



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCENZE

INDIRIZZO GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO

CICLO XXI

**IL MUTANTE *Sply* IN *Drosophila melanogaster*:
MODELLO PER LO STUDIO DI ALTERAZIONI DEL
METABOLISMO SFINGOLIPIDICO**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. TULLIO POZZAN

Supervisore: Ch.mo Prof. MAURO ZORDAN

Dottorando : ANNA MAGNABOSCO

31 gennaio 2009

*Alla mia mamma
per aver sempre creduto in me
e perché continui a camminare con me*

*A mio papà
per essere la roccia stabile della mia vita*

*A Fabio
per aver scelto di camminare insieme*

SOMMARIO

L'importanza degli sfingolipidi quali componenti delle membrane biologiche è stata rivalutata esclusivamente nel ventesimo secolo, quando diverse patologie congenite umane del metabolismo sono state finalmente correlate a difetti ed alterazioni nella degradazione degli sfingolipidi. Infatti, questa classe di lipidi è una componente ubiquitaria di tutte le membrane cellulari ed alcuni metaboliti, quali la Ceramide (Cer), la Sfingosina (Sph) e la Sfingosina-1 fosfato (S1P) svolgono importanti funzioni fisiologiche, tra le quali la regolazione della crescita e la sopravvivenza cellulare.

Recentemente, si sta, inoltre, sviluppando notevolmente un interesse volto alla comprensione del ruolo degli sfingolipidi nella biologia cellulare-neuronale. Infatti, gli sfingolipidi sembrano giocare un ruolo chiave nel *signalling* neuronale. In particolare, questa specifica funzionalità sembra essere svolta dagli sfingolipidi grazie alla loro presenza ed organizzazione in definite ed ordinate piattaforme lipidiche di membrana, le quali sono direttamente responsabili e coinvolte in numerosi processi cellulari, quali la trasduzione del segnale, il *trafficking* di membrana, l'organizzazione del citoscheletro, l'adesione neurale, la guida assonica e la trasmissione sinaptica.

In *Drosophila melanogaster*, sono stati scoperti ed individuati gli omologhi degli enzimi chiave appartenenti alla via metabolica sfingolipidica, rendendo quindi questo animale un ottimo modello per lo studio e l'analisi di tutti gli effetti funzionali e strutturali derivanti da alterazioni del metabolismo sfingolipidico, soprattutto a carico dello sviluppo, della funzionalità e dell'integrità dell'intero sistema nervoso.

In particolare, la nostra attenzione si è focalizzata sul mutante nullo per il gene sfingosina-1 fosfato liasi (Sply). Questi animali, durante lo stadio adulto, sono caratterizzati da una notevole riduzione nelle performance di volo, la quale sembra essere probabilmente correlata ad una importante degenerazione dei muscoli del volo e dei loro mitocondri.

Al contrario, durante lo stadio larvale, questi animali non evidenziano alcun deterioramento o anomalia a carico dell'apparato muscolare, essendo dotati di muscoli morfologicamente intatti e nella norma, ma mostrano comunque una chiara riduzione della capacità locomotoria. Inoltre, le giunzioni neuromuscolari (NMJ) sono caratterizzate da notevoli alterazioni morfologiche a livello dei loro complessi pre- e post-sinaptici. Infine, studi di *imaging* funzionale, realizzati mediante l'impiego del colorante lipofilico FM1-43, sottolineano delle modificazioni nel *recycling* delle vescicole sinaptiche. Questi risultati,

suggeriscono quindi una possibile relazione, almeno parziale, tra difetti locomotori e le alterazioni riscontrate a carico della giunzioni neuromuscolari.

ABSTRACT

The importance of sphingolipids in membrane biology was appreciated early in the twentieth century when several human inborn errors of metabolism were linked to defects in sphingolipid degradation. In fact, this class of lipids is a ubiquitous component of cell membranes and some metabolites: ceramide (Cer), sphingosine (Sph), and sphingosine-1-phosphate (S1P) have important physiological functions, including regulation of cell growth and survival.

Recently the role of sphingolipids in neural cell biology has also become a topic of investigation leading to the recognition that sphingolipids seem to play a key role in neuronal signalling, in particular through their presence in membrane lipid rafts which are involved in numerous cellular processes such as signal transduction, membrane trafficking, cytoskeletal organization, neural adhesion, axon guidance and synaptic transmission.

Homologs of key enzymes belonging to the sphingolipid metabolic pathway have been discovered in *Drosophila melanogaster*, making this an optimal model to study

the effects of dysregulation of sphingolipid metabolism on nervous system development, function and integrity.

In particular, our attention focused on *sphingosine-1-phosphate lyase gene (Sph)* null mutants. These animals, in the adult stages, show a profound reduction in flight performance which is probably related to the degeneration of flight muscle fibers and their mitochondria. On the other hand, larvae show locomotor impairments, although their muscles appear morphologically intact. . However, the neuromuscular junctions (NMJ) show significant morphological alterations at the level of the pre-and post synaptic complexes. Moreover, functional imaging studies using the lipophilic strylyl dye FM1-43, highlight anomalous synaptic vesicle recycling, which is confirmed by the electrophysiological analysis of synaptic function. These results suggest that the locomotion defects could be, at least in part, ascribed to the observed NMJ alterations.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| 1.1. IL MOSCERINO DELLA FRUTTA COME ORGANISMO MODELLO..... | 3 |
| 1.1.1. POTENZIALITÀ | 3 |
| 1.1.2. LO STADIO LARVALE | 5 |
| 1.1.2.1. L'apparato muscolare..... | 6 |
| 1.1.2.2. Il sistema nervoso periferico..... | 11 |
| 1.1.2.3. Il Sistema Nervoso Centrale..... | 22 |
| 1.2. GLI SFINGOLIPIDI..... | 25 |
| 1.2.1. STRUTTURA | 25 |
| 1.2.2. METABOLISMO..... | 27 |
| 1.2.3. FUNZIONE CELLULARE | 28 |
| 1.2.4. FUNZIONE NEURONALE | 31 |
| 1.2.5. PATOLOGIE UMANE CORRELATE..... | 33 |
| 1.2.6. SFINGOLIPIDI IN DROSOPHILA | 37 |
| 1.3. IL MUTANTE PER IL GENE <i>SPLY</i> | 38 |
| 1.3.1. L'ENZIMA S1P-LIASI (SPL)..... | 38 |
| 1.3.2. L'ENZIMA S1P-LIASI (SPL) IN DROSOPHILA | 40 |
| 1.3.3. CREAZIONE DEL MUTANTE <i>SPLY</i> | 41 |
| 1.3.4. CARATTERIZZAZIONE DEL FENOTIPO ADULTO | 42 |
| 2. SCOPO | 47 |
| 3. MATERIALI E METODI | 51 |
| 3.1. ORGANISMO MODELLO..... | 53 |
| 3.1.1. CICLO VITALE DI <i>Drosophila melanogaster</i> | 53 |
| 3.2. MANTENIMENTO DELLE LINEE DI DROSOPHILA IN LABORATORIO..... | 54 |
| 3.3. CEPPI DI <i>Drosophila melanogaster</i> UTILIZZATI | 55 |
| 3.3.1. CANTON-S: CANTON SPECIAL..... | 55 |
| 3.3.2. <i>SPLY</i> | 55 |
| 3.3.3. 14A..... | 55 |
| 3.4. MANIPOLAZIONE DI LARVE DI <i>Drosophila melanogaster</i> | 55 |
| 3.4.1. MATERIALE OCCORRENTE..... | 56 |
| 3.4.2. SOLUZIONI | 56 |
| 3.4.3. PROCEDURA | 57 |
| 3.5. COLORAZIONE CON RODAMINA-FALLOIDINA | 58 |
| 3.5.1. MATERIALE OCCORRENTE..... | 58 |
| 3.5.2. SOLUZIONI: | 58 |
| 3.5.3. PROCEDURA | 59 |
| 3.5.4. MICROSCOPIO CONFOCALE | 59 |
| 3.5.5. ANALISI DELLE FIBRE MUSCOLARI..... | 60 |
| 3.6. ANALISI DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE ($\Delta\Psi$ M)..... | 60 |
| 3.6.1. MATERIALE OCCORRENTE..... | 61 |
| 3.6.2. SOLUZIONI | 61 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.6.3. | PROCEDURA..... | 61 |
| 3.6.4. | MICROSCOPIO CONFOCALE..... | 62 |
| 3.6.5. | ANALISI DELLO STATUS MITOCONDRIALE | 62 |
| 3.7. | COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE..... | 63 |
| 3.7.1. | MATERIALE OCCORRENTE..... | 63 |
| 3.7.2. | SOLUZIONI..... | 63 |
| 3.7.3. | PROCEDURA..... | 64 |
| 3.7.4. | MICROSCOPIO CONFOCALE..... | 64 |
| 3.7.5. | ANALISI DEL CERVELLO E DELLE FIBRE MUSCOLARI..... | 65 |
| 3.8. | COLORAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA CON ANTI-HRP..... | 65 |
| 3.8.1. | MATERIALE OCCORRENTE..... | 65 |
| 3.8.2. | SOLUZIONI..... | 65 |
| 3.8.3. | PROCEDURA..... | 66 |
| 3.8.4. | MICROSCOPIO CONFOCALE..... | 66 |
| 3.8.5. | ANALISI MORFOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 67 |
| 3.9. | COLORAZIONI IMMUNOISTOCHEMICHE STRUTTURALI..... | 68 |
| 3.9.1. | MATERIALE OCCORRENTE..... | 69 |
| 3.9.2. | SOLUZIONI..... | 69 |
| 3.9.3. | PROCEDURA..... | 69 |
| 3.9.4. | MICROSCOPIO CONFOCALE..... | 70 |
| 3.9.5. | ANALISI STRUTTURALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE..... | 70 |
| 3.10. | METODO COLORIMETRICO CON FM1-43 | 71 |
| 3.10.1. | MATERIALE OCCORRENTE..... | 72 |
| 3.10.2. | SOLUZIONI..... | 72 |
| 3.10.3. | PROCEDURA..... | 72 |
| 3.10.4. | MICROSCOPIO CONFOCALE..... | 73 |
| 3.10.5. | ANALISI DEL <i>RECYCLING</i> VESCICOLARE..... | 73 |
| 3.11. | COLORAZIONE CON OIL RED O | 74 |
| 3.11.1. | MATERIALE OCCORRENTE..... | 74 |
| 3.11.2. | SOLUZIONI..... | 74 |
| 3.11.3. | PROCEDURA..... | 75 |
| 3.11.4. | MICROSCOPIO OTTICO | 75 |
| 3.11.5. | ANALISI DEL CERVELLO..... | 75 |
| 3.12. | ANALISI STRUTTURALE..... | 76 |
| 3.12.1. | MATERIALE OCCORRENTE..... | 76 |
| 3.12.2. | SOLUZIONI..... | 76 |
| 3.12.3. | PROCEDURA..... | 77 |
| 3.12.4. | MICROSCOPIO ELETTRONICO | 79 |
| 3.12.5. | ANALISI DEL CERVELLO E DELLE FIBRE MUSCOLARI..... | 79 |
| 3.13. | ANALISI STATISTICA..... | 79 |
| 4. | RISULTATI | 81 |
| 4.1. | APPARATO MUSCOLARE..... | 83 |
| 4.1.1. | ANALISI DELLA MORFOLOGIA MUSCOLARE | 83 |
| 4.1.1.1. | <i>Analisi dell'apparato muscolare.....</i> | <i>83</i> |
| 4.1.1.2. | <i>Analisi dei segmenti muscolari.....</i> | <i>84</i> |
| 4.1.1.3. | <i>Analisi delle singole fibre muscolari</i> | <i>86</i> |
| 4.1.2. | ANALISI DELLO STATUS MITOCONDRIALE | 88 |
| 4.1.3. | COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE..... | 93 |
| 4.1.4. | ANALISI STRUTTURALE DELLE FIBRE MUSCOLARI..... | 94 |
| 4.2. | SISTEMA NERVOSO PERIFERICO..... | 100 |
| 4.2.1. | ANALISI MORFOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE..... | 100 |
| 4.2.1.1. | <i>Analisi Morfologica della Giunzione.....</i> | <i>101</i> |
| 4.2.1.2. | <i>Analisi dei Bottoni Sinaptici.....</i> | <i>102</i> |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2.1.3. | <i>Analisi Area e Lunghezza della Giunzione</i> | 104 |
| 4.2.1.4. | <i>Analisi delle Ramificazioni Secondarie</i> | 105 |
| 4.2.2. | ANALISI ISTOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 109 |
| 4.2.2.1. | <i>Analisi della proteina Sinapsina</i> | 109 |
| 4.2.2.2. | <i>Analisi della proteina Nr82</i> | 114 |
| 4.2.2.3. | <i>Analisi della proteina DLG</i> | 123 |
| 4.2.3. | ANALISI FUNZIONALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 128 |
| 4.2.3.1. | <i>Analisi Funzionale con scarico di 1 minuto</i> | 129 |
| 4.2.3.2. | <i>Analisi Funzionale con scarico di 5 minuti</i> | 134 |
| 4.2.3.3. | <i>Analisi Funzionale con scarico di 10 minuti</i> | 138 |
| 4.2.4. | ANALISI STRUTTURALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 143 |
| 4.3. | SISTEMA NERVOSO CENTRALE | 149 |
| 4.3.1. | ANALISI ISTOLOGICA DELLA COMPONENTE LIPIDICA DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE | 149 |
| 4.3.2. | COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE | 152 |
| 5. | DISCUSSIONE | 159 |
| 5.1. | APPARATO MUSCOLARE | 162 |
| 5.1.1. | ANALISI DELLA MORFOLOGIA MUSCOLARE | 162 |
| 5.1.2. | ANALISI DELLO STATUS MITOCONDRIALE | 163 |
| 5.1.3. | COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE | 164 |
| 5.1.4. | ANALISI STRUTTURALE DELLE FIBRE MUSCOLARI | 165 |
| 5.1.5. | CONCLUSIONI COMPLESSIVE | 166 |
| 5.2. | SISTEMA NERVOSO PERIFERICO | 167 |
| 5.2.1. | ANALISI MORFOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 167 |
| 5.2.2. | ANALISI ISTOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 168 |
| 5.2.3. | ANALISI FUNZIONALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 169 |
| 5.2.4. | ANALISI STRUTTURALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE | 172 |
| 5.2.5. | ANALISI CONCLUSIVA | 174 |
| 5.3. | SISTEMA NERVOSO CENTRALE | 175 |
| 5.3.1. | ANALISI PRELIMINARE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE | 175 |
| 5.3.2. | COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE | 175 |
| 5.4. | CONCLUSIONI FINALI E PROSPETTIVE FUTURE | 177 |
| 6. | BIBLIOGRAFIA | 179 |

