



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA “TOR VERGATA”

**Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali
Corso di Laurea in Scienze Biologiche**

**Dottorato di Ricerca in Biologia Cellulare e Molecolare
XVII Ciclo**

**TRANSDIFFERENZIAMENTO LENTOGENO E
RETINOGENO IN *XENOPUS LAEVIS*: INTERAZIONI
TISSUTALI E ATTIVAZIONE GENICA**



Candidato: Emiliano ARRESTA

**Relatori: prof. Sergio FILONI
prof. Stefano CANNATA**

INDICE

SUMMARY	pag. I
Lens transdifferentiation	pag. I
Retina transdifferentiation	pag. II
<i>Xdach</i> expression during development	pag. III
I SOMMARIO	pag. 1
Transdifferenziamento lentogeno	pag. 1
Transdifferenziamento retinogeno	pag. 3
Espressione di <i>Xdach</i> durante lo sviluppo	pag. 3
II INTRODUZIONE	pag. 5
Occhio dei Vertebrati: struttura e funzione	pag. 5
Sviluppo dell'occhio dei Vertebrati	pag. 18
Aspetti molecolari dello sviluppo dell'occhio	pag. 19
Il fattore di trascrizione <i>pax6</i>	pag. 24
La famiglia EYA	pag. 25
La famiglia SIX	pag. 27
La famiglia DACH	pag. 27
Il cristallino: Sviluppo e Rigenerazione	pag. 31
Sviluppo del cristallino in <i>Xenopus laevis</i>	pag. 31

Processi induttivi durante lo sviluppo della lente	pag. 34
Aspetti molecolari dell'induzione della lente	pag. 38
<i>pax6</i> e la regolazione dei geni delle cristalline	pag. 43
Il transdifferenziamento lentogeno	pag. 44
Rigenerazione del cristallino in <i>X. laevis</i>	pag. 49
La retina: Sviluppo e Rigenerazione	pag. 53
Sviluppo della retina in <i>X. laevis</i>	pag. 53
Espressione di <i>pax6</i> durante lo sviluppo della retina	pag. 54
Rigenerazione della retina	pag. 55

III MATERIALE E METODI I pag. 60

Animali	pag. 60
Analisi delle interazioni tissutali responsabili del mantenimento della capacità lentogena nell'area lentogenica larvale	pag. 60
Analisi della distribuzione della proteina FGFR-2 nell'epidermide della testa e del fianco	pag. 68
Produzione, selezione e caratterizzazione dell'anticorpo monoclonale mAbH	pag. 69
Preparazione della sonda per <i>pax6</i>	pag. 77
Ibridazione <i>in situ</i> su sezioni	pag. 78

IV MATERIALE E METODI II pag. 79

Operazioni	pag. 79
Istologia	pag. 79
Produzione, selezione e caratterizzazione di mAbHP1	pag. 79

Ibridazione in situ per <i>pax6</i>	pag. 80
Clonaggio e analisi dell'espressione del gene <i>dachshund</i>	pag. 81
Estrazione di RNA da tessuti	pag. 81
Reazioni di RT-PCR	pag. 81
Clonaggio di <i>Xdach</i>	pag. 84
Clonaggio dei frammenti dei geni <i>XdachA</i> e <i>XdachB</i>	pag. 86
Clonaggio delle ORF di <i>XdachA</i> e <i>XdachB</i> nel vettore CS2+	pag. 88
Miniprep	pag. 88
Digestioni con endonucleasi di restrizione	pag. 89
Isolamento di frammenti di acidi nucleici da gel	pag. 89
Eluizione mediante colonnina	pag. 89
Ibridazione in situ	pag. 90
Preparazione della sonda per <i>Xdach</i>	pag. 90
V RISULTATI	pag. 91
Transdifferenziamento lentogeno ed espressione di <i>pax6</i>	pag. 91
Specificità dell'anticorpo monoclonale mAbH	pag. 91
Risposta all'anticorpo monoclonale mAbH durante lo sviluppo del cristallino	pag. 92
Risposta all'anticorpo monoclonale mAbH durante la rigenerazione del cristallino	pag. 93
Espressione di <i>pax6</i> durante lo sviluppo dell'occhio	pag. 94
Espressione di <i>pax6</i> durante rigenerazione del cristallino	pag. 95

Analisi delle interazioni tissutali responsabili del mantenimento della capacità lentogena nell'area lentogenica larvale	pag. 96
Analisi della distribuzione della proteina FGFR-2 nell'epidermide della testa e del fianco	pag. 110
Transdifferenziamento retinogeno ed espressione di <i>pax6</i>	pag. 112
Specificità di HP1	pag. 112
Risposta a mAbHP1 durante lo sviluppo della retina	pag. 115
Espressione di <i>pax6</i> durante lo sviluppo della retina	pag. 116
Analisi del processo di rigenerazione della retina	pag. 117
Espressione di <i>Xdach</i> durante lo sviluppo	pag. 120
Analisi dell'espressione genica	pag. 124
Ibridazioni <i>in situ</i>	pag. 124
RT-PCR	pag. 128
VI DISCUSSIONE	pag. 130
Transdifferenziamento lentogeno ed espressione di <i>pax6</i>	pag. 130
Transdifferenziamento retinogeno ed espressione di <i>pax6</i>	pag. 136
Espressione di <i>Xdach</i> durante lo sviluppo	pag. 139
VII BIBLIOGRAFIA	pag. 143
PUBBLICAZIONI	pag. 160

SUMMARY

Lens transdifferentiation

After lentectomy through the pupillary hole, the outer cornea of larval *Xenopus laevis* can undergo transdifferentiation to regenerate a new lens. This process is elicited by inductive factor(s) produced by the neural retina and accumulated into the vitreous chamber. During embryogenesis, the outer cornea develops from the outer layer of the presumptive lens ectoderm (PLE) under the influence of the eye cup and the lens. In this part of my thesis, we investigated whether the capacity of the outer cornea to regenerate a lens is the result of early inductive signals causing lens-forming bias and lens specification of the PLE, or late inductive signals causing cornea formation or both signals. Fragments of larval epidermis or cornea developed from ectoderm that had undergone only one kind of inductive signals, or both kinds of signals, or none of them, were implanted into the vitreous chamber of host larvae. The regeneration potential and the lens-forming transformations of the implants were tested using an antisense probe for *pax6* as an earlier marker of lens formation and a monoclonal antibody anti-lens as a definitive indicator of lens cell differentiation.

Results demonstrated that the capacity of the larval outer cornea to regenerate a lens is the result of both early and late inductive signals and that either early inductive signals alone or late inductive signals alone can elicit this capacity.

In larval *X. laevis* the capacity to regenerate a lens under the influence of inductive factors present in the vitreous chamber is restricted to the outer cornea and pericorneal epidermis (Lentogenic Area, LA). However, in early embryos, the whole ectoderm is capable of responding to inductive factors of the larval eye forming lens cells. In a previous part of my thesis, we demonstrated that the persistence of lens-forming competence in the LA is the result of early signals causing lens-forming bias in the presumptive LA and of late signals from the eye causing cornea development. In this part, we have analyzed 1) the decrease of the lens-forming capacity in ectodermal regions both near LA (head epidermis) and far from LA (flank epidermis) during development, 2) the capacity of the head epidermis and flank epidermis to respond to lens-competence promoting factors released by an eye transplanted below these epidermal regions, and 3) the eye components responsible for the promoting effect of the transplanted eye. Results were

obtained by implanting fragments of ectoderm or epidermis into the vitreous chamber of host tadpoles and by evaluating the percentage of implants positive to a monoclonal antibody anti-lens. We demonstrated that in the flank region the lens-forming competence is lost at the embryonic stage 30/31 and it is weakly restored by eye transplantation; however, in the head region the lens-forming competence is lost at the larval stage 48 and it is strongly restored by eye transplantation. We hypothesized that during development the head ectoderm outside the LA is attained by low levels of the same signals that attain the LA and are responsible for the maintenance of lens-forming competence in the cornea and pericorneal epidermis of the larva. In this hypothesis, low levels of these signals slacken the decrease of the lens-forming competence in the head ectoderm and make the head epidermis much more responsive to the effect of promoting factors released from a transplanted eye than the flank epidermis. Results obtained after transplantation of eyes deprived of some components indicate that the lens and the retina are the main source of these promoting factors. The immunohistochemical detection of the FGFR-2 (*bek* variant) protein in the epidermis of stage 53 larvae submitted to eye transplantation at stage 46 showed that the eye transplantation increased the level of FGFR-2 protein in the head epidermis but not in the flank epidermis, indicating that the lens-forming competence in *X. laevis* epidermis could be related to the presence of an activated FGF receptor system in the responding tissue.

Retina transdifferentiation

This study examined the retina transdifferentiation (TD) of RPE fragments implanted into the vitreous chamber of not lentectomized host eyes. In these experimental conditions, most RPE implants transformed into polarized vesicles resembling “inverted eyes” in which the side adjacent to the lens maintained the RPE phenotype, while the side adjacent to the host retina transformed into a laminar retina with the photoreceptor layer facing the cavity of the vesicle. The formation of a new retina with a laminar organization is the result of depigmentation, proliferation and differentiation of progenitor cells under the influence of inductive factors from the host retina. The phases of the TD process were followed using BrdU labeling as marker of the proliferation phase and a monoclonal antibody (mAbHp1) as a definitive indicator of retina formation. Pigmented RPE cells do not express *pax6*. In the early phase of RPE to retina TD all depigmented and proliferating precursor cells expressed *pax6*. Changes in the *pax6* expression pattern became apparent in the early phase of the outer

nuclear layer (ON) differentiation, when *pax6* expression decreased in the presumptive ON of the new-forming retina. Finally, during the late differentiation phase, the (ON), which contains photoreceptors, no longer expressed *pax6* and this expression was confined to the ganglion cell layer and the inner nuclear layer. Given the substantial identity of *pax6* expression during retinal development and RPE to retina TD, these observations suggest that *pax6* is necessary for correct retina formation, indicating that retina development and RPE-retina TD are highly related processes.

***Xdach* expression during development**

Two *Xenopus* Dachshund genes, *XdachA* and *XdachB*, were isolated, whose cDNAs were 2273 and 2117 bp long, respectively. They contained full-length open reading frames of 610 and 558 amino acids and showed an amino acid sequence highly similar to murine Dach1 (70%) and chick Dach1 (60%). The two *Xenopus* proteins presented a marked similarity (about 95%) at the level of the Dachbox-N of other Dach proteins and a low level of similarity (about 30%) at that of the Dachbox-C. DachA and DachB expression was analyzed by “whole mount” *in situ* hybridization and RT-PCR on embryos, at stages between 12 and 34, larval brain, eye and limb buds. The two genes are expressed in overlapping patterns during eye, ear, brain and limb development and show a significant expression similarity to mouse and chick *Dach1*.

SOMMARIO

Transdifferenziamento lentogeno

Le larve di *X. laevis* possono rigenerare il cristallino per un processo di transdifferenziamento della cornea esterna in fibre della lente. Tale fenomeno è promosso da un induttore retinico. La capacità di transdifferenziare in lente si estende anche all'epidermide pericorneale, che insieme alla cornea esterna costituisce l'area lentogenica. Al contrario, le aree epidermiche al di fuori dell'area lentogenica non manifestano alcuna capacità lentogena.

L'ectoderma corneale deriva dallo strato esterno dell'ectoderma presuntivo lentogeno (PLE) ed è quindi ragionevole supporre che, nelle fasi iniziali dello sviluppo dell'occhio, sia stato interessato dalle azioni induttive che portano alla formazione della lente da parte dello strato profondo del PLE (induzioni precoci). In una prima fase dello sviluppo della lente, il PLE acquisisce la "tendenza" (bias), grazie a segnali induttivi che diffondono planarmente dalla placca neurale, potenziati da segnali rilasciati dall'endomesoderma laterale, mentre in una fase successiva, grazie a segnali provenienti dalla vescicola ottica, il PLE acquisisce la "determinazione" lentogena. L'induzione della cornea avviene nelle fasi finali dello sviluppo dell'occhio, grazie all'azione induttrice esercitata dalla coppa ottica e dalla lente sull'ectoderma antistante (induzioni tardive).

Mi sono chiesto in primo luogo quali fossero i segnali responsabili del mantenimento della capacità lentogena nell'area lentogenica larvale. Per tale ragione, sono stati impiantati nella camera vitrea di larve ospiti frammenti di cornea o di epidermide larvale, sviluppati da un ectoderma che era stato raggiunto, durante lo sviluppo embrionale, da un solo tipo di segnale induttivo (precoce o tardivo) o da entrambi i segnali induttivi (precoci e tardivi); altri frammenti impiantati nella camera vitrea derivavano invece da un ectoderma che non aveva ricevuto nessuno di questi segnali.

La capacità lentogena degli impianti è stata valutata utilizzando una sonda antisense per *pax6*, mentre l'effettiva trasformazione lentogena degli impianti è stata analizzata utilizzando un anticorpo monoclonale anti-lente.

Nel complesso, i risultati ottenuti hanno dimostrato che la capacità della cornea esterna e dell'epidermide pericorneale di rigenerare una lente è il risultato sia delle induzioni precoci, che causano lo sviluppo della lente dal PLE, sia delle induzioni tardive, coinvolte nel differenziamento della cornea.

Inoltre, le sole induzioni precoci o le sole induzioni tardive sono sufficienti a mantenere la potenzialità lentogena nell'area lentogena larvale.

Nei primi stadi embrionali la capacità lentogena non è confinata unicamente all'area lentogena (PLE e regioni immediatamente circostanti), ma è presente in tutto l'ectoderma (Henry and Mittleman, 1995). Perciò, successivamente ho analizzato: a) il decremento della capacità lentogena in una regione ectodermica vicina all'area lentogena (ectoderma della testa) e in una lontana (ectoderma del fianco), b) la capacità dell'epidermide della testa e del fianco di rispondere ai segnali, rilasciati da un occhio trapiantato, promuoventi la competenza lentogena, c) le parti dell'occhio responsabili dell'effetto promuovente la competenza lentogena. I risultati sono stati ottenuti impiantando nella camera vitrea di larve ospiti frammenti di ectoderma o di epidermide e determinando, in seguito, la percentuale di impianti positivi all'anticorpo anti-lente.

I risultati hanno dimostrato l'esistenza di notevoli differenze nel pattern della competenza lentogena tra la regione dell'ectoderma della testa e quella del fianco. Infatti, durante lo sviluppo embrionale e larvale, la competenza lentogena decresce molto più rapidamente nell'ectoderma del fianco che in quello della testa. Inoltre, l'effetto promuovente la capacità lentogena esercitato da un occhio trapiantato si esercita in modo molto più rilevante nell'ectoderma della testa che nell'ectoderma del fianco. Tali dati si possono spiegare assumendo che i segnali precoci e tardivi, che agiscono, durante lo sviluppo embrionale dell'occhio, sul PLE e sulle regioni circostanti (Henry and Grainger, 1990; Cannata et al., 2003), siano distribuiti secondo un gradiente di concentrazione, che si estende al di fuori dell'area lentogena. In tale ipotesi, l'elevata concentrazione di questi segnali nell'area lentogena sarebbe responsabile del mantenimento della capacità lentogena durante la vita larvale, mentre la bassa concentrazione dei fattori induttivi vicino all'area lentogena, sebbene non sufficiente a far mantenere la competenza lentogena durante la vita larvale, sarebbe responsabile del rallentamento nel decremento di questa capacità e renderebbe l'epidermide della testa più sensibile a rispondere all'effetto promuovente la competenza esercitato dall'occhio.

I risultati ottenuti dopo il trapianto di occhi privati di alcune parti dimostrano che i fattori promuoventi la competenza lentogena sono rilasciati sia dalla lente che dalla retina. Infine, l'analisi della distribuzione del recettore FGFR-2, nella cornea, nell'epidermide e nell'epidermide sotto cui è

stato trapiantato un occhio, indica che la competenza lentogena potrebbe essere correlata alla presenza di tale recettore nel tessuto rispondente.

Transdifferenziamento retinogeno

In questa parte della tesi, ho analizzato il transdifferenziamento in senso retinico di frammenti dell'epitelio pigmentato (RPE), impiantati nella camera vitrea. La formazione di una nuova retina con una organizzazione laminare è il risultato dei processi di depigmentazione, proliferazione e differenziamento delle cellule dell'RPE, stimulate dai fattori induttori liberati dalla retina neurale. Le diverse fasi del processo di transdifferenziamento sono state seguite utilizzando la marcatura con BrdU come marker della fase proliferativa e l'anticorpo monoclonale mAbHp1 come indicatore del completamento della fase differenziativa. Inoltre, ho analizzato durante il processo di transdifferenziamento il pattern spazio-temporale di espressione di *pax6*.

I risultati hanno dimostrato che nella maggior parte degli impianti, localizzati nella camera vitrea dell'occhio di una larva ospite, solo la parte della vescicola rivolta verso la retina ospite transdifferenziava in una retina laminare, mentre la parte rivolta verso la lente rimaneva densamente pigmentata. Lo strato dei fotorecettori della retina neoformata era rivolto verso lo strato pigmentato dell'impianto, mentre lo strato del ganglio cerebrale era rivolto verso il ganglio cerebrale della retina dell'occhio ospite. Ciò indica che la fase differenziativa del processo di transdifferenziamento retinico è influenzata dall'azione di fattori promotori (fattori retinici e fattori liberati dall'epitelio pigmentato) e da fattori inibitori (liberati dalla lente dell'ospite).

Il quadro di espressione di *pax6* durante il processo di transdifferenziamento retinogeno ricalca quello osservabile durante il normale sviluppo della retina, ciò indica che sviluppo e rigenerazione della retina sono processi strettamente correlati.

Espressione di *Xdach* durante lo sviluppo

Lo sviluppo dell'occhio, dai Vertebrati agli Invertebrati, è regolato da uno stesso network di geni interagenti (*pax6/eya1/six3/dach1*) (Hanson, 2001). In *Xenopus laevis*, finora sono stati clonati i geni *pax6*, *eya* e *six3*

(Lupo et al., 2000). Nell'ultima parte di questa tesi ho clonato il gene *Dachshund* in *Xenopus* (*Xdach*) e ne ho delineato il quadro di espressione durante lo sviluppo embrionale e larvale. Mediante ibridazione *in situ* ho dimostrato che tale gene è espresso nel SNC, nella retina, nell'orecchio e nell'arto in sviluppo. In una successiva fase della ricerca, sarà interessante analizzare il ruolo di *Xdach* nel transdifferenziamento retinogeno.

INTRODUZIONE

Occhio dei Vertebrati: struttura e funzione

L'occhio è un organo pressoché sferico contenuto nell'orbita, sospeso da legamenti in modo che i muscoli volontari dell'orbita, che si inseriscono sul bulbo oculare (muscoli estrinseci dell'occhio), possano muoverlo per dirigere lo sguardo verso l'alto, il basso e da un lato all'altro.

Le pareti dell'occhio sono costituite da tre tonache sovrapposte (Fig. 1).

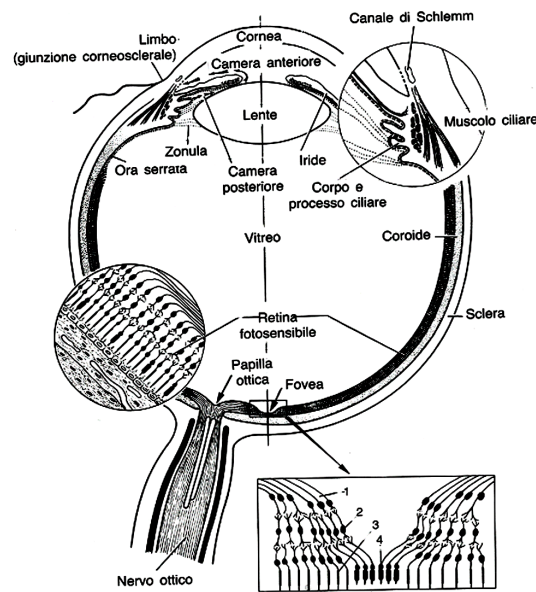


Fig. 1. Struttura dell'occhio di un Vertebrato. In basso a destra schema ingrandito della fovea: 1) assoni di cellule gangliari, 2) cellule bipolari, 3) bastoncelli, 4) coni.

Tonaca esterna o fibrosa. Lo strato esterno dell'occhio è costituito dalla sclera, formata da tessuto costituito da connettivo denso, povero di vasi sanguigni. Anteriormente, la sclera si continua con la cornea, che è incolore e trasparente e possiede l'innervazione sensitiva più ricca che qualsiasi altro tessuto dell'occhio. Essa è costituita dalla *substantia propria*, un tipo speciale di tessuto connettivo denso continuo con quello della sclerotica. Anteriormente, la *substantia propria* è ricoperta da un epitelio pavimentoso

non cheratinizzato. Nei Vertebrati terrestri, grazie alla differenza fra l'indice di rifrazione della cornea e dell'aria, la cornea funziona da lente (più forte del cristallino). Nei Vertebrati acquatici, il potere rifrangente della cornea è pressoché nullo.

Tonaca intermedia o vascolare. Lo strato intermedio dell'occhio è composto di tre parti: coroide, corpo ciliare e iride, congiuntamente note come uvea.

La coroide è una tonaca molto vascolarizzata di colore nero, dovuto alla presenza di numerosi melanociti. Essa svolge un'importante funzione nella nutrizione della retina e partecipa alla costituzione della camera oscura dell'occhio.

Il corpo ciliare, un ispessimento anteriore della coroide a livello del cristallino, è un anello continuo sottostante alla superficie interna della parte anteriore della sclera; in sezione trasversa ha forma triangolare. Una delle sue facce è in contatto con il corpo vitreo, una con la sclera e la terza con il cristallino e con la camera posteriore dell'occhio. Il corpo ciliare è fondamentalmente formato da tessuto connettivo lasso che circonda il muscolo ciliare, composto di tre fasci di fibre muscolari lisce che s'inseriscono anteriormente sulla sclera e posteriormente su differenti regioni del corpo ciliare. L'attività del muscolo ciliare è importante per l'accomodamento della visione. Dal corpo ciliare emergono delle fibre gelificate (fibre della zonula) che si inseriscono sulla capsula del cristallino, e costituiscono il legamento sospensorio della lente.

A livello del corpo ciliare, la *pars ciliaris retinae* si solleva in processi ciliari vascolarizzati (omologhi ai plessi coroidei dell'encefalo), che secernono l'umor acqueo (omologo al liquido cefalo-rachidiano). Questo liquido ha una composizione in ioni inorganici simile a quella del plasma, ma contiene meno dello 0,1% di proteine. L'umore acqueo scorre verso il cristallino, passa fra questo e l'iride e raggiunge la camera anteriore dell'occhio.

L'iride, una propaggine della coroide, ricopre parzialmente il cristallino, lasciando al centro un'apertura circolare, la pupilla. Esso costituisce il diaframma dell'occhio in quanto contiene un muscolo costrittore della pupilla, a fibre circolari, e un muscolo dilatatore della pupilla a fibre radiali. La pupilla è molto dilatata negli animali notturni e, quando si restringe, prende per lo più la forma di una fessura.

Il cristallino. Il cristallino è un corpo trasparente situato posteriormente alla pupilla. La sua forma varia in relazione all'habitat. Nei Pesci e negli Amnioti riadattatisi alla vita acquatica, quali le testuggini marine, i Cetacei e i Sirenii, il cristallino è sferico. Nei Vertebrati terrestri, il cristallino ha generalmente una forma biconvessa con la superficie anteriore meno incurvata di quella posteriore.

Il cristallino è rivestito da una capsula omogenea, molto rifrangente, ricca di carboidrati; essa aderisce alla superficie esterna di uno strato di cellule cubiche che, nella parte anteriore della lente, costituisce l'epitelio della lente. In corrispondenza del polo posteriore, al di sotto della capsula, manca l'epitelio. Le cellule epiteliali hanno un'importanza fondamentale per il normale metabolismo del cristallino. Avvicinandosi all'equatore, le cellule dell'epitelio della lente assumono una forma batiprismatica e si dispongono in file orientate secondo i meridiani. Divenute sempre più lunghe, in corrispondenza dell'equatore (zona di transizione), si trasformano in fibre, che costituiscono la maggior parte della lente. La parte centrale della lente è detta nucleo primario, ed è composta dalle fibre che, nell'ontogenesi, si sono differenziate per prime (fig. 2).

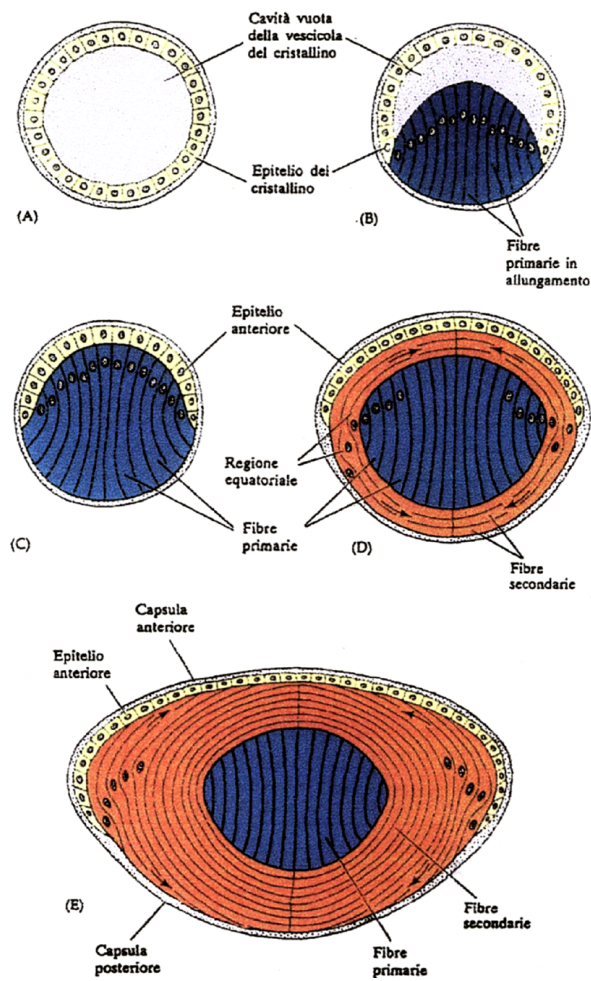


Fig. 2. Differenziamento delle cellule del cristallino. (A) Vescicola del cristallino. (B) Allungamento delle cellule interne, che producono le fibre. (C) Cristallino formato da cellule in attiva sintesi di cristalline. (D) Nuove cellule derivate dall'epitelio anteriore del cristallino. (E) Mentre il cristallino si accresce, si differenziano nuove fibre (da Paton and Craig, 1974).

Il differenziamento del tessuto del cristallino in un corpo trasparente capace di concentrare la luce sulla retina, oltre a comportare cambiamenti nella forma delle cellule, comporta anche la sintesi da parte di esse di proteine specifiche chiamate cristalline. Infatti, mentre le cellule si allungano

in fibre, esse sintetizzano le cristalline, che alla fine riempiono completamente il citoplasma delle cellule e provocano l'estrusione del nucleo. Nelle fibre differenziate, il ricambio proteico è pressoché nullo o è molto scarso. Questo significa che le proteine della lente possono essere estremamente vecchie e possono essere esposte alla luce per decenni.

La trasparenza del cristallino è dovuta all'elevato grado di organizzazione delle fibre differenziate e delle proteine che sono presenti al loro interno (Delaye and Tardieu, 1983; Duncan and Jacob, 1984).

Negli Anamni, la lente è sferica e rigida e la messa a fuoco avviene per spostamento della lente in avanti o indietro, grazie all'azione di muscoli intrinseci ciliari, protrattori o retrattori della lente.

Nei Condroitti e negli Anfibi, l'occhio in condizioni di riposo è adattato alla visione lontana: per la messa a fuoco degli oggetti vicini, nei Condroitti agisce un muscolo protrattore ventrale, mentre negli Anfibi agiscono due muscoli protrattori (dorsale e ventrale).

Negli Osteitti, l'occhio in condizioni di riposo è adattato alla visione vicina; per la messa a fuoco degli oggetti lontani, agisce un muscolo retrattore, ventrale.

Nei Sauropsidi e nei Mammiferi, generalmente il cristallino è morbido e il muscolo ciliare è ad anello. In condizione di riposo, il muscolo ciliare è rilasciato, il cristallino ha la forma di una lente biconvessa e l'occhio è adattato per la visione da lontano; per la visione da vicino, il muscolo ciliare si contrae facendo assumere al cristallino una forma più prossima a quella sferica.

Diversamente da quanto avviene negli Gnatostomi, nei Ciclostomi l'accomodamento è dovuto ad un particolare muscolo estrinseco (m. corneale) che si inserisce sulla cornea; quando si contrae, la cornea si appiattisce e sposta la lente indietro, per la visione lontana.

Le cristalline. La lente è costituita da varie proteine tra cui quelle del citoscheletro. La costituente macromolecolare maggiore è rappresentata da proteine solubili dette cristalline. In tutti i Vertebrati, sono presenti α , β e, esclusi gli Uccelli, γ -cristalline; inoltre possono essere presenti altre cristalline specifiche per determinati taxa, come ad esempio le δ -cristalline dei Sauropsidi (Wistow and Piatigorsky, 1988).

Le distinte classi delle cristalline sono altamente conservate tra i diversi Vertebrati e la loro sintesi è regolata durante il processo di sviluppo del cristallino (Wistow and Piatigorsky, 1988). La precisa sintesi, coordinata nel tempo e nello spazio delle varie cristalline durante il differenziamento della

lente, è di fondamentale importanza poichè il reciproco ordinamento spaziale delle cristalline è responsabile del mantenimento della trasparenza della lente, condizione indispensabile per la piena funzione del cristallino (Delaye and Tardieu, 1983).

α -Cristalline. Le α -cristalline sono state osservate nella lente di tutti i Vertebrati esaminati (Bloemendal and Groenewoud 1981; De Jong and Hendriks, 1986; De Jong, 1981) e sono le prime ad essere sintetizzate, almeno nei Mammiferi (Rabaey, 1965; Barabanov, 1966; McAvoy, 1978; Zwaan, 1983). La caratteristica saliente è che formano aggregati molto grandi con pesi molecolari vicino a 800.000 Da. Questi aggregati eterogenei sono prodotti da una famiglia di solo due geni, α -A e α -B, che, nei Mammiferi, codificano subunità di circa 20.000 Da. I prodotti dei due geni delle α -cristalline sono presenti, almeno nel ratto, sia nelle cellule epiteliali che nelle fibre della lente (McAvoy, 1978). Mentre la subunità α -A è specifica della lente, la subunità α -B si trova anche in altri tessuti quali retina, cuore, muscolo, pelle, cervello e polmoni (Bhat and Naginemi, 1989).

$\beta\gamma$ -cristalline. Le β e le γ -cristalline sono le cristalline più abbondanti delle lenti di tutti i Vertebrati (le γ -cristalline sono assenti negli Uccelli). Sebbene siano distinte per le loro proprietà fisico-chimiche ed immunologiche (Harding and Dilley, 1976), come risulta da dati di sequenza proteica e di cristallografia a raggi X, esse sono strutturalmente correlate e, pertanto, vengono considerate componenti della superfamiglia proteica delle $\beta\gamma$ (Wistow and Piatigorsky, 1988). I polipeptidi β e γ presentano alte omologie di sequenza (Driessen et al., 1981; Den Dunnen et al., 1985). Le catene polipeptidiche β , hanno un peso molecolare che varia tra i 20 e i 30 kDa e (con l'eccezione della catena della β s) formano dimeri o aggregati misti di 50-100 kDa (β L) o 100-200 kDa (β H). Tutte hanno il gruppo N-terminale bloccato da un gruppo acetilico. Berbers et al. (1984) hanno diviso le subunità delle β -cristalline di bue in due gruppi: un gruppo, generalmente più acido, è formato da 4 catene polipeptidiche β A1- β A4 che presentano più del 56% di similarità e sono caratterizzate dalla presenza di un'estensione C-terminale; l'altro gruppo, generalmente più basico, è formato da 3 catene polipeptidiche β B1- β B3, che hanno il 63% di similarità, e non presentano l'estensione C-terminale polipeptidica.

Un tempo, le proteine β e γ si ritenevano esclusive del cristallino. Tuttavia recentemente è stato dimostrato che negli embrioni di *Xenopus laevis* il gene di tali cristalline è trascritto anche in tessuti estranei all'occhio

(Smolich et al., 1994). In alcune specie le γ -cristalline sono le cristalline predominanti e sono le maggiori componenti, specialmente delle lenti embrionali e neonatali, dei Pesci e di molti Mammiferi (Harding and Dilley, 1976). Le γ -cristalline sono esclusivamente monomeriche, hanno un peso molecolare di circa 21 kDa ed una glicina non modificata nella regione N-terminale (Wistow and Piatigorsky, 1988). In *Xenopus laevis* le γ -cristalline sono codificate da una famiglia multigenica, similmente a quello che avviene negli altri Vertebrati e tali geni potrebbero essere derivati probabilmente da eventi di duplicazione genomica. Inoltre le γ -cristalline di *Xenopus laevis* mostrano alte omologie con le γ -cristalline degli altri Vertebrati, perfino con quelle dei Mammiferi (Smolich et al., 1993).

Le γ -cristalline sembrano essere assenti dalle lenti di tutti gli Uccelli (McDevitt and Croft, 1977; Treton et al., 1984) e possono essere assenti in molti Rettili, anche se recentemente è stata dimostrata la presenza di proteine simili alle γ -cristalline nelle lenti del caimano (Chiou et al., 1987). I primi studi di cristallografia a raggi X ad alta risoluzione sono stati compiuti sulla cristallina bovina γ_b (Summers et al., 1984) ed hanno permesso di identificare una struttura osservata, in seguito, anche nelle altre γ -cristalline. Esse sono composte da due domini simili, ognuno dei quali è a sua volta costituito, da due motivi strutturali simili tra loro. Ogni motivo è costituito da quattro filamenti β antiparalleli (motivo a chiave greca). Il dominio N-terminale consiste del motivo 1 e 2, il dominio C-terminale del motivo 3 e 4, posti consecutivamente lungo la catena polipeptidica. In termini di similarità intramolecolare, i motivi formano due coppie: il motivo 1 con il motivo 3 e il motivo 2 con il 4. Secondo Blundell et al., 1981, ci sono forti indizi del fatto che i quattro motivi strutturali a chiave greca siano evolutivamente correlati.

Studi elettroforetici ed immunologici hanno messo in evidenza differenze tra la composizione delle lenti embrionali ed adulte dei Vertebrati (Rabaey, 1965, 1968; Clayton, 1970; Rabaey and Lagasse, 1971). Durante la metamorfosi degli Anfibi Anamni, il cristallino subisce un rimaneggiamento biochimico a carico delle varie proteine che lo compongono. Jiang et al. (1989) hanno riscontrato i seguenti cambiamenti in *Rana catesbeiana*: 1) il contenuto di α e γ -cristalline diminuiva da più del 70% a meno del 60% delle proteine solubili totali della lente; 2) uno dei maggiori polipeptidi delle β -cristalline (28 kDa) aumentava da meno dell'1% a circa il 6%; 3) la ρ cristallina, specifica del genere *Rana*, aumentava da circa il 6% a più del 10%.

Gli Autori correlano tali cambiamenti con le diverse esigenze legate all'ambiente terrestre e mettono in risalto il ruolo del polipeptide β da 28 kDa, altamente stabile al calore, nell'interagire con le altre cristalline.

I dati derivanti da isoelettrofocalizzazione su strato sottile (Brahma and Bourse, 1972) di estratti di lente di *Xenopus laevis*, sia allo stadio larvale che adulto, dimostrano che lo sviluppo e la crescita della lente sono accompagnati dall'acquisizione e dalla perdita di qualche componente delle sue proteine solubili.

Il corpo vitreo. Il corpo vitreo occupa la camera vitrea, l'ampia cavità dell'occhio posta dietro la lente. E' un gel trasparente consistente di acqua (circa il 99%) e di glicosamminoglicani altamente idratati, tra i quali predomina l'acido ialuronico.

Tonaca interna. La tonaca più interna dell'occhio è costituita dalla retina. Questa è formata da due strati.

Lo strato più esterno, addossato all'uvea è l'epitelio pigmentato della retina (tappeto nero) e contribuisce a costituire la camera oscura dell'occhio. Esso si estende dalla parte posteriore dell'occhio alla parte anteriore, dove si accolla al corpo ciliare e all'iride.

Retina. Lo strato più interno forma la parte nervosa della retina (retina neurale) nei due terzi posteriori dell'occhio. Nel terzo anteriore dell'occhio, questo strato diviene simile allo strato epiteliale pigmentato esterno e si estende sul corpo ciliare (*pars ciliaris retinae*) e sull'iride (*pars iridea retinae*). La zona di confine fra la retina neurale e la *pars ciliaris retinae* è marcata da un restringimento anulare (*ora serrata*).

La retina neurale è pluristratificata (Fig. 3).

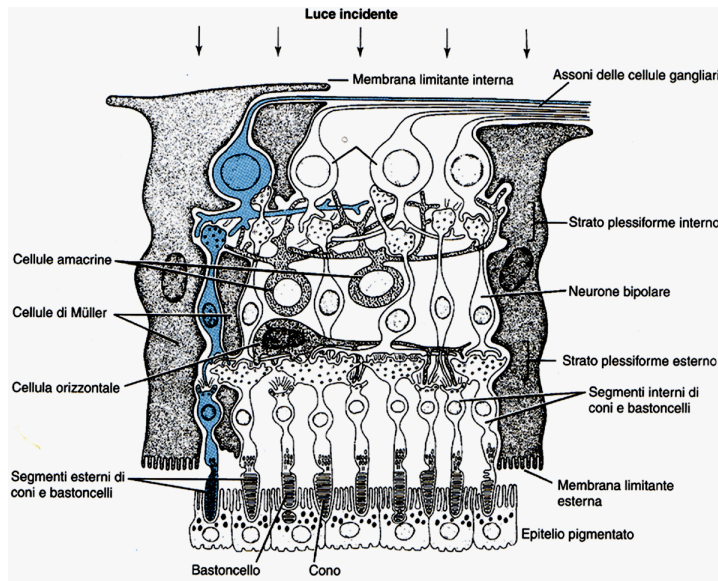


Fig. 3. Struttura della retina.

Fondamentalmente nella retina, si distinguono tre strati principali di neuroni. Lo strato più esterno, addossato al tappeto nero, è costituito dai fotorecettori (coni e bastoncelli). I fotorecettori sono neuroni capaci di trasdurre, grazie a pigmenti fotosensibili presenti nel loro segmento esterno, lo stimolo luminoso in impulso nervoso e di trasmettere tale impulso alle cellule del secondo strato retinico; sono infatti cellule sensorie di I tipo, dotate di un neurite che sinapta con i dendriti delle cellule bipolari, che costituiscono il secondo strato. I neuriti delle cellule bipolari sinaptano con i dendriti delle cellule gangliari, che costituiscono il terzo strato. I neuriti delle cellule gangliari confluiscono verso il cosiddetto punto cieco dell'occhio, dove formano il nervo ottico. Questo fuoriesce dalla parte posteriore dell'occhio, passando attraverso un'apertura della tonaca esterna.

Fotorecettori. Esistono due tipi di fotorecettori: i coni e i bastoncelli. I loro segmenti esterni rappresentano la parte sensibile alla luce. I bastoncelli sono responsabili della visione in bianco e nero; i coni sono responsabili della visione a colori. I bastoncelli sono più sensibili alla luce dei coni, ma i coni danno un maggior dettaglio delle immagini; ciò è dovuto al fatto che

mentre molti bastoncelli sinaptano con una sola cellula bipolare, un solo cono o pochi coni sinaptano con una cellula bipolare.

I bastoncelli sono elementi allungati, sottili. Ciascun bastoncello è formato da un segmento interno ed uno esterno. Il segmento esterno è congiunto a quello interno da un sottile peduncolo che contiene nove fibrille orientate longitudinalmente, terminanti in un centriolo posto all'estremità distale del segmento interno. In sezione trasversale il peduncolo ha l'aspetto di un ciglio difettoso provvisto di nove doppiette periferiche, ma privo del paio di fibrille centrali. Studi sullo sviluppo dei fotorecettori hanno, infatti, dimostrato che il segmento esterno dei bastoncelli si origina dalla trasformazione di un ciglio. Il segmento esterno è un sottile cilindro composto da un grandissimo numero di lamelle parallele; ciascuna lamella è in realtà un sacco di membrana, in cui sono immerse molte molecole fotosensibili di rodopsina. Il segmento interno contiene un notevole accumulo di mitocondri, tutti localizzati in un'area circoscritta nota come ellissoide.

I coni sono costituiti essenzialmente dalle stesse parti che compongono i bastoncelli, ma ne differiscono per alcuni particolari. I coni contengono la iodopsina; il segmento esterno, invece di un sottile cilindro, appare come una lunga formazione conica che alla base è più larga di un bastoncello e si assottiglia verso le estremità, terminando con un apice arrotondato. Come nel bastoncello, il segmento esterno è costituito da un gran numero di lamelle impilate una sopra l'altra, ognuna formata da un paio di membrane addossate tra loro. Anche il segmento esterno del cono è connesso a quello interno da un ciglio modificato, disposto eccentricamente e terminante in un corpuscolo basale all'estremità distale del segmento interno. Il segmento interno del cono si continua con il corpo cellulare, contenente un nucleo più grande e meno intensamente colorato di quello dei bastoncelli.

Il numero relativo e la distribuzione dei bastoncelli e dei coni nei diversi Vertebrati presentano grandi variazioni che dipendono dalle differenti abitudini di vita. Negli Uccelli diurni i coni sono più numerosi dei bastoncelli; nella maggior parte dei Rettili diurni si riscontrano solo coni e mancano bastoncelli. In molti Vertebrati notturni sono presenti solo i bastoncelli, mentre in altri si possono trovare numerosi bastoncelli e pochi coni rudimentali (Fig. 4).

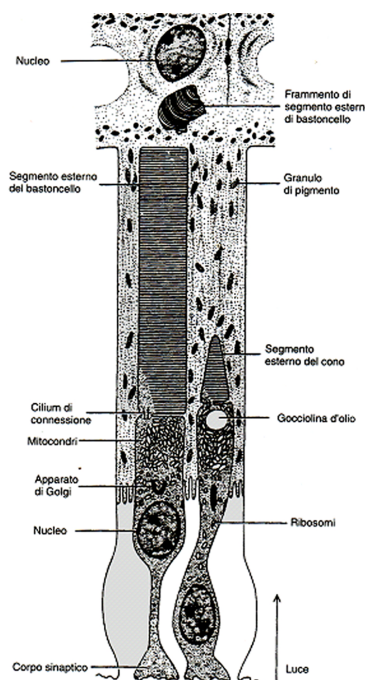


Fig. 4. Disegno schematico del complesso fotorecettori-cellule del tappeto nero.

Cellule bipolari: questi neuroni connettono i coni ed i bastoncelli alle cellule gangliari della retina e tramite questi ai centri visivi dell'encefalo.

Cellule gangliari: queste cellule costituiscono il terzo neurone della via ottica. Da ciascuna cellula gangliare emerge un assone che lascia la retina, diventa una fibra del nervo ottico e termina nei centri visivi dell'encefalo.

Oltre ai neuroni sopra descritti, che costituiscono le prime tre stazioni della via ottica, nella retina sono presenti le *cellule orizzontali*, i cui processi sinaptano coi terminali dei coni e dei bastoncelli e con le cellule orizzontali contigue, a dare un'integrazione orizzontale dei fotorecettori, e le cellule *amacrine*, connesse con i neuriti delle cellule bipolari e tra loro a dare un'altra integrazione. Infine le *cellule di Muller*, elementi gliali di sostegno, attraversano la retina per quasi tutto il suo spessore.

Nel polo posteriore dell'occhio, nella retina di quasi tutti i Vertebrati, si riconosce un'area in cui i fotorecettori sono più numerosi e fittamente stipati. Spesso, quest'area presenta al centro una depressione (*fovea centralis*) in cui la retina è più sottile ed è formata esclusivamente da coni. L'area, e

particolarmente la *fovea*, è la regione della retina dove la visione è più distinta. In molti Uccelli, vi sono due aree (ciascuna con la sua *fovea*), una per la visione laterale, l'altra per la visione in avanti.

La *fovea* è circondata da grossi vasi sanguigni, mentre in essa si trovano solo arterie e vene di piccolo calibro e capillari. Nella parte più centrale della *fovea* anche i capillari sono assenti; perciò la trasparenza di questa regione retinica è molto maggiore.

La matrice extracellulare dei fotorecettori (IPM). La matrice dei fotorecettori (IPM) occupa lo spazio tra coni e bastoncelli e le cellule del tappeto nero (RPE). Il complesso retina-RPE è un sistema molto delicato, in cui i fotorecettori sono direttamente dipendenti dalle cellule del tappeto nero per il mantenimento delle loro attività metaboliche e funzionali. L'ossigeno, vari metaboliti e i derivati della vitamina A, necessari per il processo fotoeccitatorio, sono continuamente sintetizzati, dalle cellule del tappeto nero, e trasportati verso i fotorecettori; gli scambi di queste molecole avvengono attraverso l'IPM. Lo spazio occupato dall'IPM è quello che rimane del lume della coppa ottica, ridotto, a fine sviluppo, ad un sottile spazio tra lo strato interno ed esterno, da cui si origineranno rispettivamente la retina neurale e l'epitelio pigmentato; successivamente, in questo spazio i fotorecettori proietteranno i loro segmenti esterni (Barnstable, 1987).

