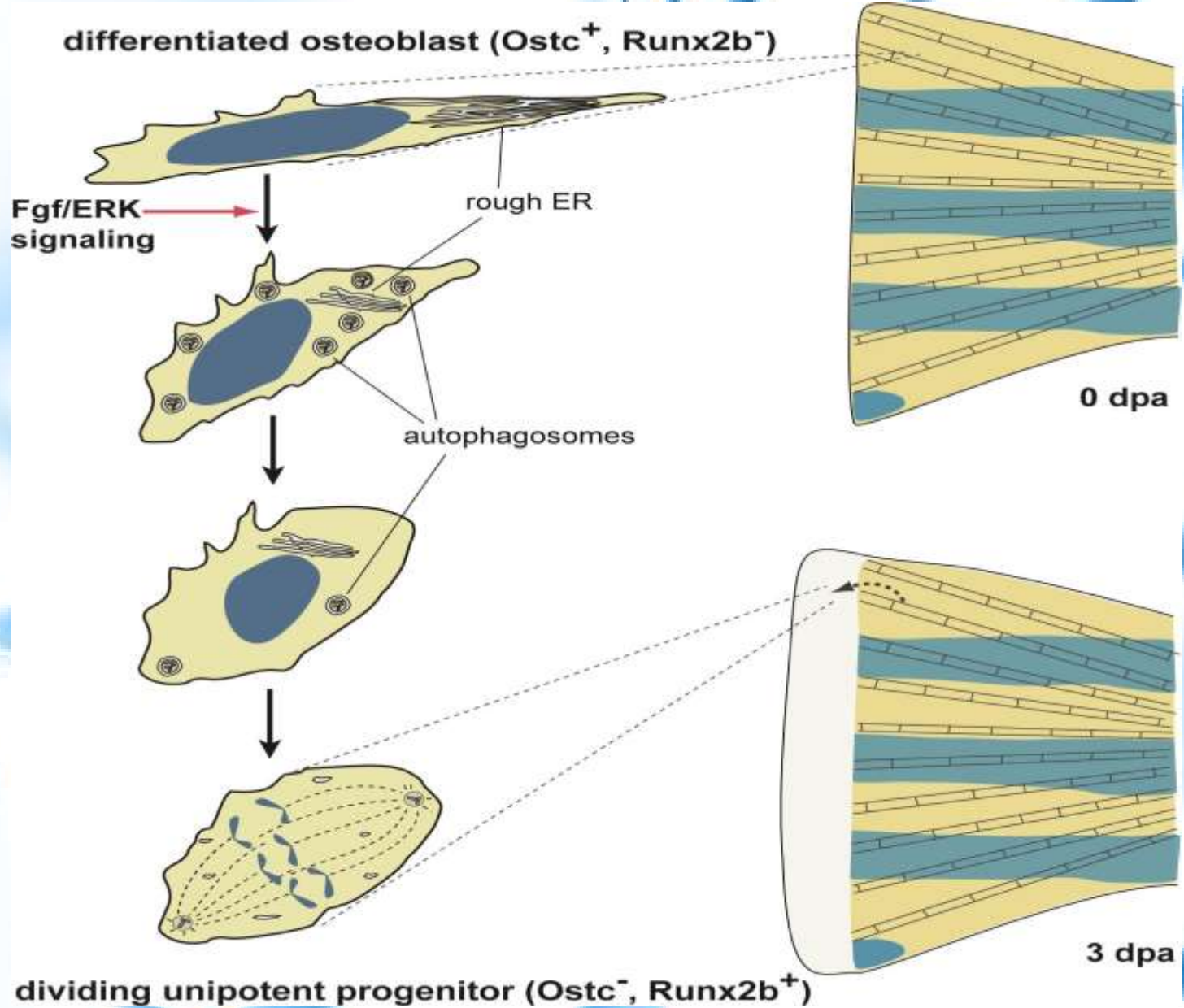


# RISULTATI

Marcatore di differenziazione precoce *Runx2b* upregolato

*MACROAUTOFAGIA*

Marcatore tardivo *Ostc* downregolato



# CONCLUSIONI

- ↑ Attività autofagica nel blastema durante la rigenerazione delle pinne caudali
- ↑ Cellule apoptotiche nei blastemi difettosi di autofagia
- Ruolo essenziale del meccanismo di segnalazione Ras-Mapk/ Erk
- Rallentamento dell'invecchiamento cellulare da parte di farmaci che promuovono l'autofagia