INDICE DELLE FIGURE

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Drosophila melanogaster</i> | 3 |
| Figura 2 - Stadio larvale. | 6 |
| Figura 3 - Pattern muscolare larvale. | 7 |
| Figura 4 - Muscoli larvali polinucleati..... | 8 |
| Figura 5 - Muscoli larvali supercontrattili. | 9 |
| Figura 6 - Struttura sarcomeri..... | 10 |
| Figura 7 - Innervazione singola di fibre muscolari. | 11 |
| Figura 8 - Sistema Nervoso Periferico in larva di <i>Drosophila</i> | 11 |
| Figura 9 - La giunzione neuromuscolare..... | 12 |
| Figura 10 - Classificazione dei bottoni sinaptici..... | 13 |
| Figura 11 - Struttura del bottone sinaptico..... | 14 |
| Figura 12 - Zone attive e T-bar in bottoni sinaptici. | 15 |
| Figura 13 - Zone Attive marcate con Nc82 in bottoni sinaptici. | 16 |
| Figura 14 - Sinapsina, localizzazione e ruolo..... | 17 |
| Figura 15 - Rappresentazione grafica di Bottoni di NMJ di <i>Drosophila</i> | 17 |
| Figura 16 - Struttura del reticolo subsinaptico. | 18 |
| Figura 17 - Organizzazione del reticolo subsinaptico. | 19 |
| Figura 18 - Rappresentazione del ciclo delle vescicole sinaptiche..... | 20 |
| Figura 19 - I due differenti pool delle vescicole sinaptiche..... | 22 |
| Figura 20 - Porzione anteriore della larva. | 22 |
| Figura 21 - Sistema Nervoso Centrale della larva..... | 23 |
| Figura 22 - SNC: gangli e neuroni..... | 23 |
| Figura 23 - La glia nel cervello di larva..... | 24 |
| Figura 24 - Gli sfingolipidi. | 26 |

| | |
|---|----|
| Figura 25 - Localizzazione degli sfingolipidi. | 27 |
| Figura 26 - Metabolismo degli sfingolipidi. | 27 |
| Figura 27 - Funzioni degli sfingolipidi. | 28 |
| Figura 28 - Vie di segnale attivate dalla S1P. | 29 |
| Figura 29 - Funzione cellulare degli sfingolipidi. | 30 |
| Figura 30 - Bilanciamento degli sfingolipidi. | 30 |
| Figura 31 - Domini di membrana classificati in base alla differente composizione lipidica. | 32 |
| Figura 32 - Regolazione dei processi di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche da parte dei <i>lipid rafts</i> | 32 |
| Figura 33 - Regolazione della mobilitazione e dell'immobilizzazione delle vescicole sinaptiche da parte dei <i>lipid rafts</i> | 33 |
| Figura 34 - Sfingolipidi in differenti organismi modello. | 37 |
| Figura 35 - Mutanti per diversi enzimi degli sfingolipidi in <i>Drosophila</i> | 38 |
| Figura 36 - Modello per la struttura e localizzazione dell'enzima SPL. | 39 |
| Figura 37 - Il gene <i>Sply</i> in <i>Drosophila</i> | 40 |
| Figura 38 - Espressione del gene <i>Sply</i> in <i>Drosophila</i> | 40 |
| Figura 39 - Mutagenesi del gene <i>Sply</i> in <i>Drosophila</i> | 41 |
| Figura 40 - Espressione del gene <i>Sply</i> nel mutante nullo per <i>Sply</i> | 41 |
| Figura 41 - Sezioni toraciche trasversali. | 42 |
| Figura 42 - Sezioni toraciche laterali. | 43 |
| Figura 43 - Ovari in adulti di controllo, mutanti e revertanti. | 45 |
| Figura 44 - Testicoli adulti in controlli, mutanti e revertanti. | 46 |
| Figura 45 - Ciclo vitale di <i>Drosophila melanogaster</i> | 53 |
| Figura 46 - Dissezione di una larva di <i>Drosophila</i> | 56 |
| Figura 47 - <i>Body wall</i> di larva di <i>Drosophila</i> | 57 |
| Figura 48 - Stima e dimensionamento dei bottoni presenti in una giunzione. | 67 |
| Figura 49 - Catalogazione ed dimensionamento delle singole ramificazioni presenti in una giunzione. | 68 |
| Figura 50 - Catalogazione ed il dimensionamento delle singole zone attive presenti in un singolo bottone. | 71 |

| | |
|---|-----|
| Figura 51 - <i>Body wall</i> con Rodamina-Falloidina. | 84 |
| Figura 52 - Valori medi delle larghezze e delle lunghezze. | 85 |
| Figura 53 - Indice Morfologico | 85 |
| Figura 54 - Analisi della lunghezza dei singoli sarcomeri. | 86 |
| Figura 55 - Grandezza media dei sarcomeri. | 87 |
| Figura 56 - Analisi status mitocondriale in fibre Canton S..... | 90 |
| Figura 57 - Analisi status mitocondriale in fibre <i>Sph</i> | 91 |
| Figura 58 - Analisi segnale TMRM. | 92 |
| Figura 59 - Colorazione con BODIPY-FL C ₅ – Ceramide. | 93 |
| Figura 60 - Struttura delle fibre muscolari Canton S..... | 95 |
| Figura 61 - Accumuli ridotti in fibre muscolari <i>Sph</i> | 97 |
| Figura 62 - Accumuli estesi in fibre muscolari <i>Sph</i> | 99 |
| Figura 63 - Struttura delle fibre muscolari <i>Sph</i> | 100 |
| Figura 64 - Giunzioni neuromuscolari. | 101 |
| Figura 65 - Numero medio bottoni sinaptici per NMJ..... | 102 |
| Figura 66 - Distribuzione dei bottoni in dimensioni..... | 103 |
| Figura 67 - Distribuzione dei bottoni in base al diametro..... | 103 |
| Figura 68 - Area media NMJ..... | 104 |
| Figura 69 - Lunghezza media delle NMJ..... | 105 |
| Figura 70 - Catalogazione delle ramificazioni secondarie..... | 106 |
| Figura 71 - Distribuzione numerica delle ramificazioni per livello. | 107 |
| Figura 72 - Lunghezza media della singola ramificazione per livello..... | 107 |
| Figura 73 - Lunghezza media complessiva per livello..... | 108 |
| Figura 74 - Giunzioni Canton S trattate con anti-Sinapsina..... | 110 |
| Figura 75 - Analisi della distribuzione della Sinapsina in bottoni Canton S. | 111 |
| Figura 76 - Giunzioni <i>Sph</i> trattate con anti-Sinapsina. | 112 |
| Figura 77 - Analisi della distribuzione della Sinapsina in bottoni <i>Sph</i> | 113 |
| Figura 78 - Giunzioni 14A trattate con anti-Sinapsina..... | 114 |
| Figura 79 - Giunzioni Canton S trattate con anti-Nc82, | 115 |

| | |
|--|-----|
| Figura 80 - Giunzioni <i>Sply</i> trattate con anti-Nc82..... | 116 |
| Figura 81 - Giunzioni 14A trattate con anti-Nc82..... | 117 |
| Figura 82 - Numero medio Zone Attive per bottone..... | 117 |
| Figura 83 - Numero medio Zone Attive per Unità Area Sinaptica. | 118 |
| Figura 84 - Numero medio Zone Attive per area del bottone. | 119 |
| Figura 85 - Area media delle singole Zone Attive..... | 120 |
| Figura 86 - Area totale delle Zone Attive per bottone. | 121 |
| Figura 87 - Area totale Zone Attive per area del bottone. | 121 |
| Figura 88 - Indice di frazione attiva..... | 122 |
| Figura 89 - Giunzioni Canton S trattate con anti-DLG. | 124 |
| Figura 90 - Analisi della distribuzione di DLG in bottoni Canton S..... | 125 |
| Figura 91 - Giunzioni <i>Sply</i> trattate con anti-DLG..... | 126 |
| Figura 92 - Analisi della distribuzione di DLG in bottoni <i>Sply</i> | 127 |
| Figura 93 - Giunzioni 14A trattate con anti-DLG..... | 128 |
| Figura 94 - Analisi funzionale della giunzione neuromuscolare..... | 129 |
| Figura 95 - Funzionalità delle NMJ larvali di Canton S con scarico di 1 minuto. | 130 |
| Figura 96 - Funzionalità delle NMJ larvali di <i>Sply</i> con scarico di 1 minuto..... | 131 |
| Figura 97 - Funzionalità delle giunzioni NMJ larvali di Canton S e <i>Sply</i> con scarico di 1 minuto. | 133 |
| Figura 98 - Valutazione rilasci Canton S e <i>Sply</i> dopo scarico di 1 minuto..... | 133 |
| Figura 99 - Funzionalità Canton S con scarico di 5 minuti..... | 134 |
| Figura 100 - Funzionalità di NMJ larvali di <i>Sply</i> con scarico di 5 minuti..... | 136 |
| Figura 101 - Funzionalità delle giunzioni NMJ larvali di Canton S e <i>Sply</i> con scarico di 5 minuti..... | 137 |
| Figura 102 - Valutazione rilasci Canton S e <i>Sply</i> con scarico di 5 minuti..... | 138 |
| Figura 103 - Funzionalità delle NMJ larvali di Canton S con scarico di 10 minuti. | 139 |
| Figura 104 - Funzionalità delle NMJ larvali di <i>Sply</i> con scarico di 10 minuti..... | 140 |
| Figura 105 - Funzionalità delle giunzioni NMJ larvali di Canton S e <i>Sply</i> con scarico di 10 minuti..... | 142 |
| Figura 106 - Valutazione rilasci Canton S e <i>Sply</i> con scarico di 10 minuti..... | 142 |

| | |
|--|-----|
| Figura 107 - Struttura dei bottoni sinaptici Canton S. | 144 |
| Figura 108 - Zone Attive nei bottoni sinaptici Canton S | 145 |
| Figura 109 - Struttura dei bottoni sinaptici <i>Sply</i> | 146 |
| Figura 110 - Zone Attive nei bottoni sinaptici <i>Sply</i> | 148 |
| Figura 111 - Analisi lipidica in cervelli Canton S. | 150 |
| Figura 112 - Analisi lipidica in cervelli <i>Sply</i> | 151 |
| Figura 113 - Colorazione con Ceramide in cervelli Canton S. | 153 |
| Figura 114 - Colorazione con Ceramide in cervelli <i>Sply</i> | 156 |
| Figura 115 - Accumuli lipidici nel cervello. | 176 |

1. INTRODUZIONE

1.1. IL MOSCERINO DELLA FRUTTA COME ORGANISMO MODELLO



Phylum: Arthropoda,
Subphylum: Uniramia
Classe: Insecta
Ordine: Diptera.
Famiglia: Drosophilidae
Genere *Drosophila*
Specie *melanogaster*

Figura 1 - *Drosophila melanogaster*.

A sinistra una femmina, a destra un maschio (tratto e modificato da *Fhymove*).

D. melanogaster è un invertebrato appartenente al Phylum Arthropoda, Subphylum Uniramia, Classe Insecta, Ordine Diptera.

Drosophila è un genere della famiglia Drosophilidae (ordine Ditteri) composto da più di 1000 specie descritte tra le quali la meglio conosciuta e più ampiamente studiata è *Drosophila melanogaster*.

Il moscerino della frutta è stato tra i primi organismi utilizzati per l'analisi genetica a partire dai primi anni del 1900 e, allo stato attuale, costituisce, tra tutti gli eucarioti, uno di quelli più diffusamente impiegati e meglio noti sotto il profilo genetico.

1.1.1. POTENZIALITÀ

Il moscerino della frutta è comunemente reperibile e relativamente semplice da allevare; le piccole dimensioni permettono di manipolarlo facilmente, e di mantenerlo senza eccessive spese. Il ciclo vitale di *Drosophila* è breve e la sua fecondità elevata, caratteristiche che rendono possibile ottenerne un gran numero di individui, e di diverse generazioni, in poco tempo. Inoltre il suo genoma, composto da 4 cromosomi, è circa 1/20 di quello di mammifero: ciò ha facilitato l'analisi genetica, l'isolamento di svariati ceppi mutanti ed il sequenziamento dell'intero genoma.

Grazie alla sua versatilità, *D. melanogaster* è stata utilizzata sin dai primi anni del '900 come organismo sperimentale in numerosi e diversi studi, genetici e non solo [1]. Infatti, dai primi esperimenti fatti da Morgan nel 1909, l'impiego di questo organismo per gli studi genetici ha condotto nuove ed importantissime conoscenze riguardanti la struttura ed i riarrangiamenti dei cromosomi, l'esistenza e la localizzazione dei geni, il concetto di mutazione e le sue caratterizzazioni, la ricombinazione genica.