L'IPM è secreta da vari tipi cellulari: coni, bastoncelli, cellule di Muller e RPE. I costituenti della matrice possono essere divisi in solubili in acqua ed insolubili in acqua; tra questi ultimi sono abbondanti le glicoproteine e i glicosamminoglicani, che si combinano per formare una rete idrofilica. Nella parte idrofila dell'IPM sono state trovate diverse molecole come l'idrolasi acida, fattori di crescita (FGF2, EGF, etc.), dermatan solfato, condroitin solfato ed eparan solfato (Kennedy and Frank, 1993); invece, collagene, laminina, fibronectina e cheratan solfato, sono assenti (Johnson et al., 1986).

Il proteoglicano condroitin solfato è abbondante ed eterogeneamente distribuito nella matrice. Si ritiene che sia sintetizzato dal RPE e dai fotorecettori (Porrello and LaVail, 1986). Inoltre, i fotorecettori sono responsabili della sintesi di diverse glicoproteine ad alto peso molecolare (Plantner, 1992). La presenza nell'IPM di enzimi lisosomiali e di metalloproteasi, rilasciati dalle cellule del tappeto nero (Adler and Evans, 1983; Plantner, 1992), suggerisce che la degradazione dei componenti della matrice possa esser regolata da un'attività proteolitica diretta nel compartimento dell'IPM.

La localizzazione di questa matrice suggerisce che alcune delle sue proprietà biochimiche e strutturali siano in qualche modo essenziali nel mantenimento della funzionalità del segmento esterno dei fotorecettori. L'adesione della retina neurale al tappeto nero è di fondamentale importanza nel mantenimento dell'attività fotoeccitatrice. Studi di microscopia elettronica condotti su retine umane hanno dimostrato che l'IPM è saldamente ancorata ai villi delle cellule del tappeto nero (Hollyfield et al., 1989). La degradazione enzimatica *in vivo* dei componenti dell'IPM di coniglio ha determinato il distacco della retina (Yao et al., 1992). Il distacco era ottenuto anche in seguito al blocco della glicosilazione, che impedisce la secrezione dei proteoglicani, rivelando il coinvolgimento diretto dei proteoglicani dell'IPM nell'adesione retinica (Lazarus and Hageman, 1992).

Se l'IPM è coinvolta nell'adesione della retina al tappeto nero, allora tale matrice deve essere ancorata, attraverso delle "ECM binding-protein", anche alle membrane delle cellule retiniche. La proteina CD44 è localizzata nella parte apicale dei villi delle cellule di Muller ed è in grado di legarsi al condroitin solfato e all'acido ialuronico presenti nell'IPM (Chen et al., 2004).

Recentemente, è stata identificata una vasta classe di sialoglicoproteine, chiamate SPACR, abbondanti nella matrice dell'occhio; una di queste, SPACRCAN, è localizzata esclusivamente nella matrice della retina e in quella della ghiandola pineale; tale proteina è sintetizzata dai fotorecettori e si dispone intorno al loro segmento esterno. SPACRCAN è costituita da 1160 aa e contiene tre sequenze consenso per l'attacco dei glicosamminoglicani, due domini EGF-like, un motivo di attacco per l'acido ialuronico ed un dominio transmembrana al C-terminale (Chen et al., 2003). Il western blotting rivela un peso molecolare apparente di 400 KDa; in seguito a trattamento con condroitinasi ABC il peso molecolare diviene di 230 KDa. La rimozione degli oligosaccaridi legati in N o in O riduce il PM a 160 KDa, dimostrando che i carboidrati costituiscono circa il 60% della massa di SPACRCAN. Si ritiene che il legame tra SPACRCAN e l'acido ialuronico sia coinvolto nell'organizzazione della matrice (Acharya et al., 2000).

Sviluppo dell'occhio dei Vertebrati

Lo sviluppo dell'occhio dei Vertebrati coinvolge una precisa sequenza d'interazioni induttive tra il cervello anteriore embrionale e l'ectoderma superficiale. Durante la gastrulazione, una regione dell'ectoderma dorsale è indotta a formare la placca neurale. Tale induzione avviene in due stadi: in un primo tempo, durante l'involuzione dell'area marginale (induzione tangenziale) e in un secondo tempo quando il cordomesoderma si posiziona al di sotto dell'ectoderma (induzione definitiva).

All'inizio della neurulazione, i campi retinici sono specificati come due aree paramediane del terzo anteriore della doccia neurale caratterizzate da cellule cilindriche e pigmentate al loro estremo distale, denominate *foveolae opticae*. Più tardi, la doccia si chiude formando il tubo neurale, e dalle pareti ventro-laterali del futuro cervello anteriore (prosencefalo), laddove si è localizzato il materiale foveolare, si estroflettono le vescicole ottiche che rimangono connesse all'encefalo dai peduncoli ottici. Le vescicole ottiche si portano in fuori, accrescendosi in direzione latero-dorsale. Poi, il loro estremo distale s'introflette e si passa allo stadio di coppe ottiche nelle quali sono ormai riconoscibili i due foglietti, esterno ed interno, della retina. Dal foglietto esterno, deriverà il *tapetum nigrum*, da quello interno, la retina neurale. Nella coppa ottica, viene accolto il cristallino, che si abbozza come una gemma epiteliale (vescicola lentogena) distaccatasi dal placode lentogeno, la regione dell'ectoderma prospiciente la coppa ottica. La vescicola lentogena è costituita da un monostrato di cellule cubiche; successivamente le cellule del polo posteriore divengono colonnari e si differenziano in fibre, mentre quelle del polo anteriore si differenziano in epitelio della lente (Fig. 5).

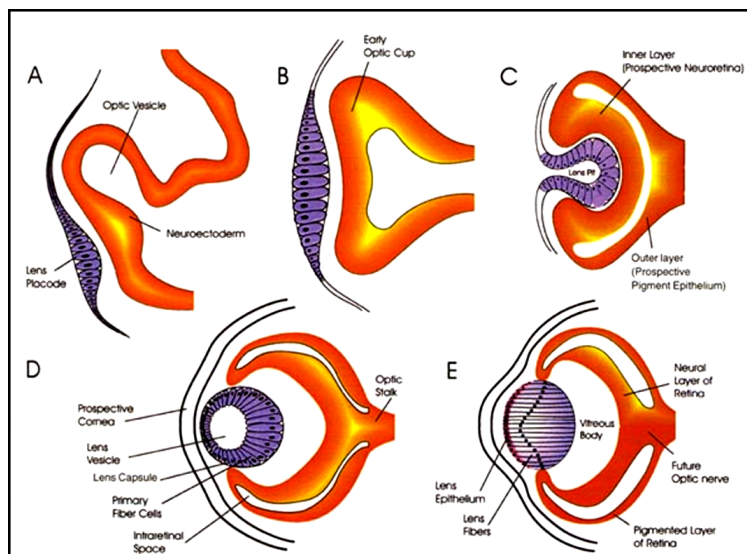


Fig. 5. Morfogenesi dell'occhio. (A-B) La vescicola ottica si allontana dal diencefalo, induce il placode del cristallino e viene da esso indotta a sua volta a formare una struttura a coppa (C). (D-E) I due strati della coppa ottica differenziano in epitelio pigmentato e retina mentre il cristallino termina il differenziamento.

Attorno alla coppa ottica differenziate in retina, e al cristallino, il mesenchima dà origine a due membrane, la sclerotica che trapassa anteriormente nella cornea, e la coroidea. A sviluppo ultimato, derivano dalla coppa ottica: la retina, la muscolatura intra-oculare, le fibre della zonula di Zinn; probabilmente anche il vitreo, che però alcuni Autori vogliono d'origine mesodermica, dal mesenchima penetrato nella cavità della coppa ottica.

Aspetti molecolari dello sviluppo dell'occhio

eyless (ey) è un gene chiave nello sviluppo dell'occhio di *Drosophila* e codifica per un fattore di trascrizione che contiene un dominio "paired" e un "omeodominio": la sua espressione ectopica comporta l'inizio di un completo programma di sviluppo dell'occhio nei dischi imaginali destinati a dare strutture non oculari, mentre mutazioni dello stesso gene causano malformazioni o mancanza dell'occhio (Quiring et al., 1994).

L'identificazione in *Drosophila* di altri geni, le cui mutazioni causano alterazioni nello sviluppo dell'occhio, ha portato a ritenere che per il normale sviluppo dell'occhio non sia sufficiente la sola attivazione di *ey*. Desplan (1997), in particolari studi funzionali, ha dimostrato che il corretto sviluppo dell'occhio dipende dall'interazione tra *sine oculis (so)*, *dachshund (dac)*, *eyes absent (eya)* ed *ey*, piuttosto che dall'azione del solo *ey* (Fig. 6A).

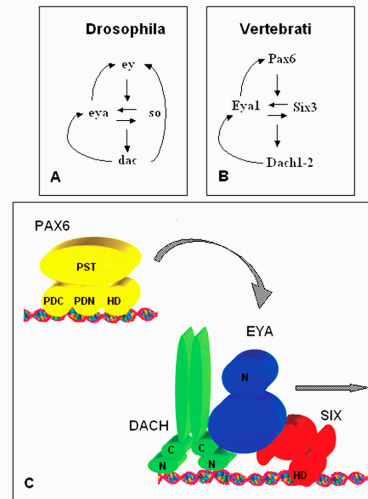


Fig. 6. Interazioni tra i geni della determinazione retinica in *Drosophila* (A), e nei Vertebrati (B). Formazione del complesso trascrizionale responsabile della determinazione retinica secondo Kim et al., 2002 (C).

Inoltre, la capacità di indurre occhi ectopici, non sembra essere una prerogativa esclusiva di *ey*, dal momento che, anche, i geni *eya* e *dac* possono promuovere la formazione dell'occhio anche se con efficienza minore rispetto ad *ey*. Tuttavia, il recente isolamento in *Drosophila* di *twin of eyeless (toy)*, un gene molto simile ad *ey*, ha riproposto l'idea dell'esistenza di un singolo "gene master", in grado di controllare lo sviluppo dell'occhio (Czerny et al., 1999). *toy*, la cui struttura e il cui quadro di espressione sono più simili a quelli di *pax6* dei Vertebrati che ad *ey* di *Drosophila*, agisce a monte di *ey*, inoltre attiva *so*, *eya* e *dach*, e la sua sovraespressione induce occhi ectopici.

In *Drosophila*, la mancanza dell'attività di *dac* causa la formazione di occhi ridotti e, in alcuni casi, la loro completa assenza. Sebbene durante tutto il processo di propagazione del solco morfogenetico, *dac* sia espresso sia

nella parte anteriore sia in quella posteriore del solco, esso non è strutturalmente richiesto per la propagazione del solco stesso. *dac* è richiesto, invece, per la costruzione e per il corretto assemblamento degli ommatidi dell'occhio composto. Considerando che *dac* è espresso molto precocemente nel margine posteriore del disco imaginale dell'occhio e che ha un ruolo essenziale nelle prime fasi del movimento del solco, si può affermare che tale gene giochi un ruolo cruciale durante i primi stadi della morfogenesi e della formazione dei fotorecettori (Mardon et al., 1994).

Shen e Mardon (1997) hanno dimostrato che l'espressione ectopica di *dac* nei dischi imaginali delle antenne e delle zampe è in grado di indurre lo sviluppo di occhi ectopici, morfologicamente molto simili agli occhi normali. Inoltre *dac* è in grado di promuovere l'espressione di *ey*, suggerendo che *dac* agisca a monte di *ey* durante lo sviluppo della retina.

Esistono nei Vertebrati vari omologhi dei geni coinvolti nella determinazione retinica di *Drosophila* e questi sono i geni *Pax* (omologhi ad *ey*), i geni *Eya* (omologhi ad *eya*), i geni *Six* (omologhi a *so*) e i geni *Dach* (omologhi a *dachshund*) (Fig. 6B-6C). Inoltre, si pensa che il sistema di regolazione dello sviluppo dell'occhio di *Drosophila* sia conservato nei Vertebrati (Chow et al., 1999) e che diverse combinazioni dei geni coinvolti nello sviluppo dell'occhio possano anche essere implicate nello sviluppo di altri organi come muscoli, orecchio e rene dei Vertebrati stessi (Henue et al., 1999).

In *Xenopus*, i processi molecolari che regolano e coordinano la sequenza degli eventi che porta alla formazione dell'occhio iniziano in una fase molto precoce dello sviluppo (gastrula tardiva-neurula precoce), mentre l'abbozzo dell'occhio comincia ad essere visibile solamente alla fine della neurulazione. Il controllo molecolare degli eventi precoci che porta alla formazione dell'occhio coinvolge due fasi differenti e temporalmente distinte. In una prima fase, si viene ad identificare una regione continua a forma di semiluna nella porzione anteriore della placca neurale. In una seconda fase, questa regione è suddivisa in due abbozzi laterali distinti in seguito allo sviluppo della porzione ventrale del diencefalo (Li et al., 1997). Da questo momento in poi, l'abbozzo dell'occhio comincia il suo differenziamento e la sua specificazione regionale (Chiang et al., 1996). Recenti esperimenti di "linear-tracing" in *X. laevis* hanno identificato la regione destinata ad evolvere in retina. Tale regione, è un'area continua posta nella parte più anteriore della placca neurale.

I geni coinvolti nello sviluppo precoce dell'occhio dovrebbero essere espressi nel territorio presuntivo dell'occhio quando questo è definito per la

prima volta. Questo è il caso di *pax6* (omologo di *ey*). Tale gene è espresso nel campo dell'occhio allo stadio di neurula precoce, e si ritiene che sia a monte della cascata genica che governa lo sviluppo dell'occhio. L'idea dell'esistenza di un "gene master" dell'occhio è stata recentemente rafforzata dall'osservazione che la sovraespressione di *pax6* induce lo sviluppo di occhi ectopici anche nei Vertebrati, come mostrano gli esperimenti di microiniezione in embrioni di *X. laevis* (Chow et al., 1999). Il ruolo di *pax6* nei Vertebrati è stato inoltre accertato dall'analisi sui topi che presentano mutazioni "loss-of-function" (Small eye: Sey) di *pax6*. I topi mutanti, oltre a mostrare difetti nello sviluppo del cervello e del naso, mostrano una formazione anormale della vescicola ottica e una completa assenza della lente. È interessante notare che sebbene nei topi mutanti non si formi mai il placode lentogeno, le vescicole ottiche inizialmente si evaginano normalmente, ed entrano in contatto con l'ectoderma sovrastante. Quindi, anche se *pax6* svolge un ruolo cruciale nello sviluppo dell'occhio, essendo in grado di indurre la formazione di un occhio in condizioni di sovraespressione ed essendo necessario per lo sviluppo delle lenti e della retina, la sua funzione non sembra essere richiesta nella fase iniziale della formazione della vescicola ottica (Czerny et al., 1999). Perciò si è dedotto che questo processo coinvolga altri geni che vengono attivati in seguito, durante lo sviluppo dell'embrione. I partners più importanti di *pax6* per lo sviluppo dell'occhio dei Vertebrati sono *six*, *eya* e *Dach*. Lo studio condotto su *so* di *Drosophila* ha rivelato l'esistenza nei Vertebrati di numerosi geni correlati, appartenenti alla famiglia dei geni *Six*. Curiosamente, i membri più strettamente messi in relazione con *so*, *six1* e *six2*, non sono espressi nell'abbozzo dell'occhio. Al contrario, è stato dimostrato che gli altri due membri della famiglia dei geni *Six*, chiamati *six3* e *optx2*, sono altamente espressi nei territori presuntivi dell'occhio. In *X. laevis*, *six3* è espresso precocemente, contemporaneamente a *pax6*, nel campo dell'occhio ed esperimenti di microiniezione nei Pesci hanno mostrato che *six3* è in grado di indurre retine e lenti ectopiche oltre all'ampliamento del prosencefalo. Anche *optx2* è espresso nel campo dell'occhio dello *X. laevis*, seppure in uno stadio più tardivo rispetto a *six3*, ed inoltre si è dimostrato in grado di controllare la proliferazione cellulare, determinando così la dimensione finale dell'occhio. Gli omologhi di *eya* e *dac* dei Vertebrati sono espressi in varie zone dell'occhio. Al momento il loro ruolo nello sviluppo dell'occhio non è stato ancora ben chiarito. Recentemente, sono stati isolati e caratterizzati in *X. laevis* due geni omeotici *rx1* e *vax2*, che giocano un ruolo importante, rispettivamente nella specificazione precoce e nel "patterning"

dell'occhio (Casarosa et al.,1997; Barbieri et al.,1999; Ohsaki et al., 1999). In *X. Laevis*, *rx1*, un gene con un "omeobox" e un dominio "paired", è espresso nel campo dell'occhio contemporaneamente a *pax6* e *six3* e svolge un ruolo chiave nello sviluppo della retina e nella proliferazione della parte anteriore del cervello. Dal momento in cui è emerso che la specificazione del campo dell'occhio richiede l'intervento di numerosi geni, è divenuto di primaria importanza identificare l'interazione che avviene tra questi. Recenti esperimenti in *X. laevis* di sovra-espressione di *pax6*, *rx1* e *optx2*, hanno mostrato che, ognuno di questi geni, è in grado di attivare l'espressione degli altri due anche se in tempi diversi. *optx2* quando è sovraespresso può anche attivare *pax6* e *rx1*, mentre la coiniezione con *pax6*, ha mostrato di potenziare gli effetti di *optx2* sugli occhi e sul cervello.

Il fattore di trascrizione *pax6*

pax6, come altri fattori di trascrizione, porta nella propria sequenza diversi motivi strutturali interagenti con il DNA (Fig. 7).

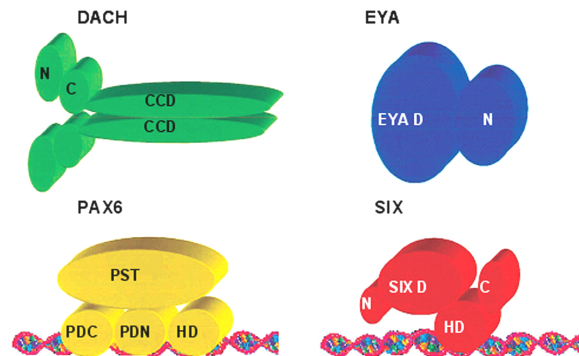


Fig. 7. Lo schema illustra i domini funzionali delle famiglie geniche Dach, EYA, Pax6 e Six: **CCD**, coiled coil domain; **C**, dominio C-term; **N**, dominio N-term; **EYA D**, dominio EYA; **PST**, regione ricca in pro,ser,treo; **PDC-N**, dominio paired C,N-term; **HD**, omeodominio; **SIX D**, dominio Six.

Tra le diverse forme purificate da estratti cellulari, le proteine prevalenti (*pax6/p46*) portano in comune i canonici 128 aminoacidi del *paired box*. Le forme con minor abbondanza (*pax6/p48*) hanno nella sequenza aminoacidica un'inserzione di 14 aminoacidi nel *paired box*, risultato di uno "splicing" alternativo dell'RNA. Come le altre proteine *paired*, *pax6* può attivare o reprimere la trascrizione e probabilmente può partecipare a cicli autoregolativi (Grindley et al., 1995; Plaza et al., 1993). Il gene *pax6* presenta un alto livello di complessità: è trascritto da almeno due promotori e può essere attivato e/o represso, in differenti cellule, da diversi set di fattori di trascrizione (Plaza et al., 1993). Tale gene, oltre al dominio d'attivazione della trascrizione al C-terminale, contiene due differenti domini che legano il DNA: la porzione N-terminale del dominio *paired* e l'*omeodominio*: ciò suggerisce che *pax6* possa interagire con un cospicuo numero di proteine e sequenze di DNA (Treisman et al., 1989; 1991). Il dominio *paired* interagisce con 24-26 bp di DNA, più ampie delle tipiche 6-10 bp delle sequenze di riconoscimento delle altre proteine leganti il DNA. La metà N-terminale del dominio *paired* di diverse proteine Pax è altamente conservata,

in misura minore quella C-terminale (Epstein et al., 1994). Lo “splicing” alternativo dell’ mRNA di *pax6* disturba la capacità, del subdominio N-terminale del dominio *paired*, d’interagire con il DNA. Così, il legame con il DNA con una differente specificità di sequenza dipende dal subdominio C-terminale del dominio *paired* (Epstein et al., 1994; Czerny et al., 1995). L’*omeodominio* di *pax6*, contenente una sequenza di 60 aminoacidi, diverge considerevolmente dalla sequenza consenso di altri *omeodomini*. La sequenza interagente, dell’*omeodominio* di *pax6*, porta una sostituzione aminoacidica a livello del nono residuo (Ser sostituisce Gln), sostituzione condivisa con Pax-3,4 e 7 (Treisman et al., 1989). L’*omeodominio* di *pax6* può svolgere almeno tre ruoli: può riconoscere una classe di siti di legame del DNA diversa da quella riconosciuta dai domini *paired*; può avere effetto sulla conformazione di altri domini all’interno delle proteine; o può interagire con altre proteine. *pax6* è veicolato nel nucleo grazie alla presenza di due segnali di localizzazione nucleare posizionati uno nel dominio *paired* e l’altro all’N-terminale dell’*omeodominio* (Carriers, et al., 1995). *pax6* può anche essere fosforilato, sebbene il significato biologico di tale fenomeno sia ancora sconosciuto (Carriers, et al., 1993). Infine la sequenza di *pax6*, contenente diversi motivi d’interazione proteina-proteina e leganti il DNA, sembra interagire con i promotori e gli enhancers di diversi geni delle cristalline.

La famiglia EYA

Le proteine della famiglia EYA condividono al C-terminale un dominio altamente conservato, di 271 aa, chiamato dominio EYA (Fig. 7).

Tale dominio, identificato unicamente nella famiglia proteica EYA e la cui struttura non è ancora stata determinata, sembra mediare le interazioni proteina-proteina, tipo quelle con il dominio SIX delle proteine SIX e con il DACHbox-C delle proteine DACH (Pignoni et al., 1997; Heanue et al., 1999). Le interazioni tra Eya e So e tra Eya e Dac, proteine che dovrebbero formare un complesso trascrizionale multimolecolare, sono eventi centrali nello sviluppo dell’occhio di *Drosophila* (Fig. 8C).

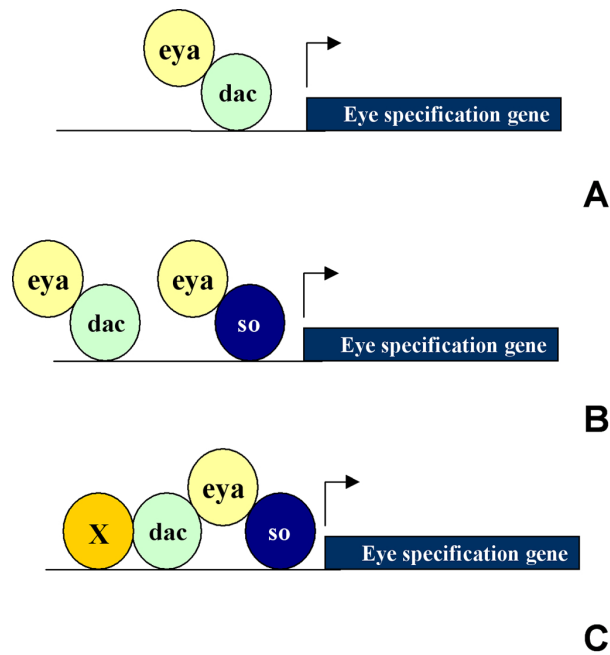


Fig. 8A,C. Modelli del complesso trascrizionale formato dalle proteine dac, eya e so.

Inoltre il dominio EYA potrebbe funzionare da sito di legame per diversi cofattori trascrizionali. Trasfettando cellule di mammifero, si è visto che le proteine EYA sono localizzate nel citosol e si muovono verso il nucleo solo in presenza delle proteine SIX (Ohto et al., 1999).

Le proteine EYA presentano all'N-terminale anche un dominio di transattivazione; tale dominio è molto variabile sia nella lunghezza che nella sequenza, che generalmente risulta ricca in proline, serine, treonine (Wawerski et al., 2000).

La famiglia SIX

In aggiunta ai due geni *six* espressi nell'occhio (*so* e *optix*), *Drosophila* ha un terzo membro, *D-six4*, che viene espresso durante lo sviluppo della testa, del mesoderma e del SNC (Seo et al., 1999; Kirby et al., 2001). I mammiferi, invece, hanno sei geni *six*, *six1-6*. In base alla comparazione delle sequenze aminoacidiche, le proteine della famiglia SIX sono suddivise in tre sottogruppi, So/SIX1/SIX2, D-Six4/SIX5 e Optix/SIX3/SIX6 (Seo et al., 1999; Kawakami et al., 2000). Tutte le proteine della famiglia SIX hanno due domini in comune, un dominio SIX di 112-116 aa e un omeodominio che è localizzato in prossimità del al C-terminale (Kawakami et al., 2000) (Fig. 7). L'omeodominio media il legame con il DNA, mentre il dominio SIX media le interazioni proteina-proteina. Nelle sottofamiglie di proteine So/SIX1/SIX2 e D-Six4/SIX5, il dominio SIX interagisce con il dominio EYA (Pignoni et al., 1997; Ohto et al., 1999). Durante lo sviluppo dell'occhio di *Drosophila*, So ed Eya agiscono come due metà di un unico fattore di trascrizione: So provvede al legame con il DNA, mentre Eya trasattiva la trascrizione (Pignoni et al., 1997) (Fig. 6C).

A dispetto dell'estesa similarità amminoacidica con tutte le altre proteine SIX, i membri della sottofamiglia Optix/SIX3/SIX6 svolgono funzioni diverse e non interagiscono con le proteine EYA (Ohto et al., 1999; Heanue et al., 1999; Seimya and Ghering, 2000).

La famiglia DACH

In *Drosophila*, *dachshund* (*dac*) è un gene implicato nello sviluppo dell'occhio e dell'arto (Mardon et al., 1994). *dac* è un componente di un complesso network di geni interagenti che coinvolge *eyless* (*ey*), *sine oculis* (*so*), *eye absent* (*eya*) ed è trascrizionalmente regolato da *ey*, *so* ed *eya* (Fig. 6A). Inoltre in *Drosophila* in seguito ad overespressione, *dac* è in grado di attivare l'espressione *eya* (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997).

Sono stati identificati gli omologhi di *dac* nei Vertebrati: *Dach1* e *Dach2* nel topo (Hammond et al., 1998; Caubit et al., 1999), *DACH1* e *DACH2* nell'uomo (Kozmik et al., 1999; Davis et al., 2001), *Dach1* e *Dach2* nel pollo (Heanue et al., 1999, 2002), *DachA*, *DachB* e *DachC* nel pesce zebra (Hammond et al., 2002) e *olDach* nel pesce medaka (Loosli et al., 2002). I geni *dachshund* di topo e di pollo sono espressi durante lo sviluppo dell'occhio, nel sistema nervoso centrale, nei somiti e nell'abbozzo dell'arto.

Le proteine Dachshund contengono due domini conservati, chiamati DACHbox-N e DACHbox-C, lunghi rispettivamente 189-275 aa e 70 aa (Fig. 9).

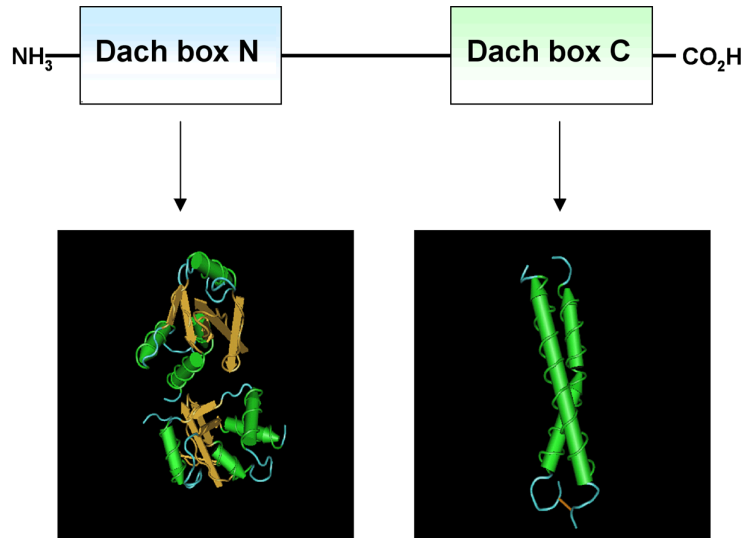


Fig. 9. Struttura della proteina Dach. Le proteine Dach sono caratterizzate dalla presenza di due domini altamente conservati; il DACHbox-N ha una struttura α/β compatta ed è in grado di legare il DNA, il DACHbox-C presenta una struttura ad α -eliche ad avvolgimento avvolto e media l'interazione con altre proteine.

Gli studi cristallografici indicano che il DACHbox-N ha una struttura terziaria in grado di legare il DNA, mentre il DACHbox-C potrebbe essere coinvolto nell'interazione proteina-proteina. La regione compresa tra il DACHbox-N e il DACHbox-C varia in lunghezza tra i 280 e i 430 residui e tende ad essere ricca in prolina (Kim et al., 2002).

La sequenza aminoacidica delle proteine DACH ha un'elevata similarità con quella delle proteine codificate dai proto-oncogeni della famiglia Ski/Sno (Hammond et al., 1998). Ski è una proteina nucleare coinvolta nella miogenesi e nella neurulazione, e la perdita di funzionalità di questo gene nei topi comporta difetti durante lo sviluppo del muscolo scheletrico, la neurulazione e malformazioni del cranio (Berk et al., 1997). La somiglianza tra le proteine DACH e le Ski/Sno, nella regione del DACHbox-N, è molto

alta (25-30% d'identità nelle sequenze consenso di tutti i Vertebrati). Un'altra importante omologia si trova tra il DACHbox-C e il dominio C-terminale delle proteine Ski/Sno. Il DACHbox-C ha una struttura ad α -elica capace di formare un avvolgimento avvolto che potrebbe mediare la dimerizzazione della proteina DACH (Hammond et al., 1998).

La struttura del DACHbox-N è stata determinata, come accennato prima, tramite dispersione anomala in multifrequenza di cristalli contenenti SeMet. Esso presenta una struttura α/β compatta, consistente in 5 file di foglietti β -antiparalleli, affiancati da 3 α -eliche da un lato e da un' α -elica dall'altro. Si ritiene che questa struttura rappresenti una variante del motivo elica-forcina-elica, struttura in grado di legare il DNA. La possibilità che il DACHbox-N sia il dominio della proteina in grado di legare il DNA è rafforzata dall'analisi della distribuzione delle cariche sulla superficie della proteina DACH, che ha rivelato che il DACHbox-N è il dominio che presenta la maggiore elettropositività. Inoltre, la presenza di sei residui conservati di cisteina nel DACHbox-N ha fatto supporre che esso possa chelare uno ione metallico (Hammond et al., 1998). Diverse prove suggeriscono che la proteina DACH sia in grado di legare il DNA. La più evidente è rappresentata dalla presenza nel nucleo di una proteina contenente un dominio fortemente basico all'estremità amino terminale. Studi condotti in soluzione hanno mostrato che il DACHbox-N ha un'affinità selettiva per il DNA a doppio filamento rispetto al DNA a singolo filamento. È probabile che il DACHbox-N isolato non sia in grado di legare il DNA ad alta affinità, quindi il DACHbox-N potrebbe legare il DNA come multimerico. L'oligomerizzazione sarebbe mediata dal DACHbox-C. Inoltre, è possibile che i residui basici al C-terminale costituiscano una seconda ala in grado di stabilizzare il complesso proteina-DNA (Taylor et al., 2000). Al contrario, DACH potrebbe essere reclutato per legare il DNA in cooperazione con altre proteine, quali EYA o il complesso EYA-SIX. Altre possibili interazioni molecolari sono suggerite dalla similarità di sequenza tra DACH e le proteine Sno/Ski, che si legano al DNA e regolano la trascrizione, interagendo con altri fattori trascrizionali, quali le proteine Smad, NF-1 e N-COR (Xu et al., 2000; Luo et al., 1999; Tarapore et al., 1997).

In virtù di tali fatti, sono stati proposti diversi modelli d'azione della proteina DACH. Secondo un modello, Dachshund legato ad un appropriato sito sul DNA, potrebbe attivare l'espressione dei geni coinvolti nella specificazione dell'occhio (Fig. 8A).

Quest'attività potrebbe essere mediata da un dominio di transattivazione di Dachshund o da domini di transattivazione di fattori trascrizionali interagenti (X) con Dachshund.

Questo modello è particolarmente rilevante nei tessuti dove Dachshund sembra funzionare indipendentemente da Eya e So, come nelle zampe di *Drosophila* (Mardon et al., 1994). La sinergia tra Dachshund ed Eya, durante lo sviluppo dell'occhio, potrebbe derivare dall'abilità di Dach di reclutare Eya tramite un appropriato sito bersaglio (Fig. 8B).

Alternativamente, i due complessi Dac-Eya e Eya-So potrebbero legarsi, cooperativamente, a siti diversi sul DNA (Fig. 8C). Un'altra possibilità è che Dac e So si leghino ad Eya contemporaneamente, aumentando così la specificità di legame al DNA. Quest'ipotesi è confortata dalle caratterizzazioni molecolari che hanno dimostrato che le interazioni tra Dac e So sono mediate da differenti subregioni del dominio conservato di Eya (Bui et al., 2000). In ogni caso nessuno dei modelli proposti preclude la possibilità che Dachshund formi complessi con fattori trascrizionali non ancora identificati.

In conclusione, è ormai chiaro che durante l'evoluzione non è il singolo gene ad essere conservato ma un intero network di geni interagenti; ciò è evidente nell'occhio, il cui sviluppo è controllato da uno stesso gruppo di geni dalla *Drosophila* all'uomo. I geni *dachshund* sono componenti chiave di queste cascate regolative, codificando per proteine nucleari in grado di funzionare da fattori di trascrizione.

Il cristallino: Sviluppo e Rigenerazione

Sviluppo del cristallino in *Xenopus laevis*

In accordo con le osservazioni di Nieuwkoop e Faber (1956) (Fig. 10), di seguito è riportata l'ontogenesi della lente in relazione ai vari stadi embrionali.

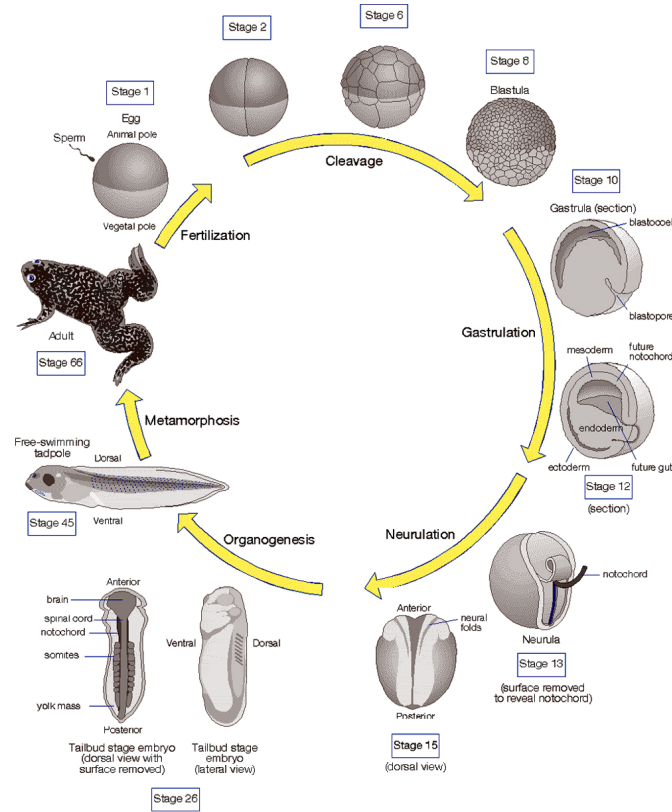


Figura 10. Ciclo vitale di *Xenopus laevis* (stadi secondo Nieuwkoop e Faber, 1956). Dopo la fecondazione inizia la segmentazione, seguita dalla gastrulazione. Dopo la neurulazione inizia l'organogenesi che è praticamente completa allo stadio di larva natante. L'embrione è pronto per la metamorfosi.

Stadio 23-24. La vescicola ottica è in apparente contatto con l'ectoderma presuntivo della lente in cui è chiaramente distinguibile uno strato esterno ed uno strato interno.

Stadio 26-27. L'ispessimento dello strato interno dell'ectoderma presuntivo della lente, porta alla formazione di un placode lentogeno.

Questo placode è comunque molto più piatto e allungato di quelli osservati in *Rana pipiens* e negli altri Vertebrati (McDevitt et al, 1969).

Stadio 29-30. L'abbozzo della lente si comincia ad ispessire riempiendo l'intera cavità della coppa ottica. Una massa di cellule, leggermente condensate, appare centralmente nell'abbozzo. La connessione dell'abbozzo della lente con il sovrastante ectoderma, in questo stadio, è piuttosto estesa.

Stadio 31. L'abbozzo della lente prima irregolare, diventa più chiaramente delineato come una massa compatta di cellule localizzate centralmente, circondate da cellule periferiche disposte più lassamente.

Stadio 34-35. Si forma la vescicola lentogena per la comparsa di una cavità tra le cellule disposte al centro e quelle periferiche.

Stadio 35-36. Nella massa centrale di cellule sono ora riconoscibili le fibre della lente, mentre l'area periferica dell'abbozzo della lente si sta strutturando in un epitelio monostratificato che darà luogo all'epitelio della lente.

Stadio 37-41. Si è formato un tipico epitelio monostratificato addossato alle cellule che si stanno differenziando in fibre.

Stadio 45 ed oltre. L'epitelio della lente si è ulteriormente appiattito e si è ulteriormente accollato alla massa di fibre in differenziamento. Al centro di questa massa di fibre (nucleo primario della lente), le cellule hanno perso i loro nuclei. Si è delineata la zona di transizione subequatoriale, costituita da cellule che si allungano nelle fibre secondarie (Fig. 11).

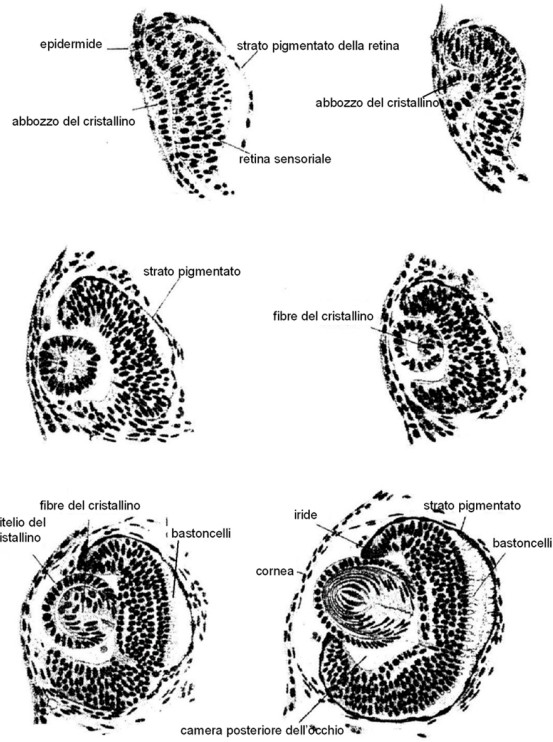


Fig. 11. Sezioni dell'occhio in sviluppo di *Xenopus laevis*. Inizialmente, si assiste alla formazione del placode lentogeno dallo strato interno dell'ectoderma. Le cellule del placode formano la vescicola del cristallino. In seguito, le cellule più interne della vescicola lentogena si allungano e formano le fibre. (da Spemann, 1938).

Processi induttivi durante lo sviluppo della lente

Il concetto di induzione fu inizialmente messo in evidenza da Spemann nel 1901. Usando un ago scaldato, distrusse la regione presuntiva della retina di un embrione allo stadio di piastra neurale, lasciando intatta l'area presuntiva della lente. Gli embrioni risultanti mancavano sia della retina che della lente, evidenziando che la retina era necessaria per la formazione della lente. Successivamente Lewis (1904) rimosse la vescicola ottica, appena dopo la sua formazione allo stadio di tubo neurale, e la trapiantò sotto l'ectoderma del fianco o del ventre. Egli osservò la formazione di una lente associata al tessuto retinico trapiantato e concluse che la vescicola ottica era sufficiente per l'induzione della lente.

La dipendenza dello sviluppo del cristallino dal calice ottico fu confermata in diversi esperimenti (Mangold, 1931). Uno di questi consiste nel togliere l'abbozzo dell'occhio prima che venga a contatto con l'epidermide: ciò impedisce lo sviluppo del cristallino. In un altro tipo di esperimenti si elimina l'ectoderma che normalmente darebbe origine al cristallino e lo si sostituisce con un pezzo di ectoderma preso in un'altra regione dell'embrione: dalla testa o anche dall'addome. Si può vedere che l'ectoderma, purchè venga a contatto con la vescicola ottica, dà origine al cristallino.

I rapporti tra lo sviluppo del calice ottico e lo sviluppo del cristallino vengono notevolmente complicati per il fatto che in alcuni Anfibi – *Rana esculenta*, *Xenopus laevis*, *Rhacophorus schlegelii*, e in altri in misura minore – (Spemann, 1912; Balinsky, 1951, Tahara, 1962) il cristallino mostra in una certa misura uno sviluppo indipendente (“autodifferenziazione”) anche in assenza del calice ottico, cioè quando quest'ultimo viene eliminato. Lo sviluppo del cristallino non è mai completamente normale, tuttavia, dimostra che il calice ottico non è la sola struttura implicata nel suo sviluppo. L'autodifferenziamento del cristallino è dovuto, quindi, alla presenza di segnali induttivi provenienti da altre regioni dell'embrione.

La provenienza di questi segnali può essere dedotta da alcuni esperimenti (Liedke, 1951, 1955) in cui l'ectoderma dell'addome, prelevato immediatamente prima dello stadio di gastrula, e trapiantato nella regione presuntiva della lente, non è in grado di dare origine al cristallino, mentre lo origina normalmente se prelevato allo stadio di neurula e trapiantato nella

stessa regione. Ne segue che la capacità dell'ectoderma di reagire ai segnali induttivi è dovuta alla posizione che esso occupa prima di entrare in contatto con la vescicola ottica. Durante questo periodo, il mesoderma della testa si trova immediatamente al di sotto dell'ectoderma presuntivo del cristallino, e Liedke concluse che il mesoderma della testa influenza e prepara l'ectoderma alla successiva induzione da parte della vescicola ottica.

Successivamente Jacobson (1958) dimostrò l'importanza anche dell'endoderma dorsolaterale nell'induzione dell'ectoderma presuntivo del cristallino; infatti, ottenne formazioni lentoidi, ponendo in coltura l'ectoderma presuntivo della lente, prelevato allo stadio di piastra neurale, con l'endoderma dorsolaterale e mise in evidenza che l'induzione poteva avere luogo allorchè i due tessuti entravano in contatto durante la gastrulazione e la neurulazione.

Questi lavori portarono a concludere che lo sviluppo del cristallino fosse il risultato di due processi induttivi, entrambi necessari per lo sviluppo completo del cristallino, uno da parte del mesoderma e dell'endoderma e l'altro della vescicola ottica.

Successivi esperimenti posero dei dubbi sulla generalità di tale modello di induzione della lente. Diversi ricercatori hanno evidenziato la difficoltà nel prelevare la vescicola ottica completamente priva di tessuto presuntivo della lente, in quanto tale tessuto vi aderisce fortemente (Spemann, 1908, 1912; Liedke, 1952; Jacobson, 1963; Rugh, 1962). Inoltre, Stone e Dinnean (1940) dimostrarono, in embrioni di *Ambystoma*, che le cellule presuntive della lente contaminanti possono completare il loro differenziamento. Così la presenza non rilevata di cellule della lente contaminanti in esperimenti volti a determinare la capacità induttiva della vescicola ottica potrebbe portare ad un'erronea interpretazione degli esperimenti di trapianto. Alla luce di questi elementi, Grainger et al. (1988) realizzarono, in *Xenopus*, degli esperimenti di trapianto, in cui i tessuti del donatore erano marcati con destrano fluorescinato. La vescicola ottica era prelevata dall'embrione donatore, prima della chiusura del tubo neurale, e impiantata sotto l'ectoderma del fianco o del ventre in un embrione tardivo. In nessun caso fu trovata una lente indotta; alcuni embrioni presentavano delle lenti formate, però, dall'ectoderma presuntivo della lente, restato sulla superficie della vescicole ottiche trapiantate. Tali risultati indicano che, in *Xenopus*, la vescicola ottica non è di per sé sufficiente a promuovere la formazione del cristallino da parte dell'ectoderma.

Grainger (1990, 1992) ha chiarito ulteriormente il ruolo della vescicola ottica e degli induttori precoci nel processo di formazione della lente, inoltre,

ha analizzato i cambiamenti, che hanno luogo durante lo sviluppo, nella capacità dei diversi tessuti ectodermici di rispondere agli induttori precoci e tardivi della lente. Nel 1992 giunse alla formulazione di un modello in base al quale l'induzione della lente avviene in tre fasi: competenza, tendenza, determinazione (Fig. 12).

