

*Corso di laurea in Scienze biologiche
Università Politecnica delle Marche*



RUOLO DI DICER NELLA RIGENERAZIONE DEGLI ARTI IN *XENOPUS LAEVIS*

Laureando : Lucrezia Spaziani

Relatore: Prof.ssa Francesca Maradonna

Anno accademico 2018-2019

L'esperimento riportato in questa tesi ha come obiettivo la valutazione dell'effetto di Dicer sullo sviluppo degli arti in *Xenopus laevis*, in modo particolare sulla loro rigenerazione.

Dicer è un enzima appartenente alla classe delle ribonucleasi III ed è coinvolto nella sintesi e nella maturazione di microRNA della lunghezza di circa 22 nucleotidi, a partire dalla degradazione di lunghe molecole di RNA.

53

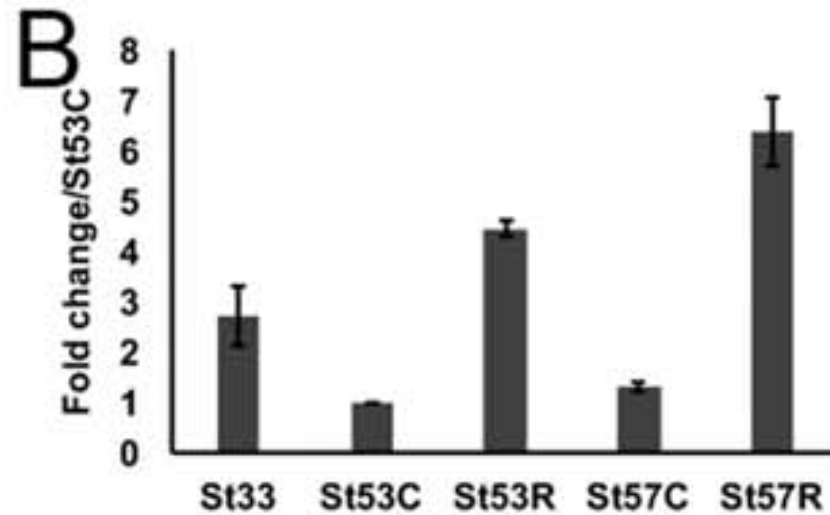
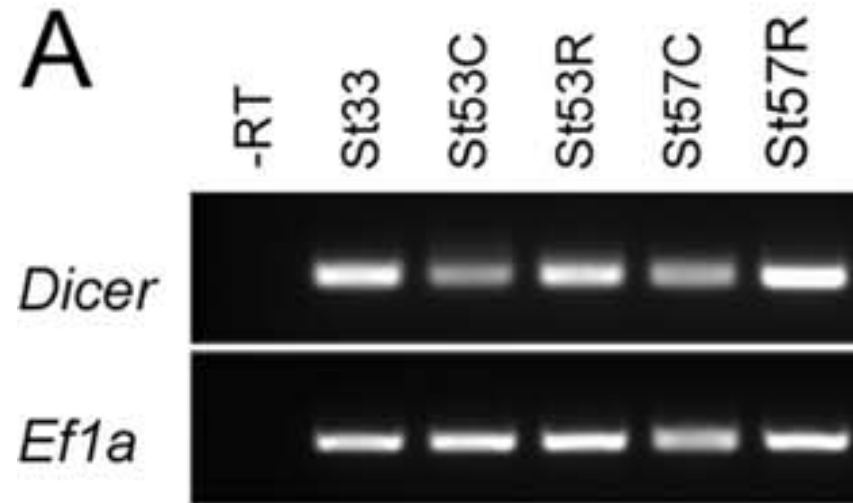