In *Drosophila*, è possibile mutagenizzare direttamente e specificatamente un gene d'interesse ed analizzare e valutare il fenotipo mutante ottenuto. Infatti, la maggior parte delle mutazioni geniche si esprime in alterazioni della vitalità, del comportamento, o in anomalie strutturali specifiche dell'animale durante gli stadi embrionali, larvali e di adulto. Inoltre, nuove tecniche d'analisi morfologica permettono lo studio di singole linee cellulari mediante l'impiego di specifici anticorpi, lo screening di mutazioni a carico dell'oogenesi, della determinazione sessuale, della percezione sensoriale e della capacità d'apprendimento e di memoria. In questo modo, sono stati già descritti più di 3000 geni, numero però in continua crescita, contribuendo così a relazionare a ciascun gene il suo fenotipo e funzione.

Le risposte fornite dai diversi esperimenti su *Drosophila* possono essere rilevanti per mammiferi come *Homo*: infatti, l'alto grado di omologia, trovato per un vasto numero di molecole fondamentali, si estende in molti casi anche ad un'omologia funzionale. Ciò suggerisce che i meccanismi basilari per lo sviluppo e la sopravvivenza degli organismi pluricellulari si instaurarono ben prima della divergenza evolutiva tra i progenitori del moscerino e quelli dell'uomo, 500 milioni di anni fa [1].

Tutto ciò rende il moscerino della frutta particolarmente idoneo ad approcci sperimentali multidisciplinari: mentre alcuni problemi posti dalle indagini sulla biologia delle cellule eucariotiche sono meglio affrontati adoperando il lievito (organismo unicellulare) o colture cellulari tratte da animali più complessi, altri aspetti possono essere capiti solo studiando un organismo *in vivo*: ad esempio, il processo sotto studio può coinvolgere un comportamento, non comprensibile guardando alle proprietà di singole cellule.

La necessità, di poter valutare un organo nella sua integrità o l'intero animale nel suo complesso, è alla base della caratterizzazione di tutte le malattie genetiche umane. Per questo motivo, *Drosophila* emerge come un organismo modello estremamente adatto non solo alla comprensione fenotipica ma anche allo sviluppo terapeutico.

Infatti, *Drosophila*, grazie alla sua eccellente manipolazione genica, permette la creazione di modelli di specifiche patologie, analizzabili morfologicamente, strutturalmente e con costi nettamente inferiori ai modelli murini.

In particolare, *Drosophila* è stata impiegata per creare modelli di diverse patologie neurodegenerative mediante animali transgenici per tauopatie, per il morbo di Alzheimer, e per la malattia di Parkinson [2][3].

In quanto a ciò, *Drosophila*, con i suoi circa 200.000 neuroni, è a un livello intermedio fra il semplice circuito nervoso necessario alla plasticità comportamentale in *Aplysia* (gasteropode marino studiato in neurofisiologia) e i 10^8 - 10^{11} neuroni del cervello di mammifero. Ciò nonostante il moscerino è in grado di sviluppare comportamenti complessi, e fornire modelli di plasticità comportamentale (ad esempio nei ritmi circadiani, nelle risposte olfattive e visive, nel corteggiamento e nell'apprendimento) [4].

Risulta comunque evidente, che vi sono delle notevoli differenze in termini di complessità tra i moscerini, i topi e l'uomo. Questa semplicità di base che contraddistingue *Drosophila* deve essere correttamente considerata nel momento in cui viene creato un nuovo modello genetico. Infatti, i moscerini sono caratterizzati da un sistema circolatorio molto semplice e processi cognitivi limitati.

Contemporaneamente però, questa semplicità organizzativa, rende facile la manipolazione genica, la comprensione di processi cellulari complessi quali il controllo del ciclo cellulare e della trasduzione del segnale, ed i meccanismi coinvolti nella genesi di molte patologie [5].

1.1.2. LO STADIO LARVALE

La larva è costituita da venti segmenti: la testa, i tre segmenti toracici ed infine gli otto segmenti addominali. L'apertura boccale si trova, in posizione ventrale, a livello del segmento della testa. La parete del corpo larvale, leggera e flessibile, è costituita da una struttura non cellulare, cuticolare, esterna e da una epidermide cellulare più interna. La cuticola è costituita da due strati: il primo che si colloca più all'esterno è detto esocuticola, il secondo strato più sottile e lamellare costituisce l'endocuticola. La cuticola di ogni singolo segmento sostiene, attorno al suo bordo anteriore, un anello multiplo di uncini chitinosi. Intorno alla bocca ci sono inoltre un buon numero di uncini chitinosi.

Le larve sono abbastanza trasparenti. Nella larva viva, se osservata sotto la luce, sono ben distinguibili i corpi grassi dall'aspetto di masse biancastre, l'intestino convoluto, i tubi Malpighiani giallastri e le gonadi, inserite nel corpo grasso. Il tubo muscolare che corre lungo la linea mediana dorsale del corpo dell'animale, rappresenta l'unico vaso sanguigno della larva, ovvero il suo organo circolatorio. La sua porzione anteriore prende il nome di aorta, mentre il cuore è ben identificabile, grazie alle sue pulsazioni, nella porzione posteriore più larga dell'organo circolatorio.

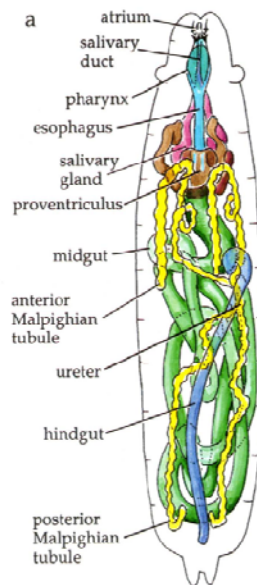


Figura 2 - Stadio larvale.

In figura è riportato uno schema del corpo di una larva di *Drosophila* con gli organi principali [6].

Le due grandi tracheole laterali che attraversano l'intero corpo della larva, da parte a parte, costituiscono la caratteristica principale della larva. I muscoli larvali, arrangiati in maniera segmentata, sono trasparenti ma possono essere resi visibili in seguito a fissazione con acqua calda. La larva si caratterizza inoltre per la presenza di strutture cellulari primitive dette dischi imaginali, dai quali avranno origine le successive strutture imaginali. Il meccanismo principale tramite il quale la larva cresce è la muta. Ad ogni muta, l'intera cuticola dell'insetto, compresa l'apparato boccale, gli spiracoli e le molte strutture cuticolari specializzate, si disintegra e deve essere ricostruita nuovamente. La crescita degli organi interni procede gradualmente e sembra essere indipendente dagli eventi di muta che interessano le strutture cuticolari [6].

1.1.2.1. L'apparato muscolare

La locomozione della larva di *Drosophila* ha un andamento peristaltico su una superficie piatta ed è normalmente rivolta all'approvvigionamento del cibo od alla ricerca di un luogo adatto per la metamorfosi.

I muscoli della parete larvale ricoprono la superficie interna del corpo, appena sotto l'epidermide e la cuticola, formando uno strato interno che circonda tutte le viscere. I muscoli larvali sono suddivisibili in tre categorie principali: dorsali, laterali e ventrali. I muscoli, sono, inoltre, denominati longitudinali, trasversali, obliqui od acuti, considerando

eccezioni quelli che costituiscono i bordi dei segmenti e quelli che costituiscono l'intestino. Infine, i muscoli obliqui ed acuti sono impiegati per distinguere tra i muscoli che corrono fra la porzione anteriore dorsale a quella ventrale posteriore (muscoli obliqui) e quelli che decorrono fra la porzione posteriore dorsale a quella anteriore ventrale (acuti). Ogni sub-categoria, come la Obliqua Dorsale, è numerata dal dorso al ventre e dall'anteriore al posteriore (Figura 3) [7].

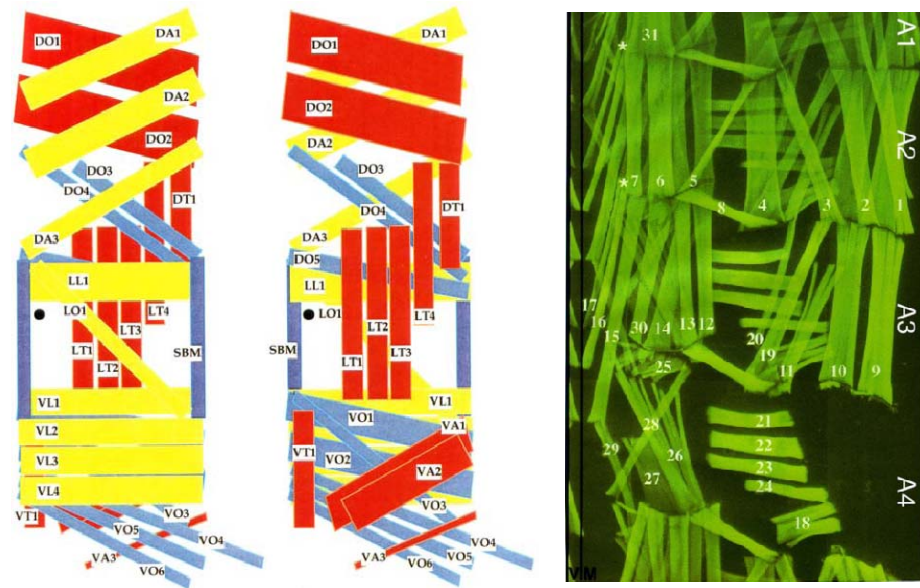


Figura 3 - Pattern muscolare larvale.

In figura è riportata l'organizzazione muscolare della larva di *Drosophila* in ogni singolo emisegmento. Per ogni emisegmento è riportata una visione dall'interno della larva (immagine a sinistra) ed una visione dall'esterno (immagine centrale). Mentre l'immagine a sinistra rappresenta tre emisegmenti consecutivi nei quali sono evidenziati i muscoli dosali, laterali e ventrali classificati con termini numerici. La porzione dorsale è sopra, mentre la linea ventrale sotto [7].

In ogni emisegmento larvale ci sono 30 muscoli disposti longitudinalmente e obliquamente lungo l'asse del corpo. Nei segmenti addominali dal 2 al 7 i muscoli sono ordinati e simmetrici mentre nei segmenti primo e ultimo ci sono delle differenze dovute alla presenza dell'apparato buccale e del tratto digerente terminale, rispettivamente. I singoli muscoli ricevono l'input nervoso grazie alla loro diretta e specifica innervazione con un particolare motoneurone che si diparte dal cervello (Figura 3).

Ogni fibra muscolare della larva è composta da una singola cellula plurinucleata attaccata alla cuticola tramite le sue proiezioni interne (apotemi), come in Figura 4.

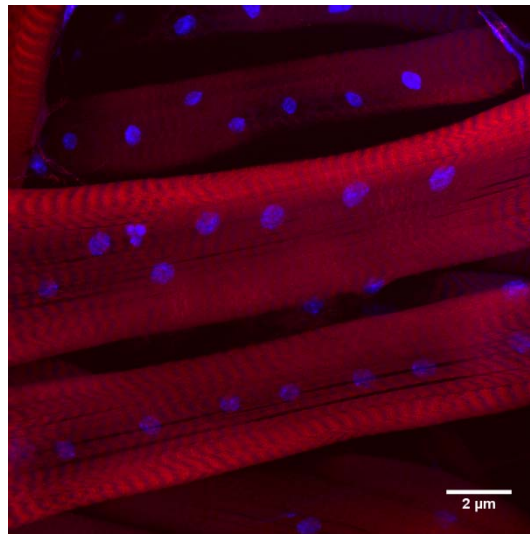


Figura 4 - Muscoli larvali polinucleati.

In figura sono fotografati i muscoli 6 e 7 del segmento 3 di destra di una larva. I muscoli sono stati trattati con Rodamina-falloidina (rosso) e con Dapi (blu). Sono visibili le strutture contrattili (rosso) ed i nuclei presenti nelle diverse fibre muscolari (blu) posti sulla porzione superiore dorsale delle fibre stesse.

Tutti i muscoli di larva di *Drosophila* sono striati, compresa la muscolatura viscerale ed il cuore, e sono detti supercontrattili per la loro capacità di contrarsi per più del 50% della lunghezza totale obbligando così i filamenti spessi di Miosina ad attraversare la linea Z. Nella sezioni longitudinali questi muscoli mostrano miofibrille con linee Z e bande A irregolari, bande I completamente estese, bande H indistinte e linee M assenti. La lunghezza del sarcomero varia tra i 2 e gli 8 μm , ma lo sviluppo della tensione è poco sensibile a questa (Figura 5).

Nonostante l'ultrastruttura dei muscoli larvali di *Drosophila* e quelli striati dei Vertebrati mostri una gran diversità, l'organizzazione molecolare dei filamenti spessi e sottili suggerisce che i principi base della contrazione e la sua regolazione siano confrontabili.

Infatti, oltre che da Miosina, i filamenti spessi sono composti da Paramiosina e Miniparamiosina, codificate dallo stesso gene. Mentre la Paramiosina è ampiamente espressa nei muscoli larvali, la Miniparamiosina mostra solo un picco transiente di espressione durante lo sviluppo embrionale e larvale che diminuisce durante la fase di pupa. L'actina invece è codificata da 6 geni ed è presente in 4 isoforme muscolo-specifiche (Figura 6).