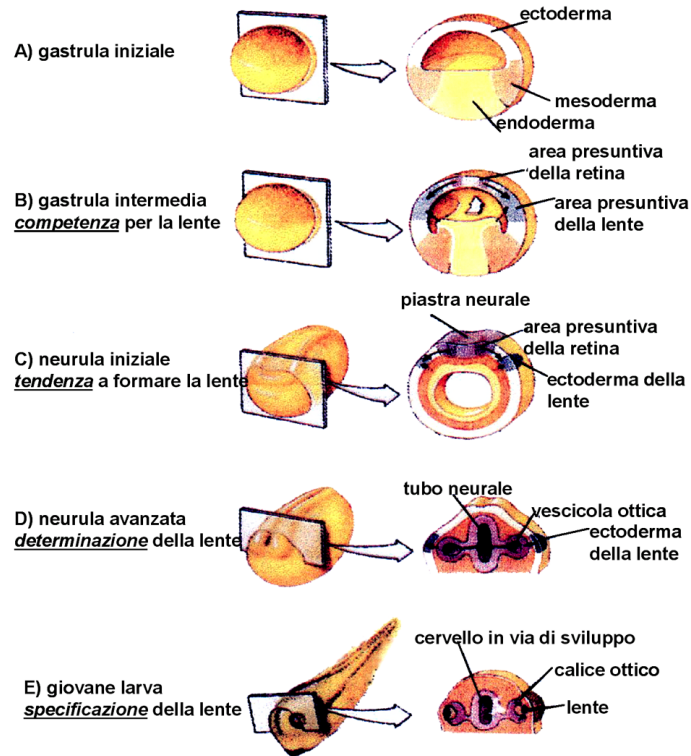


Fig. 12. Modello dell'induzione del cristallino in *Xenopus laevis*. Allo stadio iniziale di gastrula, l'ectoderma non ha ancora acquisito la competenza a divenire cristallino. Allo stadio di medio-gastrula, l'ectoderma destinato a formare la lente diviene competente a rispondere ai segnali induttivi provenienti dalla piastra neurale presuntiva (probabilmente dalle cellule della retina). Allo stadio di neurula iniziale, la piastra neurale, forse coadiuvata da segnali induttivi del mesoderma antero-laterale e dall'endoderma, ha indotto nell'ectoderma competente la capacità autonoma di formare un cristallino (*tendenza*). Nella neurula avanzata, la vescicola ottica viene in contatto con l'ectoderma che formerà la lente, dando il segnale (*determinazione*) che porterà al completo differenziamento e alla corretta localizzazione del cristallino (Grainger, 1992).

Con esperimenti di trapianto, Henry e Grainger (1987) dimostrarono che l'ectoderma della testa è competente a rispondere ad interazioni lente-induttive molto precocemente nello sviluppo, durante lo stadio di gastrula intermedia. Tali Autori rimossero ectoderma della calotta animale di gastrule a diversi stadi (precoci, intermedie, tardive) e quindi lo trapiantarono nella regione presuntiva del cristallino in embrioni allo stadio di piastra neurale. L'ectoderma di gastrula iniziale mostrava una competenza scarsa o nulla a formare cristallini (messi in evidenza con anticorpi anti-cristalline), ma l'ectoderma di stadi più avanzati era in grado di formare cristallini. Al termine della gastrulazione, invece, la capacità di rispondere al segnale della piastra neurale era persa. Essi, quindi, chiarirono che la competenza ha una precisa regolazione temporale, ma non presenta una regolazione spaziale: qualsiasi regione dell'ectoderma della calotta animale è competente; la competenza sarebbe controllata da un orologio interno, indipendente dalle interazioni tra tessuti.

Ulteriori ricerche hanno chiarito quali interazioni tissutali sono necessarie per l'induzione della lente. Come già detto sopra, i primi studi sui fenomeni induttivi suggerivano che i tessuti sottostanti l'area presuntiva della lente fossero importanti nell'induzione del cristallino, durante la gastrulazione e la neurulazione precoce. Henry e Grainger (1990) su embrioni di *Xenopus*, dimostrarono, invece, che questi tessuti non potevano attivare una risposta di formazione della lente, ma che un forte segnale di induzione della lente proveniva dalla piastra neurale presuntiva (probabilmente dalle cellule presuntive della retina). Tali Autori coltivarono l'ectoderma presuntivo del cristallino sia con l'endoderma che con il mesoderma laterale e saggiarono l'eventuale presenza di lenti con anticorpi anti-cristalline. In nessun caso osservarono la formazione di un cristallino e ciò li portò a ridimensionare il ruolo di tali tessuti nell'induzione della lente.

Esperimenti condotti da Niuewkoop (1952) avevano suggerito che un segnale proveniente dalla piastra neurale poteva viaggiare attraverso l'ectoderma. Per verificare se la piastra neurale potesse giocare un ruolo nelle fasi precoci della determinazione della lente, Grainger ed Henry (1990) realizzarono un'altra serie d'esperimenti, in cui combinarono la regione della piastra neurale anteriore di un embrione allo stadio di gastrula avanzata con ectoderma della regione presuntiva del cristallino. Mentre l'ectoderma isolato dalla regione che potenzialmente avrebbe formato il cristallino non sintetizzava le proteine del cristallino se veniva posto in coltura da solo, la stessa regione sintetizzava le proteine del cristallino se coltivata con i tessuti

della piastra neurale anteriore. Gli Autori ottenevano cristallini spesso rudimentali, ma tali formazioni erano sempre positive all'anticorpo anti-cristalline. È dunque la porzione anteriore della piastra neurale a fornire un segnale che induce il tessuto dell'ectoderma a diventare cristallino.

Sembra, quindi, come precedentemente detto, che l'ectoderma acquisisca la competenza a rispondere ai segnali di induzione provenienti dalla piastra neurale anteriore allo stadio di gastrula intermedia, e che durante lo stadio di gastrula avanzata la piastra neurale anteriore induca una tendenza a formare un cristallino attraverso un'induzione di tipo planare. I due foglietti interni, endoderma e mesoderma, potrebbero avere un ruolo nell'amplificazione di tale segnale, infatti mentre da soli non sono in grado di indurre lo sviluppo di cristallini, se coltivati in presenza della piastra neurale anteriore consentono la formazione di lenti ben strutturate.

Anche se in *Xenopus* la vescicola ottica non ha un ruolo importante nell'induzione iniziale della formazione del cristallino, ha comunque un ruolo nell'espressione del fenotipo completo del cristallino. I cristallini che si formano in assenza della vescicola ottica sono generalmente molto rudimentali (Balinsky 1951,1957); la vescicola ottica potrebbe avere, quindi, un potente effetto sul differenziamento delle cellule della lente. È stata proposta l'ipotesi (Henry and Grainger, 1987) che le cellule della cresta neurale craniale impediscano il differenziamento del cristallino e che il contatto con la vescicola ottica "protegga" il placode del cristallino da questi segnali inibitori. Inoltre, sembra che la vescicola ottica possa giocare, *in vivo*, un ruolo nello stabilire la precisa localizzazione della lente a livello dell'ectoderma della testa (Grainger, 1992). In più ci sono delle evidenze che provano che il tessuto retinico contenga fattori in grado di promuovere la crescita e il differenziamento delle cellule del cristallino (Arruti and Courtois, 1978; Campbell and Mc Avoy, 1984; Mc Avoy and Fernan 1984). Beebe et al. (1987) hanno identificato una sostanza, chiamata lentotropina, nell'umor vitreo; tale sostanza è in grado di promuovere e dirigere il differenziamento delle cellule della lente. La sua esatta origine è, però, ancora sconosciuta.

Aspetti molecolari dell'induzione della lente

I fenomeni induttivi, che portano alla formazione della lente, sono accompagnati dall'espressione e dall'interazione di diversi fattori di trascrizione. Tra questi, i più studiati sono: *otx2*, *pax6* e *sox3*. I geni che codificano per questi fattori sono espressi nel corso dello sviluppo, durante il

periodo di tendenza e determinazione della lente, nella piastra neurale, nel placode lentogeno e nella parte esterna delle pieghe neurali. Ognuno di questi geni è espresso ad alti livelli nell'ectoderma presuntivo del cristallino, prima che abbia inizio il differenziamento e l'espressione dei geni delle cristalline. I geni *otx2* e *pax6* sono espressi durante la fase di tendenza dell'ectoderma presuntivo della lente, mentre *sox3* è espresso durante quella di specificazione del cristallino. Dunque, l'espressione di *otx2* e di *pax6* è attivata in risposta a segnali della piastra neurale, la quale è stata indicata come primo induttore della lente, mentre *sox3*, venendo espresso dopo la chiusura del tubo neurale, richiede un segnale tardivo dalla vescicola ottica (Zigar et al., 1998).

pax6 è un fattore di trascrizione necessario per il normale sviluppo dell'occhio, naso, pancreas, e cervello (Walther et al., 1991; Schmal et al., 1993; St-Onge et al., 1997). Durante lo sviluppo dell'occhio nel topo, *pax6* mostra un ampio pattern di espressione sulla superficie dell'ectoderma della testa; tale pattern progressivamente diviene ristretto all'area presuntiva della lente e della cornea (Walther et al., 1991). Nell'ectoderma della testa l'espressione di *pax6* inizia prima della formazione del placode della lente. L'espressione è mantenuta nella lente in differenziamento e persiste nella lente e nell'epitelio corneale dell'adulto. L'espressione di *pax6* nella piastra neurale anteriore include la faveola ottica dalla quale si evaginerà la vescicola ottica. Nella vescicola ottica, la presenza di *pax6* è confinata distalmente ed è assente nel peduncolo ottico e nell'epitelio pigmentato della retina. Quando inizia il differenziamento delle cellule nervose, *pax6* scompare dalla maggior parte di tali cellule restando solo nelle cellule gangliari e in quelle amacrine (Macdonald e Wilson, 1997). *pax6* è presente anche nelle cellule delle fibre primarie e più tardi in quelle secondarie dell'abbozzo lentogeno (Walther et al., 1991).

In *Xenopus laevis*, la prima espressione rilevabile di *pax6*, mediante ibridazione *in situ*, è visibile appena dopo il completamento della gastrulazione (stadio 12-13 secondo Nieuwkoop and Faber) a livello di due strisce laterali che decorrono lungo l'embrione dalla parte anteriore a quella posteriore. Il pattern di reazione con la sonda antisense diviene significativamente più intenso, soprattutto anteriormente, quando l'embrione raggiunge lo stadio 14, infatti, il segnale d'espressione di *pax6* si localizza a livello del bordo anteriore della placca neurale; le cellule di questa regione formeranno il futuro telencefalo, inclusi i bulbi olfattori, e parte del diencefalo, mentre quelle delle strisce laterali daranno luogo a parte del mielencefalo. Le regioni del cervello che discendono dalle cellule della

placca neurale positive per *pax6* continueranno ad esprimerlo durante il proseguimento dello sviluppo (Hirsch and Harris, 1997).

Le cellule delle parte anteriore della piastra neurale oltre a formare i tessuti cerebrali come sopra descritto, daranno luogo anche alla retina neurale e all'epitelio pigmentato della retina. Durante lo sviluppo dell'occhio (stadio 20-28), dopo la completa chiusura del tubo neurale, le cellule della parete antero-ventrale del tubo neurale evaginano dando luogo alla vescicola ottica. In seguito, tale vescicola, invaginandosi, formerà i due strati della coppa ottica. Durante questi processi *pax6* è espresso continuamente fino a completamento dello sviluppo dell'occhio, quando, la sua espressione rimane localizzata a livello degli strati del ganglio retinico e cerebrale della retina, mentre i fotorecettori diventano negativi per *pax6*. Durante tutte le fasi di sviluppo dell'occhio, *pax6* è espresso anche nel cristallino: in ibridazione *in situ*, il suo trascritto è rivelato nel placode lentogeno e, successivamente, nell'abbozzo della lente. In concomitanza con l'aumento della positività per l'mRNA di *pax6*, nell'abbozzo della lente, compaiono le cristalline (Henry and Grainger, 1990), suggerendo che *pax6* possa svolgere un ruolo determinante nelle fasi finali dell'induzione della lente. L'espressione di *pax6* scompare nella lente dell'adulto (Hirsch and Harris, 1997), mentre per quanto riguarda l'epitelio corneale adulto la permanenza dell'espressione di *pax6* è controversa: infatti, sebbene la maggior parte degli Autori non rilevi una positività in ibridazione *in situ*, alcuni (Del Rio-Tsonis et al., 1995) ritengono che tale espressione permanga almeno negli stadi larvali iniziali (fino allo stadio 55).

Come già descritto in precedenza, lo sviluppo dell'occhio è estremamente sensibile ai livelli di *pax6*. Una riduzione dei livelli di *pax6* negli eterozigoti aventi l'allele nullo di *pax6* determina della anomalie oculari, tra cui l'Aniridia umana (Glaser et al., 1995) e Small eye nel topo e nel ratto (Hogan et al., 1986; Hill et al., 1991; Matsuo et al., 1993) (Fig.13).

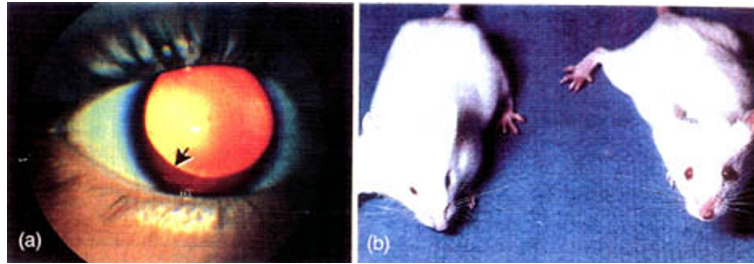


Fig. 13. a) Aniridia nell'uomo, l'iride è molto ridotta, la pupilla sembra illuminata a causa dalla luce riflessa dalla retina. b) *Small Eye allele (Sey)* nel topo, a destra un topo *wt*, a sinistra un topo *Sey*.

È interessante notare che, la sovraespressione di *pax6* nel topo produce microftalmia e perdita di fotorecettori, dimostrando, così, un ruolo di *pax6* nella specificazione della retina (Schedl et al., 1996). Comunque, in topi omozigoti per l'allele nullo di *pax6* non si sviluppano strutture oculari. In assenza di *pax6*, la vescicola ottica si evagina dal cervello, ma il contatto con l'ectoderma della testa non viene mantenuto, la retina neurale e l'epitelio pigmentato non si differenziano, e infine, la vescicola ottica degenera. Le strutture dell'occhio derivate dall'ectoderma della testa sono completamente assenti, poiché l'induzione della lente non avviene nei mutanti (Grindley et al., 1995).

Come già descritto in precedenza, il corrente modello per l'induzione della lente nei Vertebrati suggerisce che l'ectoderma presuntivo della lente sia determinato attraverso una serie sequenziale di tappe (Grainger, 1992), caratterizzate da cambiamenti nell'espressione genica. Nei Vertebrati *ptx2* (Zygar et al., 1998), BMP4 (Furuta and Hogan, 1998) e *pax6* sono coinvolti nel mantenimento della capacità dell'ectoderma di rispondere ai segnali induttivi provenienti dalla vescicola ottica. Diverse evidenze confermano l'importanza di *pax6* in questo processo: la precoce espressione di *pax6* nell'ectoderma coincide con lo stadio di competenza della lente; esperimenti di ricombinazione tra tessuti hanno dimostrato che l'ectoderma *pax6*^{-/-}, più che la vescicola ottica *pax6*^{-/-}, è responsabile dei difetti della lente nei topi *pax6*^{-/-} (Fujiwara et al., 1994); marcatori della specificazione della lente, quali *sox2* e le proteine Frissled-correlate, non sono espressi nell'ectoderma di embrioni *pax6*^{-/-} (Furuta and Hogan, 1998; Wawersik et al., 1999);

l'analisi di *pax6* chimerici ha dimostrato che *pax6* è richiesto prima della formazione del placode lentogeno (Collinson et al., 2000).

Uno studio condotto da Ashery-Padan et al. in topo (2000) ha determinato il ruolo di *pax6* nell'ectoderma presuntivo della lente, dopo che questo aveva subito l'induzione della lente. I Ricercatori hanno dimostrato che *pax6* in tale ectoderma è necessario per la formazione del placode lentogeno, ed hanno identificato, sempre nell'ectoderma, un possibile bersaglio di *pax6*: *sox2*.

Avvalendosi dell'uso di mutanti somatici deleti (mutanti-Le), definiti sia spazialmente che temporalmente, Ashery-Padan e collaboratori hanno messo in evidenza che l'espressione di *pax6* è necessaria per la transizione dallo stadio di specificazione della lente a quello di formazione del placode lentogeno.

L'attivazione di *sox2* è una delle prime risposte dell'ectoderma specificato ai segnali induttivi provenienti dalla vescicola ottica; l'espressione di *sox2* precede la formazione del placode della lente ed è dipendente da segnali derivanti dalla vescicola ottica (Furuta and Hogan, 1998; Kamachi et al., 1998; Zygar et al., 1998). Comunque, in embrioni mutanti per *pax6*, *sox2* non è attivato. Nei mutanti-Le, che esprimono *pax6* solo molto precocemente, questa espressione è sufficiente per attivare *sox2*, che si mantiene costante anche negli stadi successivi. Questi risultati dimostrano che l'attivazione di *sox2* dipende da *pax6*, mentre non è richiesta l'attività di *pax6* per mantenere l'espressione di *sox2*. Non è stato ancora determinato, se l'iniziale attivazione di *sox2* dipenda da *pax6* presente nell'ectoderma rispondente o da *pax6* della vescicola ottica inducente.

Nel topo lo stadio di preplacode precede la comparsa del placode lentogeno. Durante questo stadio, un "feedback" positivo mantiene l'espressione di *pax6* e di altri geni dell'ectoderma (Grindley et al., 1995; Wawersik et al., 1999). Durante lo stadio di placode lentogeno è stata registrata l'espressione di *six3* (omologo al gene di *Drosophila sine-oculis*) e di *prox1* (omologo al gene di *Drosophila prospero*). Ashery-Padan et al. hanno dimostrato che l'espressione di *pax6* è essenziale nel preplacode per la formazione del placode lentogeno. I mutanti-Le non formano un placode, inoltre è assente l'espressione di *six3* e *prox1* nell'ectoderma specificato e, dunque, la loro espressione è dipendente da *pax6*. Il ruolo di *six3* è attualmente sconosciuto; comunque i membri della famiglia dei geni *six* sono, di norma, coinvolti nella proliferazione cellulare (Ford et al., 1998). È possibile che *six3* nel preplacode sia coinvolto nel processo di regolazione

dell'espressione di *pax6*, infatti nel promotore di *pax6* è stato identificato un sito di legame per *six3* (Goudreau et al., 2002).

Recentemente, è stato provato che *prox1* gioca un importante ruolo nell'allungamento delle fibre della lente (Wigle et al., 1999), mentre *pax6* è coinvolto nella regolazione dell'espressione delle cristalline (Cvekl and Piatgorsky, 1996). Così, probabilmente entrambi sono essenziali durante la fasi tardive dello sviluppo del cristallino.

Da quanto detto emerge chiaramente che *pax6* svolge un ruolo chiave nello sviluppo della lente. La formazione del placode lentogeno è preceduta da tre tappe: competenza della lente, determinazione della lente, stadio di preplacode. La competenza dell'ectoderma a rispondere ai segnali provenienti dalla vescicola ottica è mediata da *pax6*. Successivamente durante l'induzione della lente compiuta dalla vescicola ottica *pax6* determina l'attivazione di *sox2*. Il passaggio dallo stadio di preplacode a quello di placode lentogeno richiede l'espressione dei geni *six3* e *prox1*, anche questa promossa da *pax6*. L'espressione di *pax6* nell'ectoderma è mantenuta da un "feedback" positivo probabilmente mediato da *six3*. Tali geni regolatori promuovono la formazione del placode e successivamente il differenziamento in lente.

***pax6* e la regolazione dei geni delle cristalline**

Molte sequenze che regolano l'espressione dei geni delle cristalline sono state identificate grazie a trasfezioni transienti ed a topi transgenici (Cvekl and Piatgorsky, 1996). Questi esperimenti hanno stabilito che il controllo trascrizionale ha un ruolo fondamentale nell'abbondante e specifica espressione dei geni delle cristalline nella lente. In generale, le sequenze promotori lente-specifiche contengono almeno una TATA-box che si trova vicino al sito d'inizio della trascrizione. Ulteriori regioni regolatorie richieste per il pattern d'espressione temporale e spaziale dei geni della lente sono frequentemente posizionate vicino e a monte del promotore lente-specifico. Tuttavia, nel caso delle δ -cristalline di pollo, la loro alta espressione nel cristallino è regolata da un enhancer nel terzo introne. Dato che i siti di legame con i fattori di trascrizione sono spesso strettamente raggruppati o fisicamente sovrapposti, è possibile che regioni regolatorie omologhe leghino differenti fattori di trascrizione in tempi diversi nello sviluppo e in differenti regioni della lente. È noto che i geni delle cristalline αA e $\delta 1$ di pollo, αA e αB di topo (Gopal-Srivastava, et al., 1995), usino *pax6* per la

loro attivazione. L'evidenza che *pax6* è richiesto per l'espressione di αA , αB e $\delta 1$ -cristalline nella lente di topo e pollo è basata sulla combinazione di studi su siti leganti il DNA, identificazione immunologica di proteine aggreganti il DNA che provocano gel-shift e mutagenesi sito-specifica del sito di legame di *pax6*. È stato rilevato che il dominio *paired* di *pax6* può interagire con altre possibili sequenze regolatrici dei geni delle cristalline. Questi siti sono localizzati nella regione fiancheggiante il 5', eccetto per la $\delta 1$ -cristallina, che ha il sito di riconoscimento nel terzo introne dell'enhancer. La localizzazione del sito di riconoscimento di *pax6* nella regione regolatrice di αA e αB di topo, αA e $\delta 1$ di pollo, concorda con l'ipotesi che *pax6* abbia un ruolo fondamentale nell'espressione dei geni del cristallino. Recentemente è stato indicato che *pax6* reprime l'attività dei promotori dei geni $\beta B 1$ e $\beta A 3/A 1$ delle cristalline di pollo; è possibile, per questo, che *pax6* sia un repressore dei geni delle β -cristalline. Tale ipotesi è confermata dall'osservazione che un'alta quantità di mRNA di *pax6* si accompagna con una bassa espressione dei geni delle β -cristalline nello sviluppo della lente. *pax6* non è il solo fattore di trascrizione a legare i diversi geni delle cristalline, infatti altre proteine funzionali intervengono nella loro regolazione, ad esempio sembra che le proteine Sox attivino il gene della $\delta 1$ -cristallina nel pollo e quelli delle γF nel topo (Kamachi et al., 1995). Le proteine Sox sono correlate ad altri fattori di trascrizione come la proteina determinante il sesso: SRY, e formano complessi di legame con il DNA provocando gel-shift; infatti Sox2, probabilmente, forma il complesso $\delta EF 2a$ quando attiva l'enhancer della $\delta 1$ -cristallina, ed è espresso nel placode lentogeno sia nell'epitelio che nelle fibre del cristallino dell'embrione di pollo (Kamachi et al., 1995). Oltre a Sox, ci sono altre molecole che entrano in gioco nel controllo dei geni delle cristalline, per esempio i recettori dell'acido retinoico (RARs), l'oncogene *maf* della famiglia delle proteine con domini a cerniera di leucina ed HSF1/2, fattori di trascrizione delle proteine "heat-shock" (Wistow and Piatigorsky, 1988; Goring et al., 1993; Sax et al., 1994).

Il Transdifferenziamento lentogeno

Di regola, durante lo sviluppo dei Vertebrati, una popolazione cellulare una volta che è stata determinata non ha altre opzioni per il differenziamento e procede lungo un determinato sentiero differenziativo che la porterà a divenire uno specifico tipo cellulare, grazie all'acquisizione di una sempre più spinta specializzazione biochimica e strutturale.

In rari casi, tuttavia, può avvenire che una popolazione cellulare, che sta percorrendo un determinato sentiero differenziativo, o che addirittura lo ha percorso fino in fondo, ed è uscita dal ciclo cellulare, subisca, dopo aver perso le caratteristiche specifiche acquisite (sdifferenziamento), una riprogrammazione del differenziamento, divenendo un tipo cellulare completamente diverso da quello originario. Questa riprogrammazione del differenziamento è detta transdifferenziamento ed è tanto più difficile che si verifichi quanto più avanzato è il grado di differenziamento originariamente raggiunto dalla popolazione cellulare. L'analisi causale del transdifferenziamento può essere molto utile per capire i meccanismi fondamentali del differenziamento e della sua stabilità. Tra i Vertebrati, casi ben documentati di questo fenomeno riguardano il transdifferenziamento lentogeno delle cellule epiteliali dell'iride dorsale di tritone (Yamada, 1977), delle cellule dell'epitelio pigmentato della retina di embrioni di pollo (Eguchi and Okada, 1973) e di feti umani (Yasuda et al., 1978), delle cellule della retina neurale o del tappeto nero di embrioni di pollo (Itoh et al., 1975; Pritchard et al., 1978; Okada et al., 1979a) e delle cellule della cornea esterna delle larve di *Xenopus laevis* (Freeman, 1963). E' stato inoltre osservato il transdifferenziamento retinogeno dell'epitelio pigmentato dell'iride e della retina in Anfibi anuri ed urodeli e in embrioni di pollo (Moscona, 1957; Lopashov and Sologub, 1972; Keefe, 1973 a, b, c, d; Eguchi, 1979; Cioni et al., 1986), come pure il transdifferenziamento della retina neurale di embrioni di pollo in epitelio pigmentato (Itoh et al., 1975; Pritchard et al., 1978; Okada et al., 1979b). Uno dei casi meglio conosciuti di transdifferenziamento è quello che si osserva nel processo di rigenerazione del cristallino dal margine irideo degli Anfibi urodeli adulti appartenenti alla famiglia Salamandridae. A partire dagli studi pionieristici di Colucci (1891) e Wolff (1895) (malgrado la priorità della scoperta spetti a Colucci; la rigenerazione della lente dal margine irideo è indicata anche come rigenerazione Wolffiana), questo processo è stato oggetto di numerosissimi lavori ed ancor oggi è un campo di ricerca molto fertile.

In *Xenopus laevis*, il transdifferenziamento della cornea in lente (rigenerazione della lente) è un percorso alternativo al normale sviluppo della lente (Fig. 14).

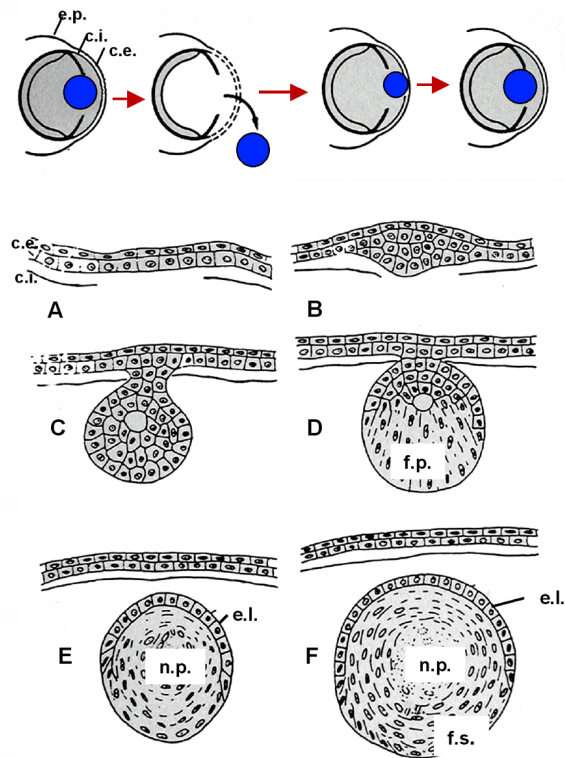


Fig. 14. Rigenerazione del cristallino da parte della cornea esterna, in larve di *Xenopus laevis*.

In alto, schema riassuntivo. A. Dopo 36 ore dalla lenticomia. Le cellule dello strato profondo della cornea esterna divengono, da squamose, cuboidali. B. Dopo 2 giorni dalla lenticomia. Le cellule dello strato interno della cornea esterna iniziano a formare un aggregato sferoidale. C. Dopo 4-5 giorni dalla lenticomia. L'aggregato cellulare diviene una vescicola lentogena pedunculata. D. Dopo 6-8 giorni dalla lenticomia. Le cellule della parete interna (posteriore) della vescicola lentogena si allungano nelle fibre primarie del cristallino; le cellule della parete esterna della vescicola daranno origine all'epitelio del cristallino. E. Dopo 10 giorni dalla lenticomia. Nella lente rigenerante, ormai distaccata dalla cornea esterna, si è costituito il nucleo primario delle fibre della lente e si stanno differenziando le fibre secondarie. F. Dopo 15 giorni dalla lenticomia. La lente neoformata, completamente differenziata, ha raggiunto un volume considerevole. c.e., cornea esterna; c.i., cornea interna; e.l., epitelio della lente; e.p., epidermide corneale; f.p., fibre primarie; f.s., fibre secondarie; n.p., nucleo primario (da Filoni, 1981).

Questo processo differisce dalla rigenerazione del cristallino negli urodela descritti da Wolff in cui la nuova lente si sviluppa dal margine dorsale dell'iride (Yamada, 1967; Eguchi, 1988). Nelle larve premetamorfiche di *X. laevis*, quando il cristallino è rimosso dalla sua sede, la nuova lente si forma dallo strato profondo della cornea esterna: le cellule dello strato profondo della cornea divengono cuboidali, e, intorno al secondo giorno postoperatorio, formano, in corrispondenza del foro pupillare, un aggregato cellulare sferoidale; nei giorni successivi, grazie alla proliferazione delle sue cellule, tale aggregato cresce rapidamente e, in seguito alla morte di alcune cellule poste nella parte centrale, si trasforma in una vescicola lentogena. Le cellule situate nella parte posteriore della vescicola lentogena cessano di dividersi (Waggoner and Reyer, 1975), divengono ricche di ribosomi liberi (Overton, 1965), sintetizzano proteine specifiche della lente (Brahma and McDevitt, 1972) e cominciano ad allungarsi formando le fibre primarie del cristallino, mentre le cellule situate nella parte anteriore della vescicola, divengono cuboidali, seguitano a moltiplicarsi e costituiscono l'epitelio della lente (Freeman, 1963; Waggoner, 1973). Si pensa che questo processo sia promosso da fattori presenti nell'occhio (Freeman, 1963) molto probabilmente prodotti dalla retina (Filoni et al., 1978; 1981; 1982). Normalmente questi fattori non raggiungono la cornea esterna per la presenza della cornea interna, che deriva dalle creste neurali (Bosco et al., 1980; Cioni et al., 1982). Esistono diverse correlazioni tra il transdifferenziamento cornea-lente e la formazione della lente embrionale. Morfologicamente il differenziamento della lente sembra essere identico in entrambi i processi (Freeman, 1963). La regione dell'ectoderma embrionale della testa dalla quale si sviluppa il cristallino è la stessa dalla quale si sviluppa la cornea esterna. Il transdifferenziamento richiede l'interazione con la retina neurale, che sembra essere simile a quella tra l'ectoderma presuntivo della lente e la vescicola ottica durante la fase tardiva dell'induzione embrionale della lente (Bosco et al., 1979; 1986; Filoni et al., 1982). Inoltre il globo oculare larvale fornisce un ambiente capace di indurre il differenziamento lentogeno quando l'ectoderma embrionale è impiantato all'interno di esso, il che indica che sono coinvolte in entrambi i processi molecole segnale simili o correlate (Henry and Mittleman, 1995).

Le somiglianze, fra il processo di sviluppo della lente e quello di transdifferenziamento lentogeno della cornea nella larva, messe in evidenza sopra, non autorizzano a concludere che tali processi utilizzino un identico percorso genetico/molecolare per ottenere lo stesso risultato finale, ovvero la

formazione di una lente morfologicamente ben organizzata ed inserita nel foro pupillare. Infatti, all'ipotesi che l'intera sequenza spazio-temporale dei geni che si attivano durante lo sviluppo della lente sia ripetuta durante il transdifferenziamento lentogeno, se ne possono affiancare varie altre: la sequenza spazio-temporale dei geni riattivati durante il transdifferenziamento lentogeno potrebbe essere diversa da quella osservata durante lo sviluppo della lente; qualche gene espresso durante l'induzione della lente embrionale potrebbe non esser riespresso durante il differenziamento. Per esempio, potrebbero esser attivati soltanto quei geni che sono espressi durante le fasi tardive dell'induzione embrionale della lente. Infatti, la cornea esterna deriva dalla stessa regione dell'ectoderma da cui si è originata la lente e che è stata esposta ad interazioni induttive precoci; poiché la cornea non completa il suo differenziamento durante le fasi larvali, qualche gene coinvolto nella determinazione della lente potrebbe continuare ad esser espresso nella cornea dopo che si è formata la lente; i geni attivati durante il transdifferenziamento lentogeno potrebbero essere diversi da quelli attivati durante l'induzione embrionale della lente.

Nel 1999 Schaefer et al. hanno realizzato esperimenti di ibridazione *in situ* per determinare, durante il transdifferenziamento lentogeno, il pattern di espressione spazio-temporale di alcuni geni (*pax6*, *otx2*, *sox3*, *prox1* e γ -*cry*), espressi durante lo sviluppo embrionale della lente. Essi hanno dimostrato che tali geni si esprimono anche durante il processo di transdifferenziamento, sebbene in alcuni casi non sia mantenuta l'esatta sequenza temporale di espressione. Quindi, si può ipotizzare che il transdifferenziamento e la rigenerazione richiedano l'attivazione di quei geni che sono cruciali per lo sviluppo embrionale della lente.

Un lavoro di Mizuno et al. (1999) riguardante l'espressione dei *pax6* e di *prox1* durante la rigenerazione della lente, in *Cynops* (ad opera dell'iride) e in *Xenopus* (dalla cornea), sembra confermare tale ipotesi. Nelle due specie lo schema generale di espressione di questi due geni, durante il normale sviluppo della lente, appare simile: a partire dagli stadi embrionali precoci, *pax6* è espresso in un'area dell'ectoderma più ampia rispetto a quella che poi darà vita alla lente, mentre l'espressione di *prox1* inizia successivamente e avviene in un'area più ristretta, coincidente con quella che darà vita alla lente. Durante la rigenerazione lentogena sia ad opera dell'iride del *Cynops* che della cornea dello *Xenopus*, l'espressione di *pax6*, nei tessuti che rigenereranno la lente, inizia subito dopo la lenticomia. Mentre in *Xenopus*, tale espressione è rilevata dopo 24 h dalla lenticomia, nell'iride del *Cynops* *pax6* appare più tardi (dopo 2/5 gg. dalla lenticomia), in accordo con la

maggior complessità del processo di sdifferenziamento cui vanno incontro le cellule dell'iride del tritone rispetto a quelle della cornea esterna dello *Xenopus*. In entrambe le specie, durante la rigenerazione della lente, l'espressione di *prox1* è successiva a quella di *pax6* e ristretta precisamente alla regione che darà vita alla nuova lente. Quindi, l'espressione spaziotemporale di questi due geni, durante il transdifferenziamento, ricalca sostanzialmente quella che ha luogo durante lo sviluppo embrionale della lente, indicando la presenza di un comune programma genetico per la formazione della lente. Tuttavia, osservazioni sull'espressione dei geni che codificano per le cristalline indicano che la rigenerazione della lente non è una semplice ripetizione del suo sviluppo (Mizuno et al., 1999). Infatti, durante lo sviluppo embrionale i segnali di tre geni codificanti per tre cristalline diverse (α -A, β -B e γ) vengono rilevati simultaneamente allo stadio di placode lentogeno, mediante ibridazioni *in situ*. Invece, durante la rigenerazione, l'espressione di tali geni appare asincrona: quella di α -A e di β -B precede il differenziamento della fibre della lente, mentre il segnale del gene della γ -cristallina è rilevato solo dopo il differenziamento delle fibre.

Rigenerazione del cristallino in *Xenopus laevis*

Tra gli Anfibi anuri, la rigenerazione del cristallino, dopo la lentesomia attraverso il foro pupillare, è stata osservata con certezza nella sola specie *Xenopus laevis*. Questa capacità tuttavia è posseduta solo dalle larve, e si riduce durante la vita larvale fino ad annullarsi alla metamorfosi.

Mediante tecniche autoradiografiche, Freeman (1963) ha dimostrato che il territorio lentogeno competente è rappresentato dalla cornea esterna. Infatti un frammento di cornea esterna, marcato con timidina tritiata e successivamente impiantato nell'occhio lentesomizzato di una larva ospite, dava origine ad una vescicola lentogena marcata.

Nelle larve degli Anfibi anuri, la cornea è costituita da due strati: la cornea esterna epiteliale, che è continua con l'epidermide, e la cornea interna connettivale, che è continua con la sclerotica. A stadi precoci di sviluppo, le due cornee sono fuse tra loro in una zona molto limitata, prospiciente il foro pupillare. Col procedere dello sviluppo, la zona di accollamento si estende sempre di più finché, alla metamorfosi, l'accollamento fra cornea esterna ed interna risulta completo. La cornea esterna dà origine all'epitelio corneale pluristratificato, mentre la cornea interna forma la *substantia propria*.

Freeman (1963) ha descritto dettagliatamente le varie fasi del processo della rigenerazione del cristallino dalla cornea esterna in larve di *Xenopus laevis* allo stadio 50, che sono riportate in Fig.14.

Lo stadio 1 è caratterizzato dalle modificazioni di forma, da squamosa a cuboidale, delle cellule della cornea esterna.

Due o tre giorni dopo la lentectomia queste cellule, in seguito a proliferazione, tendono a costituire un aggregato di forma sferoidale in corrispondenza del foro pupillare (stadio 2).

Durante lo stadio 3 (4-5 giorni dopo la lentectomia), un certo numero di cellule poste nella parte centrale dell'aggregato va incontro a morte cellulare e così l'aggregato si trasforma in una vescicola pedunculata.

Tra il 6° e l'8° giorno, le cellule della parete posteriore smettono di dividersi, sintetizzano proteine specifiche della lente e si allungano trasformandosi in fibre primarie del cristallino. Le cellule della parte anteriore (esterna) della vescicola divengono cuboidali, non escono dal ciclo cellulare, e danno origine all'epitelio della lente. Contemporaneamente, la vescicola tende a separarsi dalla cornea esterna (stadio 4).

A 10 giorni dall'operazione, si è ormai costituito il nucleo primario della lente ed è già in atto il differenziamento delle fibre secondarie a spese delle cellule dell'epitelio della lente situate in corrispondenza della zona equatoriale (stadio 5). Nei giorni successivi, il cristallino si accresce per la continua apposizione di nuove fibre secondarie.

Si deve sempre a Freeman (1963) la scoperta che anche l'epidermide circostante la cornea esterna ha notevoli potenzialità lentogene: se assieme al cristallino si asporta anche la cornea, una nuova lente può rigenerare dall'epidermide pericorneale.

Studi successivi hanno poi permesso di approfondire alcuni aspetti morfologici e biochimici del processo rigenerativo.

Overton (1965), mediante uno studio al microscopio elettronico, ha descritto le modificazioni che si verificano nelle cellule dello strato profondo della cornea esterna durante le prime fasi del processo rigenerativo. L'Autrice ha osservato un aumento del reticolo endoplasmatico granulare, un incremento nel numero dei ribosomi liberi ed un aumento volumetrico dei mitocondri.

Successivamente, Waggoner e Reyer (1975) hanno studiato l'andamento della sintesi di DNA nella cornea esterna di larve di *Xenopus laevis* durante il processo rigenerativo del cristallino. Essi hanno constatato un aumento nell'incorporazione di timidina tritiata nelle cellule della vescicola lentogena a partire dallo stadio 2 di Freeman. Allo stadio 4, l'incorporazione del

marcante non si osserva più nelle cellule che si trasformano in fibre ed è presente solo nelle cellule dell'epitelio della lente.

Nell'indagare sul possibile ruolo esercitato dagli altri componenti oculari nel processo rigenerativo del cristallino dalla cornea esterna, Freeman (1963) ha sottolineato l'importanza della presenza del bulbo oculare nel processo di rigenerazione del cristallino. Infatti, l'enucleazione, susseguente la lentesomia, comporta la mancanza di trasformazione lentogena da parte dei tessuti competenti (cornea ed epidermide pericorneale).

Filoni et al. (1978), Bosco et al. (1979), dopo aver asportato il cristallino dalla parte dorsale dell'occhio (conservando così l'integrità della cornea interna) hanno osservato che la cornea esterna non subiva alcuna trasformazione lentogena, sebbene fossero soddisfatte le due condizioni (assenza del cristallino e adeguato apporto nutrizionale), sufficienti, secondo alcuni Autori (Campbell and Jones, 1968), ad assicurare il transdifferenziamento lentogeno della cornea. La nuova lente si formava, invece, dall'epidermide pericorneale antistante la ferita praticata nella parete oculare e quindi a diretto contatto con la camera vitrea. La cornea esterna subiva trasformazioni lentogene solo quando veniva lesa anche la cornea interna.

Questi esperimenti indicano che la trasformazione lentogena della cornea esterna, in un occhio lentesomizzato, avviene in seguito all'azione di uno o più fattori induttori presenti nella camera vitrea. Tale(i) fattore(i) non può essere considerato un fattore nutrizionale aspecifico, poiché, in questo caso, esso diffonderebbe normalmente attraverso la barriera meccanica rappresentata dalla cornea interna.

Filoni et al. (1978) hanno dimostrato che il globo oculare è importante non solo per innescare il processo rigenerativo del cristallino, come già aveva osservato Freeman (1963), ma anche per consentire il completo sviluppo e differenziamento della vescicola lentogena. L'esperimento condotto da questi Autori consentiva nell'asportazione del globo oculare di larve di *Xenopus laevis* lentesomizzate da 1 a 5 giorni. L'assenza dell'occhio determinava dapprima l'arresto del processo rigenerativo e quindi la regressione del rigenerato, non solo quando questo era formato da un semplice ispessimento dell'epitelio corneale, ma anche quando era costituito da una lente già parzialmente differenziata. Filoni et al. hanno dimostrato, inoltre, che il decremento della capacità rigenerativa osservata negli stadi larvali tardivi è dovuta non alla perdita di potenzialità rigenerative della cornea esterna, quanto alla probabile inibizione meccanica esercitata dalla cornea interna, mesodermica, sulla cornea esterna stessa.

Esperimenti successivi (Bosco et al., 1986), hanno messo in evidenza che la regressione delle strutture lentogene neoformate in seguito ad enucleazione non è dovuta a carenza dei fattori nutrizionali aspecifici forniti dall'occhio, ma dall'assenza dei fattori oculari induttivi. I dati ottenuti hanno dimostrato che l'indisponibilità del fattore oculare induttivo determinava un arresto del processo transdifferenziativo ed una regressione delle strutture lentogene fino ad allora formate, malgrado nelle condizioni sperimentali adottate venisse assicurato un adeguato apporto nutrizionale da parte dell'occhio della larva ospite.

I risultati di vari esperimenti hanno individuato nella retina neurale il territorio oculare capace di produrre il fattore(i) inducente (Filoni et al., 1978; 1981; 1982). L'importanza della retina è stata evidenziata anche da Reeve e Wild (1981), e Bosco et al. (1993). Comunque fino ad ora l'induttore retinico non è stato ancora isolato e caratterizzato e anche se esistono prove del coinvolgimento di alcuni fattori di crescita nei processi transdifferenziativi.

Il fattore di crescita dei fibroblasti sembra svolgere un ruolo determinante nella morfogenesi della lente (McAvoy and Chamberlain, 1989; Reddan and Dziedzic, 1982; Reddan and Wilson-Dziedzic, 1983; Luty et al., 1985; Columbre and Columbre, 1969; Chamberlain and McAvoy, 1987; Beebe et al., 1980; Bosco et al., 1997).

McAvoy e Chamberlain (1989) hanno dimostrato che il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) ha un'azione diversa, in relazione alla sua concentrazione nei territori oculari.

A concentrazioni intermedie, in prossimità dell'equatore della lente, FGF avrebbe un'azione mitogenica nei confronti delle cellule dell'epitelio del cristallino; a concentrazioni elevate, in prossimità della parte posteriore della lente, rivolta verso la camera vitrea, determinerebbe il differenziamento delle cellule in fibre; infine, a concentrazioni basse, in prossimità della parte anteriore della lente, rivolta verso la camera anteriore, impedirebbe il differenziamento delle cellule in fibre conservando un epitelio cubico nella parte anteriore della lente.

Bosco et al. (1997), hanno ottenuto transdifferenziamento lentogeno di frammenti di cornea esterna di *Xenopus laevis* quando questi ultimi erano coltivati *in vitro* in presenza di aFGF.

Inoltre, McDevitt et al. (1997), hanno dimostrato la presenza e l'attivazione dei recettori per FGF, durante i processi rigenerativi della lente dall'iride dorsale, in *Nothophtalmus viridescens*.

Alcuni Autori hanno dimostrato l'azione mitogenica sulle cellule dell'epitelio del cristallino di altri fattori di crescita, quali IGF, EGF (Reddan and Wilson-Dziedzic, 1983; Reddan and Dziedzic, 1982) e PDGF (Brewitt and Clark, 1988); altri Autori hanno dimostrato la presenza dei recettori per l'IGF nella lente embrionale di pollo (Bassas et al., 1987).

La retina: Sviluppo e Rigenerazione

Sviluppo della retina in *Xenopus laevis*

Le vescicole ottiche di *X. laevis* si sviluppano intorno allo stadio embrionale 21 (secondo Nieuwkoop e Faber 1956). Allo stadio 22, le vescicole ottiche prendono contatto con l'ectoderma antistante. Allo stadio 23, le pareti ventrale e laterale della vescicola ottica primaria divengono più spesse della parete dorso-mediale e questo relativo aumento in spessore diviene più pronunciato negli stadi successivi. Allo stadio 25 la vescicola ottica primaria è del tutto sviluppata. Allo stadio 27, comincia il processo di invaginazione che continua durante gli stadi seguenti. Allo stadio 28, lo strato retinico diventa più spesso e le cellule che formeranno il tappeto nero costituiscono uno strato monocellulare molto fine nella porzione dorso-mediana. Allo stadio 31, lo strato retinico diviene concavo. Allo stadio 32, la cavità della vescicola ottica è divenuta virtuale tranne che nella regione in cui il peduncolo ottico passa nella coppa ottica. Allo stadio 35-36, iniziano a differenziarsi i vari tipi cellulari e, allo stadio 38-39, si possono, ormai, riconoscere i tre strati nucleari e due strati plessiformi, quello interno e quello esterno. L'ultimo tipo cellulare, che si differenzia all'interno della retina neurale, è rappresentato dai fotorecettori che divengono morfologicamente distinguibili allo stadio 45 (Fig. 15).