57

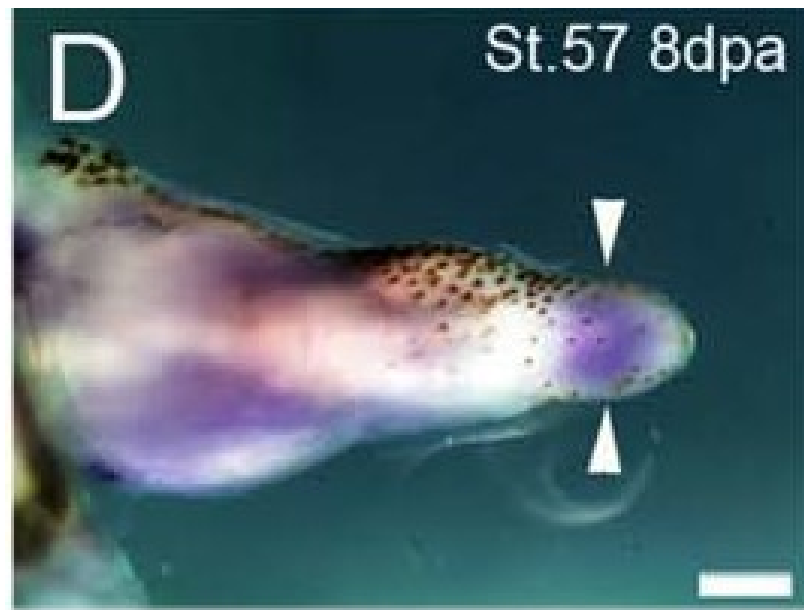
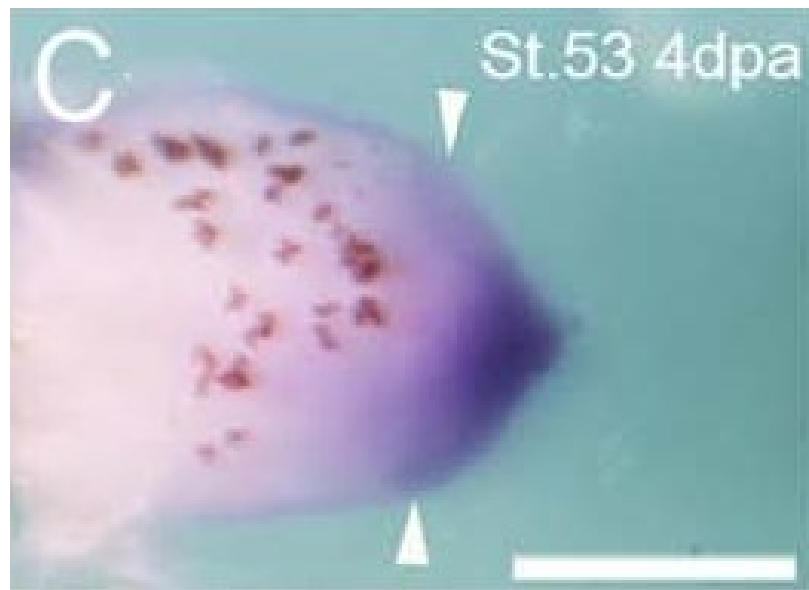