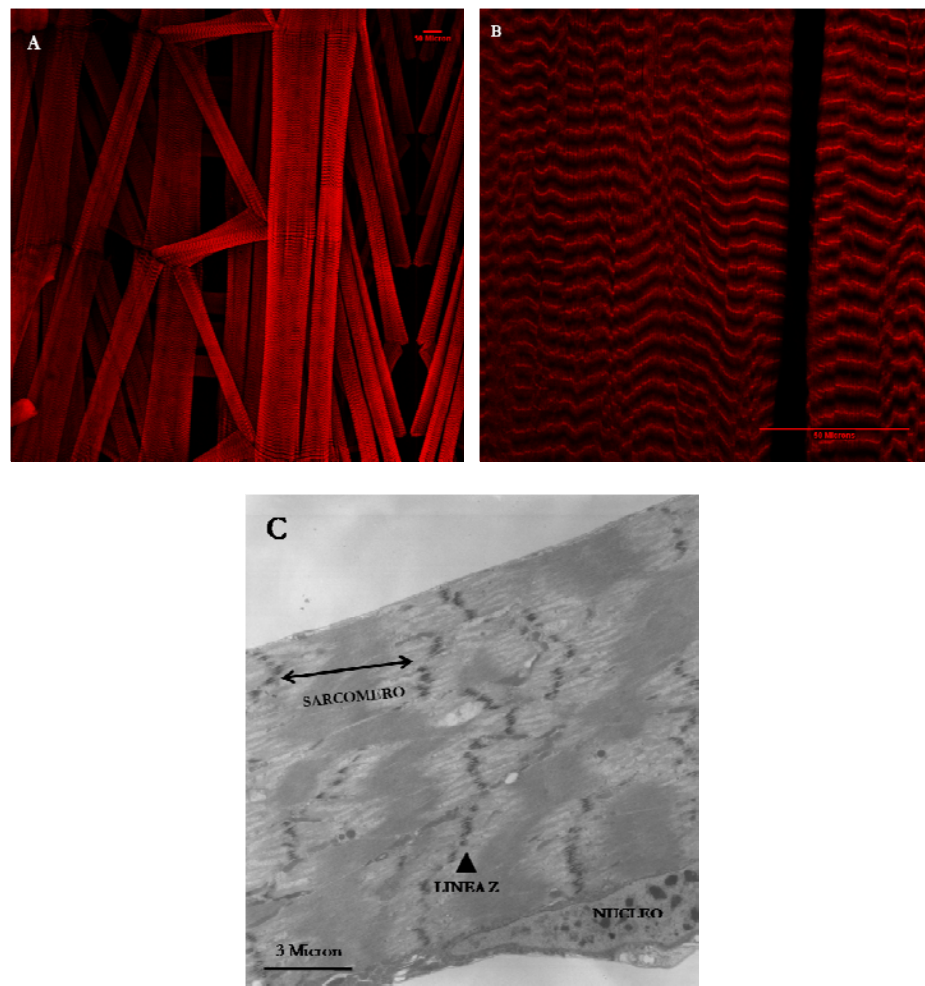


Figura 5 - Muscoli larvali supercontrattili.

In figura A sono fotografati, mediante microscopio confocale, i muscoli 6 e 7 del segmento 3 di destra di una larva. I muscoli sono stati trattati con Rodamina-falloidina (rosso) rendendo visibili i filamenti di actina. In figura B ingrandimento delle medesime fibre muscolari 6 e 7. Sono visibili le linee Z (Linee rosse molto luminose) con i filamenti di actina che da esse dipartono. In figura C sezione laterale di una fibra muscolare 6 osservata al microscopio elettronico. Si notano: il nucleo, le linee Z ed i sarcomeri.

Nei muscoli di larva, come in quelli di adulto, il principale regolatore della risposta contrattile è il complesso della Troponina formato da 3 subunità: Troponina C, I, e T che mediano la risposta del filamento sottile al calcio quando la contrazione muscolare ha inizio. In *Drosophila* la TpnT e la TpnI sono codificate da singoli geni localizzati nel cromosoma X e che danno origine a diverse isoforme con *splicing* alternativo. La quarta proteina associata al complesso proteico per la regolazione è la Tropomiosina che è codificata da 2 geni, *Tm1* e *Tm2*.

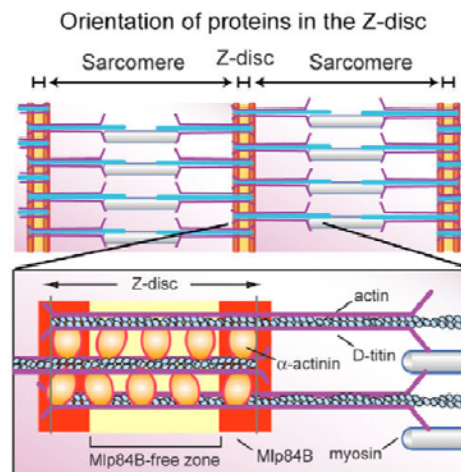


Figura 6 - Struttura sarcomeri.

In figura è riportata la struttura del sarcomero della fibra muscolare di larva. Sono evidenziati i principali componenti di questa struttura [8].

L'innervazione dell'intero apparato muscolare presente nella parete larvale è estremamente complessa, in quanto differenti muscoli presentano differenti innervazioni. Questa eterogeneità nella tipologia d'innervazione sembra essere associata con la contrazione stessa dell'apparato muscolare, la quale non è guidata da un potenziale d'azione ma da un potenziale post-sinaptico, il quale ne regola la durata e l'ampiezza. Infatti, nelle fibre muscolari larvali non sono presenti canali sodio voltaggio dipendenti, ma depolarizzazione e contrazione delle fibre stesse sono regolate da canali calcio voltaggio-dipendenti. In base a ciò, il rilascio del neurotrasmettitore avviene in differenti strutture finali sinaptiche, le quali controllano l'ampiezza e la durata del potenziale post-sinaptico, determinando così una risposta muscolare contrattile estremamente fine.

In particolare, ognuno dei 30 muscoli, che compongono ogni emisegmento, è innervato da un singolo motoneurone, e ciascuno di questi mostra un caratteristico grado di ramificazione, una particolare morfologia dei bottoni ed uno specifico set di neurotrasmettitori (Figura 7) [9].

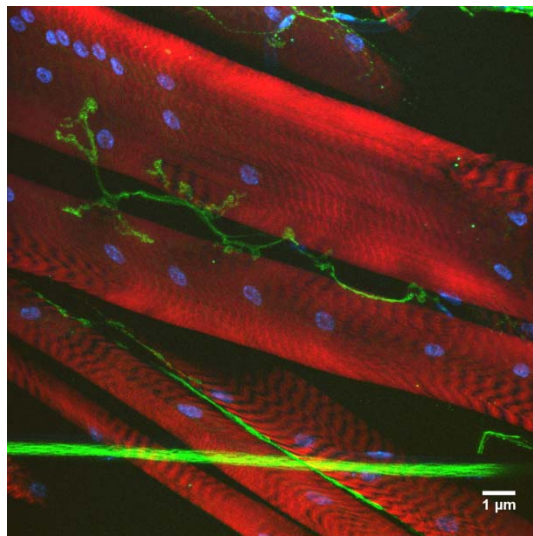


Figura 7 - Innervazione singola di fibre muscolari.

In figura sono riportate le fibre muscolari 6 e 7 del segmento 3 di destra (rosso) con la propria innervazione (verde) ed i propri nuclei (blu). Le fibre sono state colorate con Rodamina-Faloidina (rosso), la giunzione neuromuscolare con FITC- α HRP (verde) ed i nuclei con il DAPI (blu).

1.1.2.2. Il sistema nervoso periferico

Ogni emisegmento larvale è composto da 30 muscoli differenti, i quali sono direttamente innervati da 32 motoneuroni. In particolare, gli assoni dei diversi motoneuroni sono raggruppati in 6 maggiori ramificazioni nervose: ISN (ramificazione nervosa intersegmentale), SNa (braccio nervoso segmentale a), SNb (braccio nervoso segmentale b), SNc (braccio nervoso segmentale c), Snd (braccio nervoso segmentale d) e TN (nervo trasversale), come in Figura 8 [10].

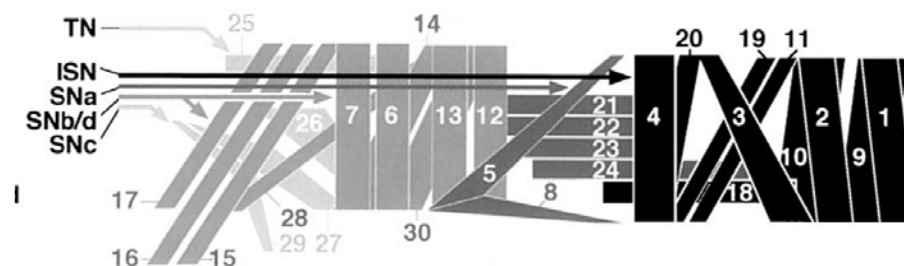


Figura 8 - Sistema Nervoso Periferico in larva di *Drosophila*.

Lo schema riporta l'organizzazione dell'innervazione e dei muscoli del secondo emisegmento di destra. La porzione anteriore della larva è in alto. Sono riportati i sei bracci nervosi, i quali dipartendo dal cervello, vanno ad innervare i 30 muscoli del singolo emisegmento [10].

L'area di contatto fra fibra nervosa e fibra muscolare è detta giunzione neuromuscolare (NMJ, Figura 9). Le NMJ sono le sinapsi che intercorrono tra gli assoni dei motoneuroni e le fibre muscolari scheletriche, e sono sinapsi di natura chimica.

La NMJ di larva di *Drosophila melanogaster* è diventata uno dei più potenti sistemi modello da usare quando si vuole rispondere a dei quesiti di tipo neurobiologico, grazie alla sua semplicità, accessibilità ed alla relativa semplicità offerta dall'organismo per l'effettuazione di manipolazioni genetiche importanti per lo studio dello sviluppo e la formazione della giunzione stessa.

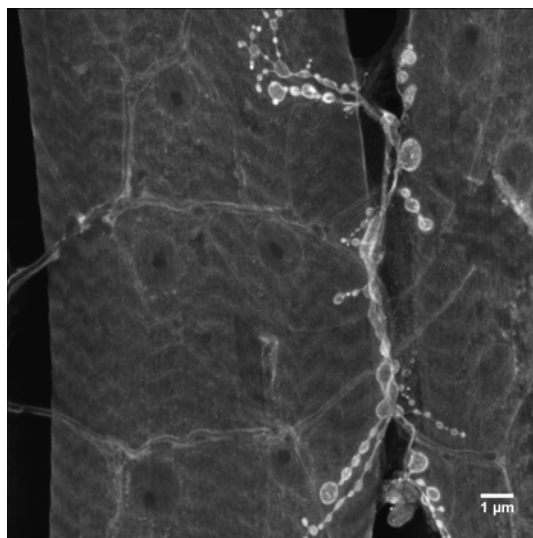


Figura 9 - La giunzione neuromuscolare.

In figura sono riportate le fibre muscolari 6 e 7 del segmento 3 di destra con la propria giunzione neuromuscolare.

I neuroni motori stabiliscono dei contatti sinaptici strutturalmente diversi con le varie cellule muscolari seppur i meccanismi di funzionamento delle giunzioni neuromuscolari siano simili. I motoneuroni vanno a formare delle connessioni con le cellule muscolari dando vita ad una doccia neurale in cui più terminazioni nervose innervano il muscolo ed ogni fibra è innervata da una solo motoneurone. Il meccanismo di funzionamento delle sinapsi chimiche prevede il rilascio di neurotrasmettitore dal neurone motore (pre-sinaptico) nella fessura sinaptica, mentre sulla membrana della cellula muscolare sottostante (post-sinaptico) vi sono i recettori per il neurotrasmettitore rilasciato che, legandosi ad essi, induce una risposta nella cellula sottostante [11].

L'assone dei motoneuroni in prossimità della fibra muscolare si ramifica dando origine ad una serie di varicosità (bottoni sinaptici) ravvicinate in una struttura chiamata placca. L'insieme di queste singole strutture costituisce la giunzione neuromuscolare. In

particolare, esistono diverse tipologie di giunzione neuromuscolare in base al grado di ramificazione secondarie, morfologia dei bottoni e soprattutto il set di neurotrasmettitori impiegato [12][13]. Infatti, il neurotrasmettitore maggiormente usato dai terminali eccitatori è il glutammato, in alcuni casi octopamina, ed in altri si tratta di neuropeptidi quali: peptidi simili all'insulina, simili alla leucochinina1, protocolina, peptidi attivanti l'adenilato-ciclastasi della ghiandola pituitaria (PACAP) [14][15][16][17].

In particolare, in base alla morfologia, dimensioni e tipologia di neurotrasmettitore rilasciato, i bottoni sinaptici vengono classificati in tipo I, II, III (Figura 10).

I bottoni di tipo I sono caratterizzati da grandi dimensioni (2-6 μm), e contengono vescicole chiare e circolari contenenti glutammato. Generalmente, i bottoni di tipo I sono suddivisi in tipo Ib (con diametro maggiore 3-6 μm) e tipo Is (con diametro minore 2-4 μm), con gli ultimi che sono più estesi sulla superficie muscolare rispetto ai bottoni Ib e contenenti vescicole chiare, più grandi e meno dense [18].

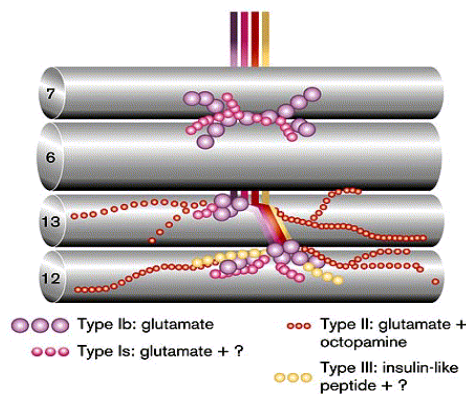


Figura 10 - Classificazione dei bottoni sinaptici.

In figura sono riportate le fibre muscolari 6 e 7, 12 e 13 di un segmento con le proprie giunzioni neuromuscolari. Ogni NMJ riportata è costituita da differenti tipologie di bottoni sinaptici: Tipo I, II e III [Guan 1996].

I bottoni di tipo II sono più piccoli (1-2 μm) e sono caratterizzati da terminali molto lunghi. Il compartimento post-sinaptico associato a questi bottoni evidenzia un sottosviluppo o assenza del reticolo subsinaptico (SSR). Questi bottoni racchiudono sia vescicole grandi e chiare, sia dense vescicole di forma ellittica contenenti glutammato e octopamina [15][18][19][20].

