



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea: Scienze Biologiche

**L'EVOLUZIONE DELLA REGOLAZIONE DI HOXA11 NEI VERTEBRATI
E' LEGATA ALLO STATO PENTADATTILO**

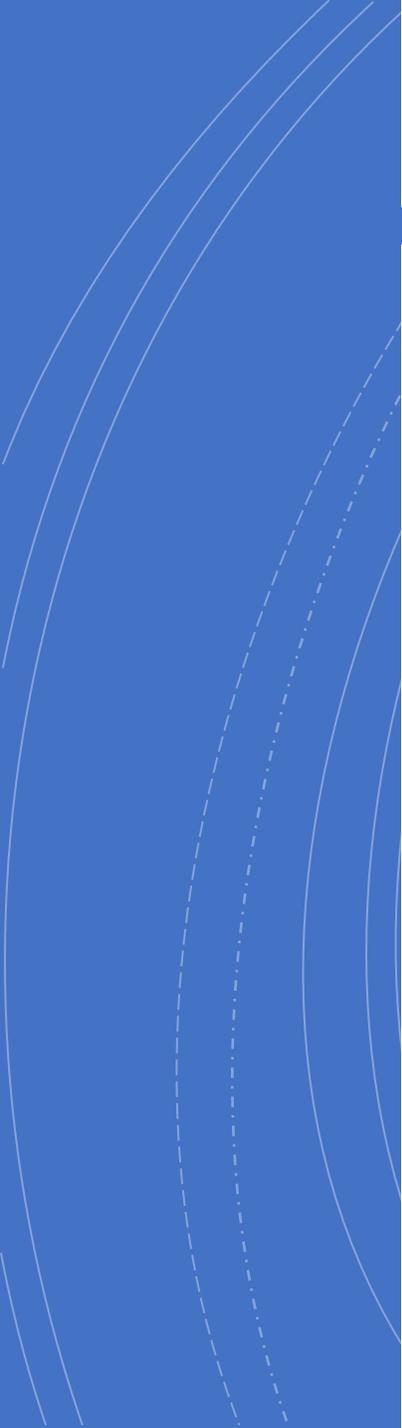
**EVOLUTION OF HOXA11 REGULATION IN VERTEBRATES
IS LINKED TO THE PENTADACTYL STATE**

Laureando
Venanzio Daniele Tosiani

Docente Referente
Chiar.mo Prof. Caputo Barucchi Vincenzo

Sessione: Febbraio 2021

Anno Accademico: 2020/2021



INTRODUZIONE

- La transizione pinna arto è una delle maggiori innovazioni dei vertebrati
- Passaggio dalla vita acquatica a quella terrestre
- Passaggio ad arto pentadattilo (inizialmente poco chiaro)
- Studi incentrati particolarmente sui geni Hoxa11 e Hoxa13

I primi vertebrati erano polidattili

- Acanthostega possedeva otto dita sugli arti anteriori e posteriori
- Ichthyostega ne possedeva sette



Fonte: https://it.m.wikipedia.org/wiki/File:Acanthostega_model.jpg

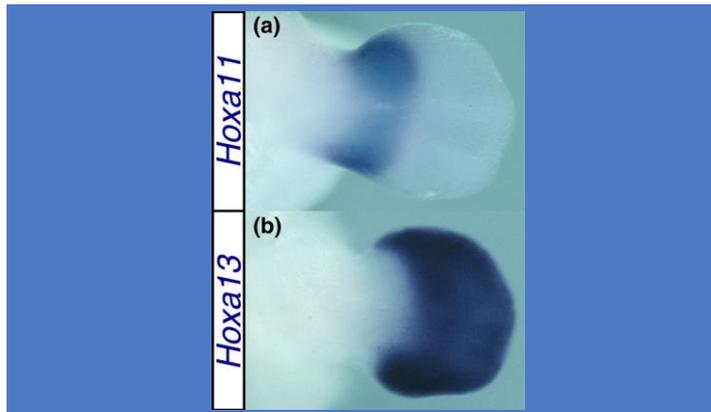


Fonte: <http://www.juliegould.net/ichthyostega/>

Proposte due ipotesi per spiegare le restrizioni subite da Hoxa11:

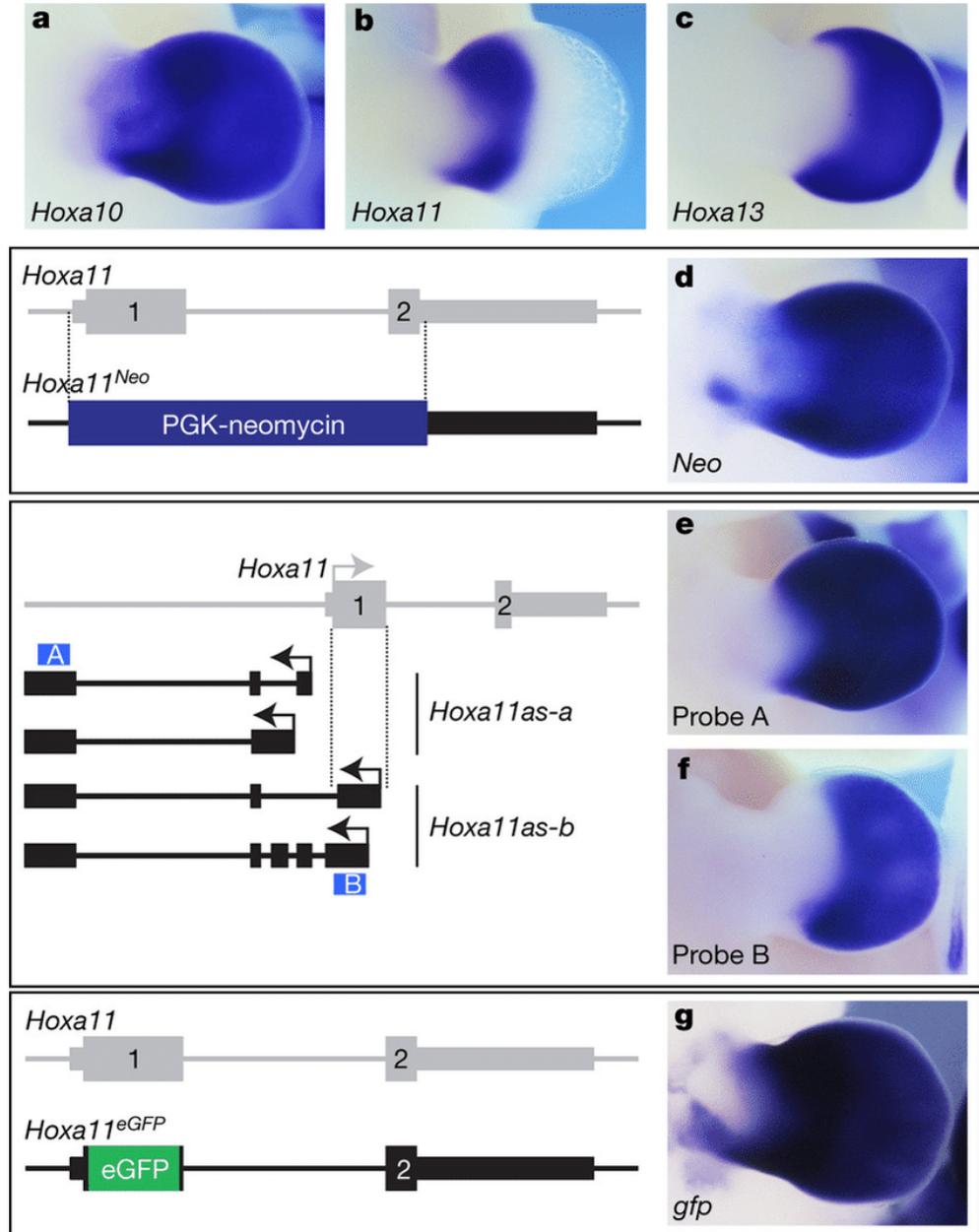
- repressione Hoxa13-dipendente di Hoxa11 nel presunto autopodio;
- modello in cui la trascrizione antisenso presente in un locus di Hoxa11 impedisce l'espressione distale di questo gene.