PROCEDURA

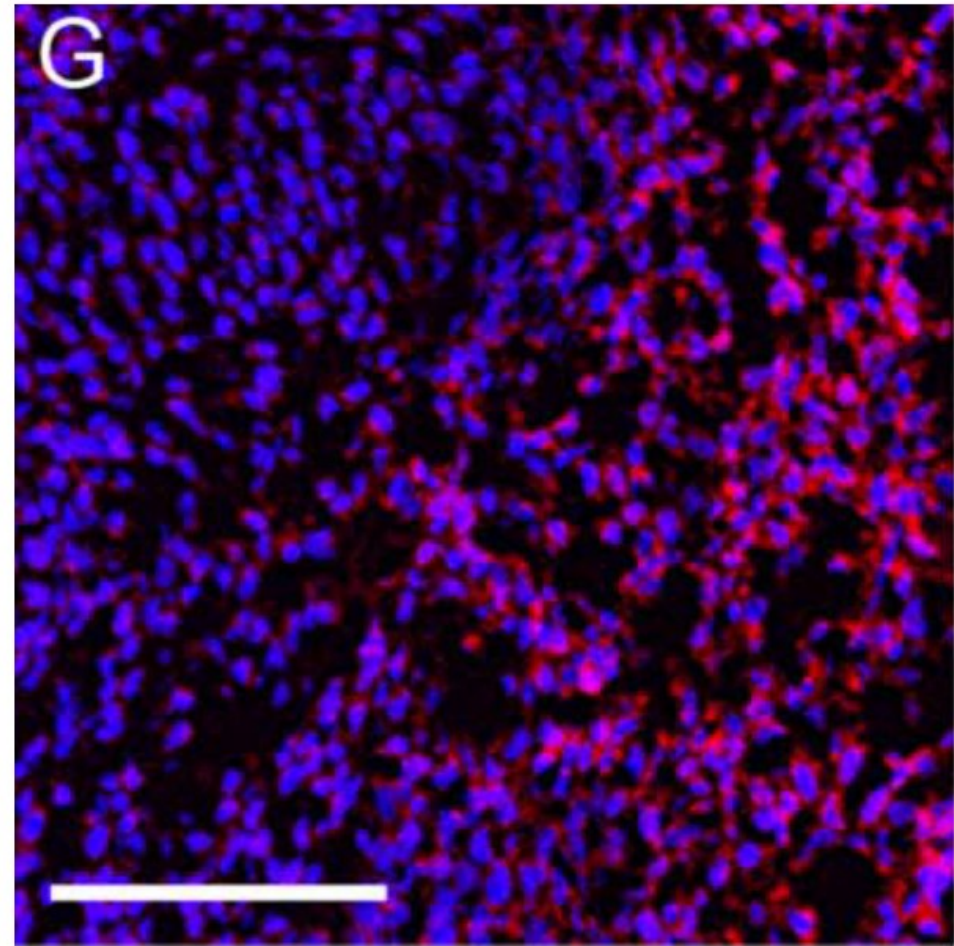
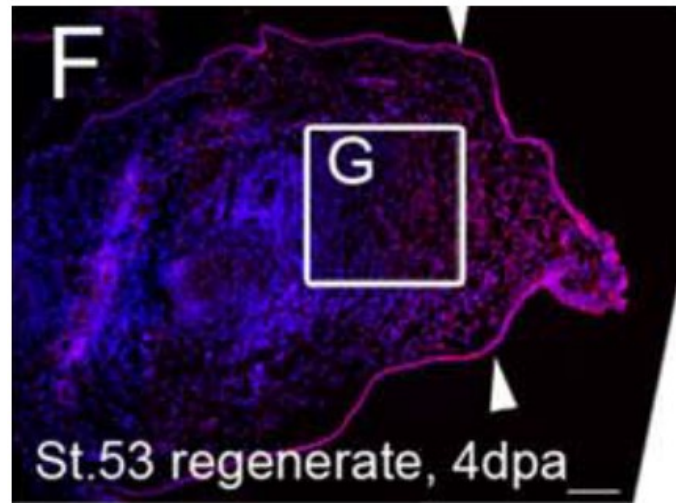
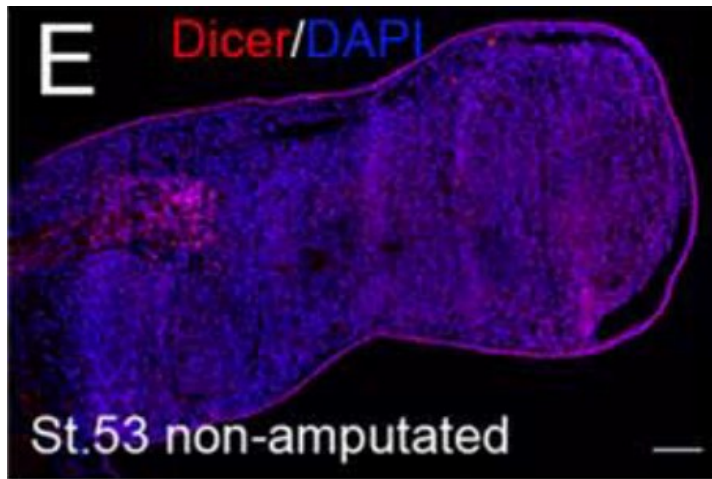
- Fecondazione in vitro degli embrioni di *Xenopus*
- Elettroporazione nei girini degli oligonucleotidi morpholino *Dicer-Mo* e degli oligonucleotidi morpholino «non target» (controllo)
- Amputazione degli arti
- Estrazione dell'RNA totale e retrotrascrizione a cDNA.
- Analisi del livello di espressione degli mRNA di Dicer mediante RT-PCR
- Ibridazione in situ
- Analisi mediante immunofluorescenza degli arti dei girini
- Real-time PCR per identificare l'espressione dei microRNA *miR-23a* e *miR-196a*
- Western blot
- Colorazione dello scheletro