# RINGRAZIAMENTI



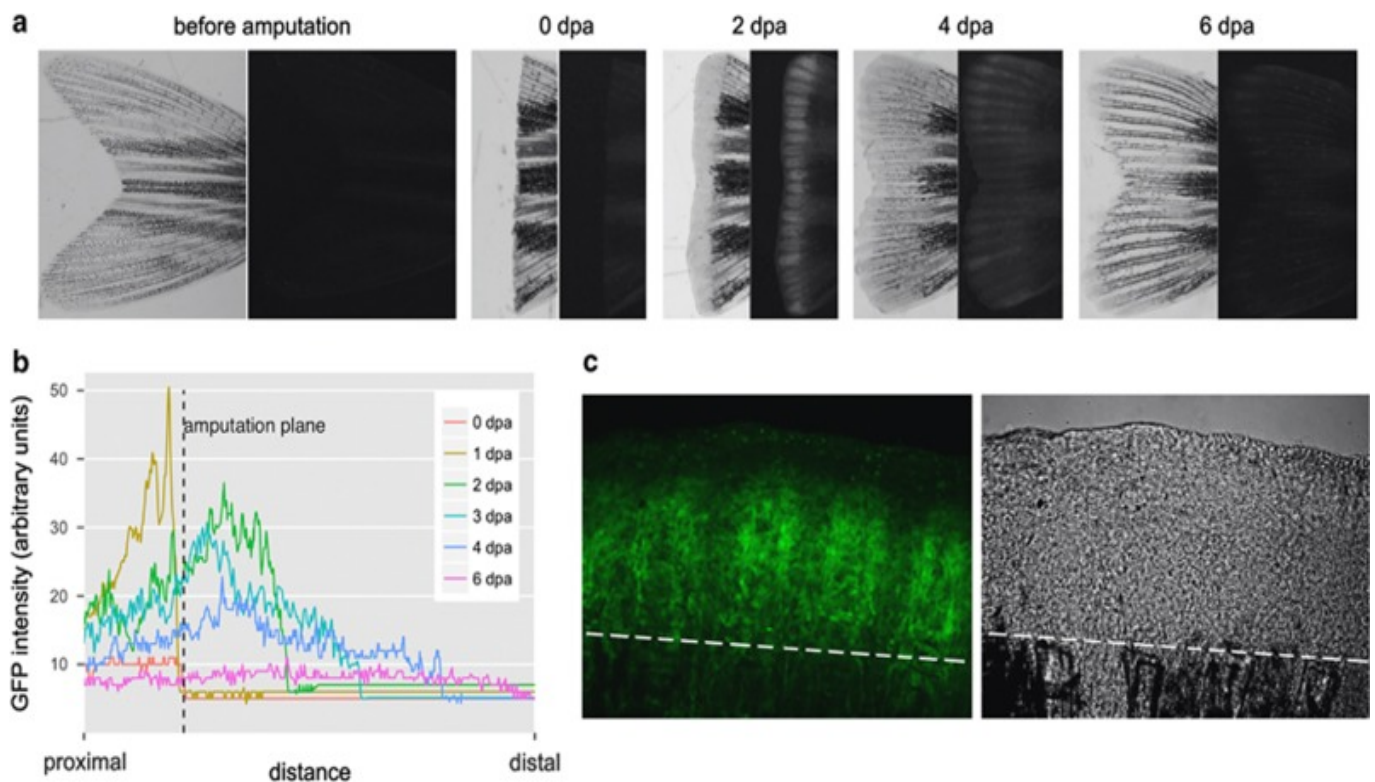
- Chiar.ma Prof.ssa Francesca Maradonna
  
- Chiar.ma Prof.ssa Oliana Carnevali

Grazie per la cortese attenzione!