I bottoni di tipo III sono presenti sugli assoni che innervano i muscoli 12 e sono caratterizzati da dimensioni intermedie ed evidenziano delle caratteristiche morfologiche simili ai bottoni di tipo I e II. Inoltre, le vescicole contenute in questi bottoni sono di grandi dimensioni e contengono un peptide simile all'insulina[18][21].

Poiché i due tipi di bottoni (I e II) mostrano differenti percorsi d'innervazione, tale aspetto è molto probabilmente correlabile con il loro differente ruolo nella modulazione dell'attività muscolare. Ogni assone di tipo I generalmente innerva uno o due muscoli, che dovrebbero consentire una fine regolazione del controllo della contrazione muscolare. Al contrario, le terminazioni di tipo II sono costituite da due motoneuroni ed innervano quasi tutti i muscoli presenti in un segmento. Ciò suggerisce che l'attività muscolare del *Body wall* potrebbe essere modulata complessivamente da un rilascio generale dell'octopamina attraverso questi terminali nervosi [22]

Le terminazioni di tipo III innervano solo i muscoli 12 ed a volte i muscoli 13 nei segmenti 2-5 [21]. Questi appaiono di forma allungata e non sono associati con alcun SSR [18]. In particolare, i bottoni di tipo III racchiudono sia vescicole circolari caratterizzate da maggiori dimensioni e densità, sia vescicole di dimensioni minori, traslucenti contenenti peptidi simili all'insulina. Questo specifico pattern d'innervazione muscolare e la presenza di un peptide, come neurotrasmettitore o come sostanza di neuromodulazione, suggeriscono che queste terminazioni operino rilasciando modulatori che possano realizzare una funzione neurormonale [22].

Il rilascio del neurotrasmettitore o del neuromodulatore avviene grazie al coinvolgimento del complesso pre-sinaptico giustapposto al complesso post-sinaptico (Figura 11).

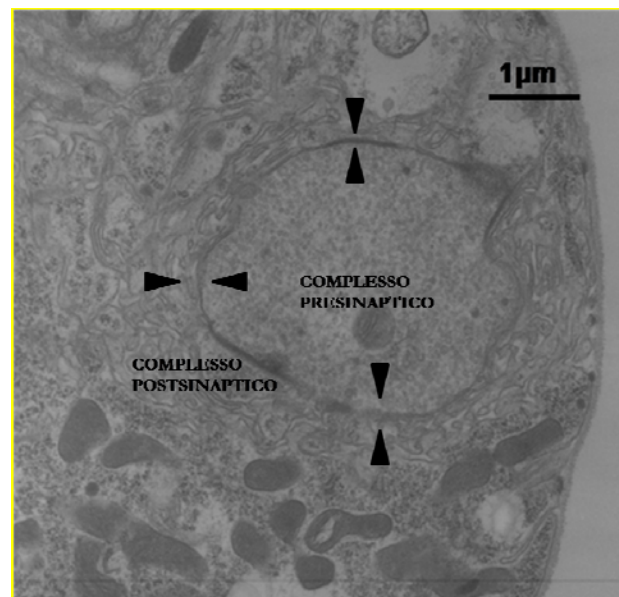


Figura 11 - Struttura del bottone sinaptico.

In figura è riportato un bottone sinaptico in cui sono evidenziati il complesso pre-sinaptico e il giustapposto complesso post-sinaptico.

Il primo è costituito dalla membrana dei bottoni sinaptici, dai complessi proteici attivi negli eventi di endo-esocitosi delle vescicole sinaptiche. In particolare, gli eventi di rilascio del neurotrasmettitore avvengono in specifici siti sinaptici lungo la membrana del bottone stesso, le cui dimensioni sembrano essere di circa 10-20 nm, i quali non evidenziano differenze rispetto alle sinapsi del sistema nervoso centrale. Una pregnante caratteristica dei siti pre-sinaptici consiste in una struttura iperdensa, direttamente connessa con la membrana pre-sinaptica dalla tipica forma a T, denominata T-bar. Generalmente, si osservano numerosissime vescicole sinaptiche pronte per l'esocitosi localizzate lungo la membrana sinaptica direttamente associate alle T-bar. Infatti, la presenza delle T-bar nella membrana sinaptica è evidenziata dall'altissima densità di vescicole ricche di neurotrasmettitore adiacenti o direttamente associate a queste [23].

Le T-bar costituiscono quindi le Zone Attive pre-sinaptiche nelle quali avviene fisicamente il rilascio del neurotrasmettitore (Figura 12).

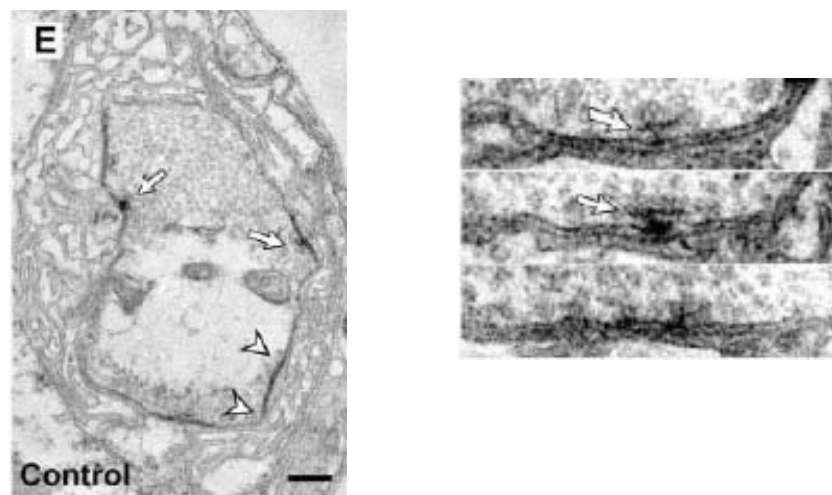


Figura 12 - Zone attive e T-bar in bottoni sinaptici.

Nella figura di sinistra è possibile vedere l'ipotetica posizione della proteina Nc82 indicata dalle frecce; nella figura di destra sono indicate le T-bar a livello delle quali si pensa sia legata l'Nc82 [24].

In *Drosophila* l'anticorpo monoclonale Nc82 lega specificatamente le Zone Attive (Figura 13). Studi con *Western Blot* hanno dimostrato che l'anticorpo riconosce due proteine di circa 190 e 170 kDa, situate nelle zone attive pre-sinaptiche di tutte le giunzioni neuromuscolari di larva. Gli spot individuati tramite MS (spettrometria di massa) hanno mostrato una significativa omologia con le proteina ELKS/CAST/ERC dei vertebrati, anch'esse associate alle Zone Attive delle sinapsi. La significativa omologia delle proteine identificate nelle Zone Attive supporta la conclusione che l'anticorpo monoclonale Nc82

riconosce la proteina riscontrata in *Drosophila* chiamata BRP *protein* (*Bruchpilot protein*). Il *knockout* di BPR, nonostante gli studi non siano del tutto terminati, mostra gravi disturbi nella trasmissione dei segnali, evidenziando come questa proteina sia essenziale per il corretto funzionamento del sistema nervoso [25].

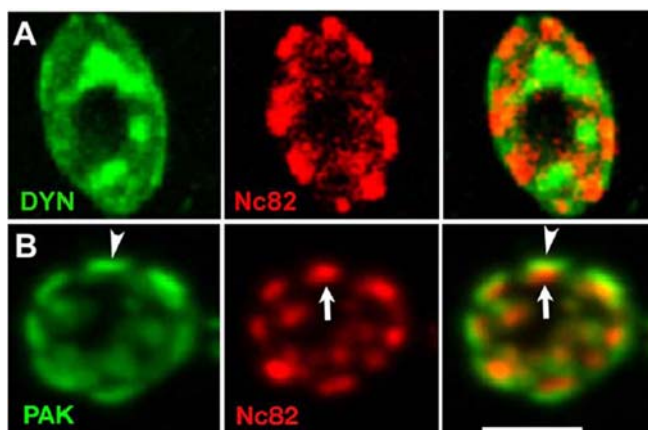


Figura 13 - Zone Attive marcate con Nc82 in bottoni sinaptici.

Nella figura sono riportati fotografie al microscopio confocale di due bottoni sinaptici di tipo Ib (A e B) marcati in verde con l'anticorpo anti-Dinamina (A) o anti-PAK (B), entrambi marcatori per il comparto pre-sinaptico. In rosso, l'anticorpo anti-Nc82, che evidenzia le Zone Attive. Scala dimensionale: 2 μ m [25].

Altra proteina particolarmente importante per l'attività pre-sinaptica è la Sinapsina. Questa proteina appartiene alla prima famiglia di proteine identificate come collocate principalmente a livello della superficie citoplasmatica delle vescicole sinaptiche. Inizialmente la Sinapsina era riconosciuta come substrato per la fosforilazione effettuata dalle proteine dipendenti dal calcio e da cAMP, oggi sembra avere anche un importante ruolo nel regolare la disponibilità delle vescicole nel processo di esocitosi, e sembra avere un ruolo significativo nella regolazione del rilascio dei neurotrasmettitori [26].

L'importanza della Sinapsina nel funzionamento del sistema nervoso è stata confermata: infatti, individui adulti mutanti per il gene della Sinapsina (*syn*) risultano avere comportamenti anomali. In realtà la specifica funzione cellulare di questa proteina vescicolare non è ancora stata individuata nelle sinapsi di *Drosophila*: analizzando ultrastrutture di sinapsi mutanti per il gene *syn*, non sono state riscontrate alterazioni [27].

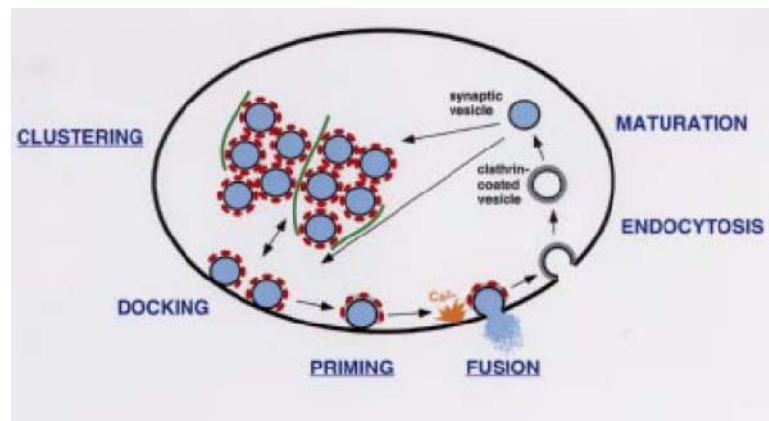


Figura 14 - Sinapsina, localizzazione e ruolo.

Ciclo delle vescicole sinaptiche. E' possibile vedere evidenziata in rosso la proteina Sinapsina adesa alle membrane delle vescicole [26].

Per quanto riguarda il complesso post-sinaptico, questo è costituito da un insieme di membrane post-sinaptiche altamente sviluppato ed invaginato denominato reticolo subsinaptico SSR (Figura 15).

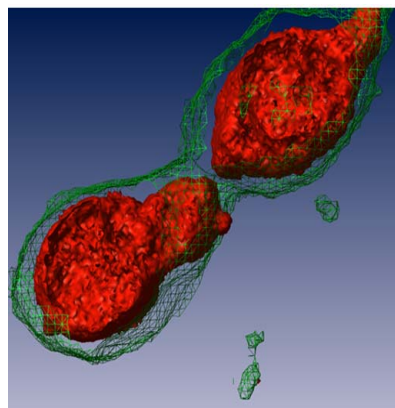


Figura 15 - Rappresentazione grafica di Bottoni di NMJ di *Drosophila*.

In foto sono riportati in rosso le regioni del bottone pre-sinaptico ed in verde il complesso post-sinaptico [28].

L'analisi strutturale del SSR evidenzia la presenza di multipli strati membranosi, i quali probabilmente derivano da complesse e multiple invaginazioni della membrana cellulare muscolare (Figura 16). Questa struttura assomiglia alle molteplici ripiegature della giunzione neuromuscolare dei vertebrati [29].

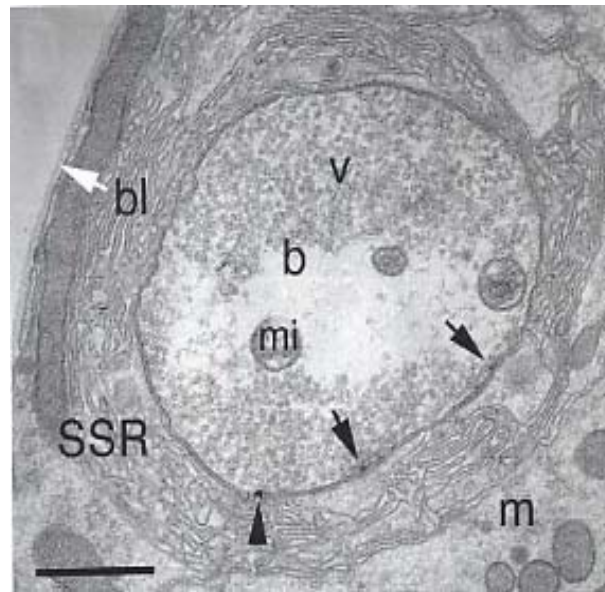


Figura 16 - Struttura del reticolo subsinaptico.

Sono indicati: b = bottone sinaptico, v = vescicole, mi = mitocondrio, bl = lamina basale SSR = reticolo subsinaptico, m = muscolo [12]. Barra dimensionale: 0,8 micron.

Strutture simili sono state individuate in altri insetti, crostacei ed invertebrati, dove sono sviluppate in vari livelli in funzione della tipologia del motoneurone e della fibra muscolare [30][31][32][33][34][35]. Studi comportamentali dimostrano che, durante lo stadio larvale, la superficie di queste strutture post-sinaptiche si incrementa di circa 100 volte mentre la cellula muscolare diventa più grande in volume di 10 volte [36]. Dal punto di vista funzionale, il SSR può essere identificato con le densità post-sinaptiche delle sinapsi dei vertebrati, per esempio il sito funzionale di una sinapsi dove sono localizzati i recettori del neurotrasmettitore, dove il segnale chimico è tradotto in un cambiamento del potenziale di membrana e in segnali intracellulari e dove sono localizzati i meccanismi per la traslocazione del neurotrasmettitore [37]. Lo sviluppo e l'estensione del SSR è variabile sui diversi tipi di bottoni sinaptici. In particolare, è altamente sviluppato nei bottoni sinaptici di tipo I e debolmente sviluppato o quasi assente nei bottoni di tipo II. Nei bottoni di tipo III è generalmente assente [12].