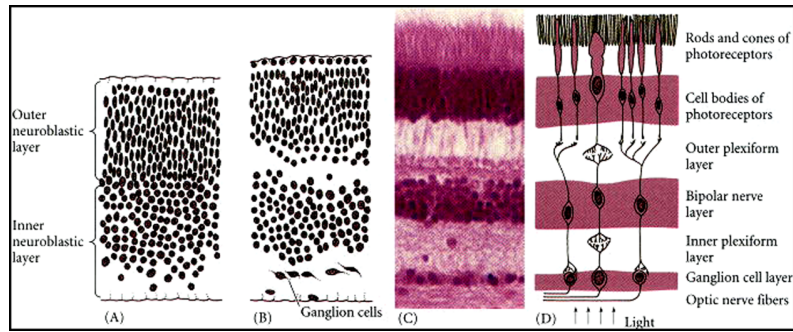


Figura. 15. Sviluppo della retina. **(A-B)** Separazione iniziale dei neuroblasti. **(C)** Stratificazione della retina adulta. **(D)** Rappresentazione funzionale delle principali connessioni sinaptiche all'interno della retina: la luce attraversa la retina stimolando i fotorecettori; gli assoni dei fotorecettori sinaptano con i neuroni bipolari, che trasmettono l'impulso nervoso alle cellule gangliari. Gli assoni delle cellule gangliari si uniscono a formare il nervo ottico.

Espressione di *pax6* durante lo sviluppo della retina

Lo sviluppo della retina è accompagnato dall'espressione e dalla interazione di molti fattori di trascrizione; tra questi *pax6* gioca un ruolo di primaria importanza. Allo stadio 28 dello sviluppo dell'embrione di *X. laevis*, le cellule che formeranno la retina neurale sono multipotenti e daranno luogo a vari tipi di neuroni (Holt et al., 1988; Wetts and Fraser, 1988; Turner et al., 1990). Il pattern di espressione di *pax6*, a questo stadio, è uniforme lungo tutto il neuroepitelio ed anche lungo il tappeto nero. Questa situazione rimane pressoché costante fino allo stadio 35-36, quando diviene evidente un cambiamento nell'espressione di *pax6*: le cellule che diventeranno fotorecettori (coni e bastoncelli) non esprimono più *pax6*, e anche le cellule del tappeto nero diventano negative verso una sonda antisense per *pax6*.

Allo stadio 42 molte cellule della parte centrale della retina smettono di dividersi e si sono ormai organizzate in tre strati: strato delle cellule gangliari, strato nucleare interno che contiene i neuroni retinici e strato nucleare esterno che contiene coni e bastoncelli. L'espressione di *pax6* è confinata allo strato delle cellule gangliari e alla parte più profonda dello strato nucleare interno (Hirsch and Harris, 1997). Tale situazione permane invariata negli stadi larvali successivi.

Rigenerazione della retina

La potenzialità rigenerativa della retina è largamente diffusa tra gli Anfibi, più di quanto non avvenga per la rigenerazione del cristallino. Così, essa si manifesta non solo nel genere *Triturus* che può rigenerare il cristallino, ma anche, seppur in minor grado, in altri Anfibi, Urodeli ed Anuri (ad es. *Ambystoma maculatum* e *Rana esculenta*), incapaci di rigenerare la lente.

Gli studi più estesi sulla rigenerazione della retina e del nervo ottico degli Anfibi Urodeli sono stati compiuti su larve ed adulti di *Triturus viridescens*, *T. pyrrhogaster* e *T. cristatus*, sottoposti alla rimozione chirurgica dell'intera retina neurale o a devascularizzazione oculare con conseguente degenerazione della retina neurale. In entrambe le condizioni sperimentali (nel secondo caso l'occhio si rivascolarizza in breve tempo), si osserva la completa rigenerazione della retina neurale e del nervo ottico. L'accurata analisi del processo rigenerativo, eseguita anche con l'ausilio di tecniche autoradiografiche, ha dimostrato che tale rigenerazione avviene a spese di due territori oculari: l'epitelio pigmentato della retina e lo strato epiteliale interno, non pigmentato, dell'ora serrata e dell'adiacente *pars ciliaris retinae* (*anterior complex*).

L'entità del contributo di ciascuno di questi due territori alla rigenerazione varia con le specie e con l'età; in genere il contributo dell'*anterior complex* è maggiore nella larva che nell'adulto; ciò è in relazione al fatto che nell'occhio normale della larva, le cellule poste in prossimità dell'ora serrata sono attivamente proliferanti e costituiscono la zona di accrescimento della retina. La seguente descrizione del processo si riferisce alla rigenerazione della retina nei tritoni adulti (Stone, 1950; Reyer, 1977; Keefe 1973 a,b,c).

La prima fase del processo rigenerativo è caratterizzata dalla proliferazione delle cellule dell'*anterior complex*: dopo retinectomia e iniezione intraperitoneale di timidina tritiata, la maggior parte delle cellule non pigmentate, poste in prossimità dell'ora serrata, appare marcata già al 2°-3° giorno postoperatorio. Poco dopo (intorno al 7° giorno postoperatorio), anche le cellule dell'epitelio pigmentato iniziano a sintetizzare DNA e a dividersi. Tali cellule si liberano dalle connessioni intracellulari, e, mentre si dividono, eliminano gradualmente i granuli di pigmento, che vengono fagocitati dai macrofagi. La continua proliferazione cellulare determina la formazione di un epitelio pluristratificato. Le cellule dello strato più esterno cessano di dividersi, divengono appiattite e incominciano a sintetizzare

granuli di melanina; esse riformeranno lo strato pigmentato della retina. Le altre cellule cominciano ad allinearsi verticalmente rispetto all'epitelio pigmentato e vanno incontro ad un graduale processo di differenziamento. Le prime cellule che si differenziano sono le cellule di Muller; il differenziamento delle altre cellule procede dall'interno verso l'esterno (dalla superficie che guarda verso la camera vitrea a quella rivolta verso l'epitelio pigmentato).

Così si ricostituisce dapprima lo strato delle cellule gangliari, separato dalle altre cellule retiniche dallo strato plessiforme esterno e, poco dopo, gli strati granulari interno ed esterno, separati dallo strato plessiforme interno. La retinogenesi si completa con il differenziamento del segmento interno ed esterno dei coni e bastoncelli. Dopo che è avvenuta la formazione dello strato delle cellule gangliari, gli assoni di tali cellule, ricostituendo il nervo ottico, ristabiliscono le connessioni anatomiche e funzionali con il tetto ottico. Man mano che procede il differenziamento della retina neurale, l'attività mitotica, dapprima uniformemente distribuita, si localizza nello strato immediatamente adiacente all'epitelio pigmentato e poi si arresta. Solo in corrispondenza dell'ora serrata permangono, per un tempo piuttosto lungo (fino a 81 giorni dopo la devascularizzazione), cellule in attività mitotica che, differenziandosi, determinano l'ulteriore accrescimento della retina.

Dall'analisi del processo rigenerativo, risulta evidente che la rigenerazione della retina neurale da parte dell'epitelio pigmentato retinico rappresenta un tipico caso di transdifferenziamento: cellule epiteliali completamente differenziate perdono i loro attributi morfologici specifici e, dopo essersi attivamente moltiplicate, si ridifferenziano, oltre che nelle cellule dell'epitelio pigmentato, in tipi cellulari completamente diversi da quello originario ricostituendo la grande complessità strutturale della retina neurale (Fig.16).

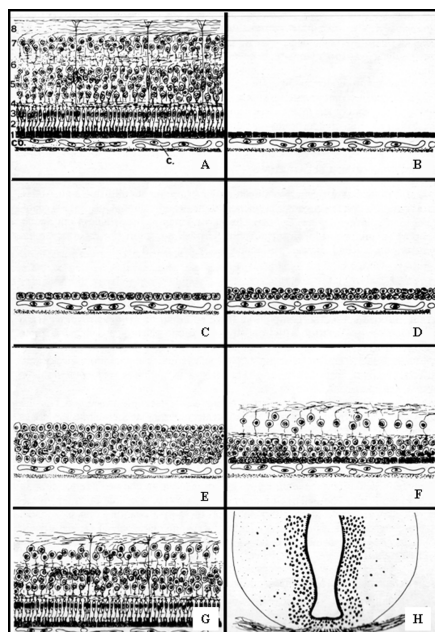


Fig. 16. Rigenerazione della retina dall'RPE in *T. viridescens*. In seguito all'asportazione della retina neurale, le cellule del tappeto nero si sdifferenziano, proliferano ed infine ricostituiscono una retina neurale laminare. **A.** Retina neurale. **B.** Dopo 6 gg. dall'asportazione della retina neurale. Al di sopra della coroide si osserva solo l'epitelio pigmentato. **C e D.** Rispettivamente dopo 10 e 12 gg. dall'operazione. Le cellule dell'epitelio pigmentato si liberano dai granuli di melanina e si moltiplicano attivamente. **E.** 20 gg. dopo l'operazione. In seguito alla attiva proliferazione delle sue cellule la retina rigenerante è divenuta pluristratificata. **F.** 30 gg. dopo l'operazione. È in atto il processo di differenziamento della retina rigenerante. **G.** dopo 60 gg. dall'operazione il differenziamento dei vari strati retinici è completato. **H.** La sezione trasversale del diencefalo, al livello del chiasma ottico, mostra che, avvenuta la rigenerazione della retina, gli assoni delle cellule gangliari ricostituiscono il nervo ottico.

Le larve degli anuri possono rigenerare la retina neurale, anche dopo asportazione totale. Tuttavia, diversamente da quanto avviene negli Urodela, nelle larve degli Anuri (*R. esculenta*, *R. temporaria*, *B. viridis*) la retina neurale si forma a spese delle cellule dello strato epiteliale interno, non pigmentato, dell'iride e non a spese del tappeto nero; se, oltre alla retina neurale, si asporta anche l'iride, la rigenerazione non avviene (Reyer, 1977).

Esperimenti d'impianto dell'epitelio pigmentato hanno tuttavia dimostrato che, in determinate condizioni sperimentali, anche l'epitelio

pigmentato della retina degli Anuri ha la potenzialità di trasformarsi in retina neurale. Perché si verifichi il transdifferenziamento, occorre che l'epitelio pigmentato venga isolato dagli involucri mesenchimatici (sclera, corioide), che avrebbero un effetto stabilizzante sul differenziamento delle cellule epiteliali, e si trovi in presenza della retina neurale (Lopashov and Sologub, 1972). La rigenerazione sarebbe, in questo caso, determinata da un fattore prodotto dalla retina neurale. Infatti, l'epitelio pigmentato dà origine alla retina neurale solo quando è impiantato unitamente ad una porzione di retina. In *X. laevis*, il transdifferenziamento del tappeto nero in retina è un percorso alternativo al normale sviluppo della retina.

Diversi studi hanno messo in evidenza che il processo di transdifferenziamento retinogeno dell'RPE avviene anche in altri Vertebrati e, di recente, si è iniziato ad investigare sulla natura molecolare dei fattori coinvolti in questo processo di transdifferenziamento. Il fattore di crescita dei fibroblasti FGF-2 è in grado di promuovere, sia *in vivo* che *in vitro*, il transdifferenziamento retinogeno dell'epitelio pigmentato embrionale di pollo (Park and Hollemberg, 1989; Pittack et al., 1991; Araki et al., 1998); tale fattore induce, inoltre, il transdifferenziamento retinogeno di cellule dell'epitelio pigmentato di ratto coltivate *in vitro* (Zhao et al., 1995). Sakaguchi et al. (1997) hanno dimostrato che l'FGF-2 è in grado di promuovere *in vitro* anche il transdifferenziamento retinogeno di cellule di RPE di larve di *X. laevis*, rafforzando così l'idea che il transdifferenziamento dei frammenti di RPE di *X. laevis*, impiantati nella camera vitrea di una larva ospite, sia dovuto all'azione dell'FGF-2 retinico, accumulato nella camera vitrea.

Studi fatti da Reh e collaboratori (1987), sugli Anfibi, hanno dimostrato che il processo di transdifferenziamento retinico è preceduto dall'involuzione di fattori legati alla matrice extracellulare (ECM).

In vitro, il processo di transdifferenziamento avviene solo se le cellule sono mantenute in sospensione o cresciute su una matrice di laminina (Sakaguchi et al., 1999); infatti, per poter indurre il transdifferenziamento del tappeto nero, FGF-2 deve legarsi ad un eparan solfato proteoglicano della laminina (HSPG), che, in condizioni normali, è mascherato dalla matrice extracellulare della retina. Anticorpi contro le HSPG inibiscono il transdifferenziamento retinogeno perché impediscono il legame tra FGF-2 e HSPG (Nagy et al., '94).

In coltura, cellule di tappeto nero trattate con FGF-2 cominciano a perdere il pigmento ed a sdifferenziarsi dopo 7 giorni; dopo 14 giorni alcune

regioni cominciano a mostrare positività ad anticorpi diretti contro strutture neurali, evidenziando l'inizio del processo di differenziamento.

Il processo di transdifferenziamento, indotto dall'FGF-2, è un processo concentrazione-dipendente, tuttavia dosi maggiori di 20 ng/ml non aumentano la percentuale di transdifferenziamento retinico. Ciò fa supporre che solo una frazione di cellule del tappeto nero sia in grado di sdifferenziarsi e di cambiare il proprio destino cellulare (Sakaguchi et al., 1997).

MATERIALE E METODI I

Animali

Gli esperimenti sono stati condotti su embrioni e larve di *Xenopus laevis* e di *X. borealis*, ottenuti in seguito ad ovulazione ed accoppiamento indotti con ormoni gonadotropi (Profasi, Serono). Gli stadi larvali e quelli embrionali sono stati determinati utilizzando le tavole di sviluppo di Nieuwkoop e Faber (1956).

Per le procedure connesse alla produzione degli anticorpi monoclonali, sono stati utilizzati topi di ceppo Balb/c.

Tutti gli animali sono stati stabulati, anestetizzati e sacrificati da personale autorizzato in accordo alla legge n°116/92.

Analisi delle interazioni tissutali responsabili del mantenimento della capacità lentogena nell'area lentogenica larvale

Operazioni sugli embrioni

Prima delle operazioni, lo strato gelatinoso e la membrana vitellina sono stati rimossi dagli embrioni utilizzando delle pinzette da orologiaio.

Tutte le operazioni sono state condotte in soluzione di Steinberg (100 µg/ml di streptomicina, 100 UI/ml penicillina e 25 µg/ml di fungizone). Dopo gli interventi, gli embrioni sono stati trasferiti gradualmente in una soluzione di Steinberg al 20% e allevati a 23°C fino al raggiungimento dello stadio larvale 50 (circa 14 giorni dopo l'operazione).

Rimozione della vescicola ottica embrionale

Negli embrioni allo stadio 20, la vescicola ottica prende contatto con l'ectoderma della testa. In 80 embrioni, utilizzando un ago di tungsteno, è stato sollevato l'ectoderma della testa, di fronte alla vescicola ottica di destra. In seguito, la vescicola ottica è stata rimossa e l'ectoderma della testa è stato ricollocato al suo posto. Gli animali operati sono stati allevati fino allo stadio 50. In 66 di queste larve, l'occhio destro era completamente assente. Quindici delle 66 larve sono state fissate nel liquido di Carnoy ed incluse paraffina. Le sezioni seriali sono state colorate con ematossilina ed eosina, per controllare la possibile presenza di lenti libere. Le altre 51 larve

sono stati utilizzate come donatrici dell'epidermide coprente l'orbita nell'esperimento III.

Rimozione della vescicola ottica e del PLE embrionale

In 80 embrioni allo stadio 20, utilizzando un ago di tungsteno, sono stati rimossi la vescicola ottica e il sovrastante ectoderma. Gli animali operati sono stati allevati fino allo stadio 50. L'occhio destro era completamente assente in 70 di queste larve. Venti delle 70 larve sono state fissate per controllare la possibile presenza di lenti libere. Le altre 50 larve sono state utilizzate nell'Esperimento IV come donatrici dell'epidermide coprente l'orbita.

Trapianti di occhio proveniente da embrioni allo stadio 39

Allo stadio 39, il differenziamento della lente è in corso mentre il processo che porta alla formazione della cornea è appena iniziato (Nieuwkoop and Faber, 1956; Lopashov and Stroeveva, 1961; Hay, 1980). Sotto la cornea esterna presuntiva, si è formato un sottile foglietto "endoteliale" (la cornea interna presuntiva), continuo con la sclera presuntiva. Dopo la rimozione della cornea esterna presuntiva, l'occhio è stato prelevato da 80 embrioni allo stadio 39. Poiché a questo stadio la cornea esterna presuntiva è ben separata dalla cornea interna presuntiva, può essere ottenuto facilmente un occhio "pulito", cioè senza frammenti di ectoderma. Come controllo della tecnica operatoria, 20 occhi degli 80 prelevati sono stati fissati in Carnoy ed inclusi in paraffina. Per verificare l'eventuale presenza di cellule ectodermiche contaminanti, le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina. Gli altri 60 occhi sono stati trapiantati in una tasca scavata sotto l'ectoderma del fianco di embrioni allo stadio 26. Gli animali operati sono stati allevati fino allo stadio 50. In 51 larve l'occhio trapiantato era normalmente sviluppato. Queste larve sono state utilizzate nell'Esperimento V, come donatrici di epidermide sovrastante l'occhio trapiantato.

Operazioni sulle larve

Prima dell'intervento operatorio, le larve sono state anestetizzate con MS 222 1:3000. Durante le operazioni, le larve sono state mantenute nella soluzione di Holtfreter. Dopo le operazioni, le larve sono stati allevate per 24 ore nella soluzione di Holtfreter e poi trasferite in acqua dechlorata. Prima di essere sacrificate, le larve sono state anestetizzate con MS 222 1:1000.

Lentectomia

L'occhio destro di 50 larve è stato sottoposto alla rimozione della lente attraverso il foro pupillare. Dopo aver inciso con un sottile ago di tungsteno la cornea esterna ed interna, si procedeva alla rimozione del cristallino, mediante aspirazione con una micropipetta di vetro, avente un diametro leggermente inferiore a quello del foro pupillare.

Impianto di un frammento di cornea o di epidermide nella camera vitrea

Frammenti di cornea o di epidermide prelevati da larve allo stadio 50, normali o sviluppate da embrioni operati (vedi sopra), sono stati impiantati all'interno della camera vitrea dell'occhio destro di una larva ospite (stadio 55/56). Dopo incisione della cornea esterna ed interna delle larve ospiti, il cristallino è stato aspirato con una micropipetta e trasferito in una capsula contenente la soluzione di Holtfreter. Utilizzando forbicette da orologiaio e aghi di tungsteno, il frammento corneale o epidermico è stato quindi inserito nella camera vitrea della larva ospite e il cristallino è stato rimesso in sede dopo l'impianto. Il reinserimento del cristallino aveva il duplice scopo di ridurre la probabilità che l'impianto andasse perduto e di ostacolare la rigenerazione del cristallino da parte della cornea esterna dell'ospite.

Sono stati eseguiti i seguenti esperimenti (Fig. 17).

Esperimento I. Impianto della cornea esterna di larve donatrici allo st. 50 (50 impianti).

Esperimento II. Impianto di un frammento di epidermide del fianco di larve allo st. 50 (53 impianti).

Esperimento III. Impianto di un frammento di epidermide coprente l'orbita di una larva stadio 50, sviluppata da un embrione privato allo stadio 20 della vescicola ottica (51 impianti).

Esperimento IV. Impianto di un frammento di epidermide coprente l'orbita di una larva stadio 50, sviluppata da un embrione privato, allo stadio 20, della vescicola ottica e del PLE (50 impianti).

Esperimento V. Impianto di un frammento di epidermide del fianco, di una larva allo stadio 50, coprente un occhio trapiantato. La larva derivava da un embrione che allo stadio 26 è stato sottoposto al trapianto, sotto l'ectoderma del fianco, della coppa ottica di un embrione allo stadio 39.

In ogni esperimento, 10 larve sono stati fissate subito dopo l'operazione (tempo 0). Le altre sono state fissate 1-8 giorni dopo l'impianto.

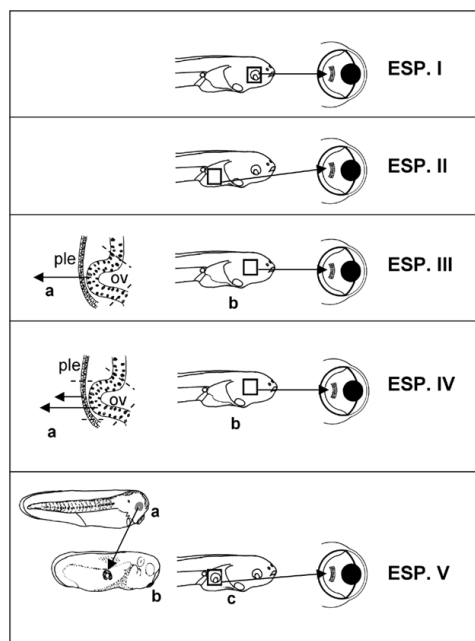


Fig. 17. Tavola operazioni. Esperimenti I e II: controlli. Esperimenti III, IV e V: a sinistra, operazioni sugli embrioni; al centro larve sviluppate dagli embrioni operati; a destra, impianto di frammenti di epidermide nella camera vitrea di una larva ospite.

Marcatura con BrdU della cornea esterna o dell'epidermide. In alcuni casi degli Esperimenti I, II, III, IV, e V, la cornea esterna o l'epidermide sono stati prelevate da animali inoculati 3 volte (una inoculazione intraperitoneale di 2 µl ogni 24 ore) con 5-BrdU (Amersham International) o allevate in una soluzione di Holtfreter al 10% addizionata con l'1% di 5-BrdU.

Esperimento VI: analisi della capacità lentogena dell'epidermide della testa e del fianco durante lo sviluppo.

Sono stati isolati da embrioni di *X. laevis* a stadio 24, 26, 30/31 e 40/41, utilizzando un ago di tungsteno, frammenti di ectoderma della testa, al di sopra del cervello anteriore, e frammenti di ectoderma della parte ventrale del fianco. Sono stati isolati da larve di *X. laevis* allo stadio 44/45, 46 e 48, utilizzando un ago di tungsteno e forbicette da iridectomia, frammenti di epidermide al di sopra del cervello anteriore e frammenti di epidermide della parte ventrale del fianco. Questi frammenti sono stati fatti aderire ad un filtro di Millipore, in seguito impiantato nell'occhio lentectomizzato di una larva allo stadio 55. Il filtro è stato inserito attraverso il foro pupillare in modo che la superficie in contatto con i frammenti di ectoderma o di epidermide fosse rivolta verso la camera vitrea. 115 larve ricevevano frammenti di ectoderma o di epidermide della testa, mentre altre 115 larve ricevevano frammenti di ectoderma o di epidermide del fianco (Fig. 18). Il filtro manteneva l'impianto nella camera vitrea ed impediva la rigenerazione della cornea esterna della larva ospite.

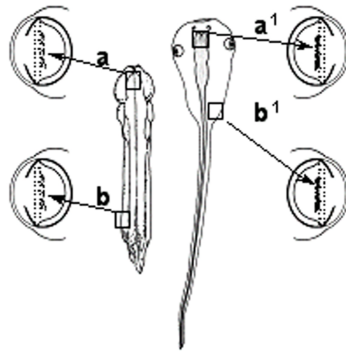


Fig. 18. *Esperimento VI.* Impianto nella camera vitrea (cv) di un frammento di ectoderma della testa (a), epidermide della testa (a'), ectoderma del fianco (b), epidermide del fianco (b').

Esperimento VII: effetto del trapianto di occhio sotto l'epidermide della testa e del fianco sulla capacità lentogena di queste due regioni.

Dopo aver rimosso la cornea esterna, l'occhio destro di embrioni allo stadio 40/41 e di larve stadio 44/45, 46 e 48 è stato espianato e autotrapiantato sotto l'epidermide coprente il cervello anteriore o sotto l'epidermide ventrale del fianco. La tasca per il trapianto nella parte ventrale del fianco è stata scavata nella muscolatura, mentre la tasca nella testa è stata ottenuta dopo aver rimosso la parte dorsale del cervello anteriore. Dopo 30 giorni dall'intervento, gli animali operati (allo stadio 53/54) sono stati usati come donatori dell'epidermide coprente l'occhio trapiantato. I frammenti di tale epidermide sono stati fatti aderire ad un filtro di Millipore e quindi impiantati nell'occhio destro lentectomizzato di una larva allo stadio 55, come descritto nell'Esperimento VI. 60 larve ricevevano frammenti di epidermide della testa, mentre 80 larve ricevevano frammenti di epidermide del fianco (Fig. 19). Inoltre come controllo, sono stati impiantati nella camera vitrea di larve ospiti (stadio 55) frammenti di epidermide della testa o del fianco, prelevati da larve allo stadio 53/54 che avevano subito agli stadi 40/41, 44/45, 46 e 48 un falso trapianto di occhio (semplice rimozione di parte della muscolatura o del cervello anteriore).

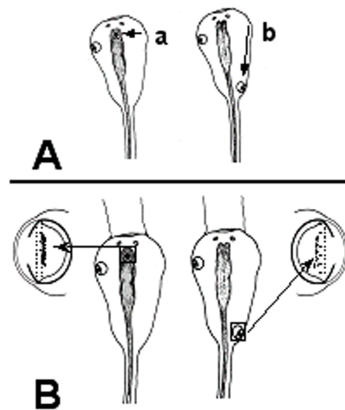


Fig. 19. *Esperimento VII.* **A.** Autotrapianto dell'occhio destro sotto l'epidermide della testa (a) o del fianco (b). **B.** 30 gg dopo l'operazione, i frammenti di epidermide coprenti l'occhio trapiantato sono stati impiantati nella camera vitrea di una larva ospite

Esperimento VIII: effetto del trapianto delle componenti dell'occhio sotto l'epidermide della testa.

Dall'occhio destro di larve allo stadio 46 sono stati rimosse la lente, la retina o entrambe. Nella prima operazione, la lente è stato rimossa come descritto sopra. Nella seconda operazione, la retina neurale è stato rimossa attraverso un'incisione semicircolare dietro l'iride, utilizzando un'ansa di tungsteno. Successivamente la lente e l'iride sono state ricollocate in sede. Nella terza operazione, prima di riporre in sede l'anello irideo, sono state rimosse sia la lente sia la retina. Gli occhi operati sono stati autotrapiantati sotto l'epidermide sovrastante il cervello anteriore, come descritto nell'esperimento VII. Trenta giorni dopo l'impianto, gli animali operati (giunti allo stadio 53-54) sono stati utilizzati come donatori di epidermide coprente l'occhio trapiantato. I frammenti di epidermide sono stati fatti aderire al filtro di Millipore e, in seguito, impiantati nella camera vitrea di una larva ospite allo stadio 55, come descritto nell'Esperimento VI. Venti larve ricevevano i frammenti di epidermide della testa coprente un occhio privo di lente, 15 larve ricevevano frammenti di epidermide della testa

coprente un occhio senza retina e 15 larve ricevevano frammenti di epidermide della testa coprente un occhio senza lente e retina (Fig. 20).

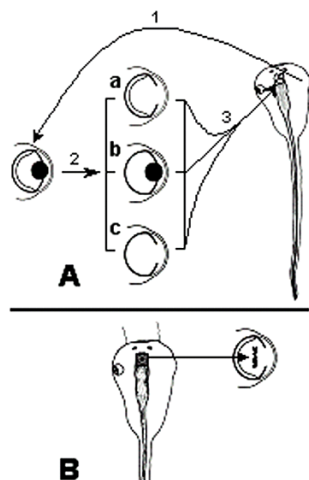


Fig. 20. *Esperimento VIII.* **A.** L'occhio destro è stato enucleato (1), sottoposto alla rimozione della lente (a), rimozione della retina (b) o alla rimozione della lente e della retina (c) e (2) autotrapiantato sotto l'epidermide della testa. **B.** 30 gg dopo l'operazione, i frammenti di epidermide coprenti l'occhio trapiantato sono stati impiantati nella camera vitrea di una larva ospite.

Sette giorni dopo le operazioni di impianto nella camera vitrea, le larve ospiti degli Esperimenti VI, VII e VIII sono state anestetizzate in 1:1000 MS 222 e fissate in liquido di Carnoy. I campioni sono stati disidratati attraverso passaggi successivi in alcool, chiarificati in Histo-Clear (National Diagnostics) inclusi in paraffina e tagliati in sezioni seriate di $7\mu\text{m}$ di spessore con un microtomo rotativo Leitz. Le sezioni, dopo essere state idratate, sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti-lente mAbH. Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente, i vetrini sono stati sciacquati in PBS/Triton X-100 (0,05%). L'anticorpo secondario (coniugato con rodamina o con perossidasi, utilizzando il 3-ammino-9-etil-carbazolo come substrato) è stato applicato per un'ora. Gli impianti erano considerati transdifferenziati in senso lentogeno solo quando reagivano positivamente con mAbH. La capacità lentogena è stata espressa come percentuale degli impianti positivi rispetto al totale degli impianti.

In alcuni casi dell'Esperimento VI, i frammenti di ectoderma o di epidermide della testa e del fianco sono stati prelevati da embrioni e da larve di *X. laevis* e impiantati nella camera vitrea di un occhio destro lentectomizzato di una larva di *X. borealis* (stadio 55).

Inoltre, in alcuni casi degli Esperimenti VII e VIII, l'occhio, proveniente da donatori di *X. borealis* (stadio 40/41, 44/45 e 46), è stato trapiantato sotto l'epidermide della testa o del fianco di ospiti di *X. laevis* pari stadio. Trenta giorni dopo, i frammenti di epidermide di *X. laevis*, coprenti l'occhio trapiantato, sono stati impiantati nella camera vitrea di un occhio destro lentectomizzato di larve di *X. borealis* (stadio 55), fissate in liquido di Carnoy 6 giorni dopo gli impianti. Le sezioni degli occhi delle larve di *X. borealis* sono state trattate con quinacrina e in seguito incubate con mAbH. L'appartenenza allo *X. laevis* degli impianti era stabilita con certezza a causa della differente reazione con la quinacrina dei nuclei di *X. laevis* rispetto ai nuclei di *X. borealis*. Infatti, al microscopio a fluorescenza, i nuclei delle cellule di *X. laevis* presentavano una fluorescenza uniforme, mentre quelli di *X. borealis* presentavano degli "spots" intensamente fluorescenti.

Analisi in immunistochemica della distribuzione della proteina FGFR-2 nell'epidermide della testa e del fianco

Larve normali allo stadio 53 e larve allo stadio 53, sottoposte allo stadio 46 all'autotrapianto di un occhio sotto l'epidermide della testa e del fianco, sono state fissate per 4 ore a 4°C in 4% paraformaldeide/PBS e, in seguito, sciacquate 3 volte in PBS 1% Triton X-100 (10 minuti per ogni sciacquo). L'*anterior complex* (anello irideo e cornea interna ed esterna), l'epidermide della testa e del fianco di larve normali, e l'epidermide del fianco e della testa coprenti l'occhio trapiantato, insieme all'aderente anello irideo, sono stati prelevati e sciacquati in PBS. I campioni sono stati incubati, per un'ora a temperatura ambiente, nella soluzione di bloccaggio (PBT, 5% BSA in PBS e 0,1% Triton X-100). In seguito, i campioni sono stati incubati (ON a 4°C) con un anticorpo di coniglio anti-FGFR-2 (*bek*) umano (Santa Cruz Biotechnology), diluito in PBT più 5% di siero di capra. Dopo gli sciacqui in PBT (tre sciacqui, da 30 minuti ciascuno), i campioni sono stati incubati, per 16 ore a 4°C, con un anticorpo anti-immunoglobuline di coniglio coniugato con perossidasi (Biorad) diluito 1:200 in PBT. I campioni sono stati sciacquati, a temperatura ambiente, in PBT (tre sciacqui, da 30 minuti ciascuno) e poi incubati in 0.5 mg/ml DAB/PB. Dopo gli sciacqui in acqua distillata, i campioni sono stati disidratati in alcool e trattati per l'inclusione in

paraffina. Le sezioni di 7 µm di spessore sono state sparaffinate in HistoClear (National Diagnostic), il coprioggetto è stato montato con DPX (BDH).

Produzione, selezione e caratterizzazione dell'anticorpo monoclonale mAbH

Il protocollo di immunizzazione che ho adottato (Tab. I) è stato programmato al fine di arricchire le cellule spleniche di cellule blastiche B, specifiche per l'antigene e attivamente proliferanti.

Anche le cellule del mieloma usate per la fusione, sono state raccolte in fase di crescita logaritmica. In questa maniera, la fusione cellulare rappresenta di per sé un sistema selettivo per i linfociti proliferanti, la maggior parte dei quali sono cellule antigene-specifiche. La diretta conseguenza della fusione selettiva in queste condizioni di larghe popolazioni di B linfociti antigene-specifici proliferanti è che la frequenza di fusione è di circa 1 cellula ibrida vitale per 2×10^4 splenociti.

Sono stati utilizzati 5 topi Balb/c di sesso femminile dell'età di 12 settimane circa, immunizzati secondo le procedure indicate in tabella I (3 topi secondo la procedura A e 2 topi secondo la procedura B).

Per le varie immunizzazioni, è stato utilizzato estratto crudo di cristallino (1300 µg totali di proteine solubili del cristallino) proveniente da *Xenopus laevis* adulto.

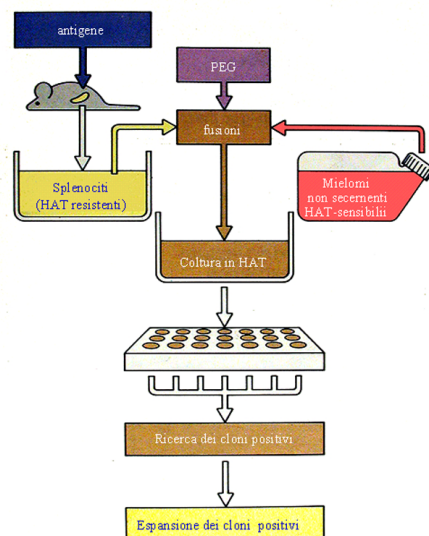


Fig. 21. Produzione di anticorpi monoclonali.

TABELLA I. Procedure di immunizzazione

immunizzazione	giorni dalla fusione	quantità di antigene somministrato in μg e condizioni di somministrazione	
		A (1300 μg totali)	B (115 μg totali)
1	-15	50, CFA, ip	50, CFA, ip
2	-8	50, CFA, ip	50, CFA, ip
3	-3	400, S, ip	5, S, ip
4	-2	200, S, ip+200, S, iv	2.5, ip+2.5, S, iv
5	-1	200, S, ip+200, S, iv	2.5, ip+2.5, S, iv

CFA, adiuvante completo di Freund; S, soluzione salina; ip, intraperitoneale; iv, intravenosa.

Mantenimento delle linee cellulari

Il mezzo usato per le culture cellulari è stato RPMI 1640 addizionato con 10 mM di HEPES, 2×10^{-5} M di 2-mercaptoetanolo, 2 mM di L-glutamina e 5% di Siero bovino fetale (FBS) (selezionato per colture). L'FBS è stato inattivato a 60°C per 90 min.

Per le fusioni operate in questa tesi, mi sono avvalso di due ceppi di mieloma SP2/01-Ag8 (Shulman et al. 1978) e NSO/1 (Galfre and Milstein, 1981), gentilmente donati rispettivamente dal dott. M. Cianfriglia (ISS) e dalla dott.ssa A.M. Di Massimo (Menarini, Pomezia). Tali mielomi sono sensibili al terreno HAT e per rimuovere ogni possibile retromutante, e quindi HAT-resistente, sono stati coltivati in terreno contenente 8-azaguanina, sostanza che sopprime i ceppi retromutanti HGPRT+.

I mielomi sono stati mantenuti in fiasche da 250 ml (o in capsule di Petri da 10 cm Ø) in 50 ml (o in 15 ml) di terreno completo (5% FBS) a una densità tra 10^5 e 5×10^5 cellule/ml. Densità inferiori o superiori influenzavano negativamente il ritmo di crescita cellulare. Quando le cellule avevano raggiunto la densità desiderata (tempo di raddoppiamento 12/16 h), sono state diluite in mezzo fresco e divise in altre fiasche. Le poche cellule che aderivano al fondo potevano essere rimosse con piccoli scuotimenti delle fiasche stesse.

Prima della fusione, le cellule del mieloma erano in fase di crescita logaritmica e, quando sono state osservate al microscopio invertito a contrasto di fase, apparivano di forma regolare con i margini ben delineati. La percentuale di cellule vive era maggiore del 95%.

Linfociti

Come fonte di linfociti, usualmente si preferisce la milza, in cui approssimativamente il 20% delle cellule sono linfociti B. Si stima che non più di 10^5 di questi linfociti siano in grado di produrre anticorpi specifici. Nonostante questo, di solito, non è un problema ottenere da queste cellule un numero sufficiente di ibridomi specifici, anche se la frequenza di fusione è bassa.

Sono stati presi in considerazione numerosi metodi per preparare una sospensione cellulare della milza, per esempio perfondere ripetutamente la milza con l'aiuto di due siringhe o pressarla attraverso una retina fina con l'aiuto di un pistone da siringa.

Il miglior metodo si è rivelato la perfusione da cui si ottenevano da 5×10^7 a 2×10^8 cellule nucleate.

I linfociti sono stati lavati almeno tre volte in terreno privo di siero preriscaldato a 37°C . Dopo l'ultimo lavaggio, il pellet di splenociti è stato risospeso in una provetta sterile con 10 ml circa di terreno completo (10^7 cellule/ml) e lasciato in incubatore a 37°C per almeno due ore prima di effettuare la fusione. In queste condizioni di coltura, le cellule della milza continuano a proliferare in presenza dei fattori di crescita rilasciati dalla popolazione di cellule linfoidi. Dopo tale periodo, gli splenociti sono stati centrifugati di nuovo e il soprannatante (CS) è stato conservato a 4°C . Solo una parte degli splenociti è stata utilizzata per la fusione (circa 10^8 cellule); le rimanenti cellule sono state congelate.

Il terreno CS, ricco di fattori di crescita, è stato utilizzato per scongelare gli splenociti immunocompetenti.

Fusione

In passato sono stati saggiati alcuni agenti chimici per aumentare la percentuale di fusione, quali le lisolecitine e il poli-etilen-glicole (PEG) (Pontecorvo, 1975). Il PEG è diventato di uso comune quale agente chimico per promuovere le fusioni.

Dopo aver saggiato PEG a vari pesi molecolari (da 1500 a 4000), ho scelto il trattamento con PEG 1550 della SERVA o la soluzione PEG della SIGMA (50% P/V in PBS). In accordo con il metodo di Cianfriglia et al. (1986), in tutte le procedure, la temperatura è stata mantenuta rigorosamente a 37°C e le cellule sono state esposte alla soluzione PEG per tempi non superiori ai due min; il rapporto splenociti/mieloma era compreso tra 5:1 a 10:1, per evitare che aumentasse la frequenza di fusione tra mieloma e mieloma.

Le cellule del mieloma e gli splenociti sono stati lavati tre volte con terreno senza siero a 37°C per rimuovere i detriti dalle membrane cellulari e ottimizzare l'attività di fusione del PEG. Dopo l'ultimo lavaggio, $10^7/10^8$ splenociti sono stati uniti alle cellule del mieloma in una provetta conica da 50 ml. Dopo centrifugazione, il soprannatante è stato completamente rimosso con l'ausilio di una pipetta Pasteur (è importante che il pellet sia quanto più possibile asciutto perchè l'efficienza di fusione è fortemente dipendente dalla concentrazione del PEG). Sono stati aggiunti al pellet 400-800 μl di soluzione di PEG al 50% in RPMI (37°C), goccia a goccia, nell'arco di un minuto scuotendo leggermente la provetta in un bagno termostato a 37°C .

La provetta è stata agitata, sempre nel bagno termostato, per un altro minuto per ottenere una sospensione cellulare omogenea; quindi si aggiungevano 5-10 ml di terreno senza siero per un periodo di 5 min. Nel periodo di 1-2 min successivi, si aggiungevano 40-80 ml di terreno completo (37°C). Le cellule erano distribuite con l'ausilio di un pipettatore multicanale in piastre da 96 pozzetti, 100 µl per pozzetto, e successivamente ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di terreno completo addizionato di 2X HAT (Sigma).

La percentuale di fusione ottenuta con questo metodo era molto alta e in alcuni casi, ad una prima osservazione dopo 7 giorni, il 100% dei pozzetti mostrava crescita cellulare e quindi era positivo per la fusione.

Selezione degli ibridi

Le cellule provenienti dalle fusioni sono state incubate in mezzo selettivo HAT direttamente dal primo giorno di coltura. Contemporaneamente, cellule di mieloma in fase di crescita logaritmica venivano poste in coltura in terreno HAT per controllare l'efficienza di tale terreno nel sopprimere le cellule sensibili. Dopo 3-4 giorni dalla fusione, le piastre di controllo erano osservate al microscopio e, se le cellule di mieloma erano morte, nelle piastre sperimentali si sostituivano 100 µl di terreno HAT con 100 µl di terreno arricchito.

Dall'ottavo giorno dalla fusione, i pozzetti positivi per la crescita sono stati osservati giornalmente. I cloni ibridi sono stati testati quando le cellule occupavano tra 1/3 e 2/3 della superficie del pozzetto e, in ogni caso, appena il colore del mezzo virava leggermente. Venivano prelevati sterilmente 100 µl del soprannatante con l'accortezza di non agitare le cellule sul fondo del pozzetto stesso. Il soprannatante è stato testato in immunofluorescenza indiretta.

Clonaggio per «diluizioni limite»

La tecnica di clonaggio per diluizioni limite è il metodo più semplice e più diffuso per la selezione degli ibridomi.

Con un opportuno numero di cellule ibride si operava un clonaggio per diluizioni successive, ovvero nella prima colonna di una piastra da 96 pozzetti sono stati poste in coltura 50 cellule ibride per pozzetto; nella

seconda colonna 25, nella terza 12,5 etc.... Negli ultimi pozzetti, era molto alta la probabilità di trovare una sola cellula ibrida. Nei giorni successivi, le piastre di clonaggio erano osservate al microscopio ed erano presi in considerazione i pozzetti a bassissime densità cellulari iniziali (dalla settima colonna alla dodicesima). Sono stati seguiti attentamente i pozzetti in cui era presente un solo clone evidente, mentre sono stati scartati i pozzetti in cui le cellule erano chiaramente originate da due o più cloni. Quando le cellule avevano raggiunto un'opportuna densità cellulare, il soprannatante di tali pozzetti era saggiato in immunofluorescenza indiretta e, se risultava positivo, l'ibridoma veniva espanso con la metodica già descritta precedentemente, congelato ad un'opportuna densità, e quindi clonato nuovamente con un'altra serie di diluizioni limite. Si analizzavano, di nuovo, in immunofluorescenza indiretta, i soprannatanti provenienti dai pozzetti in cui era evidente la presenza di un solo clone. Se il soprannatante risultava di nuovo positivo, consideravo l'ibridoma monoclonale e quindi lo espandevo attraverso passaggi successivi in piastre da 96 e da 24 (sempre con terreno arricchito e con feeder di macrofagi), ed infine in piastre Petri 10 cm di diametro (solo con terreno arricchito). Una parte dell'ibridoma monoclonale è stato catalogato, etichettato e congelato con le modalità descritte.

Espansione dell'ibridoma *in vitro* e *in vivo*

Per ottenere grandi quantità di anticorpo monoclonale, sono ricorso alla coltura *in vitro* e alla produzione di essudato ascitico.

Quando la densità dell'ibridoma in coltura è al limite e si osservano già i primi segni di sofferenza cellulare (intorno ad una concentrazione di 1.5×10^6 cellule/ml), il soprannatante è prelevato e conservato a 4°C, dopo aver aggiunto come conservante una soluzione di sodioazide ad una concentrazione finale di 0,02% Peso/Volume.

Uno svantaggio dell'utilizzo del soprannatante di coltura è la bassa concentrazione di anticorpi che si può ottenere (5-50 µg/ml). Questo fatto mi ha portato a considerare, come metodo alternativo per la produzione degli anticorpi, l'induzione di fluido ascitico in topi compatibili.

Con tale sistema si possono ottenere concentrazioni di anticorpo fino a 3000 volte maggiori rispetto alla coltura *in vitro*.

10^6 - 10^7 cellule sono state iniettate intraperitonealmente in 5 topi (Balb/c) pretrattati con pristano, un alcano ramificato con una componente di oli minerali, che agisce deprimendo le normali funzioni immunologiche dell'animale (Liddell and Cryer, 1991). L'ibridoma era lasciato crescere per

15 giorni, o almeno fino a quando il gonfiore dell'addome non impediva ai topi stessi di muoversi liberamente. Normalmente il fluido ascitico, raccolto dopo 15 giorni, conteneva 5-15 mg/ml di anticorpo.

Selezione degli anticorpi anti-lente

La selezione del sopranatante proveniente dagli ibridomi, è stata effettuata su sezioni di occhi di larve, fissate allo stadio 55 in liquido di Carnoy ed incluse in paraffina. Le sezioni sono state processate in immunofluorescenza indiretta con un anticorpo secondario coniugato con rodamina.

Nei vetrini di controllo il sopranatante di coltura è stato sostituito con il sopranatante proveniente da un ibridoma noto di altra specificità. La fluorescenza è stata valutata ad un microscopio a fluorescenza Leitz Aristoplan con la composizione di filtri M1. Erano considerate positive solo le sezioni che emanavano una evidente fluorescenza limitata al cristallino (epitelio o fibre). In alcuni casi, l'anticorpo secondario rodaminato è stato sostituito con un anticorpo secondario anti-IG di topo coniugato con perossidasi (AEC, 3-amino-9-ethylcarbazole, come substrato).