## ***L'AUTOFAGIA È NECESSARIA PER LA RIGENERAZIONE DELLA PINNA CAUDALE DEL PESCE ZEBRA***

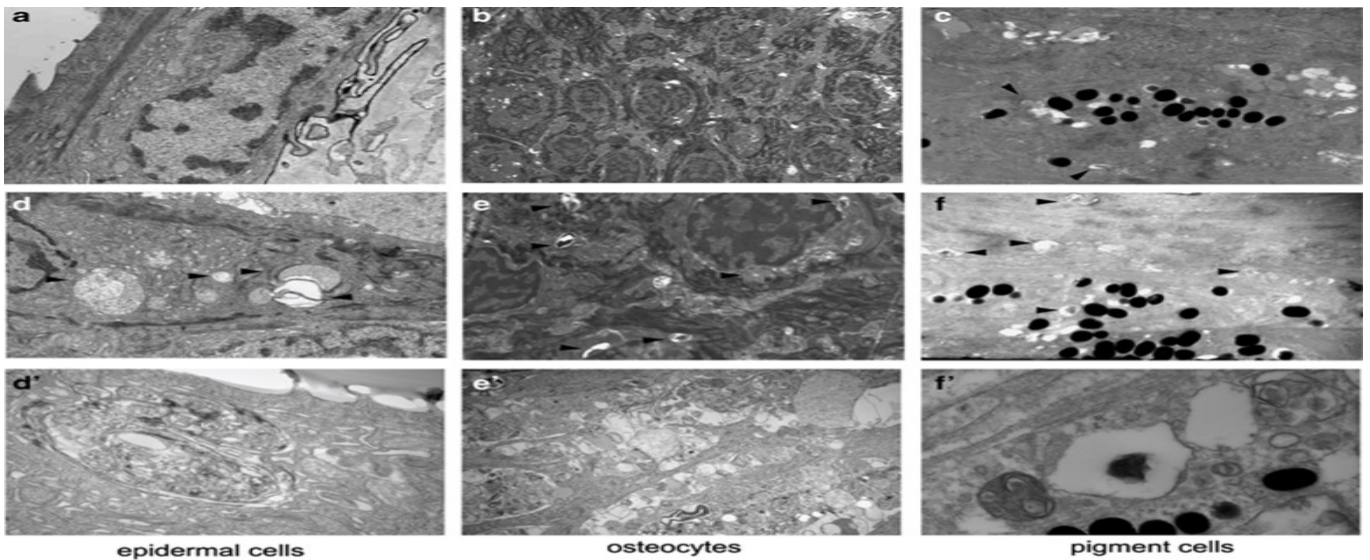
### ***AUTOPHAGY IS REQUIRED FOR ZEBRAFISH CAUDAL FIN REGENERATION***

Lo Zebrafish è un potente modello genetico di rigenerazione dei vertebrati poiché, sembra avere un potenziale apparentemente illimitato di ricrescita della sua pinna caudale dopo amputazione che, inizia da un tessuto altamente proliferativo, il blastema, tramite differenziazione cellulare che, avviene sia nel nucleo che nel citoplasma dove comporta, la sintesi di nuove proteine e, parallelamente, il degrado di quelle esistenti. Uno dei meccanismi di rigenerazione è rappresentato dall'*AUTOFAGIA*: processo di degradazione di componenti cellulari danneggiati, da parte di enzimi lisosomiali, in particolare le proteasi. In questo lavoro, è stata valutata l'importanza di tale processo nella rigenerazione della pinna caudale del