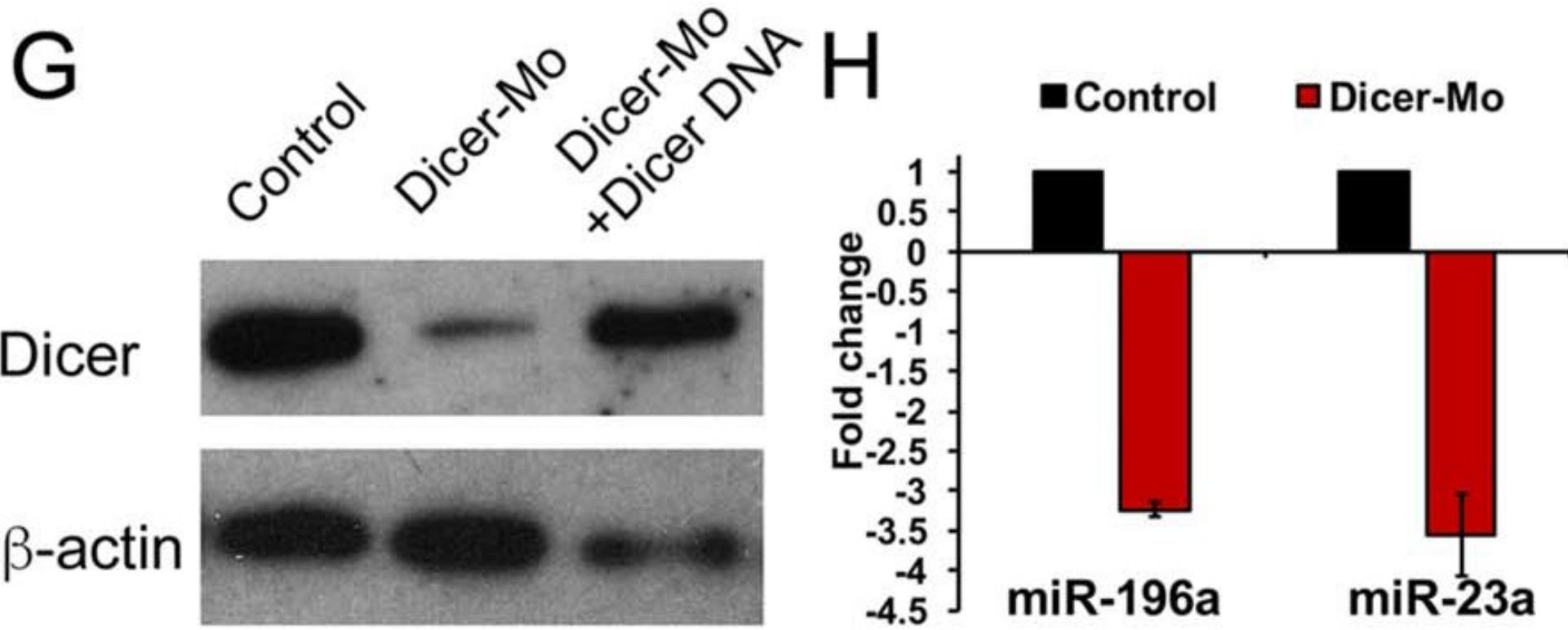
Dicer transcripts detected by RT-PCR and real-time PCR. Relative expression of Dicer was normalized to Ef1a and compared to stage 53 unamputated limb (St53C). RT–: no reverse transcriptase control; St33: stage 33 tailbud stage embryo; St53R: stage 53 limb regenerate, 4 days postamputation (dpa); St57C: stage 57 unamputated hindlimb, distal part; St57R, stage 57 limb stump, 8 dpa.



Dicer transcript detection by in situ hybridization in the limb stumps of stage 53, 4 dpa (C, lateral view), and stage 57, 8 dpa (D, ventral view) tadpoles. In situ signals are in purple blue. Black dots in (D) are melanocytes.