Elettroforesi in Gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)

Per la separazione delle proteine, è stato utilizzato un gel di risoluzione (secondo il metodo di Laemmli, 1970) costituito da una soluzione di acrilamide-bis acrilamide con concentrazione finale del 15%, polimerizzato in presenza di un catalizzatore (Persolfato d'Ammonio, 0,05%) e di un iniziatore (Temed, 0,05%), in tampone tris-HCl 1,5 M pH 8.8. Il gel concentratore, al 4% di concentrazione finale, è stato polimerizzato con Temed e Persolfato d'Ammonio in Tris HCl 0.5M a pH 6.8. Il tampone utilizzato per la separazione è il Tris-Glicina a pH 8.3.

Come standards di riferimento per i pesi molecolari, sono stati utilizzati 7 µl dei marker : Gibco BRL Benchmark prestained a largo intervallo di pesi molecolari (10 kDa – 220 kDa) ed il Kaleidoscope Bio Rad ad intervallo di pesi molecolari minore (4 kDa – 39 kDa).

I campioni sono stati diluiti nel tampone riducente, ad una concentrazione finale di circa 0,5 µg/µl e sono stati denaturati facendoli bollire per 4 min e centrifugati 1 min a 14000g. Infine, 10 µl della miscela sono stati posti in pozzetti di 0.75 mm di spessore e 5 mm di larghezza.

I campioni sono stati caricati su due gel simmetrici che migravano contemporaneamente ad amperaggio costante (20 mA per 30 min e, quindi 50 mA per 60 min circa) e al massimo voltaggio.

Una volta terminata la corsa, un gel era colorato con il Blue Coomassie, l'altro invece era trasferito su nitrocellulosa.

Il Kit utilizzato per l'elettroforesi era il «Mini-Protean» della Biorad (Richmond, California, USA).

Western blotting

I sopranatanti di omogenato di lenti erano sottoposti ad elettroforesi. Dopo la corsa elettroforetica, le proteine erano trasferite su nitrocellulosa (Trans-BLOT transfer medium, BioRad) (Towbin et al., 1979). Per tale operazione mi sono avvalso di un apparato di trasferimento Hoefer; il tampone di trasferimento era Tris-metanolo e l'amperaggio era mantenuto costante a 200 mA, per 2 ore circa. Sulla nitrocellulosa erano evidenti i marcatori dei pesi molecolari precolorati (Kaleidoscope o Gibco Benchmark).

I filtri erano incubati per almeno 45 min con una la soluzione bloccante (5% di latte in polvere scremato, 3% di siero normale di capra, in TTBS) (TBS, Tween-20 0,05%). In seguito, erano incubati con l'anticorpo mAbH per 12 ore a 4°C, in leggero stato di agitazione. L'anticorpo è stato usato o come sopranatante di coltura (intero) o come precipitato in solfato d'ammonio (diluito 1:100 in soluzione bloccante).

I filtri erano lavati 3 volte per 15 min in TTBS e quindi incubati per 2 ore a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-immunoglobuline di topo (BioRad, coniugato con la perossidasi), diluito 1:1500 in soluzione bloccante. I filtri erano infine lavati 3 volte in TTBS (15 min) e immersi in una soluzione costituita da 15 mg di 4-cloro-1-naftolo come substrato della perossidasi, 15 ml di metanolo, 25 ml di H₂O distillata, 30 µl di H₂O₂ al 30%. La reazione è stata interrotta immergendo i filtri in H₂O distillata.

Sono stati saggiati in immunofluorescenza indiretta circa 200 sopranatanti provenienti da tale fusione; 5 sopranatanti sono risultati positivi esclusivamente per il cristallino. Le cellule sono state congelate; le cellule di un pozzetto positivo sono state clonate con il metodo della diluizione limite. L'ibridoma selezionato, IgG1 a catene leggere λ, è risultato positivo alla lente sia su sezioni (immunofluorescenza – istochimica), che su Western Blot.

Immunoistochimica

Gli animali sono stati anestetizzati in 1:1000 MS 222 e fissati in liquido di Carnoy. I campioni sono stati disidratati attraverso passaggi successivi in alcool, chiarificati in Histo-Clear (National Diagnostics) inclusi in paraffina e tagliati in sezioni seriate di 7 μm di spessore con un microtomo rotativo Leitz. Le sezioni, dopo essere state idratate, sono state incubate con l'anticorpo monoclonale mAbH. Dopo un'ora di incubazione a temperatura ambiente, i vetrini sono stati sciacquati in PBS/Triton X-100 (0,05%). L'anticorpo secondario (coniugato con rodamina o con perossidasi, utilizzando il 3-ammino-9-etil-carbazolo come substrato) è stato applicato per un'ora.

Le sezioni degli occhi contenenti frammenti di cornea o di epidermide marcati con BrdU sono state prima analizzate per la BrdU e poi per le proteine della lente. Inizialmente, le sezioni sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti-BrdU (Cell proliferation kit, Amersham), rivelato da un anticorpo secondario anti-immunoglobuline di topo coniugato con perossidasi (diamminobenzidina come substrato) e, in seguito, incubate con mAbH e con un anticorpo secondario rodaminante come descritto sopra.

Dopo la reazione immunologica, le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina.

Preparazione della sonda per *pax6*

Il plasmide contenente *pax6*, xPax-6-FLAG\CS2++, (donato da Curtis Altman), dopo trasformazione, è stato amplificato in cellule batteriche competenti XL-1 Blue, estratto e linearizzato mediante digestione con enzimi di restrizione; il plasmide, digerito con EcoRI, è stato trascritto in vitro usando la RNA polimerasi T3 (per la sintesi della sequenza antisenso) e la RNA polimerasi SP6, dopo digestione con XhoI, (per la sintesi della sequenza senso), in presenza di Dig RNA Labeling Mix (Boehringer Mannheim). Dopo aver controllato la sintesi su gel di Agarosio 1%, il mix di reazione è stato trattato con DNase I per 15 min a 37°C, in seguito la DNase I è stata inattivata a 70°C per 15 min; la sonda era precipitata in EtOH assoluto dopo aver aggiunto LiCl alla concentrazione finale 2M. Dopo di che la sonda è stata essiccata e risospesa in Tampone di Ibridazione alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Ibridazione *in situ* su Sezioni (secondo Harland, 1991, metodo modificato)

Gli animali, conservati in EtOH 100%, sono stati chiarificati in Histo-Clear ed inclusi in paraffina. Il capo è stato tagliato in sezioni seriate di 7 µm di spessore.

Le sezioni sono state reidratate con passaggi in EtOH a concentrazione decrescente e trasferite in Tampone Fosfato Salino di Dulbecco più 0.1% Tween-20 (PBSAT). Sono state, quindi, trattate: per 1 min. con proteinasi K (10 µg/ml); Trietanolamina (0,1 M); Trietanolamina (0,1 M) con Anidride Acetica (0.5%). Successivamente sono state sciacquate in PBSAT, fissate di nuovo in formaldeide (4%) e sciacquate in PBSAT per almeno 5 volte. All'ultimo sciacquo in PBSAT è stata aggiunta un'uguale quantità di Tampone di Ibridazione (HB) e, quindi, la soluzione è stata sostituita con HB preriscaldato a 60°C e i vetrini sono stati trasferiti in un fornetto per ibridazione. Dopo almeno 3 ore di preibridazione, l'HB è stato sostituito dalla sonda ad RNA (1 µg/ml) in HB e i vetrini sono stati lasciati in incubazione ON a 60°C.

Il giorno seguente la sonda era rimossa (conservata a -70°C e usata per altre 3 ibridazioni); sempre a 60°C, i vetrini sono stati trattati prima in HB, poi in SSC 2x e quindi in SSC 0.2x; ad RT, sono stati sciacquati in tampone (MAB), a cui successivamente è stato aggiunto il 2% di Boehringer Mannheim Blocking Reagent ed il 20% di Siero di cavallo (soluzione di bloccaggio, 2-3 ore). Successivamente, i campioni sono stati incubati (4°C, ON) con la soluzione di bloccaggio cui è stato aggiunto un anticorpo di capra anti Dig (Boehringer Mannheim), coniugato con fosfatasi alcalina (AP), alla diluizione di 1/2000.

Rimosso l'anticorpo i campioni sono stati trattati, a RT, con MAB e con un tampone per la AP (APB); la AP è stata evidenziata da un suo substrato (BM Purple, Boehringer Mannheim).

Entro 24/48 h, si differenziava la colorazione risultante dalla reazione dell'AP con il BM Purple.

MATERIALE E METODI II

Operazioni

Gli occhi sono stati enucleati da larve di *X. laevis* allo stadio 53. Il terzo anteriore dell'occhio, comprendente l'anello irideo, il corpo ciliare, la retina prossima alla zona del margine ciliare (ZMC) e la lente, è stato eliminato. Dopo aver rimosso la sclera e la coroide con un ago di tungsteno, i frammenti di epitelio pigmentato retinico (RPE) sono stati prelevati dal polo posteriore dell'occhio. In seguito, i frammenti di RPE sono stati impiantati nella camera vitrea di larve ospiti di *X. laevis* allo stadio 53. Dopo aver inciso la cornea esterna e quella interna, la lente è stata aspirata con una micropipetta e il frammento di RPE è stato inserito nella camera vitrea. La lente è stata poi reinserita nel foro pupillare per impedire la fuoriuscita dell'impianto.

Nei controlli, i frammenti di RPE sono stati impiantati nell'orbita enucleata di una larva ospite allo stadio 53.

Da tre a trenta giorni dopo l'impianto, gli animali operati, dopo essere stati anestetizzati in MS222 1:1000, sono stati fissati in liquido di Carnoy. I campioni (gli occhi destri e le orbite enucleate dei controlli) sono stati disidratati attraverso passaggi successivi in EtOH, chiarificati in Histo-Clear (National Diagnostics), inclusi in paraffina e tagliati in sezioni seriate di 7µm di spessore. In alcuni casi, 12 ore prima di essere fissati, gli animali operati sono stati inoculati intraperitonealmente con 2 µl di 5-Bromodeossiurdina (5-BrdU, Cell Proliferation Kit, Amersham).

Istologia

Per le osservazioni istologiche, le sezioni sono state reidratate e colorate con Ematossilina ed Eosina.

Produzione e selezione di mAbHp1

Sono stati utilizzati 4 topi Balb/c di sesso femminile dell'età di 12 settimane circa, immunizzati secondo le procedure indicate in Tabella I (2 topi secondo la procedura A e 2 topi secondo la procedura B).

Per le varie immunizzazioni, è stato utilizzato estratto crudo di retina (1300 µg totali di proteine solubili ed insolubili) proveniente da *Xenopus laevis* adulto.

Sono stati saggiati in immunofluorescenza indiretta circa 300 soprannatanti; 4 soprannatanti sono risultati positivi esclusivamente per la retina neurale. Le cellule sono state congelate; le cellule di un pozzetto positivo sono state clonate con il metodo della diluizione limite. L'ibridoma selezionato, IgGM a catene leggere κ, è risultato positivo alla retina sia su sezioni (immunofluorescenza – istochimica), che su Western Blot.

Immunoistochimica

Per identificare le cellule proliferanti in fase S, le sezioni sono state trattate in accordo con il metodo Amersham. Dopo incubazione con l'anticorpo monoclonale anti-BrdU (Cell Proliferation Kit, Amersham) e la sua rivelazione con un anticorpo secondario anti-topo coniugato con perossidasi (3-ammino-9-etilcarbazzolo come substrato), le sezioni sono state colorate con l'Ematossilina. L'indice di marcatura (IM) è stato ottenuto esaminando, ad un ingrandimento 1000x, tutti i nuclei della parte depigmentata degli impianti su sezioni alterne. L'IM è stato calcolato come percentuale dei nuclei marcati rispetto al numero totale dei nuclei. Per ciascun periodo considerato, il valore medio è stato ottenuto da almeno cinque impianti.

La fase finale del processo di transdifferenziamento è stata seguita utilizzando l'anticorpo monoclonale mAbHp1, preparato nel nostro laboratorio immunizzando i topi con omogenati di retina di *X. laevis*.

Ibridazione *in situ* per *pax6*

L'ibridazione *in situ* è stata compiuta su sezione, come descritto precedentemente a pag. 78.

Clonaggio e analisi dell'espressione del gene *dachshund*

Estrazione di RNA da tessuti

Omogeneizzazione. Omogeneizzare 50-100 mg di tessuto in 1 ml di Trizol.

Separazione delle fasi. Incubare i campioni omogeneizzati per 5' a 15°-30°C per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Aggiungere 0.2 ml di cloroformio per ogni ml di Trizol. Mescolare per 15'' e incubare i campioni a 30°C per 2''. Centrifugare i campioni a 12000 g per 15'' a 4°C. Dopo la centrifugazione, nella provetta si riconoscono tre fasi: una bassa rossa di fenolo cloroformio, un'interfase e una fase acquosa incolore. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa.

Precipitazione dell'RNA. Trasferire la fase acquosa in una nuova provetta e precipitare l'RNA aggiungendo 0,5 ml di isopropanolo per ogni ml di Trizol. Incubare i campioni a 30°C per 10'' e centrifugare a 12000 g per 10'' a 4°C. L'RNA precipitato forma un pellet sul fondo della provetta.

Lavaggio dell'RNA. Rimuovere il soprannatante. Lavare il pellet di RNA con etanolo 75°, aggiungere 1 ml di etanolo 75° per ogni ml di Trizol. Miscelare il campione utilizzando il Vortex e centrifugare a 7500 g per 5'' a 4°C.

Risospensione dell'RNA. Asciugare il pellet di RNA. E' importante che il pellet di RNA non sia completamente asciutto perché questo diminuisce la sua solubilità. Risospendere l'RNA in un opportuno volume di acqua (Rnase-free).

Reazioni di RT- PCR

La RT-PCR è una tecnica che permette di valutare la presenza di uno specifico RNA in una popolazione eterogenea di RNA. Essa consiste nell'associazione di una reazione di retrotrascrizione a partire da una serie di molecole di RNA con una tecnica d'amplificazione di molecole di DNA (PCR). La reazione di retrotrascrizione polimerizza una molecola di RNA a singolo filamento (cDNAss). Il secondo filamento viene sintetizzato nel primo ciclo di PCR grazie ad un oligonucleotide specifico che funziona da innesco per l'enzima DNA polimerasi (Taq).

Protocollo dell'RT (1h e 30 min a 37°C)

RT Buffer 5X	2 μ l
DTT (0.1 M)	2 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
pDN6 (1:5 dello stock 2 μ g/ μ l)	1 μ l
Rnasin	0.2 μ l
Rtase	1 unità per reazione
RNA	500 ng
H ₂ O	Fino a 20 μ l

Protocollo della PCR

PCR Buffer (10x)	5 µl
Oligo 1	1 µl
Oligo 2	1 µl
DNTPs (10mM)	1 µl
RT	/ µl
H ₂ O	Fino a 50 µl
Taq polimerasi	1 unità

Primers

dachshund up: GACTGCACCAAGGCCAGT

dachshund down: GTGGGGCATCATCATAAATG

Prodotti di PCR: 350 e 506 bp (94°C:30"-58°C: 30"- 72°C: 30") 25 cicli

**SMARTII* : AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG

*3' *CDS* : AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀

*5' *CDS*: oligo dT

**UPM*:ATATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAT
CAACGCA

**dach reverse*: GGAGGGATCATCCCAGGAGACA (5' RACE)

**dach forward*: CAGTCTCTCCCTACCCAAGGATC (3' RACE)

* (vedi protocollo PCR-RACE)

dach10 forward: ATGGCTGTGCCAGCCGC

dach2200 reverse: TATGGCAACTTTCAATAAGCCC

Prodotti di PCR: 2034 e 2190 bp (94°C:30"-58°C: 30"-72°C: 2') 25 cicli

259fClal: ACGCGTCGATCGATATGGCTGTGCCAGC
2090rClal: GCAACTTTCAATAAGCCCATCGATCGGGGC
Prodotti di PCR: 1675 e 1831 bp (94°C:30"-56°C: 30"- 72°C: 2') 25 cicli

ODC up: GTCAATGATGGAGTGTATGGATC
ODC down: TCCATTCCGCTCTCCTGAGCAC
Prodotto di PCR: 385 bp (94°C:30"-58°C: 30"- 72°C:30") 25 cicli

Clonaggio di *Xdach*

Utilizzando la similarità di sequenza esistente tra i geni *Dach1* di topo e di pollo, sono stati designati due *primers*: ***dachshund up*** e ***dachshund down***.

L'RT-PCR è stata eseguita su RNA isolati da retine di larve di *X. laevis*. I prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore pDrive (Promega) (Fig. 22) e sequenziati. Le sequenze ottenute sono state utilizzate per designare primers specifici per la RACE 5' e 3': ***dach reverse*** e ***dach forward***.

Il kit SMART RACE della Clontech, consente di ottenere una rapida amplificazione delle estremità 5' e 3' del DNA. Si possono distinguere due fasi: una di sintesi del cDNA e l'altra di amplificazione delle estremità del gene. Nella prima fase, vengono prodotte due distinte popolazioni di cDNA, una che presenta una specifica sequenza di 25 nucleotidi (inserita utilizzando l'oligo ***SMART II***) all'estremità 5', l'altra che presenta la stessa sequenza all'estremità 3' (inserita utilizzando l'oligo ***3' CDS***). Successivamente, vengono amplificate le estremità utilizzando l'oligo ***UPM***, complementare alla sequenza di 25 nucleotidi, posta al 5' di una popolazione di cDNA e al 3' dell'altra, e i due oligo gene-specifici ***dach forward*** e ***dach reverse***. Tali oligo sono designati in modo da ottenere due frammenti con una regione di sovrapposizione e questo consente di ottenere un cDNA intero.

1) Sintesi del cDNA

Preparazione del 5' RACE-cDNA

1-3 µl RNA
1 µl 5'-CDS primer
1 µl SMART II oligo

Preparazione del 3' RACE- cDNA

1-3 µl RNA
1 µl 3'-CDS primer

Aggiungere acqua fino ad un volume finale di 5µl per ogni reazione.
Incubare i tubi a 70 °C per 2 min.
Raffreddare i tubi in ghiaccio per 2 min

Aggiungere ad ogni reazione i seguenti componenti:

2µl 5X First-Strand buffer
1µl DTT (20 mM)
1µl dNTP Mix (10mM)
1µl MMLV trascrittasi inversa (200 units/µl)

Totale Volume 10 µl

Mescolare il contenuto dei tubi
Incubare i tubi a 42 °C per 1 ½ ore
Scaldare i tubi a 72°C per 7 min
Conservare i campioni a -20°C

2) Amplificazione delle estremità

Preparare una Master Mix che può essere usata sia per le reazioni del 5' che del 3' RACE:

34.5 µl PCR-Grade Water
5 µl 10X Advantage 2 PCR Buffer
1 µl dNTP Mix (10mM)
1 µl 50X Advantage 2 Polymè stateose Mix

Totale Volume 41.5 µl

<i>Reazione per il 5' RACE</i>	<i>Reazione del 3' RACE</i>
2.5 µl cDNA 5' RACE	b) 2.5 µl cDNA 3' RACE
5 µl di UPM	c) 5 µl di UPM
1 µl di <i>dach reverse</i>	d) 1 µl di <i>dach forward</i>

3) Ciclo

a) 25 cicli	b) 25 cicli
94 °C 30 sec	94 °C 5 sec
68 °C 30 sec	68 °C 10 sec
72 °C 30 min	72 °C 3 min

Clonaggio dei frammenti dei geni *XdachA* e *XdachB*

I frammenti derivati dalle reazioni di amplificazione sono stati clonati direttamente nel plasmide pDrive mediante il kit pDrive vector system I della Promega.

Tale vettore, nella forma lineare, presenta ad entrambe le estremità un uracile (U), che si appaia alle adenine poste alle estremità degli amplificati. Inoltre, a livello di ciascun lato del sito di clonaggio, il vettore contiene i promotori delle polimerasi SP6 e T7. Questo consente di trascrivere *in vitro* i prodotti di PCR clonati.

La reazione di ligasi viene fatta in un volume totale di 10 µl e lasciata incubare per un'ora e trenta minuti a temperatura ambiente (circa 25°C):

- 3 µl di prodotto di PCR,
- 1 µl di vettore pDrive linearizzato,
- 5 µl di 2x buffer,
- 1 µl T4 Dna ligasi (1U/ µl).

La reazione di ligasi viene usata subito per trasformare le cellule competenti TOP 10.

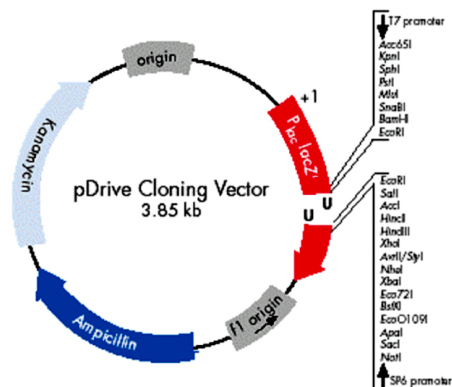


Fig. 22. Mappa del vettore pDrive.

La trasformazione viene fatta aggiungendo 5 μ l di reazione in cui è avvenuta la ligasi ad una aliquota di 50 μ l di cellule competenti, in seguito lasciate incubare 30 minuti in ghiaccio. Successivamente le cellule trasformate vengono poste in un bagno d'acqua alla temperatura di 42°C per 30 secondi, poi in ghiaccio per 2 minuti. Si aggiungono 250 μ l di SOC a temperatura ambiente e si lasciano incubare in un agitatore a 37°C per un'ora. Per ogni reazione di trasformazione vengono piastrati 50 μ l di soluzione contenente le cellule trasformate su piastre LB agar 1%, contenenti 50 μ g/ml di ampicillina, 40 μ l di X-gal (40 mg/ml). Le piastre vengono lasciate incubare tutta la notte a 37°C e successivamente poste a 4°C per lo sviluppo colorimetrico: le colonie bianche derivano da una cellula contenente l'inserto clonato nel plasmide, mentre quelle blu ne sono prive. Non è necessario aggiungere IPTG poiché le cellule competenti non hanno repressore. Nelle colonie bianche l'inserzione del frammento clonato all'interno del plasmide interrompe la reading frame del gene *LacZ α* , che quindi non viene espresso; nelle colonie blu, invece, l'inserto non è presente all'interno del plasmide quindi esprime *LacZ α* .

Clonaggio delle ORF di *XdachA* e *XdachB* nel vettore CS2+

Nel vettore d'espressione CS2+ sono state clonate unicamente le open reading frame (ORF) di *XdachA* e *XdachB*. Per tale scopo le ORF sono state amplificate utilizzando due oligo (**259fClaI** e **2090rClaI**) che presentavano all'estremità i siti di taglio dell'enzima di restrizione ClaI. Successivamente, per creare delle estremità adesive, gli amplificati e il vettore sono stati digeriti con ClaI. I prodotti della digestione sono stati utilizzati nella reazione di ligasi.

La reazione di ligasi viene fatta in un volume totale di 10 µl e lasciata incubare tutta la notte a 4°C:

7 µl di amplificato (ORF di *XdachA* o di *XdachB*) digerito con ClaI ,
1 µl di vettore CS2+ linearizzato con ClaI,
1 µl di 10x buffer,
1 µl T4 Dna ligasi (1U/ µl).

La reazione di ligasi viene usata subito per trasformare le cellule competenti TOP 10.

Miniprep: preparazione di DNA plasmidico su piccola scala.

Per controllare che le colonie cresciute contengano il plasmide ricombinante, si fanno delle preparazioni di DNA plasmidico su piccola scala di un certo numero di colonie.

Le colonie sono fatte crescere in 2ml di LB contenente ampicillina 50mg/ml. Il pellet, dopo centrifugazione a 12000rpm x 1', si risospende in 200µl della soluzione contenente EDTA 10mM, Tris 50mM, pH8.0, con RNase alla concentrazione di 100µg/ml. Successivamente si aggiungono 200 µl della soluzione di lisi (NaOH 200mM, SDS 1%) e si mescola delicatamente invertendo la provetta 5-6 volte. Si incuba a temperatura ambiente per 5' e poi si aggiunge la soluzione di neutralizzazione (KAc 3M, pH5.2) per 5' e si centrifuga a 13000rpm x 10'. Si recupera il supernatante e si estrae il DNA usando la colonna o il Fenolo/Cloroformio risospingendolo in 30 µl di ddH₂O o TE.

Digestioni con endonucleasi di restrizione

I plasmidi contenenti i frammenti del gene in studio sono stati digeriti mediante endonucleasi di restrizione (EcoRI, NOTI, PSTI...) usando 0.5µl di enzima (10U/µl) per 100-300ng di DNA e 2µl dell'apposito buffer (10x) in un volume finale di 20µl. La miscela di reazione e' stata incubata alla temperatura di digestione tipica di ogni enzima per 1 ora. In caso di una doppia digestione, se gli enzimi hanno diverse temperature di reazione, si incuba prima alla temperatura più bassa.

Le digestioni sono state controllate su gel d'agarosio all'1%; i plasmidi contenenti i frammenti della lunghezza attesa sono stati inviati al centro di sequenziamento dell'Università di Padova (CRIBI).

Isolamento di frammenti di acidi nucleici da gel

Per isolare un frammento di DNA da una miscela di bande, ottenute dopo una digestione o dopo una amplificazione in PCR, e' stata effettuata una elettroforesi su gel di agarosio 0,8%-1% e i frammenti di interesse sono stati recuperati mediante estrazione di DNA da gel.

Eluizione mediante colonnina

Il DNA può essere estratto dal gel utilizzando colonne a scambio ionico (Nucleospin). Dopo aver sciolto la banda di gel d'agarosio in un volume opportuno di una soluzione contenente sali caotropici (che favoriscono il legame del DNA alla resina di silicati), alla temperatura di 50°C per 10', si carica la sospensione su una colonnina e si centrifuga a 10000rpm x 1'. Quindi si aggiungono 500µl di soluzione NT2 (soluzione con sali caotropici) e si centrifuga a 13000rpm x 1'. Questo passaggio serve per ottimizzare la rimozione di eventuali inibitori o contaminanti dell'agarosio. Si procede aggiungendo alla colonnina 600µl della soluzione NT3 (contenente etanolo) e si centrifuga nuovamente a 13000rpm x 1', al fine di rimuovere macromolecole solubili e sali. Si ripete l'operazione aggiungendo, questa volta, 200 µl di NT3 e dopo la centrifugazione si lascia evaporare l'etanolo eventualmente rimasto nella colonnina a 70°C per 2-5'. Infine si aggiungono 25-50 µl della soluzione di eluizione NE (Tris/HCl 5mM, pH8.5) e si incuba

a temperatura ambiente per qualche minuto prima di centrifugare a 13000rpm x 1 min. Il DNA rimane così sospeso nella soluzione di eluizione NE.

Ibridazione *in situ*

L'ibridazione *in situ* su sezioni è stata eseguita utilizzando il metodo di Harland (1991), modificato come prima descritto.

Gli animali, embrioni e larve, sono stati fissati in MEMFA per 1hr oppure ON a 4°C e successivamente sono stati disidratati con passaggi in EtOH a concentrazione crescente e conservati in EtOH 100% a -20°C. L'ibridazione *in situ* è stata effettuata o su animale intero "whole mount" o su sezione. L'ibridazione *in situ* "whole mount" è stata effettuata adattando agli animali interi il protocollo dell'ibridazione *in situ* su sezioni.

Preparazione della sonda per *Xdach*

Il plasmide contenente *Xdach*, pDrive, è stato linearizzato mediante digestione con PSTI e trascritto *in vitro* usando la RNA polimerasi SP6 per la sintesi della sequenza antisenso, mentre per la sintesi della sequenza senso pDrive è stato linearizzato con Hind III e trascritto con l'RNA polimerasi T7. Le sonde senso e antisenso sono state sintetizzate in presenza di Dig RNA Labeling Mix (Boehringer Mannheim). Dopo aver controllato la sintesi su gel di Agarosio 1%, il mix di reazione è stato trattato con DNase I per 15 min a 37°C, che è stata inattivata a 70°C per 15 minuti; la sonda è stata precipitata in EtOH assoluto dopo aver aggiunto LiCl alla concentrazione finale 2M. La sonda è stata essiccata e risospesa in Tampone d'Ibridazione alla concentrazione di 1µg/ml.

RISULTATI

Transdifferenziamento lentogeno ed espressione di *pax6*

Specificità dell'anticorpo monoclonale mAbH

Come già descritto in Materiale e Metodi, la selezione dell'anticorpo monoclonale mAbH è stata effettuata in immunofluorescenza indiretta su sezioni di occhi di larve di *Xenopus laevis*, usando come anticorpo secondario un anticorpo anti-immunoglobuline di topo coniugato con rodamina. Tale tecnica rivela l'alta specificità di mAbH nei confronti del cristallino. Si può osservare un'intensa fluorescenza nelle fibre del cristallino; le altre componenti dell'occhio, quali la sclerotica, la cornea esterna, la cornea interna, l'epitelio pigmentato e la retina neurale, sono completamente negative. Come controllo negativo, a mAbH è stato sostituito il sopranatante d'altra specificità, proveniente da una precedente fusione. Dopo immunofluorescenza indiretta con tale anticorpo, il cristallino così come le altre strutture oculari risultavano completamente negative. I risultati in immunofluorescenza sono sovrapponibili ai risultati ottenuti in immunostochimica, dove come anticorpo secondario è stato usato un anticorpo anti-immunoglobuline di topo coniugato con la perossidasi (AEC come substrato) (Fig.23).



Fig. 23. Immunolocalizzazione di mAbH su sezioni di occhio di *X. laevis*, in immunostochimica (A e B) e in immunofluorescenza (C). In B mAbH non reagisce con l'epitelio della lente.

La specificità di mAbH è stata confermata in Western blotting. In Fig. 24, sono mostrati un gel elettroforetico e il rispettivo immunoblot, ibridato con

mAbH (sopranatante di coltura intero), nei quali, nelle corsie **b**, **c**, **d**, compaiono gli estratti solubili di lente, rispettivamente di *Xenopus laevis* larvale (st. 50), di *Xenopus laevis* metamorfosato, e di *Xenopus laevis* adulto e nella corsia **e** estratti di vari tessuti sempre di *Xenopus laevis*. Come si può osservare, mAbH ibridizza positivamente solo con l'estratto solubile di lente, mentre l'estratto solubile proveniente da tessuti diversi dalla lente, anche se caricato nel gel ad alte concentrazioni (fino a 50 µg totali), non presenta mai alcuna reattività con l'anticorpo. Inoltre, mAbH è immunolocalizzato in una banda ben distinta di circa 30 KDa.

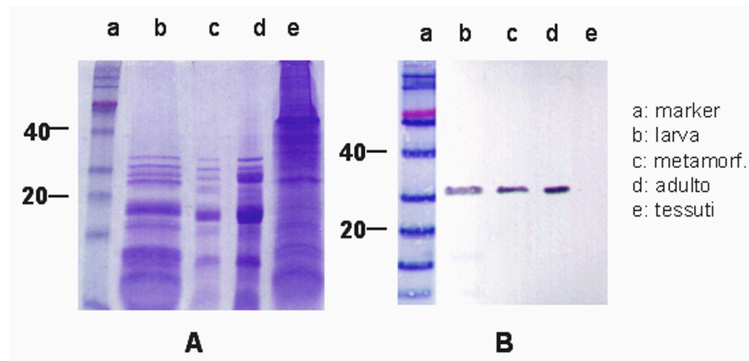


Fig. 24. Gel elettroforetico (**A**) e relativo immunoblot (**B**) (ibridato con mAbH) di estratti di lente (b,c,d) e di altri tessuti (e) di *X. laevis*.

Sempre in Western Blott, estratti di lente di rana e tritone risultano negativi a mAbH. Da tali esperimenti risulta che mAbH reagisce solo con estratti solubili di lente di *Xenopus laevis*.

Risposta all'anticorpo monoclonale mAbH durante lo sviluppo del cristallino

Fino allo stadio 25, l'ectoderma presuntivo e il placode lentogeno sono negativi alla immunoreazione con mAbH. La prima reazione positiva si osserva solo allo stadio 26, in cui è presente una debole immunoreazione a mAbH in alcune cellule situate nella porzione periferica dell'abbozzo lentogeno prospiciente la retina presuntiva e in alcune cellule situate all'interno dell'abbozzo stesso.

Dallo stadio 29-30, appare molto più estesa la positività a mAbH nella massa di cellule centrali e nella parte posteriore dell'abbozzo della lente prospiciente la retina presuntiva (Fig. 25).

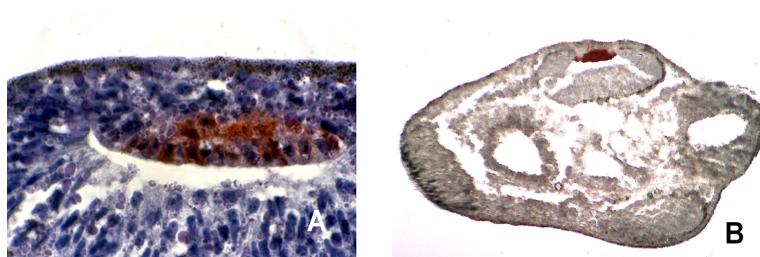


Fig. 25. Ontogenesi del cristallino di *X. laevis* in immunistoichimica con mAbH, st. 27/29.

Negli stadi successivi, la positività si estende alla zona in cui le cellule dell'abbozzo lentogeno si differenziano nelle fibre del nucleo primario.

Dallo stadio 45 in poi, la lente è completamente differenziata essendo costituita oltre che dall'epitelio della lente e dal nucleo primario, anche da fibre secondarie disposte all'esterno del nucleo primario. La positività a mAbH interessa l'intera lente, escluso l'epitelio. Negli stadi larvali successivi e nell'adulto, il quadro immunoreattivo rimane invariato.

Risposta all'anticorpo monoclonale mAbH durante la rigenerazione del cristallino

Nel processo rigenerativo, sia in immunofluorescenza che in immunistoichimica, la prima positività si osserva intorno allo stadio 3 (secondo Freeman, 1963). L'immunoreazione è localizzata in poche cellule di un'area dell'abbozzo della lente più prossima alla retina, dove si svilupperanno le fibre primarie della lente. Con l'ulteriore differenziamento dell'abbozzo lentogeno (stadio 4), sempre più cellule dell'area delle fibre primarie mostrano una immunoreazione positiva, mentre la parte della vescicola lentogena, prossima alla cornea, che darà l'epitelio della lente, permane negativa.

Dallo stadio 5 precoce, allorché cominciano a differenziarsi le fibre secondarie dalla zona equatoriale, sia le fibre primarie organizzate a costituire il nucleo primario, che le fibre secondarie, mostrano una più intensa immunoreazione. Allo stadio 5 tardivo, l'intensità della

immunoreazione a mAbH aumenta nell'area delle fibre sia primarie che secondarie, mentre l'epitelio della lente permane negativo (Fig. 26).

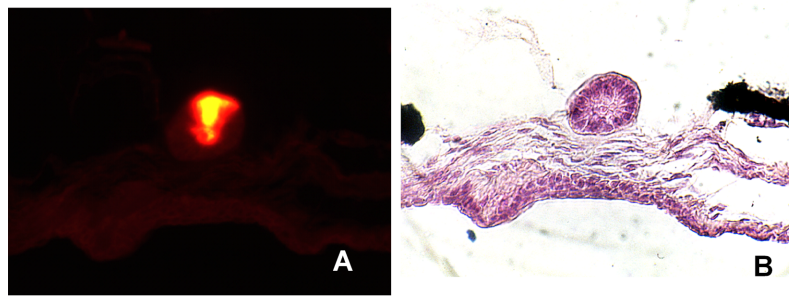


Fig. 26. Rigenerazione del cristallino: immunofluorescenza indiretta con mAbH (A) e corrispondente sezione in ematossilina/eosina (B).

Espressione di *pax6* durante lo sviluppo dell'occhio

In accordo con quanto descritto da Hirsch e Harris (1996) e da altri autori (Mizuno et al., 1999) ho osservato che nell'embrione di *X. laevis*, *pax6* è espresso dallo stadio 28-30 nel cervello anteriore e posteriore e, dopo lo stadio 42, anche nel midollo spinale; invece nel mesencefalo tale gene è inattivo. Il trascritto di *pax6* è presente anche nella retina e nel placode lentogeno. Durante l'ontogenesi, *pax6* modifica il suo quadro d'espressione: nella fasi embrionali tardive il cristallino e la cornea non esprimono più *pax6*, mentre la retina continua ad esprimerlo a livello dello strato nucleare interno, e dello strato delle cellule gangliari. Nei successivi stadi larvali, il trascritto di *pax6*, ad eccezione di una debole positività nel diencefalo e nel cervelletto, è assente nel cervello e nel midollo spinale, mentre permane nella retina neurale.

Il controllo negativo, costituito da una sonda senso per *pax6*, non ha evidenziato alcuna reazione positiva in ibridazione *in situ*.

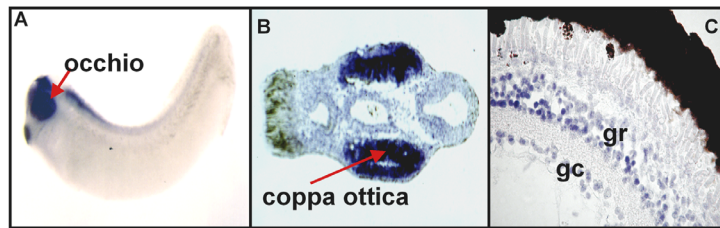


Fig. 27. Ibridazione *in situ*: espressione di *pax6* in un embrione stadio 28 (A), nell'occhio in sviluppo (B) e in quello larvale (C). gc, ganglio cerebrale; gr, ganglio retinico.

Espressione di *pax6* durante la rigenerazione del cristallino

Nel lotto di controllo, costituito da larve sottoposte a semplice lentectomia attraverso il foro pupillare, già dopo un giorno dall'asportazione della lente, la zona della cornea esterna prospiciente il foro pupillare presenta un'accentuata positività alla sonda antisenso per *pax6*. Dopo 3 giorni dall'operazione, la positività alla sonda per *pax6* diviene ben evidente in tutte le cellule della vescicola lentogena allo stadio 3. Nei giorni successivi (dopo il quinto giorno), quando è in corso il differenziamento delle fibre della lente rigenerante (stadio 4), la positività per la sonda per *pax6* diminuisce gradualmente, fino a scomparire a differenziamento ultimato (Fig. 28).

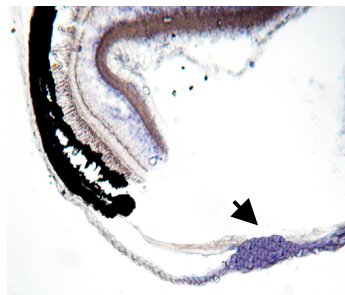


Fig. 28. Ibridazione *in situ* su sezione con sonda antisenso per *pax6*: rigenerazione della lente dalla cornea esterna (3gg). La freccia indica un aggregato sferoidale di cellule della cornea in attiva proliferazione; tali cellule esprimono *pax6*.

Analisi delle interazioni tissutali responsabili del mantenimento della capacità lentogena nell'area lentogenica larvale

Esperimento I: Impianto della cornea esterna di larve donatrici allo st. 50 (controllo positivo)

Nessuno degli impianti fissati subito dopo l'operazione (cinque per l'ibridazione *in situ* con *pax6* cinque per la reazione con mAbH) mostrava un'espressione di *pax6* o una reazione positiva a mAbH.

Ventidue dei venticinque impianti (88%), esaminati in ibridazione *in situ* da uno a cinque giorni dopo l'impianto, esprimevano *pax6*. *pax6* era espresso già 24 ore dopo l'impianto e la sua espressione si manteneva ad alti livelli per almeno 4 giorni dopo l'operazione (fig. 29).

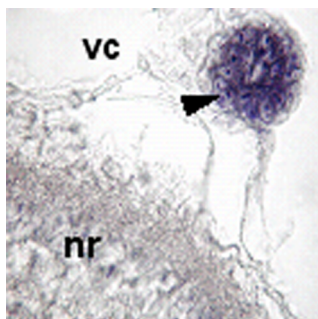


Fig. 29. Ibridazione *in situ* su sezione con sonda antisenso per *pax6*. La freccia indica la porzione dell'impianto che esprime *pax6*. nr, retina neurale; vc, camera vitrea.

Dodici dei 15 impianti (80%), esaminati da 6 a 8 giorni dopo l'operazione, avevano subito una trasformazione lentogena risultando positivi a mAbH. Sei giorni dopo l'operazione, gli impianti formavano una vescicola caratterizzata dalla presenza di uno o più aggregati cellulari. In questi aggregati, era in corso la formazione delle fibre (stadio 4). Otto giorni dopo l'operazione, la maggior parte degli impianti si presentava come dei corpi lentogeni (stadio 5) (Fig. 30, Tab. I).

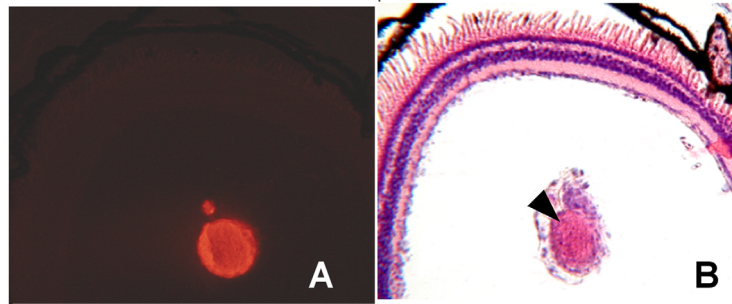


Fig. 30. **A.** Immunofluorescenza con mAbH, l'impianto transdifferenziato in lente è positivo ad mAbH. **B.** Stessa sezione in ematossilina ed eosina (H&E), la freccia indica la regione transdifferenziata dell'impianto.

Esperimento II: Impianto di un frammento di epidermide del fianco di larve allo st. 50 (controllo negativo)

Nessuno degli impianti fissati subito dopo l'operazione (cinque per l'ibridazione *in situ* con *pax6* e cinque per la reazione con mAbH) mostrava un'espressione di *pax6* o una reazione positiva a mAbH.

Nessuno dei venticinque impianti, esaminati in ibridazione *in situ* da uno a cinque giorni dopo l'impianto, esprimeva *pax6* (Fig. 31).

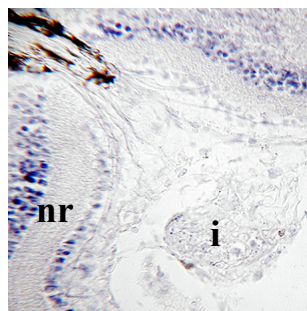


Fig. 31. Ibridazione *in situ* su sezione con sonda antisense per *pax6*. L'impianto non esprime *pax6*. nr, retina neurale; i, impianto.

Nessuno dei 18 impianti, esaminati da 6 a 8 giorni dopo l'operazione, aveva subito una trasformazione lentogena risultando positivo a mAbH (Fig.32) (Tab. I).

In tutti i casi esaminati, l'epidermide si era separata dal derma che appariva dissociato; nella maggior parte dei casi l'epidermide conservava la sua tipica organizzazione epiteliale e spesso formava delle vescicole epiteliali vuote.

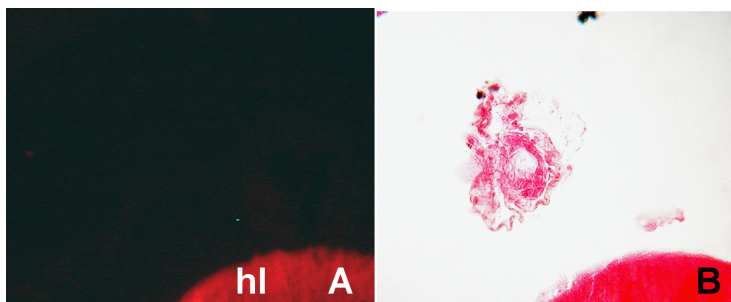


Fig. 32. A. Immunofluorescenza con mAbH, l'impianto non reagisce con mAbH. B. Stessa sezione in ematossilina ed eosina (H&E), la freccia indica l'impianto. hl, lente ospite.

Esperimento III: Impianto di un frammento di epidermide coprente l'orbita di una larva stadio 50, sviluppata da un embrione privato allo stadio 20 della vescicola ottica

Esaminata allo stereomicroscopio, l'epidermide coprente l'orbita di una larva allo stadio 50 non differiva dall'epidermide circostante e presentava alcuni cromatofori.

Sei delle 15 larve, fissate prima di procedere alla rimozione dell'epidermide coprente l'orbita (vedi Materiali e Metodi), presentavano delle lenti libere. In tutti i casi, le lenti libere erano completamente separate dall'epidermide. In tre casi le lenti libere erano ben differenziate, sebbene molto piccole; negli altri tre casi le lenti si presentavano come piccole vescicole lentogene, contenenti poche fibre.

Nessuno degli impianti fissati subito dopo l'operazione (cinque per l'ibridazione *in situ* per *pax6* e cinque per la reazione con mAbH) mostrava un'espressione di *pax6* o una reazione positiva a mAbH.

Venti dei venticinque impianti (80%), esaminati in ibridazione *in situ* da uno a cinque giorni dopo l'impianto, esprimevano *pax6* in modo simile a quanto osservato nell'Esperimento I (Fig. 33).