Negli arti distali sono presenti dei domini sub-TAD contenenti *enhancers* specifici, ma l'espressione di Hoxa11 è bloccata direttamente suggerendo che non è parte dell'architettura di questi domini.



METODI

- Hoxa11 è rimpiazzato da una cassetta genomica PGK-neomicina resistente;
- Analisi dell'esone 1 contenente Hoxa11 as-b;
- Sfruttamento della linea mutante Hoxa11 eGFP per capire l'esatto ruolo di Hoxa11 as-b;



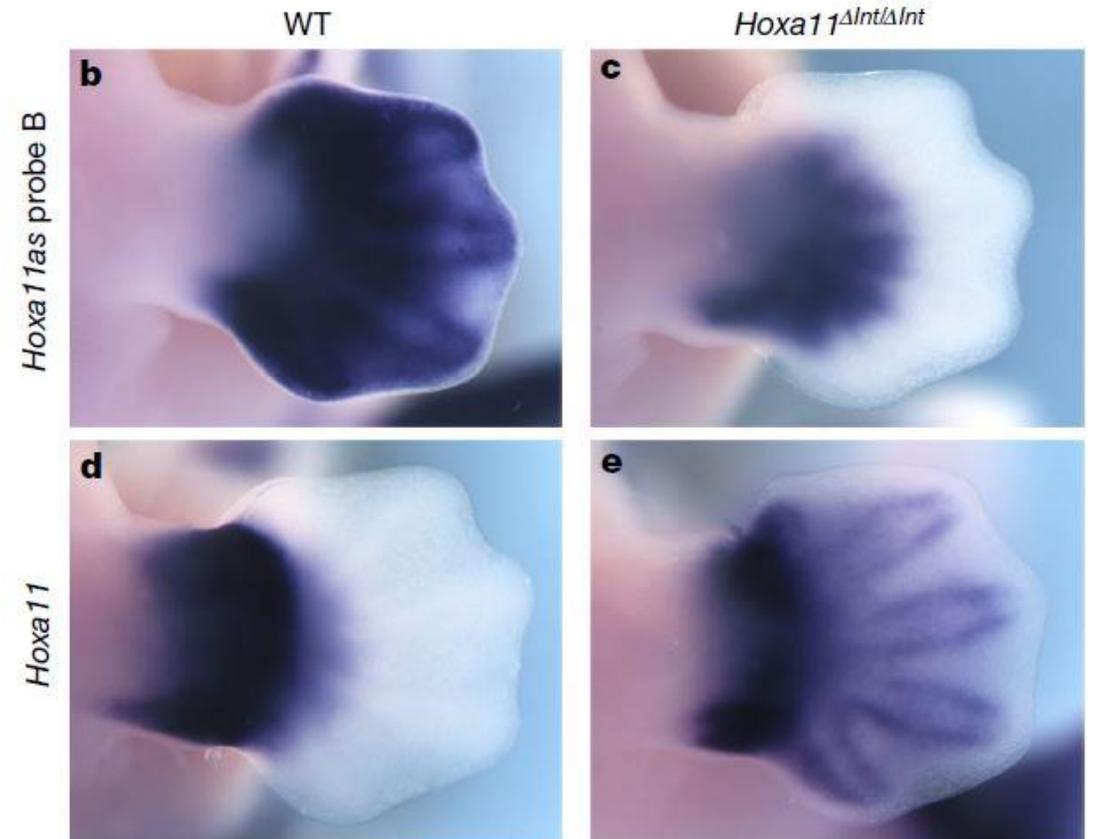
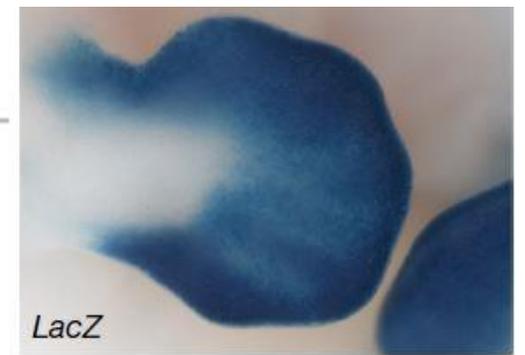
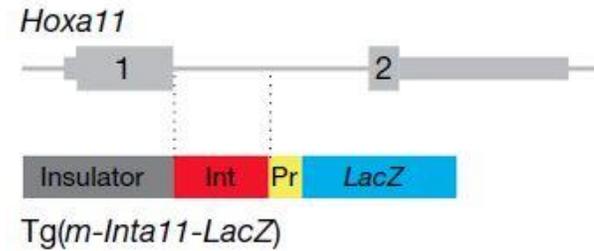