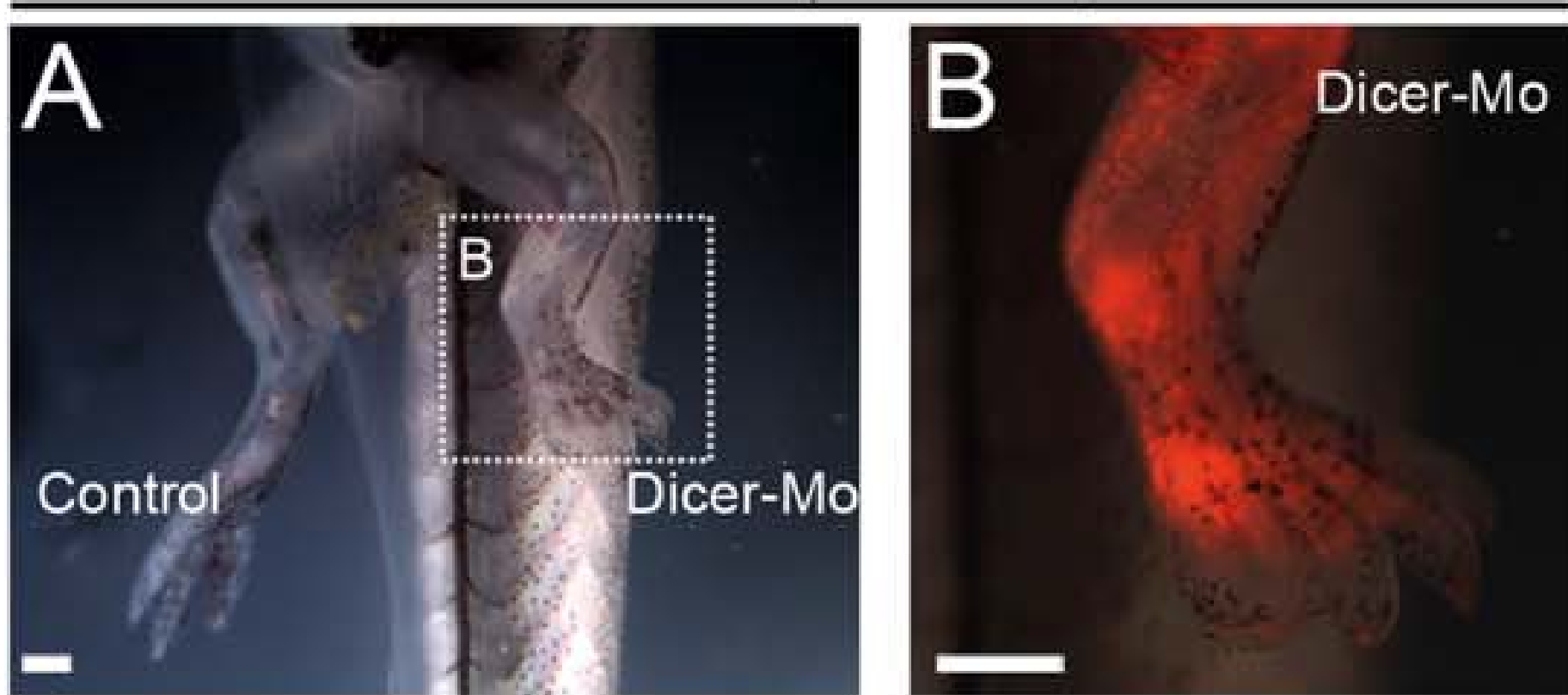


Immunofluorescence analysis of Dicer expression in parasagittal sections of unoperated stage 53 limb (E) and regenerating limb, 4 dpa (F). (G) Enlarged view of Dicer expression in the regenerating blastema.