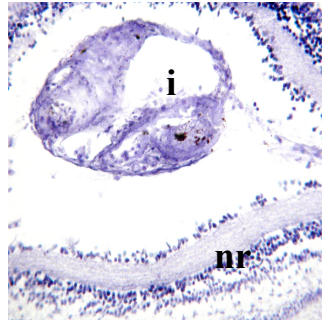


Fig. 33. Ibridazione *in situ* su sezione con sonda antisenso per *pax6*. Tutto l'impianto esprime *pax6*. nr, retina neurale; i, impianto.

Dodici dei 16 impianti (75%), esaminati da 6 a 8 giorni dopo l'operazione, subivano una trasformazione lentogena risultando positivi a mAbH. La trasformazione lentogena avveniva con modalità sovrapponibili a quelle descritte nell'Esperimento I (Fig. 34) (Tab. I).

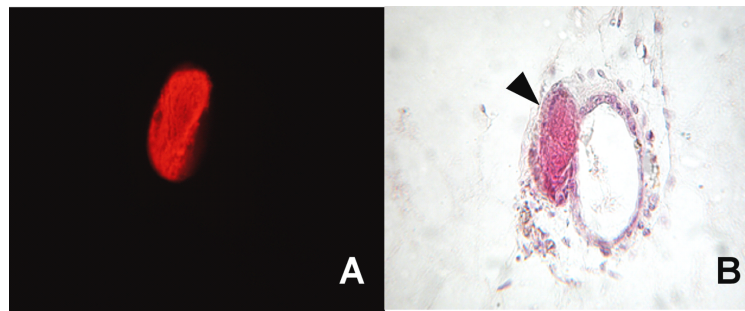


Fig. 34. **A.** Immunofluorescenza con mAbH, una regione dell'impianto è transdifferenziata in lente. **B.** Stessa sezione in ematossilina ed eosina (H&E), la freccia indica la regione transdifferenziata.

Esperimento IV: Impianto di un frammento di epidermide coprente l'orbita di una larva stadio 50, sviluppata da un embrione privato allo stadio 20 della vescicola ottica e del PLE

Esaminata allo stereomicroscopio, l'epidermide coprente l'orbita di una larva allo stadio 50 non differiva dall'epidermide circostante e presentava alcuni cromatofori.

Nessuna delle venti larve fissate prima di procedere alla rimozione dell'epidermide sovrastante l'orbita (vedi Materiali e Metodi) presentava lenti libere.

Nessuno degli impianti fissati subito dopo l'operazione (cinque per l'ibridazione *in situ* per *pax6* e cinque per la reazione con mAbH) mostrava un'espressione di *pax6* o una reazione positiva a mAbH.

Diciotto dei venticinque impianti (72%), esaminati in ibridazione *in situ* da uno a cinque giorni dopo l'impianto, esprimevano *pax6* in modo simile a quanto osservato nell'Esperimento I (Fig. 35).

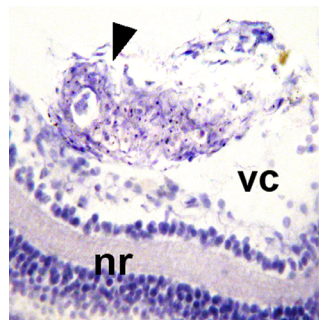


Fig. 35. Ibridazione *in situ* su sezione con sonda antisense per *pax6*. La freccia indica l'impianto. nr, retina neurale; vc, camera vitrea.

Nove dei 15 impianti (60%), esaminati da 6 a 8 giorni dopo l'operazione, subivano una trasformazione lentogena risultando positivi a mAbH. La trasformazione lentogena avveniva con modalità sovrapponibili a quelle descritte nell'Esperimento I (Fig. 36) (Tab. I).

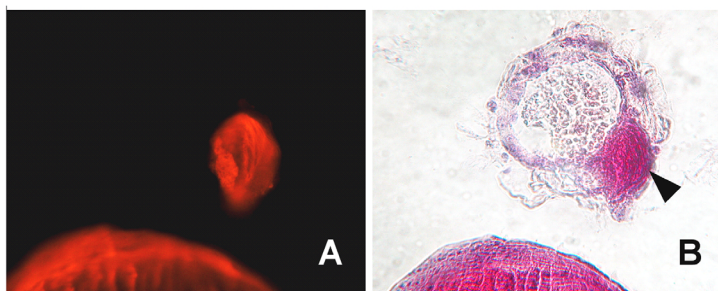


Fig. 36. A. Immunofluorescenza con mAbH, una regione dell'impianto è transdifferenziata in lente. B. Stessa sezione in ematossilina ed eosina (H&E).

Esperimento V: Impianto di un frammento di epidermide del fianco, di una larva allo stadio 50, coprente un occhio trapiantato

Le larve derivano da embrioni in cui allo stadio 26 è stata impiantata, sotto l'ectoderma del fianco, la coppa ottica di un embrione allo stadio 39.

In nessuno dei 20 occhi espianati dagli embrioni stadio 39 e fissati immediatamente dopo l'enucleazione (vedi Materiali e Metodi) erano presenti cellule ectodermiche aderenti.

Esaminata allo stereomicroscopio, l'epidermide del fianco, di una larva allo stadio 50, coprente l'occhio trapiantato era molto simile alla cornea esterna, essendo priva di cromatofori.

Nessuno degli impianti fissati subito dopo l'operazione (cinque per l'ibridazione *in situ* per *pax6* e cinque per la reazione con mAbH) mostrava un'espressione di *pax6* o una reazione positiva a mAbH.

Diciassette dei venticinque impianti (68%), esaminati in ibridazione *in situ* da uno a cinque giorni dopo l'impianto, esprimevano *pax6* in modo simile a quanto osservato nell'Esperimento I (Fig. 37).

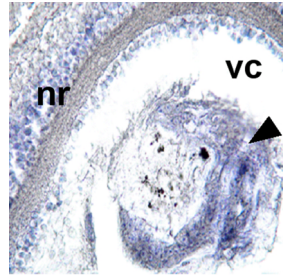


Fig. 37. Ibridazione *in situ* su sezione con sonda antisenso per *pax6*. La freccia indica la porzione dell'impianto che esprime *pax6*. nr, retina neurale; vc, camera vitrea.

Sette dei 16 impianti (44%), esaminati da 6 a 8 giorni dopo l'operazione, subivano una trasformazione lentogena risultando positivi a mAbH. La trasformazione lentogena avveniva con modalità sovrapponibili a quelle descritte nell'Esperimento I (Fig. 38) (Tab. I).

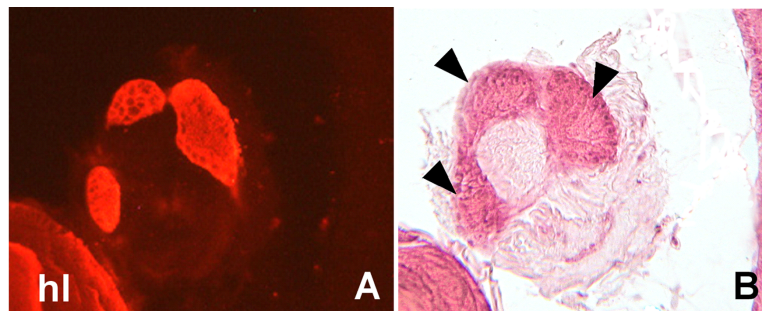


Fig. 38. **A.** Immunofluorescenza con mAbH, un'ampia regione dell'impianto è transdifferenziata in lente. **B.** Stessa sezione in ematossilina ed eosina (H&E).

In alcuni casi degli Esperimenti I, III, IV, e V, gli impianti erano compiuti utilizzando frammenti di cornea o di epidermide prelevati da larve inoculate con BrdU. Dopo 6 giorni dall'operazione, gli impianti risultavano positivi sia a mAbH che all'anticorpo anti-BrdU, rivelando così che la trasformazione lentogena era effettivamente a carico del tessuto impiantato (Fig. 39).

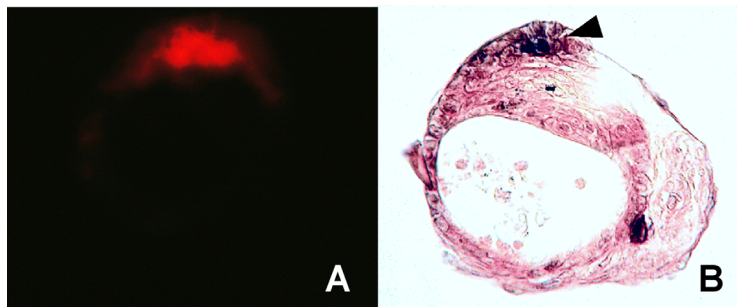


Fig. 39. Impianto di un frammento di epidermide marcato con BrdU. Le immunoreazioni con anti-BrdU e con mAbH dimostrano che la trasformazione lentogena avviene effettivamente a carico del tessuto impiantato. **A.** Immunofluorescenza indiretta con mAbH. **B.** Stessa sezione in ematossilina ed eosina. La porzione transdifferenziata dell'impianto (visibile in A) presenta diversi nuclei BrdU positivi, visibili in B (nuclei neri).

Esp.	Tessuto impiantato	n° di impianti esaminati per		n° di impianti <i>pax6</i> + dopo giorni					n° di impianti mAbH+ dopo giorni		<i>pax6</i> + %	mAbH+ %
		<i>pax6</i>	mAbH	1	2	3	4	5	6	8		
I	Cornea esterna	25	15	5	5	5	5	2	7(st.4) ^a	5(st.5)	88	80
II	Epidermide del fianco	25	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	Epidermide coprente l'orbita dopo rimozione della v.o.	25	16	5	5	5	4	1	6(st.4)	6(st.5)	80	75
IV	Epidermide coprente l'orbita dopo rimozione della v.o. e del PLE	25	15	4	5	4	4	1	5(st.4)	4(st.5)	72	60
V	Epidermide del fianco coprente un occhio trapiantato	25	16	4	4	4	4	1	3(st.4)	4(st.5)	68	44

Tabella I. Espressione di *pax6* e reazione con mAbH nei frammenti di cornea esterna o di epidermide, fissati 1-8 giorni dopo l'impianto nella camera vitrea.

Esperimento VI: analisi della capacità lentogena dell'epidermide della testa e del fianco durante lo sviluppo

Come risulta dalla tabella II, la capacità lentogena dell'epidermide della testa, al di sopra del cervello anteriore, decresce gradualmente, dal 60% allo stadio 24 al 20% allo stadio 44/45, diviene molto bassa allo stadio 46 (5%) e scompare allo stadio larvale 48. Agli stadi 24, 26, 30/31 e 40/41 gli impianti

formano, principalmente, delle lenti ben organizzate con fibre o degli aggregati caratterizzati dalla presenza di cellule della lente e di fibre (lentoidi). Invece, agli stadi 44/45 e 46 la risposta positiva a mAbH era dovuta alla presenza di piccoli aggregati di cellule della lente o di cellule della lente disperse.

La capacità lentogena dell'epidermide del fianco è bassa già allo stadio 24 (13%) e scompare allo stadio 30/31 (Tab. II). La risposta positiva consisteva in piccoli aggregati di cellule della lente o in cellule della lente disperse (Fig. 40).

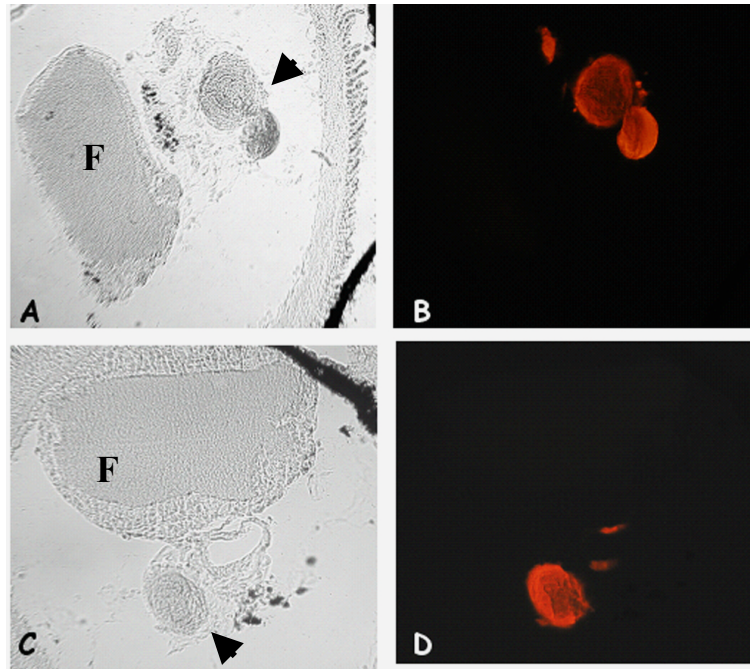


Fig. 40. A-B. Impianto di un frammento di ectoderma della testa (st. 40). A. Immunofluorescenza con mAbH. B. Stessa sezione a contrasto di fase. C-D. Impianto di un frammento di ectoderma del fianco (st. 24). C. Immunofluorescenza con mAbH. D. Stessa sezione a contrasto di fase. F, filtro in Millipore.

stadio	n° di casi esaminati		n° di casi con lenti o lentoidi		n° di casi con cellule della lente		% di trasformazione lentogena	
	testa	fianco	testa	fianco	testa	fianco	testa	fianco
24	15	15	7	0	2	2	60	13
26	15	15	7	0	0	1	47	7
30/31	15	15	5	0	0	0	33	0
40/41	15	15	3	0	1	0	27	0
44/45	15	15	0	0	3	0	20	0
46	20	20	0	0	1	0	5	0
48	20	20	0	0	0	0	0	0

Tabella II. I frammenti di epidermide della testa o del fianco sono stati a) prelevati da embrioni e larve a differenti stadi di sviluppo, b) impiantati nella camera vitrea di una larva ospite stadio 55, c) fissati 7 giorni dopo l'operazione.

Esperimento VII: effetto del trapianto di occhio sotto l'epidermide della testa e del fianco sulla capacità lentogena di queste due regioni.

Nessuno degli impianti di epidermide della testa e del fianco di larve stadio 53/54, sottoposte dallo stadio 40/41 allo stadio 48 al "falso" trapianto di occhio (controlli), subiva una trasformazione lentogena.

Al contrario, gli impianti di epidermide della testa coprente un occhio trapiantato presentavano una trasformazione lentogena in un numero molto alto di casi. L'epidermide era prelevata da larve allo stadio 53/54, sottoposte dallo stadio 40/41 allo stadio 48 ad un autotrapiantato di occhio sotto l'epidermide coprente il cervello anteriore. La percentuale di trasformazione lentogena era del 80% circa quando il trapianto di occhio era compiuto agli stadi 40/41 e 44/45, del 70% quando il trapianto era compiuto allo stadio 46 e del 60% quando era compiuto allo stadio 48. Molte delle risposte positive consistevano in lenti ben organizzate con fibre e/o in lentoidi.

Gli impianti di epidermide del fianco coprente un occhio trapiantato presentavano una trasformazione lentogena in un numero basso di casi (10/15%). L'epidermide era prelevata da larve allo stadio 53/54 sottoposte dallo stadio 40/41 allo stadio 48 ad un autotrapiantato di occhio sotto l'epidermide del fianco. Inoltre, la trasformazione lentogena avveniva solo quando l'occhio era trapiantato negli stadi precoci (40/41 e 44/45). La

risposta positiva era dovuta alla presenza di piccoli aggregati di cellule della lente o di cellule della lente disperse (Fig. 41) (Tab. III).

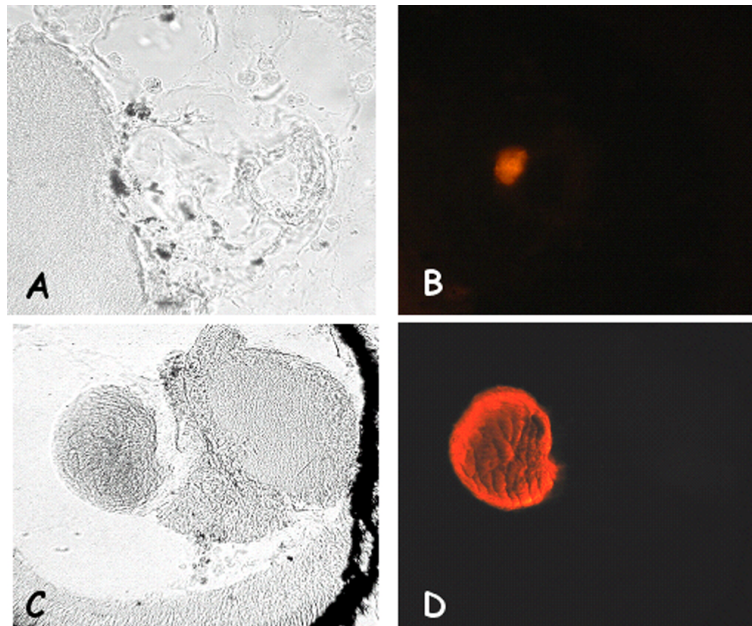


Fig. 41. A-B. Impianto di un frammento di epidermide del fianco sotto cui è stato trapiantato un occhio. A. Immagine a contrasto di fase. B. Immunofluorescenza con mAbH, la fluorescenza è prodotta da un piccolo aggregato di cellule della lente. C-D. Impianto di un frammento di epidermide della testa sotto cui è stato trapiantato un occhio. C. Immagine a contrasto di fase. D. Immunofluorescenza con mAbH.

Stadio	n° di casi esaminati		n° di casi con lenti o lentoidi con fibre		n° di casi con cellule della lente		% di trasformazione lentogena	
	testa	fianco	testa	fianco	testa	fianco	testa	fianco
40/41	15	20	12	2	1	1	87	15
44/45	15	20	11	0	1	2	80	10
46	15	20	10	0	1	0	73	0
48	15	20	8	0	1	0	60	0

Tabella III. Frammenti di epidermide della testa o del fianco coprenti un occhio trapiantato sono stati a) prelevati da larve stadio 53/54, sottoposte all'autotrapianto dell'occhio dallo stadio 40/41 al 48, b) impiantati nella camera vitrea di una larva ospite stadio 55, c) fissati 7 giorni dopo l'operazione.

Esperimento VIII: effetto del trapianto delle componenti dell'occhio sotto l'epidermide della testa.

Quest'effetto è stato studiato su larve allo stadio 46 sottoposte al trapianto di alcune parti dell'occhio sotto l'epidermide della testa. La scelta del sito del trapianto (l'epidermide della testa e non quella del fianco) e dello stadio di sviluppo era giustificata dal fatto che: 1) allo stadio 46 le operazioni sull'occhio sono più semplici che non agli stadi 40/41 e 44/45; 2) allo stadio 46 la competenza lentogena dell'epidermide della testa, sebbene molto bassa, non è completamente persa (questo avviene allo stadio 30/31 nell'epidermide del fianco e allo stadio 48 nell'epidermide della testa); in questo modo era più probabile che si potesse osservare anche un debole effetto promotore da parte dell'occhio trapiantato.

I risultati dimostravano che gli impianti di epidermide della testa coprente un occhio lenticomizzato o privato della retina presentavano una trasformazione lentogena in un'alta percentuale di casi (40-45%). La maggior parte delle risposte positive era dovuta alla presenza di lenti ben organizzate con fibre e/o di lentoidi. Al contrario, nessuno degli impianti di

epidermide della testa coprente un occhio privato sia della lente sia della retina presentava una trasformazione lentogena (Tab. IV).

Trapianto di un occhio privato di	n° di casi esaminati	n° di casi con lenti o lentoidi	n° di casi con cellule della lente	% di trasformazione lentogena
lente	20	8	1	45
retina	15	6	0	40
lente e retina	15	0	0	0

Tabella IV. Frammenti di epidermide della testa coprenti un occhio trapiantato sono stati a) prelevati da larve stadio 53/54, sottoposte all'autotrapianto di un occhio privato di alcune parti allo 46, b) impiantati nella camera vitrea di una larva ospite stadio 55, c) fissati 7 giorni dopo l'operazione.

I risultati ottenuti dall'impianto di epidermide di *X. laevis* nella camera vitrea di un occhio lenticomizzato di una larva di *X. borealis* allo stadio 55 (alcuni casi degli Esperimenti I, II, III) dimostravano che la trasformazione lentogena era a carico del tessuto del donatore. Infatti, le cellule di tutti gli impianti positivi ad mAbH erano cellule di *X. laevis*, poiché i loro nuclei presentavano una fluorescenza uniforme (Fig. 42).

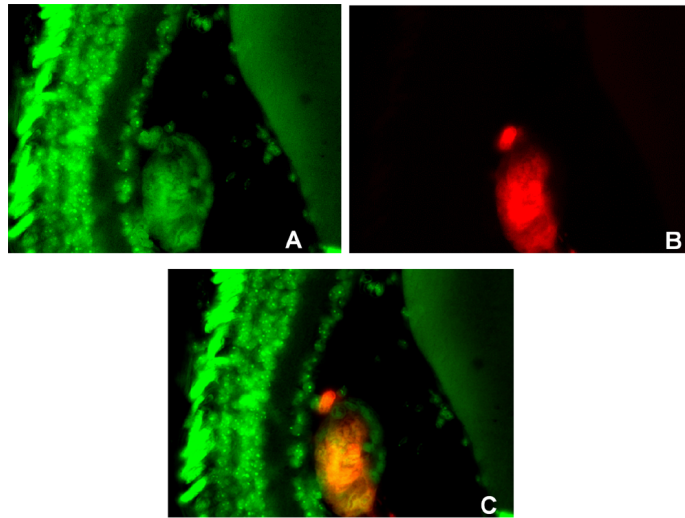


Fig. 42. Impianto di un frammento di epidermide della testa coprente un occhio trapiantato nella camera vitrea di un occhio lentectomizzato di una larva di *X. borealis*. Il donatore di epidermide era una larva di *X. laevis*, sottoposta allo st. 46 al trapianto di un occhio prelevato da una larva di *X. borealis* di pari stadio. Sei giorni dopo l'operazione di impianto, fibre della lente erano presenti nel tessuto impiantato. L'immunoreazione con mAbH (**B**) è stata compiuta su sezioni trattate con quinacrina (**A**). In **A**, i nuclei di *X. borealis* presentano degli "spots" fluorescenti, mentre i nuclei di *X. laevis* presentano una fluorescenza uniforme. **C**. Sovrapposizione delle due fluorescenze.

Analisi della distribuzione della proteina FGFR-2 nell'epidermide della testa e del fianco

L'immunoreazione con l'anticorpo policlonale di coniglio anti-FGFR-2 umano (*bek*), condotta sull'epidermide della testa e del fianco di larve di *X. laevis* stadio 53-54, sottoposte allo stadio 46 all'autotrapianto di occhio e sacrificate 30 giorni dopo, dimostrava che l'occhio trapiantato faceva aumentare notevolmente il livello di FGFR-2 nell'epidermide della testa ma non in quella del fianco. È interessante notare che, il più alto livello di FGFR-2, simile al livello della cornea, era osservato nella porzione dell'epidermide della testa posta di fronte al foro pupillare dell'occhio trapiantato (Fig. 43).

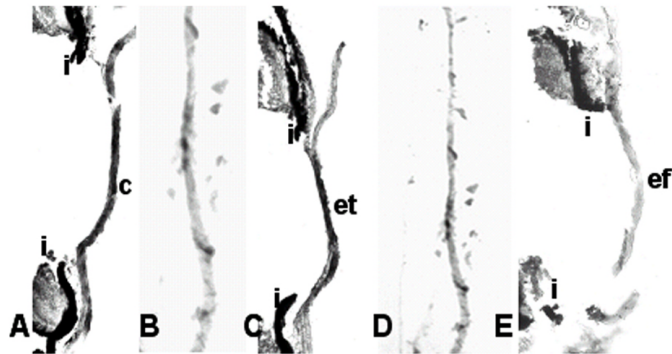


Fig. 43. Analisi in immunistochemica della proteina FGFR-2. **A.** Occhio stadio 53. **B.** Epidermide della testa stadio 53. **C.** Epidermide della testa, stadio 53, coprente un occhio trapiantato allo stadio 46. **D.** Epidermide del fianco. **E.** Epidermide del fianco, stadio 53, coprente un occhio trapiantato allo stadio 46. L'occhio trapiantato aumenta i livelli di FGFR-2 nell'epidermide della testa posta di fronte al foro pupillare. c., cornea; i, iride; et, epidermide della testa; ef, epidermide del fianco. Gli spots neri in **B** e **D** sono cromatofori.

Transdifferenziamento retinogeno ed espressione di *pax6*

Specificità di HP1

Come già descritto in materiali e metodi, la selezione dell'anticorpo monoclonale HP1 è stata effettuata in immunofluorescenza indiretta su sezioni di occhio di larve di *Xenopus laevis*, usando come secondario un anticorpo anti-immunoglobuline di topo coniugato con rodamina (Fig. 44); a volte, come secondario, è stato utilizzato un anticorpo anti-immunoglobuline di topo coniugato con perossidasi e l'AEC come substrato; le due tecniche hanno dato risultati sovrapponibili.

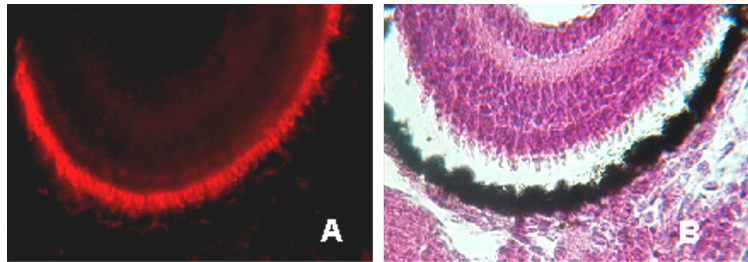


Fig. 44. Sezione di retina di larva di *X. laevis*. **A.** Immunofluorescenza indiretta con mAbHp1. **B.** Stessa sezione in ematossilina ed eosina.

Le immunoreazioni evidenziano l'alta specificità di HP1 nei confronti della matrice che ricopre i segmenti esterni dei fotorecettori (IPM); gli altri strati retinici e tutte le altre strutture dell'occhio sono completamente negativi. L'analisi al TEM (microscopio elettronico a trasmissione), dopo immuno-oromarcatura, ha dimostrato che la glicoproteina riconosciuta è localizzata nella matrice extracellulare della retina (Fig. 45).

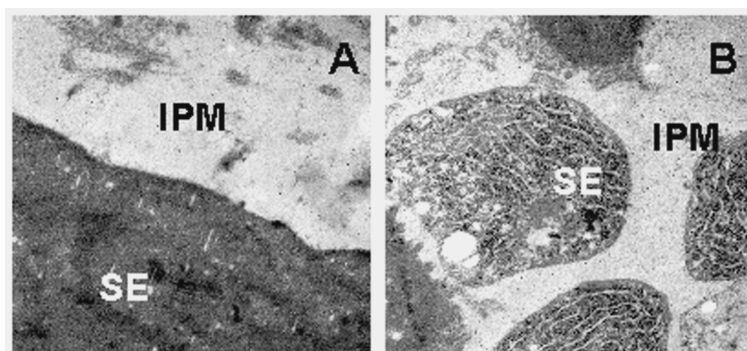


Fig. 45. Immuno-oromarcatura con mAbHP1 su sezione longitudinale (A) e trasversale (B) di retina di *X. laevis* larvale a livello dei segmenti esterni dei fotorecettori. IPM: matrice dei fotorecettori; SE: segmenti esterni.

Come controllo negativo, è stato utilizzando un sopranatante d'altra specificità, proveniente da una precedente fusione. Dopo immunoreazione con questo anticorpo, la matrice extracellulare dei fotorecettori risultava completamente negativa.

Inoltre, HP1 marca fortemente la matrice dei fotorecettori dell'occhio pineale (Fig. 46). Nello *Xenopus* e negli Anuri la lamina dorsale della regione diencefalica rimane per buona parte sottile e forma con la pia madre la tela coroidea. Questa tela dà vita ad una plica, chiamata velo trasverso, che si prende come limite tra telencefalo e diencefalo. Dietro il velo trasverso, la tela coroidea forma una dilatazione vescicolosa, il sacco dorsale, e più indietro due estroflessioni ependimali, una dietro l'altra, che costituiscono due organi di senso rudimentali: l'organo parietale anteriore e quello posteriore. In *Xenopus* l'organo parietale anteriore è appena abbozzato, mentre il posteriore si differenzia in una struttura piuttosto complessa: la parte prossimale costituisce l'epifisi, struttura cava comunicante con il III ventricolo; la parte distale dà l'organo pineale (o occhio frontale), che si fa sottocutaneo ed in cui è presente una cavità. In tale cavità sporgono gli apici di cellule sensoriali fotorecettive, destinate a degenerare nell'adulto. Durante la vita larvale, l'organo pineale ha sicuramente una funzione fotorecettiva. Ricerche sperimentali condotte su *Xenopus*, dimostrano che i fotorecettori della pineale contengono pigmento visivo e sono in grado di reagire agli stimoli luminosi (Vigh et al., 1998;

Ekstrom and Messel, 1990). Non stupisce perciò che HP1 reagisca positivamente con la matrice extracellulare della ghiandola pineale.

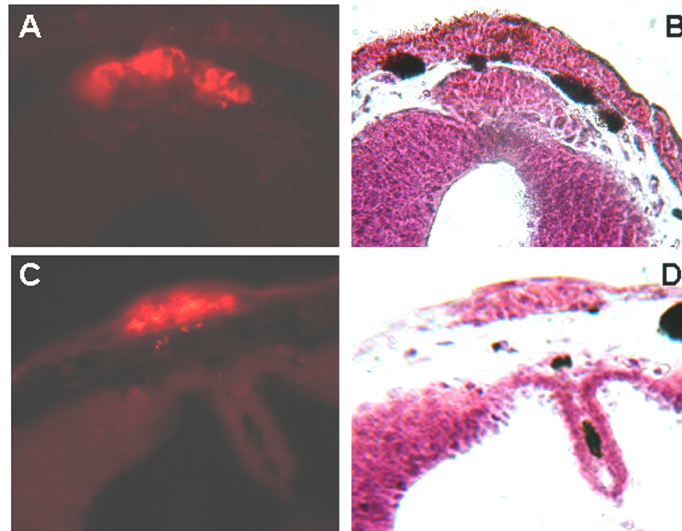


Fig. 46. Sezioni di epifisi embrionale (A,B) e larvale (C,D) di *Xenopus laevis*. A,C. Immunofluorescenza indiretta. B, D. Stesse sezioni in ematossilina ed eosina.

La specificità di mAbHP1 è stata confermata in Western Blotting. HP1 ibridizza positivamente sia con l'estratto di retina di *X. laevis* larvale digerito con l'enzima N-glicosidasi-F (tale enzima taglia gli zuccheri legati ai residui di azoto delle catene laterali degli aminoacidi) sia con l'estratto non digerito con N-glicosidasi-F; negli estratti non trattati con la glicosidasi, HP1 riconosce una proteina di circa 200 kDa, mentre negli estratti trattati con l'enzima compare una nuova banda di circa 150 kDa (dati non mostrati).

HP1 reagisce solo con estratti di retine di *X. laevis*, come confermato dai saggi ELISA, condotti su estratti di diversi tessuti di *Xenopus* ed estratti di retina di coniglio.

Risposta a mAbHP1 durante lo sviluppo della retina

Fino allo stadio 28, lo strato interno della coppa ottica, che darà la retina neurale, è negativo alla immunoreazione con HP1. La prima reazione positiva si osserva solo allo stadio 37, quando è presente una debole immunoreazione a HP1 in un sottile strato monocellulare dell'abbozzo della retina, proprio dove i segmenti esterni dei coni e bastoncelli iniziano il loro differenziamento. Dallo stadio 38 la positività ad HP1 appare molto più estesa nella massa di cellule che formeranno lo strato dei coni e dei bastoncelli, ancora prima però che si formi il segmento esterno. Negli stadi successivi, la positività aumenta con l'aumentare della lunghezza del segmento esterno dei fotorecettori, nello spazio compreso tra i fotorecettori ed il tappeto nero. Dallo stadio 45 in poi, la retina è completamente differenziata e la positività ad HP1 interessa tutta la matrice extracellulare, che va dalla base all'estremità dei segmenti esterni dei coni e bastoncelli (Fig. 47). Negli stadi larvali successivi e nell'adulto, il quadro immunoreattivo rimane invariato.

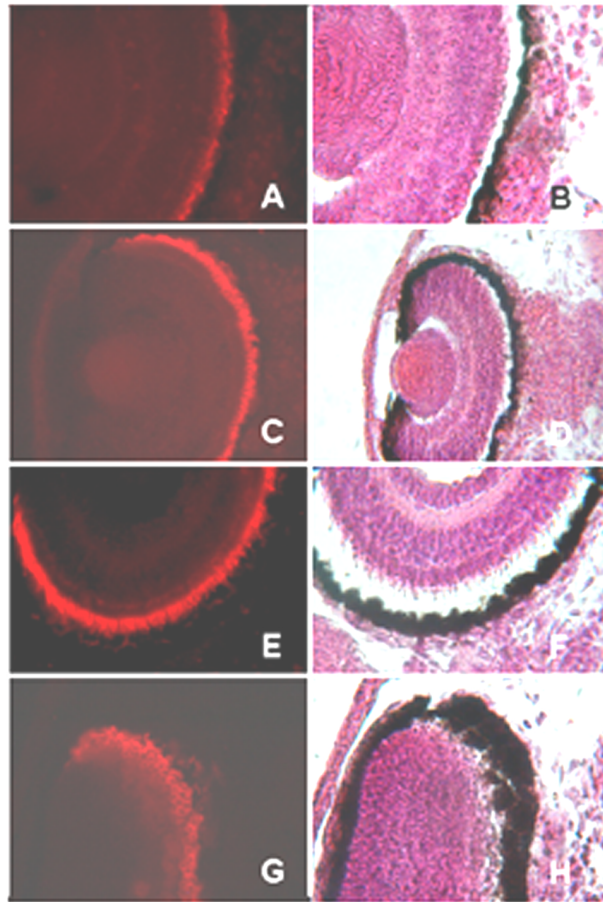


Fig. 47. Immunofluorescenza indiretta con mAbHP1 (A, C, E, G) e relative immagini in H&E (B, D, F, H) su sezioni di occhio di embrione di *X. laevis* a vari stadi di sviluppo. A-B #37; C-D #40; E-F #42; G-H #40, sezione trasversale dei fotorecettori.

Espressione di *pax6* durante lo sviluppo della retina

In accordo con le osservazioni di Hirsch ed Harris (1997) e di Zygar et al. (1998), ho osservato che, a partire dallo stadio embrionale 28, *pax6* è ugualmente espresso nella retina (NR) e nell'epitelio pigmentato retinico (RPE) presuntivi. Inoltre, dallo stadio 29/30, quando le cellule del RPE

iniziano a sintetizzare il pigmento, l'RPE non esprimeva più *pax6*. Dallo stadio 42, nella retina neurale l'espressione di *pax6* era confinata agli strati del ganglio cerebrale e del ganglio retinico (Fig. 27).

Analisi del processo di transdifferenziamento retinogeno

Nessuno dei frammenti di RPE impiantati nell'orbita enucleata (controlli) transdifferenziava in retina. Le cellule dell'RPE rimanevano densamente pigmentate e non incorporavano BrdU.

Al contrario, la maggior parte (circa il 70%) dei frammenti di RPE impiantati nella camera vitrea transdifferenziava in retina neurale attraverso i processi di depigmentazione, proliferazione e differenziamento. Tre giorni dopo l'operazione, le cellule degli impianti iniziavano a perdere il pigmento e dopo 5 giorni erano evidenti i primi aggregati di cellule depigmentate. L'inizio della replicazione del DNA si osservava negli impianti a partire dal quarto giorno dall'operazione. Tra i 10 e 15 giorni dall'operazione, la maggior parte degli impianti presentava un'ampia regione costituita da cellule depigmentate, ben separata dalla parte pigmentata. In queste regioni, 10 giorni dopo l'impianto, l'indice di marcatura era del 43%, e del 26%, 15 giorni dopo l'impianto (Fig. 48).

Tra i 15 e i 20 giorni dopo l'operazione, iniziava il differenziamento istologico nella parte depigmentata degli impianti. Tra i 25 e i 30, la retina neoformata era completamente differenziata. Il processo di differenziamento interessava prima lo strato delle cellule gangliari (GC) e lo strato nucleare interno (IN); in seguito, lo strato nucleare esterno (ON), che contiene i fotorecettori. Nella maggior parte dei casi, gli impianti apparivano come strutture polarizzate: la parte anteriore dell'impianto rivolta verso la lente era intensamente pigmentata, mentre la parte posteriore, rivolta verso la retina dell'ospite, era trasformata in una retina neurale laminare. Gli strati retinici erano organizzati in maniera tale che lo strato delle cellule gangliari della retina neoformata era adiacente allo strato delle cellule gangliari della retina dell'ospite, mentre lo strato dei fotorecettori era di fronte alla parte pigmentata dell'impianto. Questo tipo di transdifferenziamento degli impianti avveniva in 14 casi sui 20 (70%) esaminati dopo 25-30 giorni dall'operazione. Nei restanti 6 casi, gli impianti erano ridotti di dimensione e apparivano come un piccolo gruppo di cellule pigmentate o come cellule pigmentate disperse. In 9 dei 14 casi positivi, la parte pigmentata dell'impianto e la retina neoformata erano separate da una cavità cosicché gli

impianti si presentavano come dei piccoli “occhi invertiti”, in cui lo strato nucleare esterno delimitava la cavità interna dell’impianto.

Durante il periodo di differenziamento, l’attività proliferativa degli impianti gradualmente decresceva. Venti giorni dopo l’impianto, l’indice di marcatura era del 13%, mentre 30 giorni dopo l’impianto le cellule proliferanti erano presenti solo nel margine periferico della retina neoformata. In questa regione, non era osservabile nessuna evidente organizzazione in strati, così come nella zona mitoticamente attiva del margine ciliare (ZCM) dell’occhio normale.

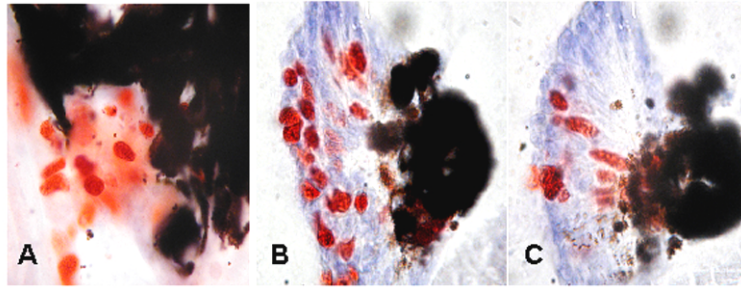


Fig. 48. Cellule BrdU-positive (rosse) presenti nei frammenti di RPE fissati 10 (A), 15 (B) e 20 (C) giorni dopo l’impianto nella camera vitrea.

I frammenti di RPE impiantati nell’orbita enucleata non esprimevano *pax6*.

Nonostante il tappeto nero cominci a depigmentarsi dopo 5 giorni dall’operazione, negli impianti di RPE la prima espressione di *pax6* era rilevabile solo 15 giorni dopo l’operazione, in piccoli aggregati cellulari depigmentati. Il livello di espressione aumentava notevolmente dopo 20 giorni. Un cambiamento nel quadro d’espressione di *pax6* nella retina in formazione diveniva evidente 25 giorni dopo l’operazione, quando la gran parte delle cellule dell’impianto cessava di dividersi e si organizzava a formare le tre *laminae* retiniche (Fig. 49).

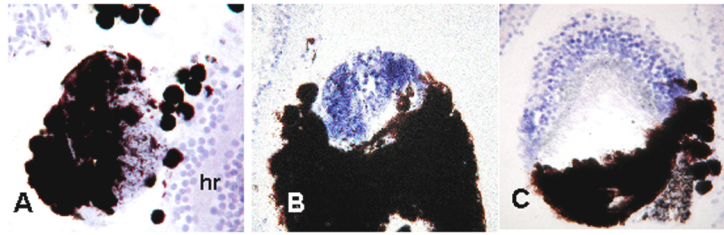


Fig. 49. Espressione di *pax6* (in ibridazione *in situ*) nei frammenti di RPE fissati 15 (A), 20 (B) e 25 giorni (C) dopo l'impianto nella camera vitrea.

Negli impianti di RPE nella camera vitrea, la prima reazione positiva all'anticorpo si osservava dopo 20 giorni dall'operazione; il rigenerato non presentava ancora la fine architettura retinica, ed i segmenti esterni non erano ancora morfologicamente distinguibili. La positività ad HP1 era segno evidente che l'IPM aveva cominciato ad organizzarsi intorno agli abbozzi dei segmenti esterni ancora in fase di sviluppo. Dopo 25 giorni, quando la morfologia retinica dell'impianto transdifferenziato cominciava ad apparire più evidente, la positività all'anticorpo si estendeva sullo strato ora ben delineato, che ricopriva i segmenti esterni dei fotorecettori.

In impianti di 30 giorni, quando gli impianti mostravano una morfologia del tutto analoga a quella di una retina completa, la positività all'anticorpo era sovrapponibile a quella osservabile nella retina dell'ospite, segno che l'IPM si era rigenerata ed organizzata nuovamente tra i fotorecettori ed il tappeto nero (Fig. 50).

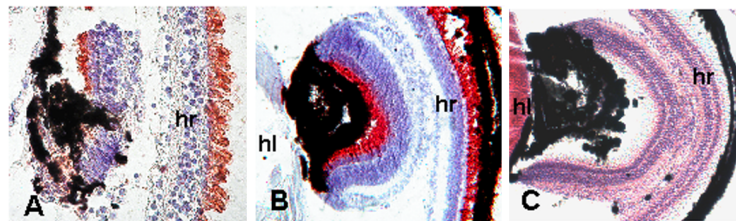


Fig. 50. A,B. Reazione di mAbHP1 (in rosso) nello strato nucleare esterno neoformato di frammenti di RPE transdifferenziati, fissati 20 e 30 giorni dopo l'impianto nella camera vitrea. C. Retina neoformata per transdifferenziamento di un frammento di RPE fissato 30 giorni dopo l'impianto nella camera vitrea (colorazione in ematossilina ed eosina). Solamente la parte dell'impianto rivolta verso la retina neurale dell'ospite transdifferenzia in retina. La parte dell'impianto adiacente alla lente dell'ospite conserva il fenotipo RPE.

Espressione di *Xdach* durante lo sviluppo

Per clonare il gene *dachshund* in *Xenopus* ho utilizzato la “Rapid Amplification of cDNA Ends” (RACE); tale tecnica è una PCR che consente di amplificare sequenze nucleotidiche comprese tra una regione interna nota e l'estremità (5' o 3') del gene di interesse.

Per designare i due oligonucleotidi da utilizzare come primers interni, ho confrontato le sequenze dei geni *dachshund* di *Drosophila*, pesce zebra, pollo, topo e uomo con il programma ClustalW alignment; inoltre, tale programma è in grado di creare alberi filogenetici radicati, calcolati tramite l'algoritmo di *neighbour-joining clustering*, in cui la lunghezza di ogni ramo è proporzionale alla distanza evolutiva. In base a questo confronto ho messo in evidenza numerose regioni che presentavano un'elevata similarità di sequenza nucleotidica; due di queste regioni, di circa 20 nucleotidi e localizzate in prossimità del DACHbox-N, erano identiche nel topo, nel pollo e nel pesce zebra. Tali sequenze nucleotidiche sono state utilizzate per designare i due *primers*, chiamati *dachshund up* e *dachshund down*. L'efficacia di questi primers è stata valutata in RT-PCR, eseguita su RNA totale isolato da omogenati di retine larvali di *X. laevis*, tessuto in cui *dachshund* è espresso ad alti livelli negli altri Vertebrati. Tale PCR ha prodotto due amplificati, come evidenziato dalla corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1%; i prodotti di PCR ottenuti sono stati clonati e sequenziati. I due cDNA, lunghi rispettivamente 350 e 506 nucleotidi (Fig. 51), avevano, come atteso, un'alta similarità di sequenza con la regione localizzata in prossimità del DACHbox-N del gene *dach* del topo e del pollo; quindi ho designato i primers specifici, *dach forward* e *dach reverse*, per la RACE 5' e 3' scegliendoli all'interno delle sequenze dei due cDNA precedentemente sequenziati.

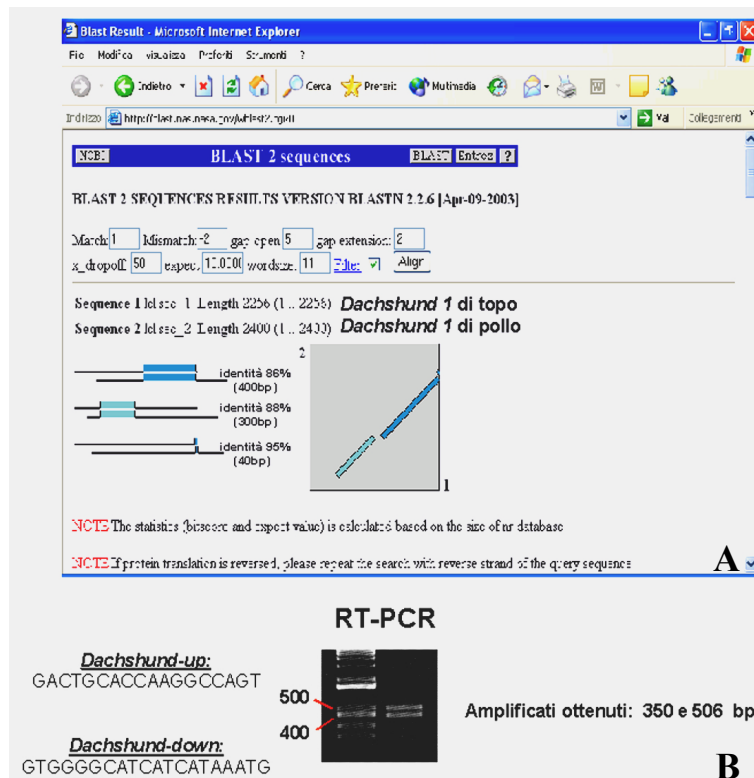


Fig. 51. A. Confronto tra le sequenze dei geni *dachshund 1* di topo e di pollo. B. RT-PCR.