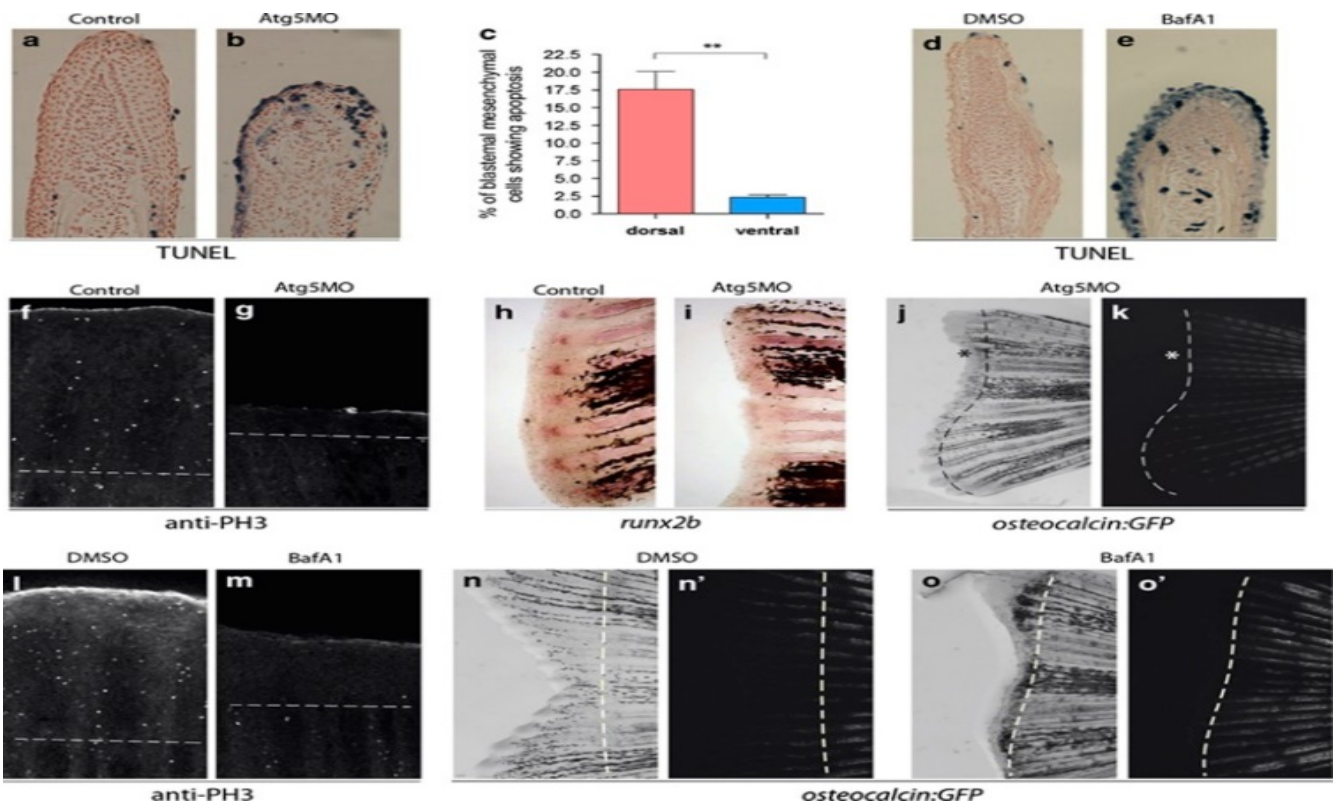


pesce Zebra.

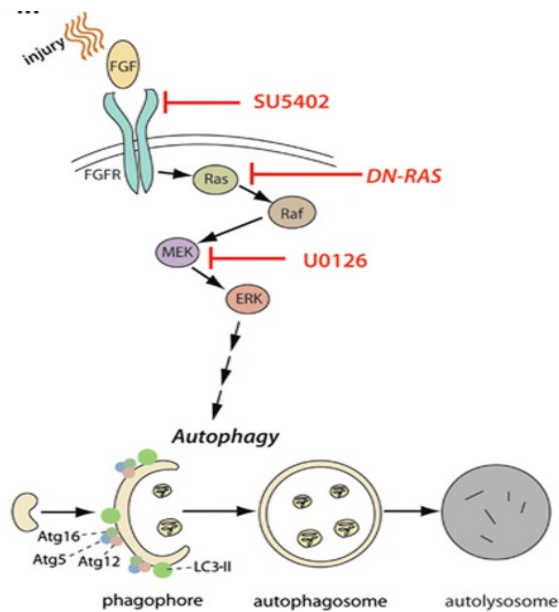
Inizialmente, sono state amputate le pinne caudali dello Zebrafish transgenico per un reporter della *proteina -microtubulo fluorescente verde (GFP-Lc3)*, la cui intensità di espressione è stata marcatamente sovraregolata nella pinna, prossimale al piano di lesione e nel blastema, 2 giorni dopo l'amputazione (dpa), e in seguito, è stata gradualmente diminuita a livelli quasi normali durante il resto del processo di rigenerazione. Durante questo periodo, l'espressione del transgene ha mostrato una maggiore attività autofagica nella zona proliferante, vicino alla punta della coda, come rivelato anche dalle immagini di microscopia elettronica di cellule epidermiche, osteociti e cellule del pigmento.