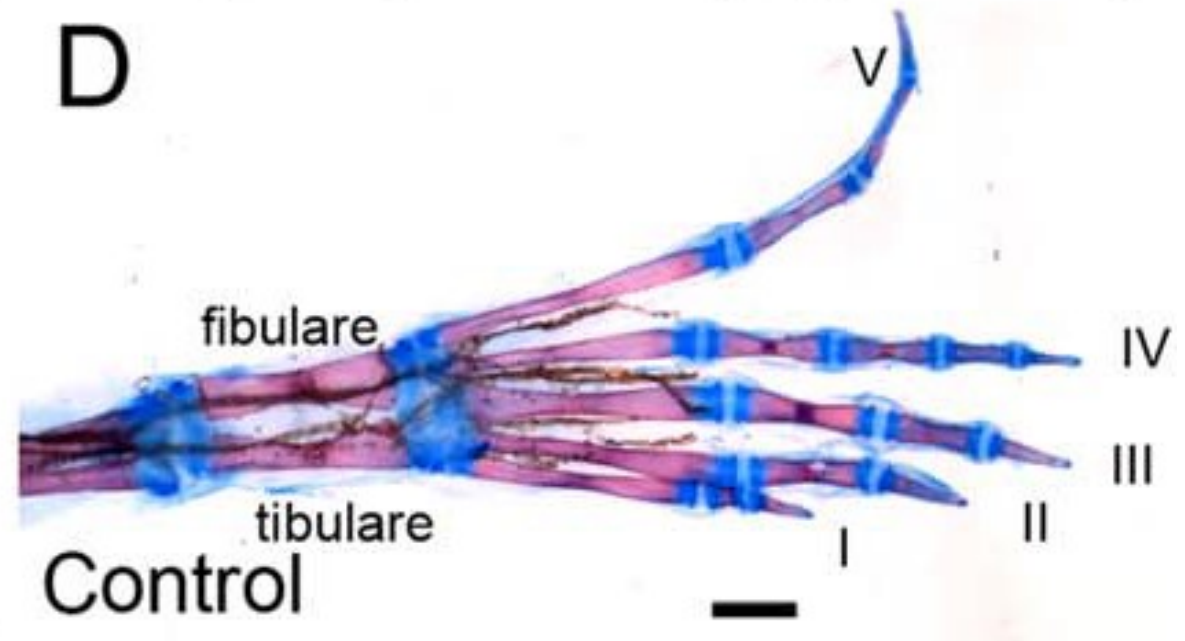
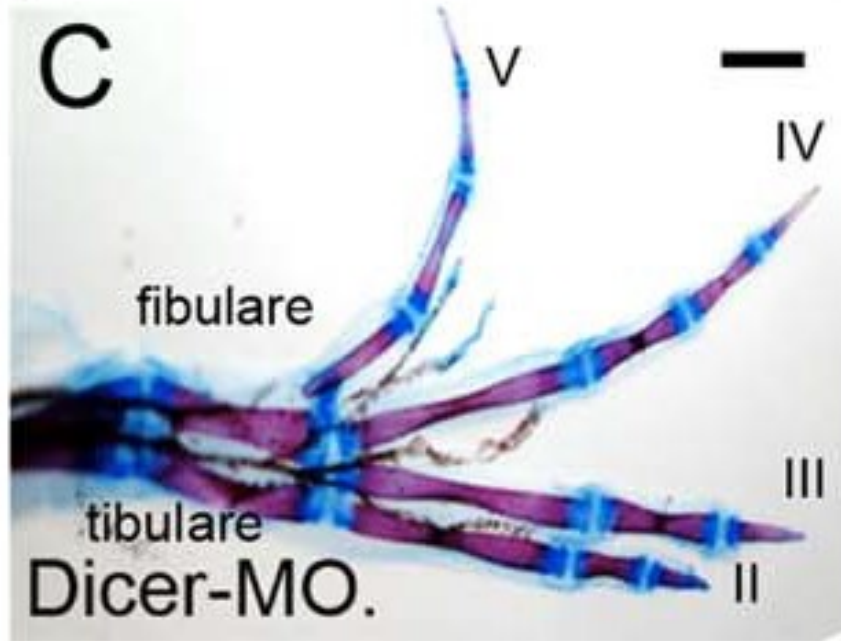
(G) Detection of Dicer by Western blotting in tadpole limb regenerates (3 dpa), after injection/electroporation with control or Dicer-Mo and Dicer-Mo + Dicer DNA. (H) Real-time PCR analysis of mature miR-196a and miR-23a in tadpole limb regenerates (3 dpa) after Dicer-Mo injection/electroporation.