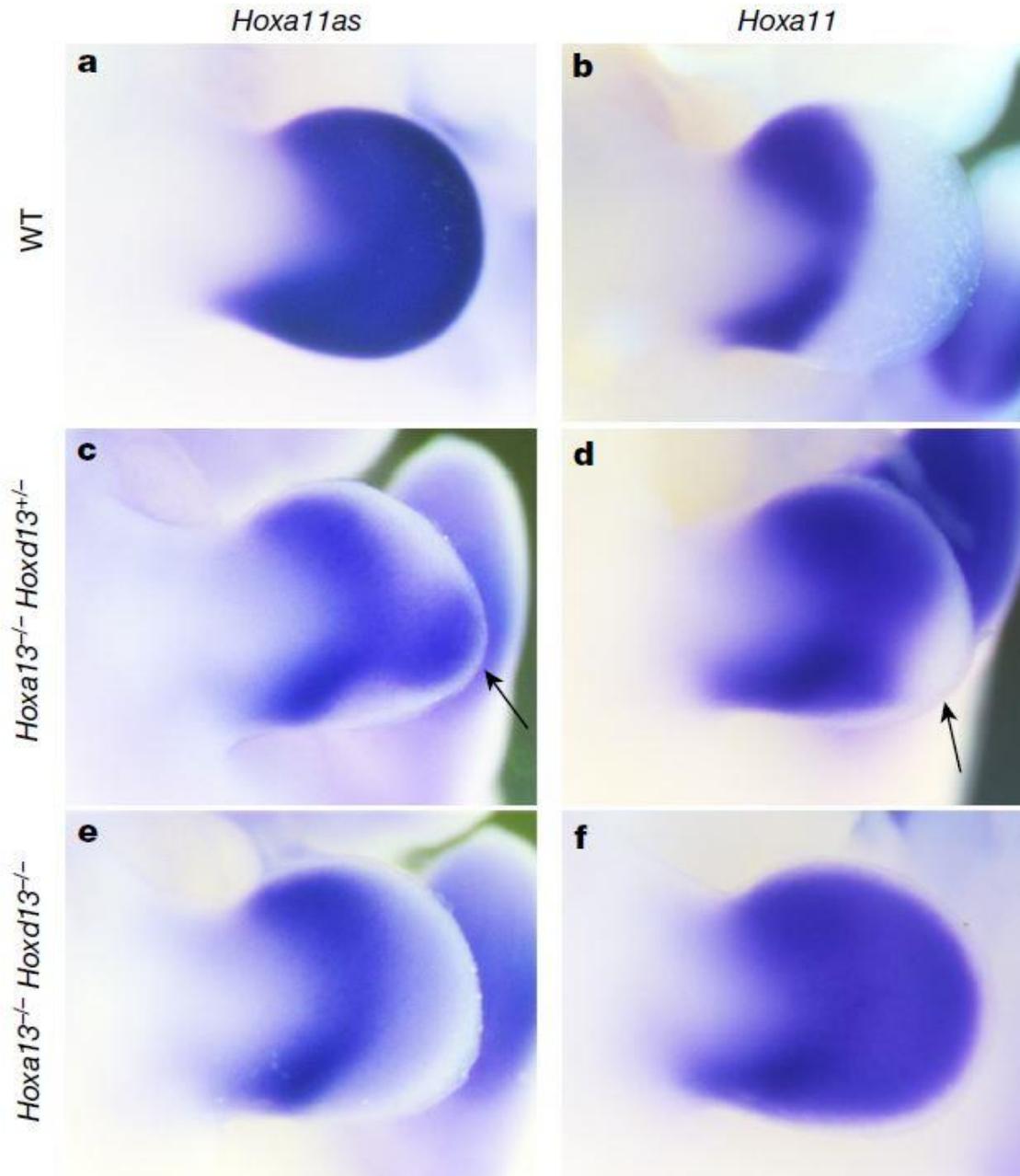
METODI

Generati topi mutanti privi dell'*enhancer* che innesca le trascrizioni antisenso di *Hoxa11as-b* (*Hoxa11*ΔInt/ΔInt) per esaminare la sua potenziale implicazione nell'espressione di *Hoxa11as-b*.