Per verificare se l'autofagia fosse necessaria per tale rigenerazione, sono state utilizzate diverse strategie per bloccarne il processo. Innanzitutto, è stato iniettato morfolino oligonucleotide antisense sintetico (MO) mirando al sito di traduzione di *atg5* (Atg5MO) nella parte dorsale del moncone della pinna a 2 dpa e, successivamente l'inibitore dell'autofagia in stadio avanzato bafilomicina A<sub>1</sub>. Questi trattamenti, oltre a provocare un aumento di cellule apoptotiche, come evidenziato dall'utilizzo della colorazione TUNEL, hanno anche ridotto la capacità proliferativa del blastema, non riuscendo ad esprimere marcatori di differenziazione, come *runx2b* e *osteocalcina*. Tali risultati hanno suggerito che l'autofagia compromessa, previene sia la sopravvivenza che la proliferazione delle cellule de-differenzianti nelle prime fasi del processo di rigenerazione.



E' stato inoltre osservato che, utilizzando l'inibitore Mapk/ Erk U0126, si ha avuto un arresto quasi completo del processo di rigenerazione. Questo effetto era paragonabile ai trattamenti con SU5402, un inibitore a piccole molecole del recettore Fgf, che compromette anche la rigenerazione delle pinne rimosse



chirurgicamente. A sostenimento di ciò, è stata sfruttata una linea di pesci transgenici che esprime una forma dominante negativa di Ras (DN-Ras) sotto un promotore di shock termico, ed ha mostrato un'alterata rigenerazione e formazione di blastema. Per confermare ulteriormente che l'autofagia agisce a valle della segnalazione Mapk / Erk, le cellule umane (HeLa) prive di siero fetale, sono state trattate con U0126 e

analizzate con microscopia a fluorescenza. Le cellule non trattate contenevano significativamente più autofagosomi e autolisosomi maturi rispetto alle cellule trattate.

Per quanto riguarda i materiali utilizzati in questo studio: l'amputazione è stata effettuata su pesci di tipo selvatico del ceppo *ekwill* (*ekw*) e zebrafish transgenico di 4-12 mesi di età che, dopo diversi cicli di shock termico, sono stati mantenuti a T costante di 28,5 ° C. I tessuti della coda sono stati fissati inizialmente per 3 giorni a 4 ° C in una soluzione di  $(\text{CH}_3)_2\text{AsOONa}$  0,1 M e, incorporati in resina plastica Durcupan. Le sezioni ultrasottili sono state raccolte su griglie rivestite con formvar, colorate con citrato di piombo e acetato di uranile ed osservate con un microscopio elettronico JEOL CM-II 100.

Allo stadio 1-2 cellule, nel tuorlo, sotto il citoplasma, sono stati iniettati oligonucleotidi morfolino antisense (MO) sintetici per bloccare l'attività delle trascrizioni di *atg5*. Frammenti di pinne sono stati fissati e reidratati mediante lavaggio di 10 minuti in miscela di metanolo-PBST (Tween-20) al 50%, seguito da diversi lavaggi in PBST e, prima del rilevamento, in un tampone alcalino fosfatasi, usando come substrato una combinazione di tetrazolio blu nitro e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato come cromogeno. I campioni sono stati tenuti al buio durante la reazione di colorazione, interrotta poi da tre brevi risciacqui in PBST, seguita da una post-fissazione con PFA al 4% e conservazione in glicerolo all'80% a 4 ° C.

La colorazione TUNEL è stata eseguita utilizzando un kit ApopTag: i campioni sono stati fissati, reidratati, incorporati in resina JB-4 e divisi in sezioni colorate con rosso neutro allo 0,002% per 15 minuti. Dopo l'imaging con uno stereomicroscopio Zeiss AxioZoom e un microscopio Nikon E1000, le cellule sono state

contate manualmente nel mesenchima blastemale.

La linea di cellule HeLa è stata coltivata in DMEM contenente glucosio, siero di vitello fetale inattivato al 10%, 50  $\mu\text{g} / \text{ml}$  di gentamicina e 600  $\mu\text{g} / \text{ml}$  di G418 e, successivamente placcata, 10 ore prima del trattamento, su vetrini con rivestimento in poli-D-lisina di diametro 10 mm in piastre da 24 pozzetti. L'autofagia è stata indotta dalla fame in un mezzo privo di siero di vitello fetale, mentre le cellule sono state esposte a 10  $\mu\text{M}$  U0126 o 0,1% DMSO come controllo per 14 ore e poi fissate in PFA al 4%.

Alla fine di questo studio, è stato osservato un significativo aumento sia dell'attività autofagica nel blastema durante la rigenerazione delle pinne caudali e sia delle cellule apoptotiche nei blastemi difettosi di autofagia, come dimostrato dal trattamento con cloroquina e altri inibitori.