La proteina DLG, codificata dal gene soppressore tumorale di *Drosophila*, *discs large* (*dlg*), è espressa nelle sinapsi neuromuscolari, ed è indispensabile per una corretta formazione di queste strutture (Figura 17). La DLG, presente nel sistema nervoso nelle regioni sinaptiche centrali e periferiche, è necessaria durante la maturazione sinaptica, e mutanti per questo gene mostrano processi di espansione post-sinaptica parzialmente bloccati.

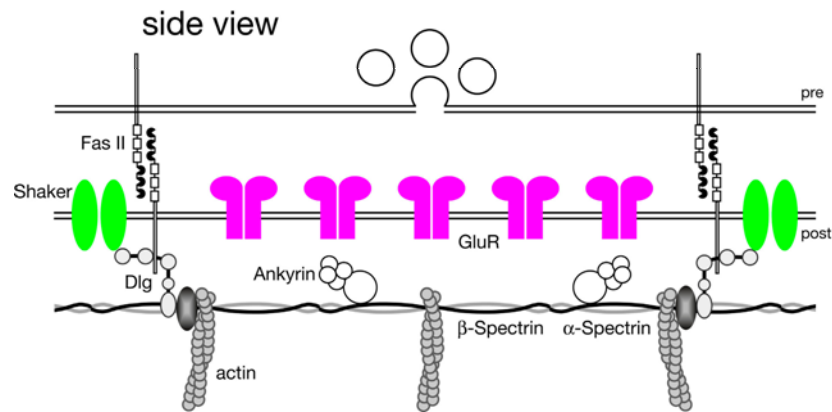


Figura 17 - Organizzazione del reticolo subsinaptico.

In figura è rappresentato l'organizzazione proteica del sistema post-sinaptico. Questo è costituito da un *network* di actina la quale sorregge il DLG, il quale a sua volta determina il corretto allineamento tra pre e post-sinaptico [38].

Appartiene alla famiglia delle proteine MAGUK (*Membrane-Associated-Guanylated-Kinase-Homologues*) [28], trovate nei siti pre- e post-sinaptici: tra le altre funzioni, le MAGUK sembrano essere coinvolte nella regolazione della formazione della struttura delle giunzioni cellulari.

Durante lo sviluppo larvale la parete muscolare di *Drosophila* viene innervata da terminazioni sinaptiche strutturalmente differenti, di tipo I II o III: studi sulla DLG ne hanno evidenziato la presenza nelle regioni post-sinaptiche di una particolare regione dei bottoni di tipo I, il reticolo subsinaptico (SSR) [36].

Mutazioni nel gene *dlg* mostrano uno scarso sviluppo del SSR, avvalorando la tesi della necessità di DLG per una corretta maturazione delle sinapsi. DLG ha un'espressione dinamica durante lo sviluppo di *Drosophila*: nei tardi stadi dello sviluppo embrionale la DLG è localizzata negli assoni e nei bottoni pre-sinaptici, mentre negli stadi larvali si trova nei bottoni pre-sinaptici e nei siti giunzionali post-sinaptici. Durante gli stadi larvali più tardivi si osserva che DLG è localizzata nell'intera periferia dei bottoni sinaptici [12].

Le membrane cellulari sono mosaici eterogenei di domini lipidici che presentano identità distinte e malleabili, che hanno un ruolo importante nel traffico di membrana e nel *signalling* cellulare. Esse comprendono combinazioni di differenti classi di fosfolipidi, sterolo e sfingolipidi.

Il ciclo delle vescicole sinaptiche avviene a livello delle sinapsi chimiche ed è orchestrato attraverso l'azione combinata di queste proteine, appena descritte, e lipidi di membrana. La caratteristica fondamentale di tutte le sinapsi chimiche è la presenza di piccoli organelli delimitati dalla membrana detti vescicole sinaptiche, all'interno della

terminazione sinaptica. Questi organelli contengono neurotrasmettitori e sono proprio queste sostanze chimiche che agiscono come messaggeri tra neuroni comunicanti. Nelle sinapsi chimiche la trasmissione si basa su una successione di eventi: il processo inizia quando un potenziale d'azione giunge alla terminazione del neurone; questo provoca un cambiamento nel potenziale di membrana che causa l'apertura dei canali del Ca^{2+} a dipendenza di voltaggio. L'ingresso di una concentrazione massiccia di Ca^{2+} produce la fusione delle vescicole sinaptiche che rilasciano nella fessura il neurotrasmettitore che si andrà a legare al recettore sulla membrana della cellula muscolare post-sinaptica.

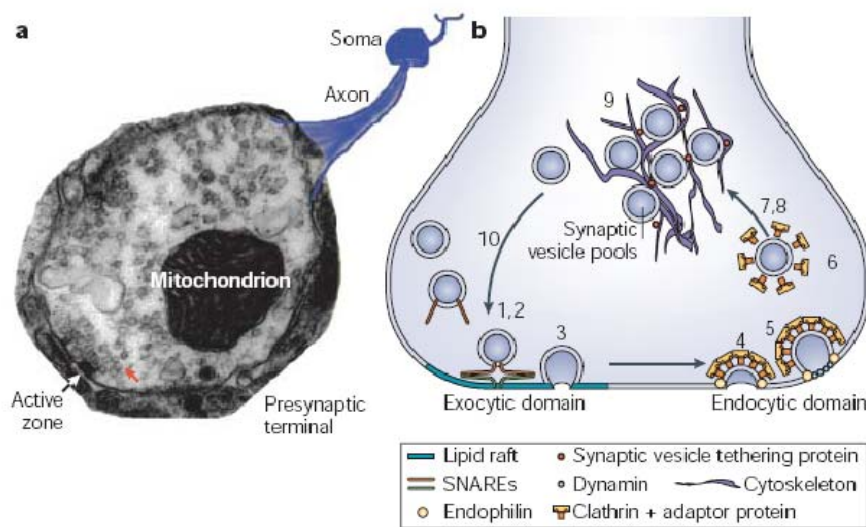


Figura 18 - Rappresentazione del ciclo delle vescicole sinaptiche.

In figura A è riportata un'immagine al microscopio elettronico del terminale pre-sinaptico di un bottone di una giunzione neuromuscolare di *Drosophila*. Si notano: le vescicole sinaptiche, gli organelli pre-sinaptici quali i mitocondri, e le zone attive. In figura B è rappresentato il terminale pre-sinaptico con differenti stadi del ciclo vescicolare sinaptico e le strutture coinvolte [39].

Vi sono diverse proteine importanti nel meccanismo di rilascio delle vescicole due delle quali sono NSF (proteine di fusione N-etilmaleimide -sensibili) e SNAP (Proteine di adesione delle NSF solubili) che hanno la funzione chiave di assemblare altre proteine chiamate SNARE. Le proteine SNARE, di cui le più importanti sono Sinaptobrevina, Syntaxina e SNAP-25, danno vita ad un complesso macromolecolare che attraversa le due membrane (della vescicola e della cellula neuronale) portandole in stretta apposizione per facilitare la fusione delle vescicole. Vi è inoltre un'altra proteina che è presente nella membrana delle vescicole sinaptiche la quale ha il compito di percepire l'aumento di concentrazione del Ca^{2+} , in quanto funge da sensore di tale catione, la Sinaptotagmina.

Il rilascio di neurotrasmettitori nelle sinapsi neuronali è mediato dal ciclo delle vescicole sinaptiche. Il neurotrasmettitore è rilasciato nella fessura sinaptica mediante

esocitosi, e successivamente si va a legare ai recettori presenti sulla membrana post-sinaptica. La vescicola, che ha rilasciato il neurotrasmettitore, viene recuperata per endocitosi da parte della membrana, mentre il neurotrasmettitore viene risintetizzato in appositi endosomi e reimmagazzinato in una nuova vescicola che si avvicinerà alla membrana pre-sinaptica per essere rilasciata una volta che un'ulteriore potenziale di azione raggiungerà il terminale pre-sinaptico [39].

In particolare, il ciclo vescicolare è rapido (intercorrono 30 secondi dal rilascio della vescicola alla maturazione di una nuova vescicola [23] ed è caratterizzato da due diversi processi concatenati: l'esocitosi e l'endocitosi. Entrambi i processi sono influenzati dalla funzionalità dei canali del calcio voltaggio-dipendenti che provocano un movimento vescicolare all'interno della membrana pre-sinaptica [40].

Durante l'esocitosi avviene la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana pre-sinaptica e il conseguente rilascio del contenuto vescicolare a livello della fessura sinaptica. L'endocitosi è il processo che segue all'esocitosi e permette di formare rapidamente nuove vescicole a partire dalla membrana pre-sinaptica.

In *Drosophila melanogaster*, le vescicole del terminale pre-sinaptico si dividono in due tipi di pool (Figura 19):

- ECP (eso/endo cycling pool) che include le RRP (readily releasable pool) e le IRP (immediately releasable pool);
- RP (riserve pool).

ECP fornisce vescicole sinaptiche (SV) durante una ridotta attività nervosa (potenziali d'azione ridotti in numero e frequenza), mentre le SV appartenenti all'RP sono reclutate quando l'attività nervosa è elevata (alta frequenza dei potenziali d'azione per un periodo di tempo prolungato) [40][41].

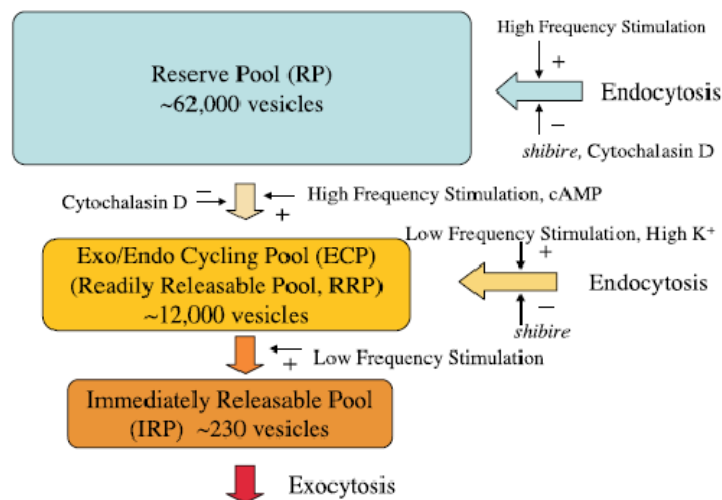


Figura 19 - I due differenti pool delle vescicole sinaptiche.

In figura è riportata una rappresentazione schematica dell'organizzazione generale dei differenti pool di vescicole sinaptiche nei bottoni sinaptici di *Drosophila*. I due differenti pool rispondono a due tipologie diverse di stimolazione [42].

1.1.2.3. Il Sistema Nervoso Centrale

Come in altri insetti, il sistema nervoso dei Ditteri origina da neuroblasti che si differenziano dall'ectoderma nell'embrione precoce [43].

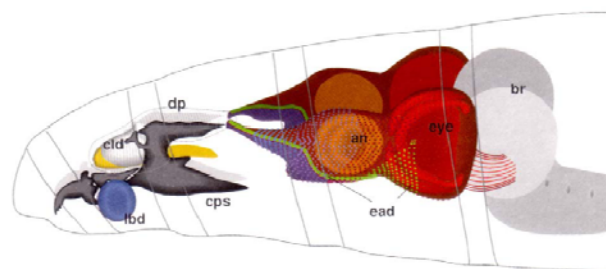


Figura 20 - Porzione anteriore della larva.

Rappresentazione schematica della porzione anteriore della larva, ove si ritrovano l'uncino boccale, gli occhi ed il cervello. Br:cervello, eye:occhio, an:disco immaginale delle antenne, parti e strutture dell'apparato boccale [7].

Il Sistema Nervoso Centrale (CNS) della larva di *D. melanogaster* è formato da due emisferi cerebrali, connessi ventralmente, e da un complesso ganglio ventrale (Figura 21). Il tutto si trova nel terzo segmento toracico, e si prolunga fino alla fine del primo segmento addominale. Il punto di connessione degli emisferi è attraversato dall'esofago, che poi

prosegue dorsalmente al ganglio ventrale; quest'ultimo, legato anteriormente al punto di congiuntura degli emisferi, si compone di un ganglio sottoesofageo, tre paia di gangli toracici, e otto paia di gangli addominali (dove è ben evidente la struttura metamERICA).

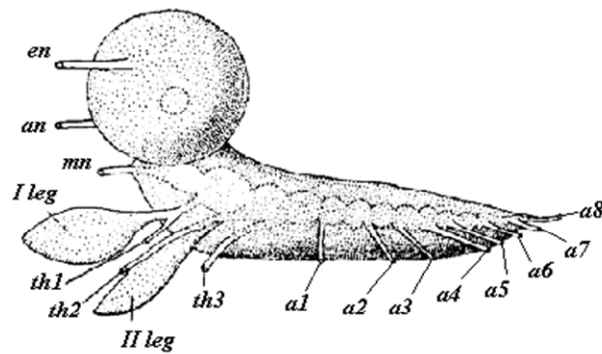


Figura 21 - Sistema Nervoso Centrale della larva.

Simbologia utilizzata: en (eye nerve), an (antenna nerve), mn (maxillary nerve), th1, th2, th3 (thoracic nerve 1, 2, 3), a1-a8 (abdominal nerve 1-8) [43].