Per la PCR-RACE ho utilizzato il kit SMART RACE della Clontech, che prevede una prima fase di sintesi di cDNA in seguito a retrotrascrizione e una seconda fase di amplificazione delle estremità del gene. Nella prima fase, vengono prodotte due distinte popolazioni di cDNA, una che presenta una specifica sequenza di 25 nucleotidi (inserita utilizzando l'oligo **SMART II**) all'estremità 5', l'altra che presenta la stessa sequenza all'estremità 3' (inserita utilizzando l'oligo **3' CDS**). Successivamente, si amplificano le estremità del gene che si vuole clonare utilizzando l'oligo **UPM** (universal primer mix, presente nel kit), complementare alla specifica sequenza di 25 nucleotidi, posta al 5' di una popolazione di cDNA e al 3' dell'altra, e i due oligo gene-specifici *dach forward* e *dach reverse* precedentemente designati.

Nella 5' PCR-RACE, i primer *dach reverse* e *UPM* consentono di produrre un frammento di 927 nucleotidi, mentre i primer *dach forward* e *UPM*, utilizzati nella 3' PCR-RACE, amplificano due frammenti di 1346 e di 1190 nucleotidi. Il prodotto di PCR ottenuto nella 5'-RACE presentava una regione di sovrapposizione con i prodotti di PCR della 3'-RACE e sfruttando la presenza di tale regione è stato possibile dedurre le sequenze di due cDNA di 2273 e di 2117 pb. Successivamente, è stato possibile amplificare i due cDNA "full-length" utilizzando due primers localizzati, uno in prossimità del 5' (*dach 10 forward*) e l'altro in prossimità del 3' (*dach 2200 reverse*).

I prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore pDrive. Le sequenze dei due cloni sono state depositate in banca dati (EMBL) con il nome di *XdachA* (ac: AJ555469) e *XdachB* (ac: AJ555540); il primo contiene una "open reading frame" (ORF) che si estende dal nucleotide 259 al 2088 e codifica per una proteina di 610 amminoacidi, il secondo è caratterizzato da una ORF che va dal nucleotide 259 al 1932 e codifica per una proteina di 558 amminoacidi. *XdachA* e *XdachB* hanno una sequenza identica, fatta eccezione per una regione di 156 nucleotidi, assente in *XdachB*. Anche in altri Vertebrati, sono presenti più forme del gene *Dach* (*Dach1* e *Dach2* nel topo e nel pollo, *DachA*, *DachB* e *DachC* nel pesce zebra), e come *XdachA* e *XdachB* sono caratterizzate da una notevole similarità di sequenza.

Il confronto con le sequenze amminoacidiche delle proteine Dach degli altri Vertebrati, compiuto con il programma ClustalW alignment, evidenzia che le proteine putative codificate dai due cDNA di *Xenopus* presentano un'elevata similarità con le proteine codificate dai geni *Dach1* di topo (circa 70%) e di pollo (circa 60%), e una bassa similarità con le proteine dac di *Drosophila* (circa 30%) e di *Zebrafish* (circa il 50%). Le proteine della famiglia dachshund sono proteine nucleari che contengono due domini conservati chiamati DACHbox-N, in quanto localizzato in prossimità dell'estremità amino-terminale, e DACHbox-C localizzato in prossimità dell'estremità carbossi-terminale; il DACHbox-N contiene un dominio di legame al DNA, avente una struttura α/β compatta (Kim et al., 2002), mentre il DACHbox-C, caratterizzato dalla presenza di α -eliche ad avvolgimento-avvolto, media l'interazione con altre proteine. Le due proteine DACH di *Xenopus* presentano un'elevata similarità (circa il 95%) a livello del DACHbox-N con le proteine DACH conosciute, (Fig. 52) e una bassa similarità (circa il 30%) a livello del DACHbox-C. Per compiere test funzionali, che prevedono l'inattivazione o la sovraespressione, ho clonato i geni *XdachA* e *XdachB* nel vettore di espressione CS2+.

```

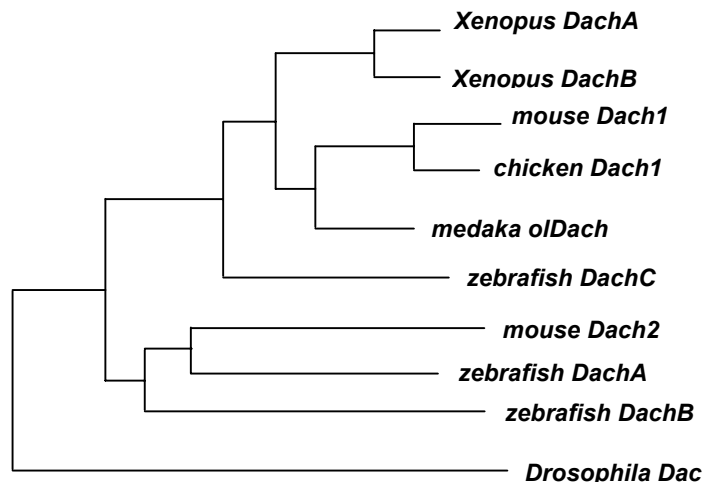
Xenopus DachA -----LPGKPVYSTPSPVENIQNNECRMVELRGAKVASFTVETCELICL
Xenopus DachB -----LPGKPVYSTPSPVENIQNNECRMVELRGAKVASFTVETCELICL
murine Dach1 -----SCGPLPGKPVYSTPSPVENTPQNNECKMVDLRGAKVASFTVEGCELI
chicken Dach1 -----LPGKPVYSTPSPVENTPQNNECKMVDLRGAKVASFTVEGCELI
medaka olDach -----AKPVYATASPVESTPQNNECKLVEVKGAKLASFTVKDRELI
zebrafish DachC -----LPHKPVYSTPSPVENTPQNNECKMVEVRGAKLASFTVNGNELICL
murine Dach2 -----TNTNECRMVDMHGKVASFLMDGQELICL
zebrafish DachA -----VHNNECKMVEVHGKVASFTVDGQELICL
zebrafish DachB -----TTNECKIVEVHGKVASFSVDGQELICL
Drosophila dac HHASPLELMAAAHHVPPRSYNSPPPISDPSANECKLVEYRGQKVAAFIISNETMLCL
                    *****

Xenopus DachA PQAFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEISPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
Xenopus DachB PQAFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEISPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
murine Dach1 PQAFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEITPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
chicken Dach1 PQAFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEITPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
medaka olDach PQAFDVFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEITPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKG
zebrafish DachC LQAFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEITPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
murine Dach2 PQVFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEISPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
zebrafish DachA PQVFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEICPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
zebrafish DachB PQVFDLFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEINPVVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISRKD
Drosophila dac PQAPELFLKHLVGGGLHTVYTKLKRLEIVPLVVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLISCKD
                    * * * * *

Xenopus DachA FETLYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTQSVTSSDNPHIMPH-----
Xenopus DachB FETLYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTQSVTSSDNPHIMPH-----
murine Dach1 FETLYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTQSVTSPENSHIMPH-----
chicken Dach1 FETLYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTQSVTSPENSHIMPH-----
medaka olDach FETLYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTQSVTSTENPHIMPH-----
zebrafish DachC FEVLYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTQNVTSPPDSPHVLP-----
murine Dach2 FETLFDCTNARKRQM---TRKQAVNSSRPGRPPKRTSLG-VLQDNARLLPH-----
zebrafish DachA FETLYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTSLGVAMQDSRRLPH-----
zebrafish DachB FEALYNDCTNA-----SSRPGRPPKRTSYGASVQESPRILHH-----
Drosophila dac FDILYRDCTTARCLSIKPPESNSLQFRSSRPGRPPKRTGVPVGLSLPPTHLGQHPQLKXHL
                    * * * * *

```

A



B

Fig. 52. Confronto delle sequenze aminoacidiche del Dachbox-N (A). Relazioni filogenetiche tra i geni dach conosciuti (B).

Analisi dell'espressione genica

Ho analizzato l'espressione dei geni *dach* in ibridazione *in situ* e in RT-PCR sia su embrioni (dallo stadio 12 allo stadio 34) (Nieuwkoop e Faber, 1956) che su larve (dallo stadio 50 allo stadio 56).

Per le ibridazioni *in situ* ho usato una sonda antisenso, diretta contro una regione condivisa dai geni *XdachA* e *XdachB*. Come descritto in Materiali e Metodi, tale sonda era coniugata con digoxigenina e la sua presenza era messa in evidenza con un anticorpo anti-DIG coniugato con la fosfatasi alcalina, con BM purple come substrato; i tessuti positivi alla sonda presentavano una colorazione blu.

Ibridazioni *in situ*

Su embrioni

In whole mount (Fig. 53), la prima espressione dei geni *dach* si osserva allo stadio di neurula tardiva (st. 22) nella regione anteriore delle vescicole ottiche. Allo stadio 24, i geni *Xdach* sono espressi nella regione mediale del prosencefalo e nel territorio presuntivo della retina neurale. Dallo stadio 30, l'espressione di *Xdach* si estende al romboencefalo e alla parte più interna della coppa ottica; a questo stadio è anche evidente un'elevata espressione nella vescicola ottica che ormai è completamente separata dall'epidermide. Allo stadio 34 l'espressione dei geni *dach* permane costante nel cervello e nella retina, mentre la presenza dei trascritti diminuisce nella vescicola ottica; inoltre a questo stadio sul fianco dell'embrione si evidenzia una leggera ma circoscritta positività alla sonda nella regione del pronefro e del dotto di Wolff.

Per una più precisa localizzazione del segnale, alcuni embrioni, dopo l'ibridazione *in situ* whole mount, sono stati disidratati in alcool, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo in sezioni seriate di 7 µm di spessore. Allo stadio 22 risulta evidente la positività alla sonda per *Xdach* sull'intera vescicola ottica; a questo stadio risulta positivo anche il placode lentogeno ancora largamente in contatto con l'ectoderma, ma già chiaramente delaminato in una parte più esterna, negativa alla sonda, e una parte più interna, rivolta verso la vescicola ottica, positiva a *Xdach* (Fig. 54). A stadi di sviluppo più tardivi (st. 34), quando iniziano i primi processi di differenziamento e la conseguente stratificazione delle cellule retiniche, il

trascritto per *Xdach* si localizza nella parte anteriore della coppa ottica; a questo stadio, l'abbozzo del cristallino, che si è appena distaccato dall'ectoderma e incomincia a sintetizzare le sue proteine specifiche (cristalline), è negativo alla sonda (Fig. 54).

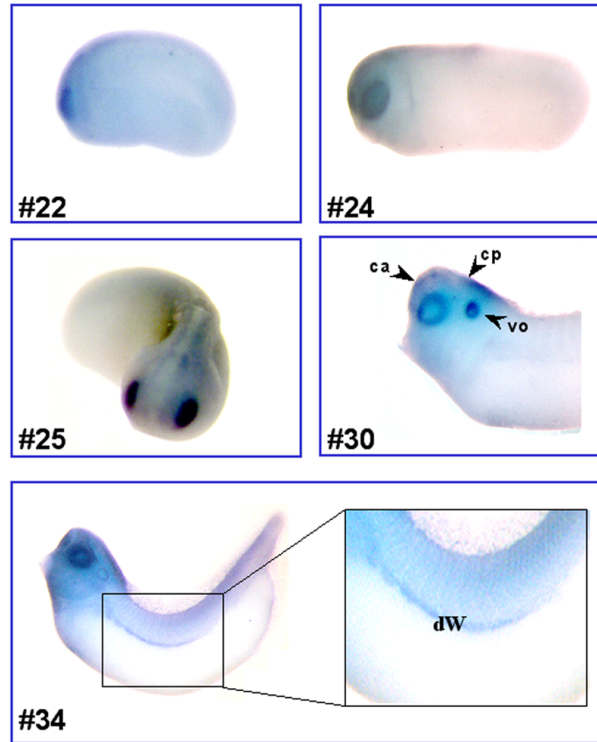


Fig. 53. Ibridazione *in situ* whole mount: analisi dell'espressione dei geni *Xdach* su embrioni di *X. laevis*. **dW**, dotto di Wolff; **ca**, cervello anteriore; **cp**, cervello posteriore; **vo**, vescicola ottica.

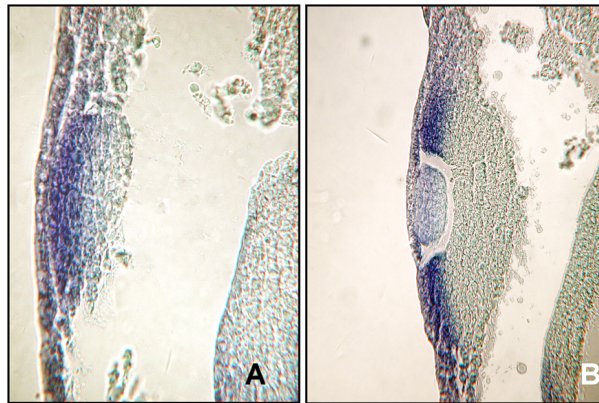


Fig. 54. Ibridazione *in situ*: sezioni della regione dell'occhio di embrioni di *Xenopus* allo stadio 22 (A) e 34 (B).

Su larve

L'ibridazione *in situ* su sezioni dell'occhio, ha evidenziato che, allo stadio di larva precoce (st. 47), la localizzazione dei trascritti di *Xdach* è ridotta d'intensità ed è limitata alla parte anteriore della retina, in una regione che comprende il margine ciliare (ZMC) e una ristretta zona limitrofa (Fig. 55).

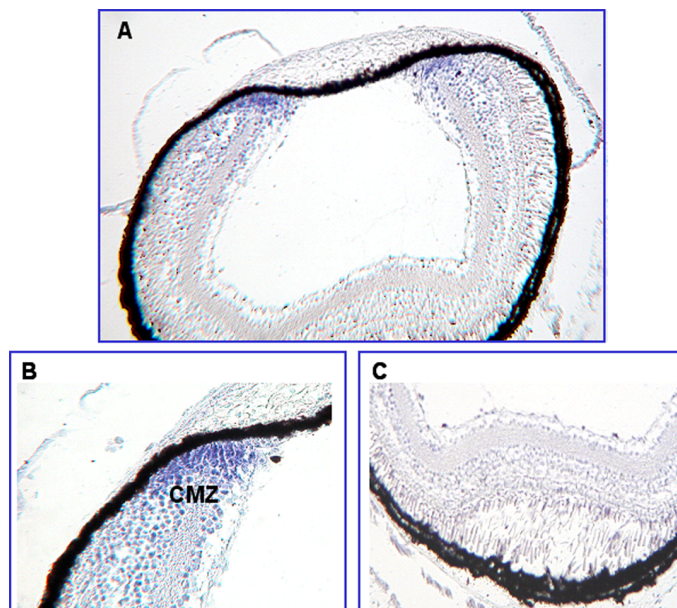


Fig. 55. Ibridazione in situ su sezione. **A.** Occhio di larva allo st. 47. **B.** Particolare del margine ciliare, positivo alla sonda per *Xdach*. **C** regione centrale della retina neurale.

L'analisi, in ibridazione *in situ* "whole mount" dell'espressione dei geni *Xdach* durante lo sviluppo dell'arto, mostra, che allo stadio 51-52, i trascritti di *dach* sono presenti in tutto il mesenchima dell'abbozzo dell'arto. Successivamente (tra lo stadio 53 e 56), col procedere del differenziamento, il trascritto diviene gradualmente confinato nel mesenchima della parte più distale delle dita. Nell'arto in sviluppo l'analisi in RT-PCR ha confermato una diminuzione del livello dei trascritti con il procedere del differenziamento (Fig. 56).

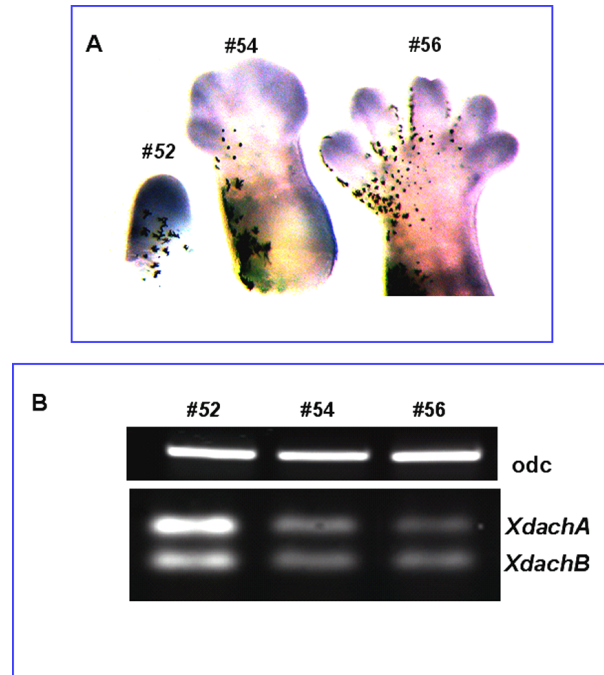


Fig. 56. Analisi dell'espressione di *Xdach* durante lo sviluppo dell'arto di *Xenopus* mediante ibridazione *in situ* whole mount (A) e RT-PCR (B).

RT-PCR

L'analisi in ibridazione *in situ* non permette di discriminare eventuali differenze nell'espressione dei geni *Dach* di *Xenopus*, quindi ho eseguito un'ulteriore analisi in RT-PCR su RNA totale proveniente da embrioni, retina larvale, cervello e arto; tale analisi ha mostrato che *XdachA* e *XdachB* sono coespressi, approssimativamente ad uno stesso livello, durante tutto lo sviluppo embrionale, a partire dallo stadio 18 (neurula precoce), e larvale, con l'eccezione del cervello anteriore in cui *XdachA* sembra essere espresso ad un livello maggiore di *XdachB* (Fig. 57).

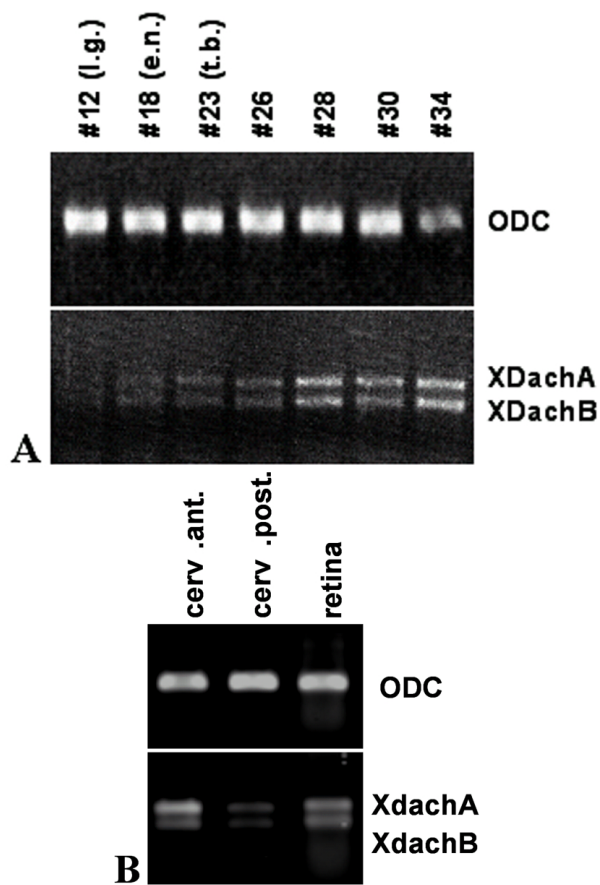


Fig. 57. Analisi in RT-PCR dell'espressione di *XdachA* e *XdachB* su estratti di embrioni di *Xenopus* (A) e su estratti di cervello larvale (B). ODC, Ornitindecarbossilasi.

DISCUSSIONE

Transdifferenziamento lentogeno ed espressione di *pax6*

Come detto nell'Introduzione, le larve di *X. laevis* possono rigenerare il cristallino per un processo di transdifferenziamento della cornea esterna in fibre della lente; tale fenomeno è promosso da un induttore retinico. La capacità di transdifferenziare in lente si estende anche all'epidermide pericorneale, che insieme alla cornea esterna costituisce l'area lentogenica. Al contrario, le aree epidermiche al di fuori dell'area lentogenica non manifestano alcuna capacità lentogena (Freeman, 1963; Bosco and Filoni, 1992 e gli Esperimenti I e II di questa tesi, relativi all'impianto di un frammento di cornea o di epidermide nella camera vitrea di larve ospiti).

Poiché, negli stadi embrionali precoci (da gastrula a neurula) tutto l'ectoderma ha la capacità di rispondere all'induttore retinico formando fibre della lente, mi sono chiesto in primo luogo quale fossero i segnali responsabili del mantenimento della capacità lentogena nell'area lentogenica larvale.

L'induzione della cornea (e dell'ectoderma pericorneale) avviene nelle fasi finali dello sviluppo dell'occhio, grazie all'azione induttrice esercitata dalla coppa ottica e dalla lente sull'ectoderma antistante (induzioni tardive). Questo ectoderma deriva dallo strato esterno del PLE ed è quindi ragionevole supporre che, nelle fasi iniziali dello sviluppo dell'occhio, sia stato interessato dalle azioni induttive che portano alla formazione della lente, da parte dello strato profondo del PLE (induzioni precoci). In una prima fase dello sviluppo della lente il PLE acquisisce la "tendenza" (bias), grazie a segnali induttivi che diffondono dalla placca neurale, potenziati da segnali rilasciati dall'endomesoderma laterale, mentre in una fase successiva, grazie a segnali provenienti dalla vescicola ottica, il PLE acquisisce la "determinazione" lentogena. Durante la prima fase il PLE diviene capace di formare fibre della lente, ma solo dopo la seconda fase può formare una lente ben organizzata, localizzata nel foro pupillare.

Gli Esperimenti III, IV, V di questa tesi sono stati condotti per stabilire quale delle interazioni induttive, che avvengono durante lo sviluppo embrionale, determini il mantenimento della capacità lentogena nell'area lentogenica.

Nell'Esperimento III, embrioni allo stadio 20 sono stati sottoposti alla rimozione unilaterale della vescicola ottica. A questo stadio, la vescicola

ottica protrude dal cervello anteriore e per la prima volta entra in contatto con il PLE (Holt, 1980; Henry and Grainger, 1987). Perciò, l'epidermide coprente l'orbita della larva donatrice dell'Esperimento III derivava da un ectoderma della testa, che era stato raggiunto dai segnali induttivi precoci che causano il bias, probabilmente rafforzati dai segnali induttivi rilasciati dalla vescicola ottica (Grainger, 1992). Nell'Esperimento IV, gli embrioni allo stadio 20 hanno subito la rimozione sia della vescicola ottica sia dell'ectoderma sovrastante. L'epidermide, coprente l'orbita della larva donatrice dell'Esperimento IV, derivava dalla convergenza verso il centro dell'ectoderma della testa, circostante la regione operata, e destinato a divenire epidermide pericorneale. Poiché diversi studi hanno condotto all'idea che la vescicola ottica debba essere in diretto contatto con l'ectoderma per promuovere l'induzione della lente (vedi Piatigrosky, 1981), risulta chiaro che, al momento dell'operazione, l'epidermide pericorneale presuntiva aveva subito solo le induzioni precoci che causano il "bias" nell'ectoderma della testa. Certamente, in entrambi gli Esperimenti, la cornea esterna e l'epidermide pericorneale presuntive non erano state raggiunte dai segnali tardivi rilasciati dalla coppa ottica durante l'induzione della cornea. Eppure, l'epidermide coprente l'orbita di una larva, derivata dalla cornea esterna presuntiva (Esperimento III) o dall'epidermide pericorneale presuntiva (Esperimento IV), mostrava la capacità di esprimere *pax6* e di transdifferenziare in lente sotto l'influenza dei fattori retinici presenti nella camera vitrea.

Poiché gli embrioni di *X. laevis* possono formare "lenti libere" anche in assenza dell'abbozzo dell'occhio (Balinsky, 1951; Brahma and Grunz, 1988) e poiché alcuni dati indicano che la cornea possa essere indotta anche dalla sola lente (Lopashov and Stroeveva, 1961; Hay 1980), la capacità lentogena nell'epidermide coprente l'orbita delle larve degli Esperimenti III e IV poteva essere stata promossa dai segnali tardivi rilasciati dalle "lenti libere". Tuttavia, l'analisi istologica, per verificare la possibile presenza di lenti libere nelle larve donatrici faceva escludere questa possibilità. Infatti, dopo la rimozione della vescicola ottica (Esperimento III), lenti libere, sotto l'epidermide coprente l'orbita, sono state osservate solo in 6 dei 15 animali operati (40%). Questa percentuale era molto più bassa rispetto a quella di transdifferenziamento (75%) osservata nell'Esperimento III. Inoltre dopo la rimozione della vescicola ottica e dell'ectoderma presuntivo lentogeno (Esperimento IV), nessuno degli animali operati mostrava la presenza di lenti libere, mentre la percentuale di transdifferenziamento osservata nell'Esperimento IV era del 60%.

Nell'Esperimento V, l'epidermide larvale coprente l'occhio trapiantato derivava dall'ectoderma del fianco. Tale ectoderma non era stato raggiunto dai segnali induttivi precoci, che causano il bias e la specificazione lentogena, ma solo dai segnali tardivi, coinvolti nella formazione della cornea, rilasciati dall'occhio trapiantato di un embrione tardivo. Eppure, l'epidermide coprente l'occhio trapiantato, quando era impiantata nella camera vitrea, esprimeva *pax6* e transdifferenziava in lente,.

Poiché l'espressione di *pax6*, negli Esperimenti I, III, IV, V, avveniva in un numero di casi maggiore rispetto ai casi di transdifferenziamento lentogeno, si può ipotizzare che l'attivazione di *pax6* rappresenti una fase necessaria ma non sufficiente della cascata genica che conduce alla rigenerazione della lente.

Si potrebbe pensare che le trasformazioni lentogene osservate negli Esperimenti III, IV, V siano dovute all'azione di alcuni fattori promuoventi la competenza presenti nella camera vitrea. In questa ipotesi, i frammenti impiantati nella camera vitrea dovrebbero prima acquisire la capacità lentogena sotto l'influenza di fattori promuoventi la competenza e in seguito transdifferenziare in lente sotto l'influenza dei fattori retinici. L'analisi dell'espressione di *pax6* e degli stadi di trasformazione lentogena degli impianti dei vari Esperimenti dimostravano che non è questo il caso. Infatti, il pattern temporale di espressione di *pax6* osservato negli impianti degli Esperimenti III, IV e V era sovrapponibile a quello osservato negli impianti di cornea (Esperimento I), mentre i frammenti di epidermide del fianco (Esperimento II) non esprimevano mai *pax6*. Inoltre, gli stadi di trasformazione lentogena osservati, utilizzando mAbH, negli impianti degli Esperimenti III, IV e V erano sovrapponibili a quelli osservati negli impianti di cornea, mentre i frammenti di epidermide del fianco mantenevano il loro fenotipo epiteliale e non reagivano mai con mAbH.

Nel complesso, i risultati degli Esperimenti III, IV e V dimostrano che la capacità della cornea esterna e dell'epidermide pericorneale di rigenerare una lente è il risultato sia delle induzioni precoci, coinvolte nello sviluppo della lente dal PLE, sia delle induzioni tardive, coinvolte nel differenziamento della cornea. Inoltre ciascun tipo di induzione è in grado da sola di promuovere tale capacità.

È interessante notare che, non è richiesta la continua presenza dell'occhio larvale per il mantenimento della capacità lentogena della cornea e dell'epidermide pericorneale. Infatti, Bosco e Filoni (1992) hanno dimostrato che frammenti di cornea e di epidermide pericorneale prelevati da larve donatrici, che avevano subito l'enucleazione dell'occhio, formavano

lenti se impiantati nella camera vitrea di larve ospiti, e non era osservata nessuna significativa correlazione tra il tempo dall'enucleazione e quello dell'impianto.

Nei primi stadi embrionali la capacità lentogena non è confinata unicamente all'area lentogena (PLE e regioni immediatamente circostanti), ma è presente in tutto l'ectoderma (Henry and Mittleman, 1995). Perciò, successivamente ho delineato, durante lo sviluppo embrionale e larvale, il quadro spazio-temporale del decremento della capacità lentogena nell'ectoderma al di fuori dell'area lentogena presuntiva. Tale studio è stato effettuato su regioni ectodermiche prossime all'area lentogena (ectoderma della testa) e distanti dall'area lentogena (ectoderma del fianco). I risultati hanno dimostrato l'esistenza di notevoli differenze nel pattern della competenza lentogena tra le due regioni ectodermiche. Infatti, i dati dell'esperimento VI hanno dimostrato che la competenza lentogena decresce rapidamente nell'ectoderma del fianco e lentamente in quello della testa: nel fianco, tale capacità diviene molto bassa allo stadio 26 ed è completamente persa allo stadio 30/31, al contrario, nella testa persiste durante lo sviluppo embrionale ed è persa solo allo stadio larvale 48.

I risultati dell'esperimento VII, ottenuti in seguito al trapianto di un occhio, hanno dimostrato che non solo l'occhio embrionale ma anche l'occhio larvale poteva promuovere la competenza lentogena nell'epidermide sovrastante l'occhio trapiantato. L'effetto promuovente esercitato dall'occhio era strettamente dipendente dal sito del trapianto e dallo stadio in cui il trapianto era compiuto. Infatti, l'epidermide della testa acquisiva una notevole capacità lentogena anche se il trapianto era effettuato allo stadio larvale 48, mentre l'epidermide del fianco acquisiva una debole capacità lentogena solo se il trapianto era compiuto prima dello stadio 46.

I risultati degli esperimenti VI e VII potrebbero essere spiegati assumendo che i segnali precoci e tardivi che agiscono, durante lo sviluppo embrionale dell'occhio, sul PLE e sulle regioni circostanti (Henry and Grainger, 1990; Cannata et al., 2003) siano distribuiti secondo un gradiente di concentrazione, che si estende al di fuori dell'area lentogena. In tale ipotesi, l'elevata concentrazione di questi segnali nell'area lentogena sarebbe responsabile del mantenimento della capacità lentogena durante la vita larvale, mentre la bassa concentrazione dei fattori induttivi embrionali vicino all'area lentogena (ectoderma della testa), sebbene non sufficiente a far mantenere la competenza lentogena durante la vita larvale, sarebbe responsabile del rallentamento nel decremento di questa capacità e

renderebbe l'epidermide della testa più sensibile a rispondere all'effetto promuovente la competenza esercitato dall'occhio.

I risultati dell'esperimento VIII, basato sul trapianto di occhi privi di varie componenti, dimostrano che sia gli occhi privati della retina che quelli privati della lente sono in grado di promuovere nell'epidermide della testa situata al di fuori dell'area lentogenica la competenza lentogena, mentre il trapianto di occhi privati sia della lente che della retina non ha alcun effetto. Questo indica che l'effetto promotore, esercitato dall'occhio trapiantato, è dovuto all'azione di fattori diffusibili rilasciati sia dalla retina sia dalla lente.

Recenti ricerche sulla natura molecolare dei segnali induttori coinvolti nello sviluppo dell'occhio hanno dimostrato che alcuni membri della famiglia TGF-beta sono coinvolti nel controllo della specificazione del PLE (Furuta and Hogan, 1998; Wawersik et al., 1999; Belecky-Adams et al., 2002), mentre alcuni membri delle famiglie FGF e IGF sono implicati nel controllo del differenziamento delle cellule epiteliali in fibre della lente (Beebe et al., 1987; McAvoy and Chamberlain, 1989; Schultz et al., 1993; Miller et al., 2000; Ogino and Yasuda, 2000; Le and Musil, 2001). I fattori FGF sono inoltre implicati nella rigenerazione della lente sia dalla cornea delle larve di *X. laevis* sia dall'iride dorsale dei tritoni. Infatti, il fattore FGF-1 è in grado di promuovere la formazione delle fibre della lente nei frammenti di cornea esterna coltivati *in vitro* (Bosco et al., 1997), inoltre i recettori dell'FGF sono presenti nelle cellule, in sdifferenziamento, dell'iride di tritone e il livello della loro espressione è alto nelle fibre in differenziamento della lente neoformata (McDevitt et al., 1997, Del Rio-Tsonis et al., 1997; 1998).

Alla luce di questi studi, si potrebbe supporre che la competenza lentogena sia correlata alla presenza di un sistema di recettori per l'FGF nel tessuto rispondente. In particolare: a) gli elevati livelli dei segnali induttivi, precoci e tardivi, che raggiungono l'area lentogenica durante lo sviluppo embrionale, manterrebbero un sistema attivato di recettori FGF, nella cornea esterna e nell'epidermide pericorneale della larva; b) i bassi livelli dei segnali induttivi, precoci e tardivi, che raggiungono l'epidermide della testa, vicino all'area lentogenica, sebbene non sufficienti a mantenere un sistema attivato di recettori FGF, renderebbero l'epidermide della testa molto più sensibile ai fattori che promuovono la sintesi dei recettori FGFR rispetto all'epidermide del fianco; c) l'effetto esercitato dall'occhio trapiantato sull'epidermide della testa sarebbe dovuto all'azione di fattori diffusibili che promuovono la sintesi dei recettori FGFR nelle cellule epidermiche. I risultati di questa tesi, dimostrando che l'occhio trapiantato incrementa

notevolmente i livelli della proteina FGFR-2 nell'epidermide della testa ma non in quella del fianco, sono coerenti con le precedenti ipotesi.

I fattori diffusibili liberati dall'occhio trapiantato potrebbero essere simili a quelli liberati dalla retina e dalla lente, dell'occhio in sviluppo, durante l'induzione della cornea (Lopashov and Stroeva, 1961; Hay, '81). Comunque, la natura molecolare di questi segnali deve essere ancora studiata.

In conclusione, i nostri dati fanno ritenere che la capacità della cornea esterna e dell'epidermide pericorneale larvale di rigenerare una lente (competenza lentogena), in risposta all'induttore retinico accumulato nella camera vitrea, sia dovuta all'azione di fattori che durante lo sviluppo dell'occhio promuovono la "tendenza" nel PLE e l'induzione della cornea; tali fattori sono distribuiti secondo un gradiente di concentrazione, il cui livello è massimo in corrispondenza dell'area lentogenica presuntiva (futura cornea esterna ed epidermide pericorneale). Nella regione della testa al di fuori dell'area lentogenica presuntiva, il basso livello dei fattori promotori embrionali non è sufficiente a far mantenere, durante lo sviluppo larvale, la capacità lentogena, ma ha l'effetto 1) di fare perdurare la capacità lentogena nell'ectoderma della testa per un tempo molto più lungo di quello osservato a livello dell'ectoderma del fianco, che non è mai raggiunto dai fattori embrionali che promuovono lo sviluppo dell'occhio, 2) di rendere l'epidermide della testa molto più capace dell'epidermide del fianco di recuperare la capacità lentogena sotto l'azione di fattori promotori liberati da un occhio trapiantato al di sotto dell'epidermide. Tali fattori sono fattori diffusibili prodotti dalla retina e dalla lente e, probabilmente, promuovono nell'epidermide la sintesi dei recettori dell'FGF, rendendola così capace di rispondere all'FGF, il fattore, presente nella camera vitrea, che promuove il differenziamento delle fibre della lente.

Transdifferenziamento retinogeno ed espressione di *pax6*

In questa parte della tesi, ho analizzato il transdifferenziamento in senso retinico di frammenti dell'epitelio pigmentato (RPE), impiantati nella camera vitrea di un occhio di una larva ospite. La formazione di una nuova retina con una organizzazione laminare è il risultato dei processi di depigmentazione, proliferazione e differenziamento delle cellule dell'RPE, stimulate dai fattori induttori liberati dalla retina neurale. Le diverse fasi del processo di transdifferenziamento sono state seguite utilizzando la marcatura con BrdU come marker della fase proliferativa e l'anticorpo monoclonale mAbHp1 come indicatore del completamento della fase differenziativa. Inoltre, ho analizzato durante il processo di transdifferenziamento il pattern spazio-temporale di espressione di *pax6*.

I risultati dimostrano che nella maggior parte degli impianti, localizzati nella camera vitrea dell'occhio di una larva ospite, solo la parte della vescicola rivolta verso la retina ospite transdifferenziava in una retina laminare, mentre la parte rivolta verso la lente rimaneva densamente pigmentata. Precedenti risultati, ottenuti in seguito all'impianto di frammenti di RPE nella camera vitrea di un occhio lentectomizzato (Sologub, 1977; Sakaguchi et al., 1997), non hanno evidenziato la presenza di impianti polarizzati, visto che i frammenti di RPE transdifferenziavano completamente in retina oppure erano formati da gruppi di cellule pigmentate tra gruppi di cellule retiniche. Inoltre, mentre Sakaguchi et al. (1997) non hanno osservato un'organizzazione laminare, nella parte transdifferenziata dell'impianto, Sologub (1977) ha descritto la formazione degli strati retinici negli impianti transdifferenziati. La chiara polarizzazione degli impianti osservata nei miei esperimenti può essere spiegata considerando che la lente non era eliminata, ma reinserita attraverso il foro pupillare. Mentre in un occhio lentectomizzato l'impianto è posizionato casualmente nella camera vitrea, nelle mie condizioni sperimentali un lato dell'impianto era adiacente alla retina dell'ospite, dove la concentrazione dei fattori retinici raggiunge il valore massimo, mentre il lato opposto era adiacente alla lente. Pertanto il mio risultato può essere spiegato supponendo che la lente inibisca il transdifferenziamento delle cellule del RPE rimuovendo alcuni fattori dal microambiente oppure rilasciando delle sostanze inibitrici. È interessante notare che, in alcuni impianti di RPE la parte pigmentata era separata dalla parte transdifferenziata da una cavità, così che gli impianti apparivano come "occhietti invertiti" con lo strato dei

fotorecettori rivolto verso l'interno della cavità. In precedenza, un simile risultato era stato osservato solo quando gli impianti di RPE, all'interno di occhi lentiectomizzati, occupavano la porzione anteriore della camera vitrea, vicino al foro pupillare (Sologub, 1977; Cioni et al., 1986). In questi impianti, la parte adiacente alla camera anteriore era pigmentata, mentre la parte posteriore era transdifferenziata in retina neurale, con i fotorecettori rivolti all'interno della cavità dell'impianto e lo strato delle cellule gangliari rivolto verso la camera vitrea dell'ospite. Per spiegare tale organizzazione laminare nella retina neoformata Cioni et al. (1986) hanno supposto che la fase di differenziamento del processo transdifferenziativo fosse influenzata da un gradiente dei fattori retinici, rilasciati dalla retina dell'ospite all'interno della camera vitrea: lo strato gangliare si formerà nella parte esterna dell'impianto, dove la concentrazione dei fattori retinici è maggiore, mentre i fotorecettori si differenzieranno dallo strato di cellule più interno, che è parzialmente isolato dall'ambiente della camera vitrea dell'ospite. A mio avviso, poiché è stato dimostrato che l'RPE è in grado di produrre il PEDF (fattore derivato dall'epitelio pigmentato), che esercita un notevole effetto morfogenetico sui fotorecettori dell'occhio embrionale (Jablonsky et al., 2000; Karakousis et al., 2001), il differenziamento dei fotorecettori, negli impianti polarizzati, potrebbe essere promosso dal PEDF, rilasciato dalle cellule pigmentate e accumulato all'interno della cavità dell'impianto. Inoltre, il differenziamento laminare della nuova retina potrebbe essere promosso da fattori che agiscono localmente. Infatti, recenti ricerche sullo sviluppo della retina hanno dimostrato che il destino delle cellule progenitrici è influenzato dall'interazione cellula-cellula e che la natura di tali interazioni è destinata a cambiare con il tempo, così che possono essere generati differenti tipi cellulari (Watanabe and Raff, 1990, 1992; Harris and Messersmith, 1992; Dorsky et al., 1995, 1997; Rapaport and Dorsky, 1998; Rapaport et al., 2001). L'assenza di un'organizzazione laminare osservata da Sakaguchi (1997) potrebbe essere dovuta ad un'alterazione nella distribuzione spazio-temporale di fattori intrinseci ed estrinseci negli impianti non polarizzati, formati da piccoli gruppi di cellule progenitrici non pigmentate frammiste a gruppi di cellule pigmentate.

L'anticorpo monoclonale HP1 utilizzato in questa tesi, per seguire il differenziamento dei fotorecettori nella retina neoformata, riconosce una componente proteica della matrice dei fotorecettori (IPM), una matrice altamente organizzata, ricca in carboidrati, che accoglie i segmenti esterni dei fotorecettori. Come per SPACRCAN, un proteoglicano presente nell'IPM della retina di ratto e di uomo (Chen et al., 2003), l'epitopo

riconosciuto da HP1 è presente sia nella retina sia nella ghiandola pineale. Considerando che 1) sia durante lo sviluppo della retina sia durante il transdifferenziamento dell'RPE la prima reazione positiva ad mAbHP1 è osservata nell'IPM, che circonda i prolungamenti immaturi dei fotorecettori, che 2) l'aumento della positività a HP1 è correlato con il progressivo differenziamento del segmento esterno dei fotorecettori e che 3) si pensa che l'IPM sia coinvolta in diverse importanti funzioni, come ad esempio la comunicazione intercellulare, il differenziamento e il mantenimento dei fotorecettori (Hageman et al., 1991; Wu et al., 1995; Beuckmann et al., 1996; Karakousis et al., 2001), il componente dell'IPM riconosciuto da mAbHP1 potrebbe fornire l'ambiente extracellulare necessario per il corretto differenziamento dei fotorecettori. L'identificazione e la caratterizzazione della molecola riconosciuta da mAbHP1 dovrebbe essere di aiuto per definire la specifica funzione di questo componente dell'IPM durante la formazione della retina.

Questo studio rappresenta la prima evidenza in *Xenopus* dell'espressione di *pax6* durante il processo di transdifferenziamento dell'RPE in retina. Il pattern spazio-temporale di espressione di *pax6* ricalca sostanzialmente quello osservato da Hirsch e Harris ('97) durante lo sviluppo della retina. Durante le prime fasi di sviluppo della retina embrionale, tutte le cellule neuroepiteliali esprimono *pax6*. Cambiamenti nel pattern di espressione divengono evidenti durante la fase intermedia del processo di sviluppo e di transdifferenziamento, quando l'espressione di *pax6* decresce nello strato nucleare esterno presuntivo. Infine, durante le fasi tardive dei due processi, lo strato nucleare esterno, che comprende i fotorecettori, non esprime più *pax6*; il trascritto di *pax6* resta confinato nello strato gangliare e in quello nucleare interno. Durante lo sviluppo dell'occhio, *pax6* gioca un ruolo cruciale nella retinogenesi, poiché è essenziale per il mantenimento della multipotenza delle cellule progenitrici retiniche e per la loro proliferazione. Inoltre, diverse osservazioni fanno ritenere che *pax6* possa essere coinvolto nella fase finale della specificazione del destino cellulare delle cellule progenitrici retiniche, agendo come attivatore dei geni proneurali (Grindley et al., 1995; Perron et al., 1998; Chow et al., 1999; Ashery-Padan and Gruss, 2001; Marquardt et al., 2001). Vista la sostanziale identità nell'espressione di *pax6* tra il processo di sviluppo della retina e quello di transdifferenziamento dell'RPE, si può ipotizzare che *pax6* abbia, così come nello sviluppo, ruoli differenti durante fasi differenti del transdifferenziamento, agendo prima da determinante retinico (le cellule depigmentate che esprimono *pax6* sono determinate come cellule

progenitrici retiniche multipotenti) e poi controllando il destino delle cellule progenitrici. Poiché *pax6* è riespresso solo dalle cellule depigmentate dell'impianto, la depigmentazione appare un prerequisito per la riattivazione di *pax6*. Nel tritone, il transdifferenziamento dell'RPE in retina può avvenire anche in assenza di fattori esogeni rilasciati dalla retina neurale (Ikegami et al., 2002). Comunque, così come ho dimostrato nello *Xenopus*, anche nel tritone la formazione di una nuova retina è associata alla riespressione di *pax6* nella cellule depigmentate dell'RPE (Kaneko et al., 1999). Perciò, è evidente che, qualunque sia lo stimolo iniziale, *pax6* gioca un ruolo cruciale nel processo di transdifferenziamento del RPE.

Espressione di *Xdach* durante lo sviluppo

Allo scopo di identificare altri geni coinvolti nel processo di transdifferenziamento retinogeno, nell'ultima parte del mio dottorato ho clonato il gene *Xdach* e ne ho delineato, in ibridazione *in situ*, il quadro di espressione durante lo sviluppo embrionale e larvale. Numerosi dati dimostrano che lo sviluppo dell'occhio è regolato da un network di geni interagenti (*pax6/eyal/six3/dach1*) altamente conservati nell'evoluzione (Chow et al., 1999; Heanue et al., 1999; Hanson, 2001). Finora, in *X. laevis* sono stati clonati i geni *pax6*, *eyal* e *six3*. In questa tesi, ho isolato due cDNA di Dachshund in *Xenopus*, *XdachA* (ac:AJ555469) e *XdachB* (ac:AJ555540). Questi cloni sono lunghi 2273 e 2117 bp, rispettivamente; il primo contiene una "open reading frame" (ORF) che si estende dal nucleotide 259 al 2088 e codifica per una proteina di 610 amminoacidi, il secondo è caratterizzato da una ORF che va dal nucleotide 259 al 1932 e codifica per una proteina di 558 amminoacidi. *XdachA* e *XdachB* presentano un'elevata similarità di sequenza con i geni *Dach1* di topo (circa il 70%) e di pollo (circa il 60%). Il confronto delle sequenze amminoacidiche delle due proteine DACH di *Xenopus* con quelle dei geni *dach* degli altri Vertebrati indica che *XdachA* e *XdachB* presentano un elevato grado di conservazione del DACHbox-N, che sembra sia il dominio funzionalmente più importante della proteina (Kim et al., 2002), e un basso grado di conservazione del DACHbox-C.