L'analisi non ha rilevato alcuna espressione di *Hoxa11as-b* indicando che l'*enhancer* identificato è necessario per la sovrapposizione della trascrizione antisenso con l'esone 1 di *Hoxa11*.

La delezione dell'*enhancer* che abroga l'espressione di *Hoxa11as-b* nelle cellule più distali ha anche provocato un'espressione ectopica di *Hoxa11* nelle dita primordiali.





METODI

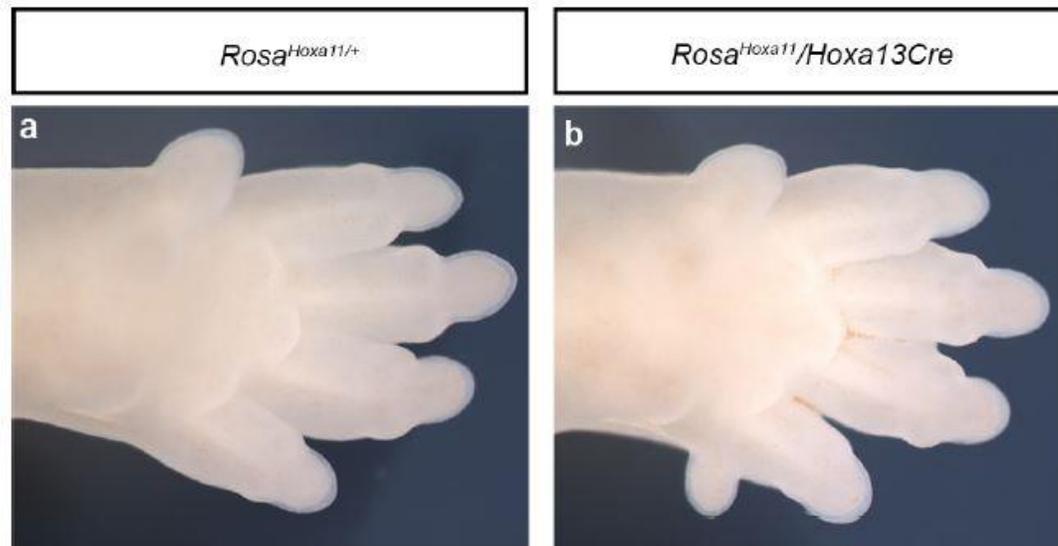
- La trascrizione antisenso di *Hoxa11* fa affidamento su *Hox13*;
- analizzata l'attività di *Hoxa11* nelle serie alleliche di *Hoxa13*; *Hoxd13*;
- la trascrizione antisenso decresce considerevolmente nei mutanti *Hoxa13^{-/-} Hoxd13^{+/-}*, ed è completamente abolita negli arti distali di questi ultimi;
- con lo stop della trascrizione antisenso, l'espressione di *Hoxa11* è stata ottenuta distalmente.



METODI

Per stimare il significato funzionale della repressione HOXA13/D13-mediata di *Hoxa11* è stato generato un allele che acquisisce la funzione di *Hoxa11* (*Rosa26Hoxa11*) per esprimere ectopicamente e distalmente *Hoxa11*.