Da ciascun emisfero emergono i nervi dell'occhio e dell'antenna; i nervi massillari, che raggiungono gli organi di senso ed i muscoli cefalici, derivano dalla regione più anteriore del ganglio ventrale. Dal primo e secondo paio di gangli toracici emergono i nervi relativi alle prime due paia di zampe, i quali si diramano poi ad innervare muscoli e strutture sensoriali del primo e secondo segmento toracico. Il terzo ganglio produce solo i nervi relativi al terzo segmento toracico. Anche i gangli addominali si prolungano in un paio di nervi ciascuno, che raggiungono i segmenti relativi.

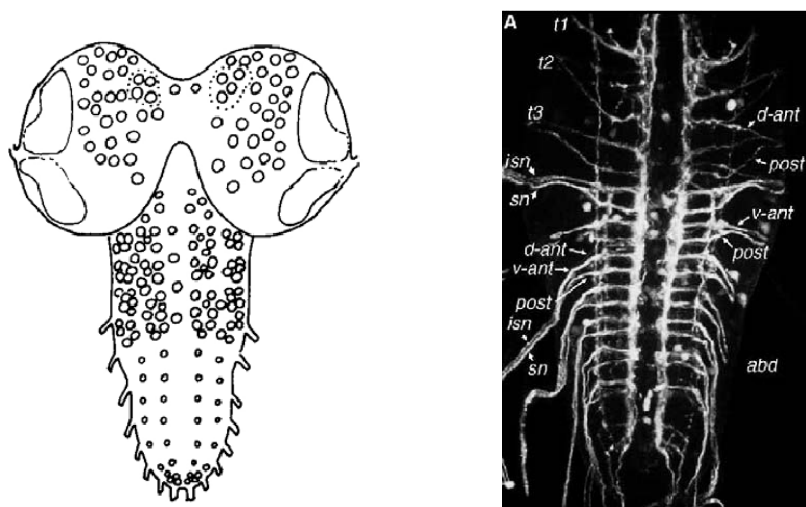


Figura 22 - SNC: gangli e neuroni.

In figura A è riportato uno schema della distribuzione dei gangli nel cervello di larva. In figura B foto al microscopio confocale dei neuroni che compongono il cervello della larva [7].

In *Drosophila* i gangli sono fusi tutti insieme in un'unica struttura neurale che mantiene l'organizzazione segmentale. In particolare, le caratteristiche anatomiche del cervello di larva corrisponde ad un archetipo piano strutturale del corpo dell'insetto adulto. Il sistema nervoso è bilateralmente simmetrico. Infatti, i neuroni sono organizzati nella porzione di destra come in quella di sinistra, in modo esattamente speculare. Inoltre, vi sono dei neuroni specifici che collegano le due porzioni mettendole in comunicazione tra loro. Infine, si notano i nervi che dipartono dal cervello stesso. Questi contengono gli assoni motori, i quali controllano i muscoli periferici. Contemporaneamente, si osservano gli assoni sensoriali che regolano le informazioni periferiche verso il cervello (Figura 22).

Durante il periodo larvale, riprendono la loro attività proliferativa e producono numerose linee di neuroni secondari. Questi neuroni secondari costituiscono dei complessi assonici che attraversano la corteccia cerebrale ed invadono il neuropilo, non iniziando però alcun tipo di differenziamento. Durante tutto lo sviluppo cerebrale, le cellule della glia costituiscono un'impalcatura attorno ai neuroblasti, ai corpi neurali ed ai neuriti (Figura 23). Infatti, le cellule della glia si suddividono in tre differenti categorie: una prima denominata subperineurale che si estende attorno all'intero cervello; una seconda, la glia della corteccia, la quale racchiude i corpi neurali ed i neuroblasti ed infine, una terza, la glia del neuropilo, la quale si localizza sull'interfaccia neuropilo-corteccia e forma un rivestimento del neuropilo stesso [44].

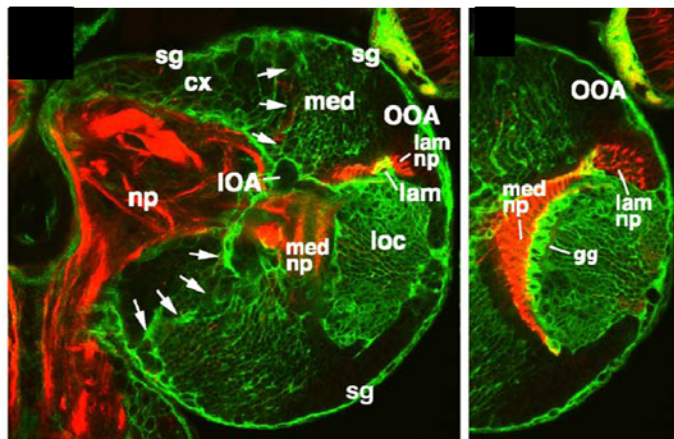


Figura 23 - La glia nel cervello di larva.

In figura è riportato un lobo destro di cervello di larva. In verde, le cellule della glia sono colorate mediante l'impiego del costrutto UAS-GFP attivato da Gal4 che induce l'espressione della GFP solamente nelle cellule gliali superficiali, della corteccia nel lobo ottico e nel cervello centrale. In rosso il neuropilo è evidenziato mediante l'anticorpo FasII. sg: strato gliale superficiale; OOA, IOA: primordio del lobo ottico, CX: glia della corteccia; med: medulla; loc: complesso della lobula; gg: glia gigante [44].

Nel cervello della larva, il reticolo costituito dalla glia della corteccia è fondamentale e necessario per la stabilizzazione la localizzazione e disposizione dei neuroni nella corteccia e per le estensioni dei tratti assonali neurali secondari. Inoltre, la glia del neuropilo e superficiale giocano un ruolo basilare nell'esplorazione e nel *targeting* assonale.

Il cambiamento morfologico principale a cui sottostà il CNS durante la vita della larva, è l'aumento delle dimensioni. Al momento della formazione del pupario gli emisferi cerebrali assumono una forma a pera, a causa dello sviluppo del ganglio dell'occhio (il ganglio oculare esterno arriverà a giacere direttamente sotto la coppa dell'occhio); in seguito si uniscono anche medioventralmente. Col procedere della metamorfosi la regione fra il ganglio sottoesofageo ed i primi gangli toracici subisce una strozzatura, formando il cordone cefalo-toracico presente nell'adulto. I tre gangli toracici rimarranno separati, mentre quelli addominali si uniranno in un'unica massa nervosa.

1.2. GLI SFINGOLIPIDI

Le membrane cellulari sono di cruciale importanza per la vita delle cellule. I lipidi costituiscono il 50% della massa delle cellule animali ed esistono circa 10^9 molecole lipidiche nelle loro membrane plasmatiche. Non sono infatti presenti solo le tre classi principali di lipidi (glicerolipidi, sfingolipidi e steroli) ma anche un'enorme varietà strutturale in ciascuna di queste classi.

1.2.1. STRUTTURA

Gli sfingolipidi sono una delle tre principali classi di lipidi, oltre ai glicerolipidi e agli steroli, presenti sulla membrana delle cellule eucariotiche. Sono molecole anfipatiche, il cui scheletro è una sfingosina, che costituisce la regione idrofobica; in genere ad essa è legato, in posizione 1-idrossilica, un gruppo carico (denominato la testa) che può essere ad esempio un'etanolamina, una serina o una colina. Un acido grasso è legato in posizione C2 tramite un'ammina (Figura 24).

Gli sfingolipidi possono essere distinti in tre tipi principali, a seconda del gruppo di testa:

- *ceramidi* - sono gli sfingolipidi più semplici, costituiti da un acido grasso legato alla sfingosina;
- *sfingomieline* - sono ceramidi cui si trova legata una fosforilcolina o una fosfoetanolamina esterificata;

- *glicosfingolipidi* - sono ceramidi legate a uno o più residui di zuccheri, tramite legami β -glicosidici. Si suddividono ulteriormente in *cerebrosidi* e *gangliosidi*: i primi vedono nella loro composizione un singolo glucosio, o un galattosio; i secondi invece possiedono almeno tre zuccheri, fra cui un acido sialico.

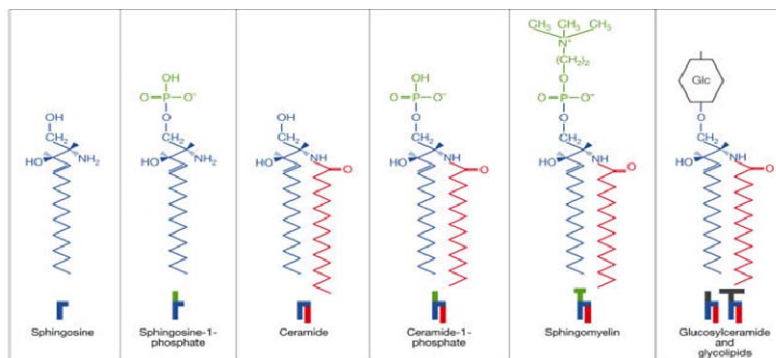


Figura 24 - Gli sfingolipidi.

In figura sono riportati alcuni tra gli sfingolipidi più comuni e studiati, quali la sfingosina, la sfingosina 1-fosfato e la ceramide. In blu è riportata la base sfingoide, in rosso l'acido grasso ed in verde il gruppo carico [45].

Gli sfingolipidi vennero scoperti già nel 1884 e furono sempre considerati importanti componenti strutturali della membrana cellulare, formanti nella pagina esterna del doppio strato lipidico una barriera meccanicamente stabile e chimicamente resistente. In realtà, gli sfingolipidi sono componente fondamentale di tutte le membrane che costituiscono le cellule. Infatti, questi sono presenti nella membrana plasmatica, nelle membrane dei mitocondri, del reticolo endoplasmatico, del Golgi, del nucleo e degli endosomi e lisosomi (Figura 25).

Quando si scoprì che alcune patologie, come, nel 1934, la malattia di Gaucher, erano dovute all'accumulo di glicosfingolipidi, si iniziò a porre più attenzione sulla via biosintetica e sull'omeostasi di tale molecole [46].

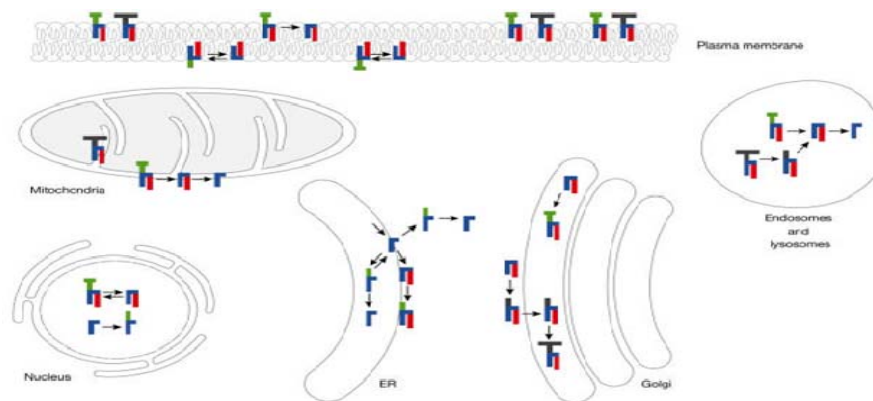


Figura 25 - Localizzazione degli sfingolipidi.

In figura sono riportati le localizzazioni degli sfingolipidi nelle diverse membrane che costituiscono una cellula eucariotica [45].

1.2.2. METABOLISMO

Il metabolismo degli sfingolipidi è l'area meglio conosciuta della loro biologia; si tratta di una via sintetica intricata, altamente regolata (Figura 26). Infatti, il metabolismo sfingolipidico è finemente regolato a molteplici livelli, dal controllo dell'espressione enzimatica, a modificazioni postrascrizionali e meccanismi allosterici. Alcuni di questi eventi sono specifici per particolari linee cellulari, sebbene il controllo degli sfingolipidi è attuato in tutti gli stadi dello sviluppo di una cellula, o in risposta a determinati segnali [45].

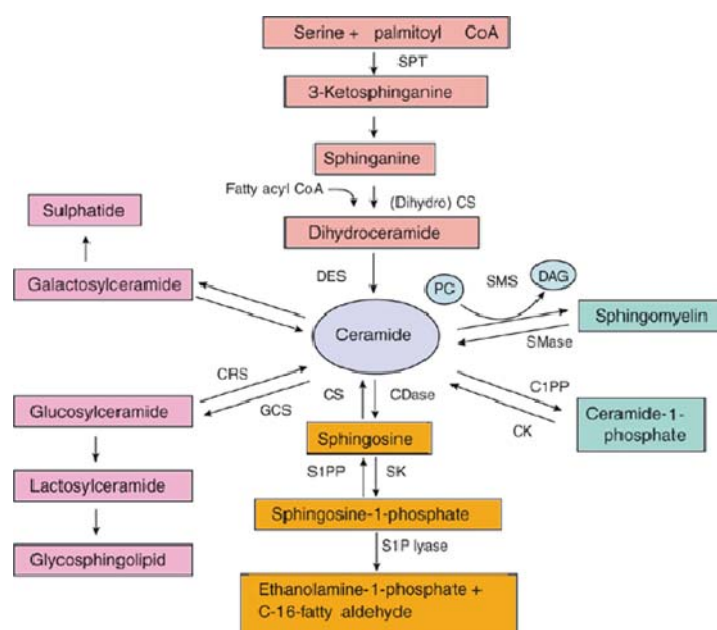


Figura 26 - Metabolismo degli sfingolipidi.

In figura sono riportati i diversi passaggi del pattern metabolico degli sfingolipidi [47].

Nelle cellule la riduzione di certe specie sfingolipidiche comporta un incremento di altre; esiste pertanto un presunto meccanismo di bilanciamento che regola il flusso dei vari metaboliti attraverso la via sintetica, denominato "reostato degli sfingolipidi". Esso comprende diversi enzimi regolatori che interconvertono fra loro vari metaboliti (come forme fosforilate e forme non fosforilate), che sembrano avere azioni antagoniste [45].