Ho analizzato l'espressione dei due cDNA clonati in ibridazione *in situ* e in RT-PCR, durante lo sviluppo embrionale e larvale dello *X. laevis*. Queste analisi hanno dimostrato che *XdachA* e *XdachB* presentano un pattern d'espressione sovrapponibile e molto simile a quello di *Dach1* di topo e di pollo. In ibridazione *in situ*, la prima espressione di *XdachA* e *XdachB* è stata

osservata, allo stadio embrionale 22, a livello delle vescicole ottiche. Allo stadio 24, questi due geni sono espressi nel prosencefalo e nella retina neurale. Dallo stadio 30, l'espressione di *XdachA* e *XdachB* si estende al cervello posteriore e alla vescicola otica. Mentre il loro livello d'espressione sembra essere costante nel cervello e nella retina con il progredire dello sviluppo, la presenza dei trascritti di *XdachA* e *XdachB* diminuisce nella vescicola otica. L'analisi in ibridazione *in situ* "whole mount" dell'espressione dei geni *Xdach* durante lo sviluppo dell'arto della larva mostra che, nell'abbozzo dell'arto larvale, la presenza dei trascritti di *XdachA* e di *XdachB* è in relazione alla popolazione delle cellule indifferenziate presenti nell'arto stesso: a stadi larvali precoci (st.50-52), l'abbozzo dell'arto, costituito per la maggior parte da cellule indifferenziate, risulta uniformemente positivo alla sonda per i geni *Xdach*. Con il progressivo differenziamento dell'arto in direzione prossimo-distale, si osserva una diminuzione della positività alla sonda per i geni *Xdach* nella stessa direzione. A stadi larvali intermedi solo l'autopodio, ancora indifferenziato, risulta positivo, mentre a stadi tardivi la sonda si localizza nella parte più distale delle falangi.

Poiché l'analisi in ibridazione *in situ* non permette di discriminare eventuali differenze nell'espressione dei geni *Dach* di *Xenopus*, ho eseguito un'ulteriore analisi in RT-PCR su RNA totale di embrioni *in toto* e su retina, cervello e arto di larve. Tale analisi ha mostrato che *XdachA* e *XdachB* sono coespressi, approssimativamente ad uno stesso livello, durante tutto lo sviluppo embrionale e larvale.

Considerando che: a) *XdachA* e *XdachB* presentano il 90% di identità tra di loro e una buona similarità di sequenza con i geni *Dach1* di topo e di pollo; b) i pattern spazio-temporale d'espressione di *XdachA* e *XdachB* sono sovrapponibili e molto simili a quelli di *Dach1* di topo e di pollo c) entrambi i *dachshund* di *Xenopus* non sono espressi a livello dei somiti, mentre i geni *Dach2* di topo e di pollo sono altamente espressi, posso ipotizzare che *XdachA* e *XdachB* siano due ortologhi del gene *Dach1*.

Desplan (1997) ha dimostrato che, in *Drosophila*, il gene *dac* è sotto il controllo diretto del gene *ey*. Non è stato invece ancora chiarito se l'omologo di *dac* dei Vertebrati sia controllato o meno da *pax6*, omologo di *ey*. Finora, è stata dimostrata un'espressione sequenziale di *pax6* e di *Dach* solo nella retina neurale e nel cervello dell'embrione di pollo e di topo (Heanue et al., 2002) e ciò suggerisce che *pax6* possa regolare l'espressione di *Dach* in un numero limitato di casi e, probabilmente, solo durante le fasi precoci dello sviluppo della retina e del cervello.

Il confronto tra il pattern d'espressione di *pax6* (Hirsh and Harris, 1997) (Fig.22) e quello di *XdachA* e *XdachB* durante lo sviluppo embrionale e larvale di *Xenopus*, indica che la regolazione dei geni *Xdach* da parte di *pax6* in *Xenopus* potrebbe essere più ampia di quella messa in evidenza nel topo e nel pollo.

Infatti, i dati da me ottenuti in ibridazione *in situ* dimostrano che l'espressione di *pax6* a livello del sistema nervoso precede quella di *XdachA* e *XdachB* e che *pax6* e *XdachA* e *XdachB* sono coespressi nella vescicola ottica, nel placode della lente, nel cervello anteriore e posteriore dell'embrione precoce. È interessante notare che a livello del mesencefalo non si esprimono né *pax6* né i geni *Xdach*. Negli stadi embrionali tardivi, permane la coespressione di *pax6* e dei geni *Xdach* nella retina neurale e nel cervello.

Nell'occhio della larva, l'espressione di *pax6* persiste nelle cellule del ganglio retinico e del ganglio cerebrale e nel margine ciliare (ZMC), mentre l'espressione di *XdachA* e *XdachB* è limitata alla ZMC. Considerando che la ZMC è la zona di proliferazione e formazione di nuove cellule della retina in accrescimento, si può ipotizzare che a livello della ZMC *pax6* e i geni *Xdach* cooperino nella determinazione del destino cellulare, come accade in *Drosophila*.

Nel cervello larvale, i dati in RT-PCR mostrano la presenza dei geni *Xdach* e di *pax6*. In ibridazione *in situ*, *pax6* è espresso nelle cellule endodermali. Anche se mancano i dati di localizzazione in ibridazione *in situ* per *XdachA* e *XdachB*, si può ritenere che *pax6* e i geni *Xdach* possano essere coespressi nelle stesse cellule.

A livello della vescicola ottica, del pronefro e del dotto pronefrico dell'embrione e dell'abbozzo dell'arto della larva, in cui *XdachA* e *XdachB* sono espressi negli stadi precoci dello sviluppo, ma in cui *pax6* non si esprime, l'espressione di *XdachA* e *XdachB* potrebbe essere sotto il controllo di altri membri della famiglia *Pax*, quali *pax2* e *pax3*. Quest'ipotesi è suffragata dal fatto che nell'embrione di pollo e di topo, Heanue et al. (2002) hanno messo in evidenza la presenza di *pax2* nell'abbozzo della vescicola ottica, mentre Davis et al. (2001) hanno dimostrato che *pax3* è espresso durante il differenziamento del muscolo scheletrico. Anche nello *Xenopus*, *pax2* e *pax3* sono stati messi in evidenza negli stessi territori, ovvero, rispettivamente, nella vescicola ottica e nell'abbozzo dell'arto, ed è stato dimostrato che una loro perturbazione attraverso esperimenti di "gain or loss of function" porta a un anormale sviluppo dell'orecchio e del muscolo (Fernander-Teran et al., 1999).

Concludendo, in questa tesi, ho messo in evidenza che i geni *Xdach* sono espressi in popolazioni di cellule indifferenziate o in via di differenziamento in cui altri Autori hanno dimostrato la presenza di un membro della famiglia *Pax*. Quindi si può ipotizzare che i geni *Dach* possano essere controllati, in tessuti diversi, da membri diversi della famiglia dei fattori di trascrizione *Pax*. Per verificare tali ipotesi sono necessari test funzionali che prevedano l'inattivazione o la sovraespressione selettiva dei vari elementi coinvolti nella "cassetta" regolativa. A tal scopo ho clonato *XdachA* e *B* nel vettore d'espressione CS2+; tale costrutto può essere utilizzato per l'espressione di geni *in vivo* in esperimenti di lipofezione e microiniezione. In una successiva fase della ricerca, sarà interessante analizzare il ruolo di *Xdach* nel transdifferenziamento retinogeno.

BIBLIOGRAFIA

Acharya S, Foletta VC, Lee JW, Rayborn ME, Rodriguez IR, Young WS 3rd, Hollyfield JG (2000). SPACRCAN, a novel human interphotoreceptor matrix hyaluronan-binding proteoglycan synthesized by photoreceptors and pinealocytes. *J Biol Chem* 275(10):6945-55.

Adler AJ, Evans CD (1983). Rapid isolation of bovine interphotoreceptor retinol-binding protein. *Biochim Biophys Acta* 761(3):217-22.

Araki M, Yamao M, Tsudzuki M (1998). Early embryonic interaction of retinal pigment epithelium and mesenchymal tissue induces conversion of pigment epithelium to neural retinal fate in the silver mutation of the Japanese quail. *Dev Growth Differ* 40:167-76.

Arruti C, Curtis Y (1978). Morphological changes and growth stimulation of bovine epithelial lens cells by retinal extract in vitro. *Exp Cell Res* 117:283-292.

Ashery-Padan R, Gruss P (2001). Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr Opin Cell Biol* 13:706-14.

Ashery-Padan R, Marquardt T, Zhou X, Gruss P (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* 14:2701-2711.

Balinsky BI (1951). On the eye cup lens correlation in some South African amphibians. *Experientia* 7: 180-181.

Barabanov VH (1966). Formation of organ specific antigens of the lens in ontogenesis in mice. *Byull. Eksp. Biol. Med.* 62:82-85.

Barbieri AM, Lupo G, Bulfone A, Andreazzoli M, Mariani M, Consalez G, Borsani G, Beckmann JS, Barsacchi G, Ballabio A, Banfi S (1999). A omeobox gene, *vax2*, controls the patterning of the eye dorsoventral axis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* '96, 10729-10734.

Barnstable CJ (1987). Immunological studies of the diversity and development of the mammalian visual system. *Immunol Rev* 100:47-78.

Bassas L, Zelenka IS, Serrano J, De Pablo F (1987). Insulin and IGF-1 receptors are developmentally regulated in the chick embryo eye lens. *Exp Cell Res* 168:561-566.

Beebe DC, Feagans DE, Jebens HH (1980). Lentropin: a factor in vitreous humor which promotes lens fiber differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:490-493.

Beebe DC, Silver MH, Belcher KS, van Wyk JJ, Svoboda ME, Zelenka PS (1987). Lentropin, a protein that controls lens fiber formation, is related

functionally and immunologically to the insulin-like growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2327-2330.

Belecky-Adams TL, Alder R, Beebe DC (2002). Bone morphogenetic protein signaling and the initiation of lens fiber cell. *Development* 129: 3795-3802.

Berbers GA, Hoekman WA, Bloemendal H, de Jong WW, Kleinschmidt T, Braunitzer G (1984). Homology between the primary structures of the major bovine beta-crystallin chains. *Eur J Biochem* 139(3):467-79.

Berk M, Desai SY, Heyman HC, Colmenares C (1997). Mice lacking the Ski proto-oncogene have defects in neurulation, craniofacial patterning and skeletal muscle development. *Genes Dev* 11, 2029-2039.

Beuckmann CT, Gordon WC, Kanaoka Y, Eguchi N, Marcheselli VL, Gerashchenko DY, Urade Y, Hayaishi O, Bazan NG (1996). Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is located in pigment epithelial cells of rat retina and accumulates within interphotoreceptor matrix. *J Neurosci* 16:6119-24.

Bhat SP, Naginemi CN (1989). α B subunit of lens-specific protein α -crystallin is present in other ocular and non-ocular tissues. *Biochem. Biophys Res Comm*, vol. 158:319-325.

Blomendal, H. (1981). *Molecular and cellular biology of the eye lens*. pp 1-47. New York: Wiley-Interscience.

Blundell T, Lindley P, Miller L, Moss D, Slingsby C, Tickle I, Turnell B, Wistow G. (1981). The molecular structure and stability of the eye lens: X-ray analysis of gamma-crystallin II. *Nature* 289:771-777.

Bosco L, Filoni S, Cannata S (1979). Relationships between eye factors and lens-forming transformations in the cornea and pericorneal epidermis of larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 209:261-282.

Bosco L, Filoni S, Cioni C (1980). Lens formation from cornea in the presence of the old lens in larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 213:9-14.

Bosco L, Filoni S, Cioni C, Bernardini S (1986). Eye factor and lens-forming transformation of outer cornea in *Xenopus laevis* larvae. *J Exp Zool* 240:401-407.

Bosco L, Filoni S (1992). Relationships between presence of the eye cup and maintenance of lens-forming capacity in larval *Xenopus laevis*. *Develop Growth Differ* 34:619-625.

Bosco L, Valle C, Willems D (1993). In vivo and in vitro experimental analysis of lens regeneration in larval *Xenopus laevis*. *Develop Growth and Differ* 35:257-270.

Bosco L, Venturini G, Willems D (1997). In vitro lens transdifferentiation of *Xenopus laevis* outer cornea induced by Fibroblast Growth Factor FGF. *Development* 124:421-428.

Brahma SK, McDevitt DS (1972). Ontogeny and localization of the lens crystallins in *Xenopus laevis* lens regeneration. *J Embryol Exp Morph* 32:783-794.

Brahma, S K, Grunz, H (1988). Crystallins during *Xenopus laevis* free lens formation. *Roux's Arch Dev Biol* 197: 190-192.

Brewitt B, Clark JI (1988). Growth and transparency in the lens, and epithelial tissue, stimulated by pluses of PDGF. *Science* 242:777-779.

Bui QT, Zimmerman JE, Liu H, Bonini NM (2000). Molecular analysis of *Drosophila* eyes absent mutants reveals features of the conserved Eya domain. *Genetics* 155:709-720.

Campbell JC, Jones KW (1968). The in vitro development of lens from cornea of larval *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 17:1-15.

Campbell MT, McAvoy JW (1984). Onset of fibre differentiation in cultured rat lens epithelium under the influence of neural retina-conditioned medium. *Exp Eye Res* 39:83-94.

Candiani S, Kreslova J, Benes V, Olivieri D, Castagnola P, Pestarino M, Kozmik Z (2003). Cloning developmental expression of amphioxus *Dachshund*. *Gene Expression Patterns* 3, 65-69.

Cannata SM, Arresta E, Bernardini S, Gargioli C, Filoni S. 2003. Tissue interactions and lens-forming competence in the outer cornea of larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 299A: 161-171.

Carriers CS (1993). Characterization of quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol Cell Biol* 13:7257-7265.

Carriers CS (1995). Nuclear localization signals, DNA-binding, and transactivation properties of quail Pax-6 (Pax-QNR) isoforms. *Cell Growth Diff* 6:1531-1540.

Casarosa S, Andreazzoli M, Simeone A, Barsacchi G (1997). rx1, a novel *Xenopus* homeobox gene expressed during eye and pineal gland development. *Mech Dev* 61, 187-198.

Caubit X, Thangarajah R, Theil T, Wirth J, Nothwang HG, Ruther U, Krauss S (1999). Mouse *Dac*, a novel nuclear factor with homology to *Drosophila dachshund* shows a dynamic expression in the neural crest, the eye, the neocortex, and the limb bud. *Dev Dyn* 214, 66-80.

Chamberlain CG, McAvoy JW (1987). Evidence that fibroblast growth factor promotes lens fibre differentiation. *Curr Eye Res* 6:1165-1168.

Chen R, Amoui M, Zhang Z, Mardon G (1997). Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* 91:893-903.

Chen Q, Lee JW, Nishiyama K, Shadrach KG, Rayborn ME, Hollyfield JG (2003). SPACRCAN in the interphotoreceptor matrix of the mouse retina: molecular, developmental and promoter analysis. *Exp Eye Res* 76:1-14.

Chen Q, Cai S, Shadrach KG, Prestwich GD, Hollyfield JG (2004). Spacrcan binding to hyaluronan and other glycosaminoglycans. Molecular and biochemical studies. *J Biol Chem* 279(22):23142-50.

Chiang C, Litington Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic Hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413.

Chiou SH, Chang WP, Lo CH, Chen SW (1987). Sequence comparison of gamma-crystallins from the reptilian and other vertebrate species. *FEBS Lett* 221:134-138.

Chow RL, Altman CR, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126:4213-4222.

Cianfriglia M, Mariani M, Armellini D, Massone A, Lafata M, Presentini R, Antoni G (1986). Methods for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas; specificities and affinities of the monoclonal antibodies obtained. *Methods in Enzymology* 121:193-211.

Cioni C, Filoni S, Bosco L (1982). Inhibition of lens regeneration in larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 220:103-108.

Cioni C, Filoni S, Aquila C, Bernardini S, Bosco L. (1986). Transdifferentiation of eye tissues in anuran amphibians: analysis of the transdifferentiation capacity of the iris of *Xenopus laevis* larvae. *Differentiation* 32:215-220.

Clayton RM (1970). Problems of differentiation in the Vertebrate lens. *Curr Top Develop Biol* 5:115-121.

Collinson JM, Hill RE, West JD (2000). Different roles for pax6 in the optic vesicle and facial epithelium mediate early morphogenesis of the murine eye. *Development* 127:945-956.

Cvekl A, Piatigorsky J (1996). Lens development and crystalline gene expression: many roles for Pax-6. *BioEssay* 18(8):621-630.

Czerny T, Busslinger M (1995). DNA-binding and transactivation properties of Pax-6; three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol. Cell Biol.* 15:2858-2871.

Czerny T, Halder G, Kloter U, Souabni A, Gehring WJ (1999). twin of eyeless, a second pax-6 gene of *Drosophila*, acts upstream of eyeless in the control of eye development. *Mol. Cell.* 3:297-307.

Davis RJ, Shen W, Henue TA, Mardon G (1999). Mouse Dach, a homologue of *Drosophila* dachshund, is expressed in the developing retina, brain and limbs. *Dev. Genes Evol.* 209:526-536.

Davis RJ, Shen W, Sandler YI, Amoui M, Purcel P, Mass R, Ou CN, Vogel H, Beaudet AL, Mardon G (2001). Dach1 mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb and brain development and exhibit postnatal lethality. *Mol Cell Biol* 21:1484-1490.

Del Rio Tsonis K, Washabaugh CH, Tsonis PA (1995). Expression of Pax-6 during urodele eye development and lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci* 92:5092-5096.

Del Rio-Tsonis K, Trombley MT, McMahon G, Tsonis PA (1998). Regulation of lens regeneration by fibroblast growth factor receptor 1. *Dev Dyn* 213:140-6.

Del Rio Tsonis K, Jung JC, Chiu IM, Tsonis PA (1997). Conservation of fibroblast growth factor function in lens regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:13701-13706.

Delage M, Tardieu A (1983). Short-range order of crystallin proteins accounts for eye transparency. *Nature* 302: 415-417.

Den Dunnen JT, Moormann RJM, Schoenmakers, JGG (1985). Rat lens beta-crystallins are internally duplicated and homologous to gamma-crystallins. *Biochim. Biophys. Acta* 824 (4):295-303.

Desplan C (1997). Eye development: governed by a dictator or a junta? *Cell* 91:861-864.

De Jong WW (1981). *Molecular and cellular biology of the eye lens*. pp 221-278 New York: Wiley-Interscience.

De Jong WW, Hendriks W (1986). The eye lens crystallins: ambiguity as evolutionary strategy. *J Mol Evol* 24:121-129.

Dorsky RI, Chang WS, Rapaport DH, Harris WA (1997). Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling. *Nature* 385:67-70.

Dorsky RI, Rapaport DH, Harris WA. 1995. Xotch inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina. *Neuron* 14:487-96.

Driessen HPC, Herbrink P, Bloemendal H, De Jong WW (1981). Primary structure of the bovine beta-crystallin Bp chain. Internal duplication and homology with gamma-crystallin. *Eur. J. Biochem.* 121 (1):83-91.

Duncan G, Jacob TJC (1984). The lens as a physicochemical system. *The Eye*, 3rd ed. Vol. 1b (H. Davson. ed.), Academic Press, Orlando, FL, 169-206.

Eguchi G, Okada TS (1973). Differentiation of lens tissue from the progeny of chick retinal pigment cells cultured in vitro: a demonstration of a switch of cell types in clonal cell culture. *Proc. Natl Acad Sci USA* 70:495-1499

Eguchi G (1979). Transdifferentiation of pigmented epithelial cells of vertebrate eyes in vitro. In Ebert JD and Okada TS (eds.) *Mechanisms of cell change*. Wiley, New York, pp 273-292.

Eguchi G (1988). Cellular and molecular background of wolffian lens regeneration. *Cell Differ Dev* 25 Suppl:147-58.

Epstein JA, Glaser T, Cai L, Jepeal L, Walton DS, Maas RL (1994). Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax-6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 8:2022-2034.

Filoni S, Bosco L, Cannata S (1978). Influenza dell'occhio sulla rigenerazione del cristallino in larve di *Xenopus laevis*. *Acta Embr Exp* 2:179-195.

Filoni S, Bosco L, Paglioni N, Cioni C (1980). Lens formation from pericorneal epidermis in presence of the old lens in larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 211: 303-309.

Filoni S, Bosco L, Cioni C (1981). Experimental analysis of the lens regeneration in larval *Xenopus laevis*: the role of the retina and the lens. *Acta Embr Morph* 2:26-28.

Filoni S, Bosco L, Cioni C. (1982). The role of neural retina in lens regeneration from cornea in larval *Xenopus laevis*. *Acta Embryol Morphol Exp* 3:15-28.

Filoni S, Bernardini S, Cannata SM, D'Alessio A (1997). Lens regeneration in larval *Xenopus laevis*: experimental analysis of the decline in the regenerative capacity during development. *Dev Biol* 187:13-24.

Ford HL, Kabingu EN, Bump EA, Mutter GL, Pardee AB (1998). Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with the overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 95:12608-12613.

Freeman G (1963). Lens regeneration from cornea in *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 54:39-66.

Furuta Y, Hogan BLM (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev* 12: 3764-3775.

Fujiwara M, Uchida T, Osumi-Yamashita N, Eto K (1994). Uchida rat

(rSey): a new mutant rat with craniofacial abnormalities resembling those of the mouse Sey mutant. *Differentiation* 57:31-38.

Galfré G, Milstein C (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* 73:3-46.

Glaser TD, Walton S, Cai J, Epstain J, Jepeal L, Mass RL (1995). Pax6 gene mutations in aniridia. In *Molecular genetics of ocular diseases*, (ed. J. Wiggs) pp. 51-82. Wiley Liss, NY.

Goudreau G, Petrou P, Reneker LW, Graw J, Loster J, Gruss P (2002). Mutually regulated expression of Pax6 and Six3 and its implications for the Pax6 haploinsufficient lens phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(13):8719-24.

Gopal-Srivastava R, Haynes JJ, Piatigorsky J (1995). Regulation of the murine $\alpha\beta$ -crystallins/small heat shock protein gene in cardiac muscle. *Mol Cell Biol* 15:7081-7090.

Goring DR, Bryce DM, Tsul LC, Breitman ML, Liu Qn (1993). Developmental regulation and cell type-specific expression of the murine γ F-crystallin gene is mediated through a lens-specific element containing the γ F-1 binding site. *Dev Dynam* 196:143-152.

Grainger RM, Henry JJ, Henderson R. (1988). Reinvestigation of the role of the optic vesicle in embryonic lens induction. *Development* 102:517-526.

Grainger RM. (1992). Embryonic lens induction: Shedding light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet* 8:349-355.

Grindley JC, Davidson DR, Hill RE (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121:1433-1442.

Guillemot F, Cepko CL (1992). Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an in vitro assay of early retinal development. *Development* 114:743-754.

Hageman GS, Kirchoff-Rempe MA, Lewis GP, Fisher SK, Anderson DH (1991). Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6706-6710.

Hammond KL, Hanson IM, Brown AG, Lettice LA, Hill RE (1998). Mammalian and *Drosophila* dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb. *Mech. Dev.* 74: 121-131.

Hammond KL, Hill RE, Whitfield TT, Currie PD (2002). Isolation of three zebrafish dachshund homologues and their expression in sensory organs, the central nervous system and pectoral fin buds. *Mech Dev* 2002 112(1-2):183-9.

Harding JJ, Dilley KJ (1976). Structural proteins of the mammalian lens: a review with emphasis on changes in development, aging, and cataract. *Exp Eye Res* 22:1-73.

Harland RM (1991). In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol* 36:685-695.

Harris WA, Messersmith SL (1992). Two cellular inductions involved in photoreceptor determination in the *Xenopus* retina. *Neuron* 9:357-372.

Heanue TA, Reshef R, Davis RJ, Mardon G, Oliver G, Tomarev S, Lassar AB, Tabin CJ (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by *Dach2*, *Eya2* and *Six1*, homologue of genes required for *Drosophila* eye formation. *Genes Dev* 13: 3231-3243.

Heanue TA, Davis RJ, Rowitch DH, Kispert A, McMahon AP, Mardon G, Tabin CJ (2002). *Dach1*, a vertebrate homologue of *Drosophila* *dachshund*, is expressed in the developing eye and ear of both chick and mouse and is regulated independently of *Pax* and *Eya* genes. *Mech Dev* 111:75-87.

Henry JJ, Grainger RM. (1987). Inductive interactions in the spatial and temporal restriction of lens-forming potential in embryonic ectoderm of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 124:200-214.

Henry JJ, Grainger RM (1990). Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 141:149-163.

Henry JJ, Mittleman JM (1995). The matured eye of *Xenopus laevis* tadpoles produces factors that elicit a lens-forming response in embryonic ectoderm. *Dev Biol* 171:39-50.

Henry JJ, Carinato ME, Schaefer JJ, Wolfe AD, Walter BE, Perry KJ, Elbl TN (2002). Characterizing gene expression during lens formation in *Xenopus laevis*: evaluating the model for embryonic lens induction. *Dev Dyn* 224:168-185.

Hill RE, Favor J, Hogan BL, Ton CC, Saunders GF, Hanson IM, Prosser J, Jordan T, Hastie ND, Van Heyningen V (1991). Mouse small eye result from mutation in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354: 522-525.

Hirsch N, Harris WA (1997). *Xenopus Pax-6* and retinal development. *J Neurobiol* 32:45-61.

Hogan BL, Horsburgh G, Cohen J, Hetherington CM, Fisher G, Lyon MF (1986). Small eyes (*Sey*): a homeozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morph* 97: 95-110.

Hollyfield JG, Varner HH, Rayborn ME, Osterfeld AM (1989). Retinal attachment to the pigment epithelium. Linkage through an extracellular sheath surrounding cone photoreceptors. *Retina* 9(1):59-68.

Holt CE. (1980). Cell movements in *Xenopus* eye development. *Nature* 287: 850-852.

Holt CE, Bertsch TW, Ellis HM, Harris WA (1988). Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* 1:15-26.

Ikegami Y, Mitsuda S, Araki M (2002). Neural cell differentiation from retinal pigment epithelial cells of the newt: an organ culture model for the urodele retinal regeneration. *J Neurobiol* 50:209-220.

Ingham PW, Taylor AM, Nakano Y (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signaling. *Nature* 353: 184-187.

Itoh Y, Okada TS, Ide H, Eguchi G (1975). The differentiation of pigment cells in cultures of chick embryonic neural retina. *Dev. Growth Differ* 17:39-50.

Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A (2000). Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci* 20:7149-7157.

Jacobson AG (1958). The roles of neural and non-neural tissues in lens induction. *J Exp Zool* 139:525-557.

Jacobson AG (1963). The determination and positioning of the nose, lens and ear. II. The role of the endoderm. *J Exp Zool* 154:285-91.

Jiang Y.J, Chiou SH, Chang WC (1989). Lens crystallin changes associated with Amphibian metamorphosis: involvement of a β -crystallin polipeptide. *Biochem Biophys Res Comm* 164:1423-1430.

Johnson LV, Hageman GS, Blanks JC (1986). Interphotoreceptor matrix domains ensheath vertebrate cone photoreceptor cells. *Inv Ophthal & Vis Sci* 27:129-135.

Kamachi Y, Uchikawa M, Collingnon J, Lovell-Badge R, Kondoh H (1998). Involvement of Sox1, 2 and 3 in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125:2521-2532.

Kaneko Y, Matsumoto G, Hanyu Y (1999). Pax-6 expression during retinal regeneration in the adult newt. *Dev Growth Differ* 41:723-729.

Karakousis PC, John SK, Behling KC, Surace EM, Smith JE, Hendrickson A, Tang WX, Bennett J, Milam AH (2001). Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis* 7:154-163.

Kawakami K, Sato S, Ozaki H, Ikeda K (2000). Six family gene structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bio Essays* 22:616-626.

Keefe J R (1973a). An analysis of urodelian retinal regeneration: I. Studies of the cellular source of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens* utilizing ³H-thymidine and colchicine. *J Exp Zool* 184:185-206.

Keefe JR (1973b). An analysis of urodelian retinal regeneration: II. Ultrastructural features of retinal regeneration in *Notophthalmus viridescens*. *J Exp Zool* 184:239-258.

Keefe JR (1973c). An analysis of urodelian retinal regeneration: III. Degradation of extruded melanin granules in *Notophthalmus viridescens*. *J Exp Zool* 184:233-238.

Kennedy A, Frank RN (1993). Effects of a high-galactose diet on the interphotoreceptor matrix of two strains of rat. *Inv Ophthal & Vis Sci* 34:547-558.

Kim S, Zhang R, Braunstein E, Joachimiak A, Cvekl A (2002). Structure of the retinal determination protein dachshund reveals a DNA binding motif. *Structure* 10:787-795.

Kirby Rj, Hamilton G, Finnegan DJ, Johnson KJ, Jarman AP (2001). The *Drosophila* homologue of the myotonic dystrophy associated gene, Six5, is required for muscle and gonad development. *Curr Biol* 11:1044-1049.

Kozmik Z, Pfeffer P, Kralova J, Paces J, Paces V, Kalousova A, Cvekl A (1999). Molecular cloning and expression of the human and mouse homologues of the *Drosophila* Dachshund gene. *Dev Genes Evol* 209:537-545.

Laemmli UY (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lazarus HS, Hageman GS (1992). Xyloside-induced disruption of interphotoreceptor matrix proteoglycans results in retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(2):364-76.

Le AC, Musil LS (2001). FGF signaling in chick lens development. *Dev Biol* 233:394-411.

Lewis WH (1904). Experimental studies on the development of the eye in Amphibia. I. On the origin of the lens, *Rana palustris*. *Am J Anat* 3:505-536.

Li HS, Tierney C, Wen L, Wu J, Rao Y (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the precordale plate. *Development* 124:603-615.

Liddell JE, Cryer A (1991). A practical guide to monoclonal antibodies. John Wiley & Sons, New York.

- Liedke KB (1942). Lens competence in *Rana pipiens*. *J Exp Zool* 90:331-351.
- Liedke KB (1951). Lens competence in *Ambystoma punctatum*. *J Exp Zool* 117:573-591.
- Liedke KB (1955). Studies on lens induction in *Ambystoma punctatum*. *J Exp Zool* 130:353-379.
- Loosli F, Mardon G, Wittbrodt J (2002). Cloning and expression of medaka Dachshund. *Mech Dev* 112:203-206.
- Lopashov GV, Stroeva OG. 1961. Morphogenesis of the vertebrate eye. *Adv Morphogen* 1:331-377.
- Lopashov GV, Sologub AA (1972). Artificial metaplasia of pigmented epithelium into retina in tadpoles and adult frogs. *J. Embryol Exp Morph* 28:521-546.
- Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S, Zhou U (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev* 13:2196-2206.
- Lutty GA, Mello RJ, Chandler C, Fait C, Bennett A, Patz A (1985). Regulation of cell growth by vitreous humour. *J. Cell Sci.* 76:53-65.
- Mangold O (1931). Das Determinationsproblem. III. Das Wirbeltierauge in der Entwicklung und Regeneration. *Ergeb Biol* 7:193-403.
- Mardon G, Solomon NM, Rubin GM (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* 120:3473-3486.
- Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F, Gruss P (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105:43-55.
- Matsuo T, Osumi-Yamashita N, Noji S, Ohuchi H, Koyama E, Myokai F, Matsuo N, Taniguchi S, Doi H, Iseki S (1993). A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nat Genet* 3(4):299-304.
- McAvoy JW (1978). Cell division, cell elongation and the coordination of crystallin gene expression during lens morphogenesis in the rat. *Embryol. Exp. Morphol.* 45:271-281.
- McAvoy JW, Fernon V (1984). Neural retinas promote cell division and fibre differentiation in lens epithelial explants. *Curr Eye Res* 3:827-834.
- McAvoy JW, Chamberlain CG. (1989). Fibroblast growth factor (FGF) induces different responses in lens epithelial cells depending on its concentration. *Development* 107:221-228.
- McDevitt DS, Meza I, Yamada T (1969). Immunofluorescence

localization of the crystallins in amphibial lens development, with special reference to the gamma-crystallins. *Dev Biol* 19(6):581-607.

McDevitt DS, Croft LR (1977). On the existence of gamma-crystallin in the bird lens. *Exp Eye Res* 25:473-481.

McDevitt DS, Brahma SK, Courtois Y, Jeanny J-C (1997). Fibroblast growth factor receptors and regeneration of the eye lens. *Dev Dyn* 208:220-226.

Miller DL, Ortega S, Bashayan AO, Basch R, Basilico C (2000). Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 20:2260-2268.

Mizuno N, Mochii M, Yamamoto TS, Takahashi TC, Eguchi G, Okada TS (1999). Pax-6 and Prox 1 expression during lens regeneration from *Cynops* iris and *Xenopus* cornea: evidence for a genetic program common to embryonic lens development. *Differentiation* 65:141-149.

Moscona AA (1957). Formation of lentoids by dissociated retinal cells of the chick embryo. *Science* 125:598-599.

Nieuwkoop PD (1952). Activation and organization of the central nervous system in Amphibians. *J Exp Zool* 120:1-108.

Nieuwkoop PD, Faber J. (1956). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North-Holland, Amsterdam.

Ogino H, Yasuda K (2000). Sequential activation of transcription factors in lens induction. *Dev Growth & Differ* 42:437-448.

Ohsaki K, Morimitsu T, Ishida Y, Kominami R, Takahashi N (1999). Expression of the Vax family Homeobox genes suggests multiple roles in eye development. *Genes Cells* 4: 267-276.

Ohto H, Kamada S, Tago K, Tominaga SI, Ozaki H, Sato S, Katawami K (1999). Cooperation of six and eya in activation of their target genes through nuclear traslocation of Eya. *Mol Cell Biol* 19:881-891.

Okada TS, Yasuda K, Araki M, Eguchi G (1979a). Possible demonstration of multipotential nature of embryonic neural retina by clonal cell culture. *Dev Biol* 68:600-617.

Okada TS, Yasuda K, Nomura K (1979b). The presence of multipotential progenitor cells in embryonic neural retina as revealed by clonal cell culture. *INSERM Symo. N° 10*, pp. 335-346.

Overton J (1965). Changes in cell fine structure during lens regeneration in *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 24:211-222.

Park CM, Hollenberg MJ (1989). Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev Biol* 134:201-205.

Paton D, Craig JA (1974). Cataracts: development, diagnosis, and management. *Ciba Clin. Symp.* 26(3):2-32.

Perron M, Kanekar S, Vetter ML, Harris WA (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev Biol* 199:185-200.

Piatigorski J (1981). Lens differentiation in vertebrates. *Differentiation* 19:134-153.

Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA, Zipursky SL (1997). The eye specification proteins *So* and *Eya* form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* 91: 881-891.

Pittack C, Jones M, Reh TA (1991). Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina in vitro. *Development* 113:577-588.

Plantner JJ (1992). The presence of neutral metalloproteolytic activity and metalloproteinase inhibitors in the interphotoreceptor matrix. *Curr Eye Res* 11:91-101.

Plaza S, Dozler C, Saule S (1993). Quail Pax-6 (PAX-QNR) encodes a transcription factor able to bind and transactivate its own promoter. *Cell Growth Differ.* 4:1041-1050.

Pontecorvo G (1975). Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet.* 1:397-400.

Porrello K, LaVail MM (1986). Immunocytochemical localization of chondroitin sulfates in the interphotoreceptor matrix of the normal and dystrophic rat retina. *Curr Eye Res* 5:981-93.

Quiring R, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ (1994). Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* 265:785-789.

Rabaey M (1965). Lens protein during embryonic development of different vertebrates. *Invest Ophthalmol* 44:560-78.

Rabaey M (1968). In «Biochemistry of the eye» Symp. Tutzing Castle, p 301. Karger, Basel/New York.

Rabaey M, Lagasse A (1971). In «proteins of the Biological fluids, vol. 18, p. 117. Pergamon Press, Oxford/New York.

Rapaport DH, Patheal SL, Harris WA (2001). Cellular competence plays a role in photoreceptor differentiation in the developing *Xenopus* retina. *J Neurobiol* 49:129-141.

Reddan JR, Wilson-Dziedzic D (1983). Insulin like growth factor and epidermal growth factor trigger mitosis in lenses cultured in a serum free medium. *Invest Ophth Vis Sci* 24:409-416.

Reeve JG, Wild AE (1978). Lens regeneration from cornea of larval *Xenopus laevis* in the presence of the old lens. *Embryol Exp Morphol* 48:205-214.

Reyer RW (1977). The amphibian eye: development and regeneration. *Handbook of sensory Physiology* 7:309-390.

Rugh R (1962). "Experimental embryology". Burgess, Minneapolis, MN.

Saha MS, Spann CL, Grainger RM (1989). Embryonic lens induction: more than meets the optic vesicle. *Cell Diff Devel* 28:153-171.

Sakaguchi DS, Janick LM, Reh TA (1997). Basic fibroblast growth factor (FGF-2) induced transdifferentiation of retinal pigment epithelium: generation of retinal neurons and glia. *Dev Dyn* 209:387-398.

Sakaguchi K, Lorenzi MV, Bottaro DP, Miki T (1999). The acidic domain and first immunoglobulin-like loop of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF2) modulate downstream signaling through glycosaminoglycan modification. *Mol Cell Biol* 19(10):6754-64.

Sax CM, Piatigorsky J (1994). Expression of the α -crystallin/small heat shock protein/ molecular chaperone genes in the lens and other tissues. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 69:155-201.

Schaefer JJ, Oliver G, Henry JJ (1999). Conservation of gene expression during embryonic lens formation and cornea-lens transdifferentiation in *Xenopus laevis*. *Dev Dyn* 215:308-318.

Schedl A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van Heyningen V, Hastie ND (1996). Influence of Pax6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86:71-82.

Shen W, Mardon G (1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed dachshund expression. *Development* 124(1):45-52.

Schmahl W, Knoedlseder M, Favor J, Davidson D (1993). Defects in neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformation are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6 locus. *Acta Neuropathol* 86:126-135.

Schultz MW, Chamberlain CG, de longh RU, McAvoy JW (1993). Acidic and basic FGF in ocular media and lens: implications for lens polarity and growth patterns. *Development* 118: 117-126.

Seimia M, Ghering WJ (2000). The *Drosophila* homeobox gene optix is capable of inducing ectopic eyes by an eyeless-independent mechanism. *Development* 127:1879-1886.

Seo Hc, Curtiss J, Mlodzik M, Fjosc A (1999). Six class homeobox genes in *Drosophila* belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech Dev* 83:127-319

Servetnick M, Grainger RM (1991). Changes in neural and lens competence in *Xenopus* ectoderm: evidence for an autonomous developmental timer. *Development* 112:177-88.

Shulman M, Wilde CD, Kohler G (1978). A batter cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 276:269-270.

Smolich BD, Tarkington SK, Saha MS, Stathakis DG, Grainger RM (1993). Characterization of *Xenopus laevis* gamma-crystallin-encoding genes. *Gene* 128:189-95.

Smolich BD, Tarkington SK, Saha MS, Grainger RM (1994). *Xenopus* γ -crystallin gene expression: evidence that the γ -crystallin gene family is transcribed in lens and nonlens tissue, vol.14 (2), pp 1355-1363.

Sologub AA (1977). Mechanisms of repression and derepression of artificial transformation of pigmented epithelium into retina in *Xenopus laevis*. *Roux Arch Dev Biol* 182:277-291.

Spemann H (1901). Uber Korrelationen in der Entwicklung des Auges. *Verh Anat Ges* 15:61-79.

Spemann H (1908). Neue Versuchen zum Entwicklung des Wirbeltierauges. *Verh Dt Zool Ges* 18:101-110.

Spemann H (1912). Zur Entwicklung des Wirbeltierauges. *Zool Jb* 32:1-98.

Spemann H (1938). Embryonic development and induction. New Haven: University press.

Stone LS, Dinnean FL (1940). Experimental studies on the relation of the optic vesicle and cup to lens formation in *Ambystoma punctatum*. *J Exp Zool* 83:95-125.

Stone LS (1950). Neural retina degeneration followed by regeneration from surviving retinal pigment cells in grafted adult salamander eyes. *Anat Rec* 106:89-109.

St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P (1997). Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387(6631):406-9.

Summers L, Wistow G, Nareber M, Moss D, Lidley P (1984). Peptide and protein reviews, pp 147-168. Dekker, New York.

Tahara Y (1962). Formation of the idipendent lens in Japanese amphibians. *Embryologia* 7:127-149.

Tarapore P, Richmond C, Zheng G, Choen SB, Kelder B, Kopchick J, Kruse U, Sipel AE, Colmenatres C, Stavnezer E (1997). DNA-binding and transcriptional activation by the Ski oncoprotein mediated by interaction with NFI. *Nucleic Acids Res* 25:3895-3903.

Taylor IA, McIntosh PB, Pala P, Treiber MK, Howell S, Lane AN, Smerdon SJ (2000). Characterization of the DNA-binding domains from the yeast cell-cycle transcription factors Mbp1 and Swi4. *Biochemistry* 39:3943-3954.

Thiébaud CH (1983). A reliable new cell marker in *Xenopus*. *Dev Biol* 98:245-249.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci* 76:4350-4354.

Treisman J, Gonezy P, Vashlahta M, Harris E, Desplan C (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59:553-562.

Treisman J, Harris E, Desplan C (1991). The paired-box encodes a second DNA-binding domain in the Paired homeodomain protein. *Genes Dev* 5:594-604.

Treton JA, Jones RE, King CR, Piatigorsky J. (1984). Evidence against gamma-crystallin DNA or RNA sequences in the chicken. *Exp Eye Res* 39(4):513-522.

Turner DL, Snyder EY, Cepko CL (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4:833-845.

Waggoner PR (1973). Lens differentiation from the cornea following lens extirpation or cornea transplantation in *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 186(1):97-110.

Waggoner PR, Reyer RW (1975). DNA synthesis during lens regeneration in larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 192:65-72.

Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P (1991). Pax: a murine multigene family of paired-box containing genes. *Genomics* 11:424-434.

Watanabe T, Raff MC (1990). Rod photoreceptor development in vitro: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron* 4:461-467.

Watanabe T, Raff MC (1992). Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina. *Development* 114:899-906.

Wawersik S, Purcell P, Rauchman M, Dudley AT, Robertson EJ, Maas R (1999). BNP7 acts in murine lens placode development. *Dev Biol* 207:176-188.

Wawersik S, Purcell P, Maas RL (2000). Pax6 and the genetic control of early eye development, in *Vertebrate Eye Development* (Fini Me, ed.) pp. 15-36. Springer-Verlag, Berlin.

Wetts R, Fraser SE (1988). Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239:1142-1145.

Wistow GJ, Piatigorky J (1988). Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Ann Rev Biochem* 57:479-504.

Wu YQ, Notario V, Chader GJ, Becerra SP (1995). Identification of pigment epithelium-derived factor in the interphotoreceptor matrix of bovine eyes. *Protein Expr Purif* 6:447-456.

Xu W, Angelis K, Danielpour D, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Stavnezer E, Medrano EE (2000). Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 97:5924-5929.

Yamada T (1967). Cellular and subcellular events in Wolffian lens regeneration. *Curr Top Dev Biol* 2:247-83.

Yamada T (1977). Control mechanism in cell-type conversion in newt lens regeneration. *Monogr Dev Biol* 13:1-124.

Yao XY, Hageman GS, Marmor MF (1992). Recovery of retinal adhesion after enzymatic perturbation of the interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(3):498-503.

Yasuda K, Okada TS, Eguchi G, Hayashi M (1978). A demonstration of a switch of cell type in human fetal eye tissue in vitro. Pigmented cells of the iris or the retina can transdifferentiate into lens. *Exp Eye Res* 26:591-595.

Yasuda K, Educhi G, Okada TS (1981). Age-dependent changes in the capacity of transdifferentiation of retinal pigment cells as revealed in clonal culture. *Cell Diff* 10:3-11.

Zhao S, Thornquist SC, Barnstable CJ. 1995. In vitro transdifferentiation of embryonic rat retinal pigment epithelium to neural retina. *Brain Res* 677:300-310.

Zheng G, Teumer J, Colmenares C, Richmond C, Stavnezer E (1997). Identification of a core functional and structural domain of the v-Ski oncoprotein responsible for both transformation and myogenesis. *Oncogene* 15:459-471.

Zygar CA, Cook TL, Grainger RM Jr (1998). Gene activation during early stages of lens induction in *Xenopus*. *Development* 125:3509-3519.

Zwaan J (1983). The appearance of α -crystallin in relation to cell cycle phase in the embryonic mouse lens, 96:173-181.

PUBBLICAZIONI

Cannata SM, Arresta E, Bernardini S, Gargioli C, Filoni S. 2003. Tissue interactions and lens-forming competence in the outer cornea of larval *Xenopus laevis*. *J Exp Zool* 299A: 161-171.

Arresta E, Giambra V, Gargaro A, Bernardini S, Filoni S, Cannata SM. 2004. Dachshund expression during embryonic and larval development of *Xenopus laevis*. *Ita J Zool* 71(4): 275-278.

Arresta E, Filoni S, Bernardini S, Gargioli C, Cannata SM. 2005. Lens-forming competence in the epidermis of *Xenopus laevis* during development. *J Exp Zool* 303: 1-12.

Arresta E, Filoni S, Bernardini S, Cannata SM (submitted). Pigmented epithelium to NR transdifferentiation and *Pax6* expression in larval *X. laevis*. *J Exp Zool*.