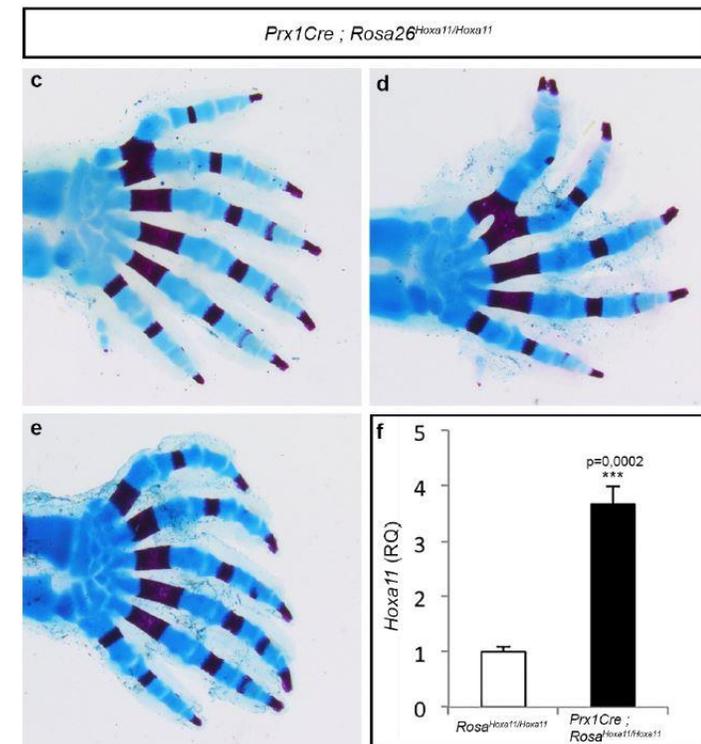
Tutti gli embrioni portatori di questo allele hanno arti con dita extra, anche in posizione post assiale.



Fonte: <https://www.researchgate.net/publication/308992155>



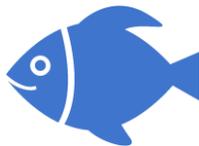
Fonte: <https://www.researchgate.net/publication/308992155>

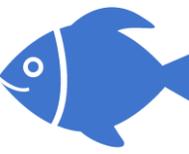




RISULTATI

- la restrizione distale di Hoxa11 è richiesta per lo stato pentadattilo;
- in contrasto con la mutuale esclusione tra Hoxa11 e Hoxa13 negli arti tetrapodi, la loro espressione genica si sovrappone in gran parte delle pinne 3-7 di zebrafish così come in altri teleostei;
- la repressione HOXA13/D13-mediata di Hoxa11 nelle cellule degli arti distali è comparsa dopo la separazione tra actinopterigi e condroitti;
- l'insorgenza dell'innesco dell'*enhancer* della trascrizione antisenso di Hoxa11 è accaduta nel corso dell'evoluzione dei tetrapodi.





CONCLUSIONI

La mutuale esclusione tra Hoxa11 e Hoxa13 è associata all'insorgenza di un *enhancer* nell'introne Hoxa11, il quale, attraverso una regolazione HOXA13/D13-dipendente, innesca una trascrizione antisenso in modo da prevenire l'espressione distale di Hoxa11.

Sulla base dell'evidenza che questa regolazione HOX13-mediata di Hoxa11 sia apparsa durante la transizione pinna-arto e la polidattilia sia causata dall'espressione distale di Hoxa11, è stato dedotto che l'evoluzione della regolazione di Hoxa11 ha contribuito alla transizione da un gruppo chiave di tetrapodi polidattili (estinti) in un gruppo esistente pentadattilo.



RIASSUNTO ESTESO

- La transizione pinna-arto è considerato un passaggio chiave dalla vita acquatica a quella terrestre ed e' regolata da Hoxa11 e Hoxa13
- Due ipotesi per spiegare le restrizioni subite da Hoxa11
- Analisi dell'esone1 contenente Hoxa11^{a5-b} e della linea mutante Hoxa11 eGFP
- Analisi della mutazione Hoxa11 Δ Int/ Δ int
- Analisi delle serie alleliche di Hoxa13;Hoxd13 e dei mutanti Hoxa13^{-/-} Hoxd13^{+/-}
- Significato funzionale della repressione HOXA13/D13-mediata e analisi del fenotipo derivante dall'allele Rosa26Hoxa11
- Risultati degli esperimenti precedenti applicati a topo e zebrafish
- Riflessione finale sulla mutuale esclusione tra Hoxa11 e Hoxa13 e ricostruzione sulla storia evolutiva della regolazione HOXA13/D13-mediata