St.53 limb electroporation, d20

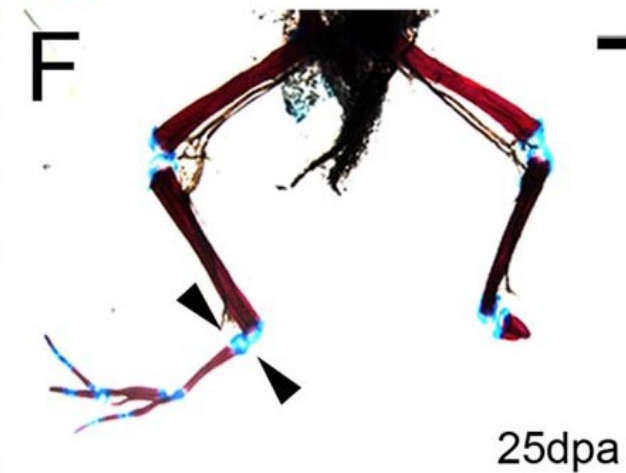
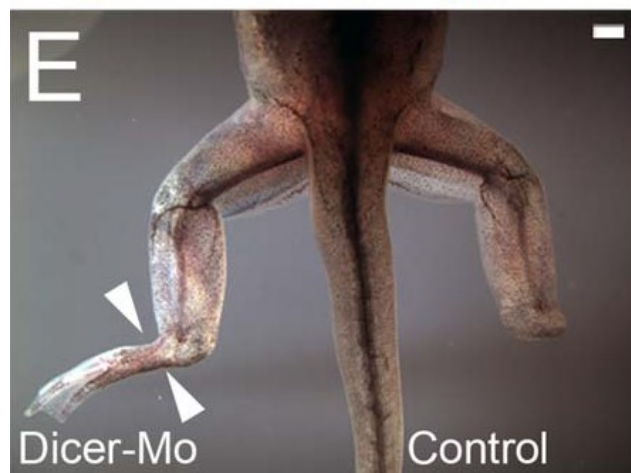
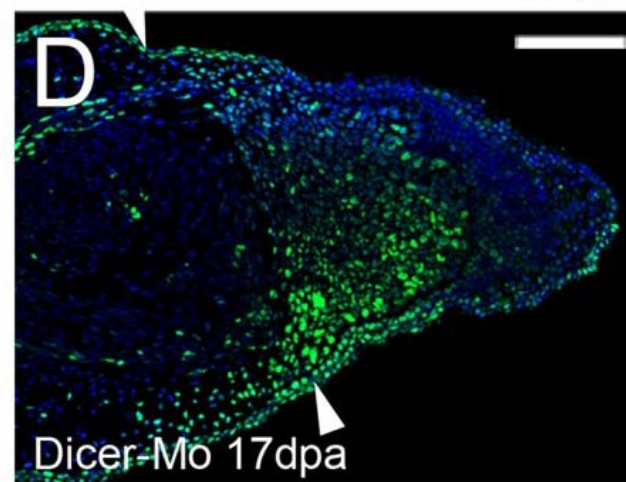
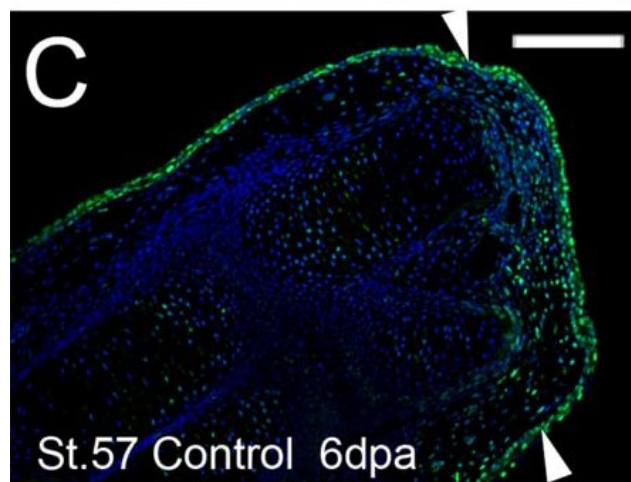


Dicer inactivation in stage 53 tadpole limbs leads to limb development defects. (A) A tadpole with Dicer-Mo (50 nL of 125 IM) injection/electroporation in the left limb at stage 53 developed shortened limb. (B) Enlarged view of the Dicer-Mo injected limb, 20 days after electroporation. Red fluorescence shows the distribution of Dicer-Mo.

St.53 limb electroporation, d45 , skeleton preparation



Skeletal staining of Dicer-Mo injected (C) and control (D) limbs, 45 days after Dicer-Mo injection/electroporation. I-V indicate digit identities.



RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti possono essere riassunti come segue:

- 1) Dicer è attivato durante la rigenerazione degli arti nei girini di *Xenopus laevis*;
- 2) Dicer-Mo porta ad un'effettiva inattivazione di Dicer;
- 3) L'attività di Dicer è necessaria per la corretta morfogenesi degli arti in *Xenopus laevis*;
- 4) Nei girini di *Xenopus laevis* ad uno stadio avanzato, l'inattivazione di Dicer aumenta la capacità di rigenerazione degli arti.

Con tali risultati, possiamo quindi identificare, per ogni singola fase, delle **variazioni** nei meccanismi di rigenerazione degli arti, che corrispondono, di volta in volta, all'attivazione o meno dell'enzima Dicer.