1.2.3. FUNZIONE CELLULARE

Grazie a molteplici studi, si è così venuti a conoscenza di un ampissimo *range* di funzioni svolte dagli sfingolipidi, in ambiti cellulari che vanno *dall'housekeeping*, al *signalling* intracellulare nello sviluppo, al trasporto di membrana e traffico vescicolare. Tuttavia non si sa ancora con precisione con quali meccanismi agiscano queste molecole, tanto che il loro nome si riferisce alla figura mitologica della sfinge ed ai suoi enigmi (Figura 27).

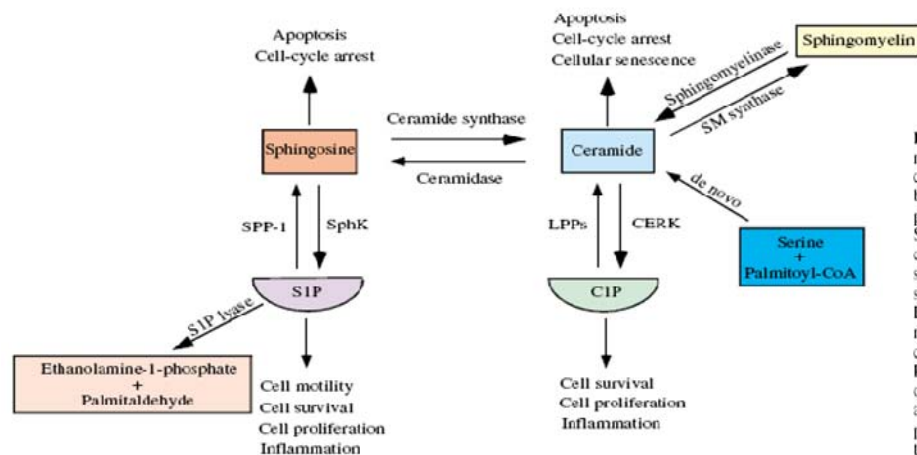


Figura 27 - Funzioni degli sfingolipidi.

In figura sono riportati i diversi passaggi del pattern metabolico degli sfingolipidi, i diversi sfingolipidi e le relative funzioni [48].

Da tempi relativamente recenti è noto che semplici metaboliti sfingolipidici (ad esempio ceramide, sfingosina e sfingosina-1-fosfato) sono importanti mediatori intracellulari nelle cascate di segnale relative ad apoptosi, proliferazione e risposte agli stress. Quali secondi messaggeri, alcuni sfingolipidi possono modulare l'azione di diverse proteine (recettori, canali ionici, enzimi) ed il livello intracellulare di Ca^{2+} (Figura 28-B)

Per esempio, la sfingosina 1-fosfato (S1P) sembra essere un naturale ligando per diversi recettori associati a proteine G (GPCRs). Questi recettori sono altamente specifici e quindi sono in grado di riconoscere legare esclusivamente la S1P. Inoltre, sono espressi

ubiquitariamente e sono accoppiati sia ad una molteplice varietà di proteine G, sia a delle piccole GTPase della famiglia Rho, quali Rho e Rac (Figura 28-A) [49].

Grazie a queste relazioni, la S1P, a livello della singole cellule sembra stimolare gli arrangiamenti citoscheletrici con conseguenti movimenti cellulari e la protrusione di lamellopodi.

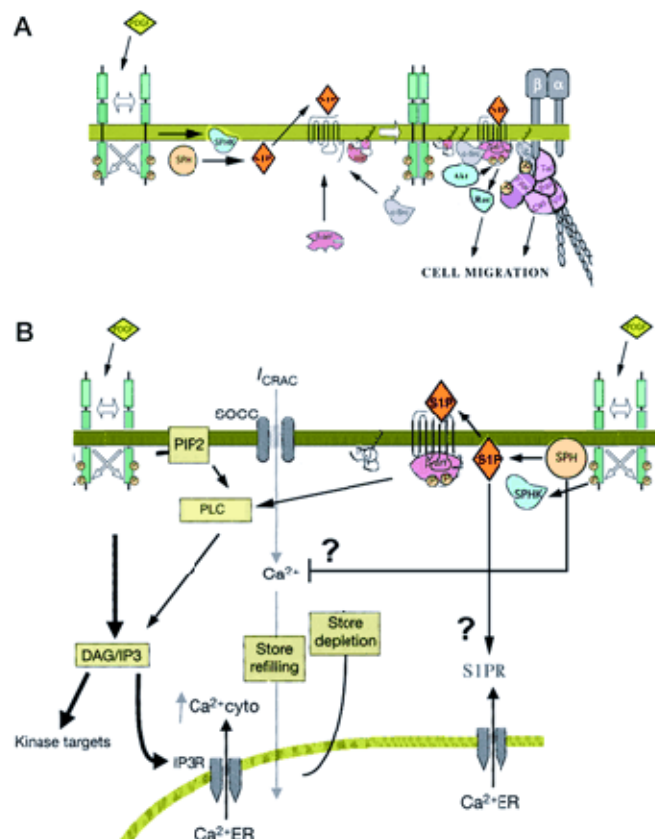


Figura 28 - Vie di segnale attivate dalla S1P.

In figura A è riportata la via di segnale attivata dal legame della S1P con un recettore di membrana associato a proteine G, risultante nella stimolazione della migrazione cellulare. In figura B è rappresentato il *pathway* mediante il quale la S1P determina la liberazione di Ca²⁺ cellulare [49].

Contemporaneamente, la S1P agisce come secondo messaggero estremamente importante per la regolazione dell'omeostasi del calcio e la soppressione dell'apoptosi. Infatti, la S1P è direttamente implicata nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare (Figura 29). La produzione di S1P avviene soprattutto grazie all'azione della sfingosina chinasi, la quale a sua volta è attivata da numerosissimi stimoli esterni, quali il fattore PDGF, i fattori di crescita dei nervi, la vitamina D3.

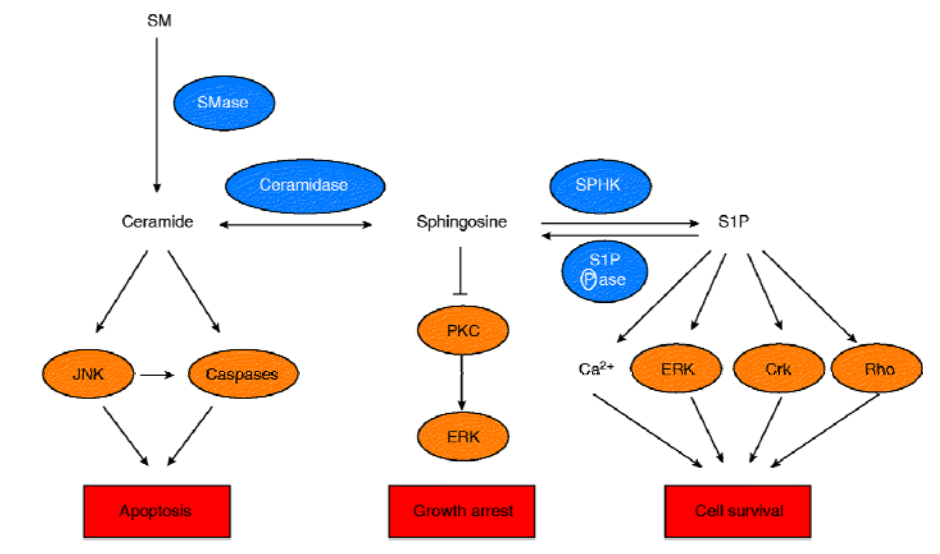


Figura 29 - Funzione cellulare degli sfingolipidi.

In figura sono riportati i diversi passaggi del *pathway* metabolico degli sfingolipidi con relativi ruoli di stimolazione dei differenti sfingolipidi [50]

Risulta evidente come il corretto bilanciamento tra S1P intracellulare verso la sfingosina e la ceramide e la conseguente regolamentazione di vie di segnale opposte sia un fattore fondamentale per determinare la vita o la morte della cellula stessa (Figura 30).

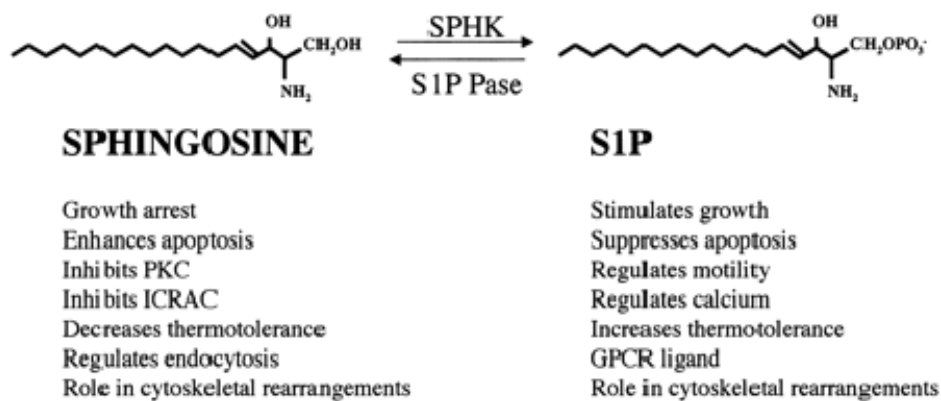


Figura 30 - Bilanciamento degli sfingolipidi

In figura sono riportate le due opposte vie di segnale stimulate da due sfingolipidi differenti: la S1P e la sfingosina [49].

Il “reostato” è un regolatore delle risposte agli stress che risulta evolutivamente conservato tra le specie ed i phyla eucarioti, in quanto se ne è riscontrata evidenza sia in animali, che in piante, che in lievito [49]. Consiste sostanzialmente in un bilanciamento fra

ceramide e sfingosina, e il loro derivato sfingosina-1-fosfato (S1P), che sono gli sfingolipidi meglio studiati. Sono metaboliti che intervengono nelle risposte agli stress: ceramide e sfingosina sono associati all'arresto della crescita cellulare e all'induzione dell'apoptosi; al contrario la S1P, agendo nelle risposte adattative, è implicata nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, ed evidentemente ha un'azione protettiva contro l'attività pro-apoptotica della ceramide. Ad esempio, si è sperimentato, in femmine di topo *wild-type*, che l'aumento di S1P o la riduzione di ceramide può prevenire la perdita di oociti indotta da radiazioni (evento che porta ad una prematura disfunzione ovarica ed infertilità nelle pazienti affette da cancro) [52]. Si ipotizza poi che l'altalena tra sfingosina e S1P sia determinante per la reattività allergica dei mastociti [53].

1.2.4. FUNZIONE NEURONALE

Negli ultimi anni l'attenzione si è spostata sul ruolo che gli sfingolipidi hanno sulla biologia delle cellule neuronali.

Ad esempio, è stato riportato che la S1P può essere rilasciata nel mezzo extracellulare, dove può agire da messaggero primario legandosi a recettori di membrana: in neuroni e cellule della glia l'espressione di questi recettori è regolata durante lo sviluppo, e la loro distribuzione varia nei diversi distretti nervosi, cosa che suggerisce un loro possibile ruolo nei processi fisiologici dello sviluppo (proliferazione cellulare, migrazione, differenziazione, attivazione degli astrociti, mielinizzazione, apoptosi) [54].

Oltre alle funzioni legate al destino cellulare, esercitate anche negli altri tessuti, si è stabilito che nel neurone queste molecole sono fondamentali per la trasmissione del segnale, in particolare per la loro presenza nei *raft* lipidici (Figura 31) [55].

I *raft* sono microdomini di membrana (sia delle cellule che dei loro organelli) poveri in fosfolipidi, ma ricchi in sfingomieline, ceramide, glicosfingolipidi, colesterolo e proteine associate. Questi microdomini si formano probabilmente per la capacità degli sfingolipidi di associarsi rapidamente ed impaccarsi nelle membrane (proprietà data forse dalle loro catene sature relativamente lunghe, con alto punto di fusione) [56]. L'elevato impaccamento rende i *raft* insolubili a certi detergenti non ionici, caratteristica che li ha definiti nei saggi biochimici delle membrane [39].

Con il colesterolo e i fosfolipidi saturi, i glicosfingolipidi (GSL) formano dunque un'unica fase liquida; il colesterolo è necessario per l'integrità e la funzionalità del *raft*: la sua deplezione infatti causa la dissociazione delle proteine dal microdominio, per cui vengono meno le interazioni proteine-lipidi che lo mantengono stabile [39].

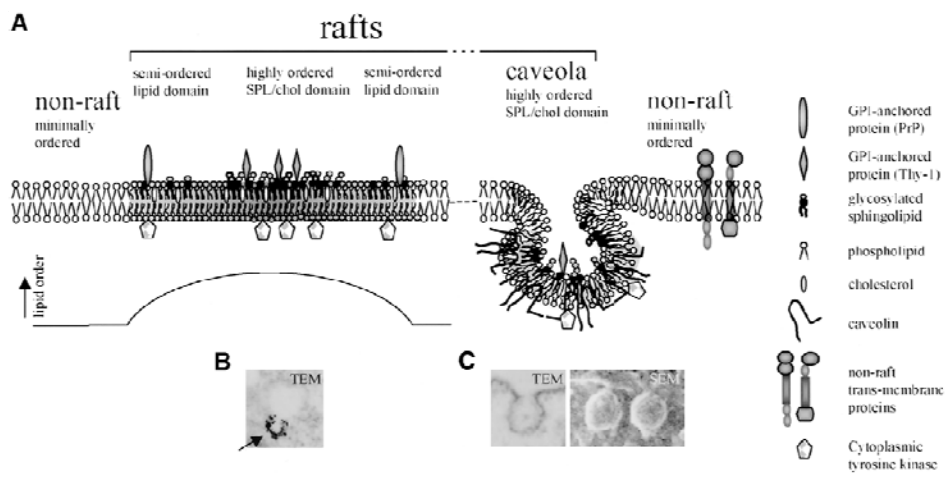
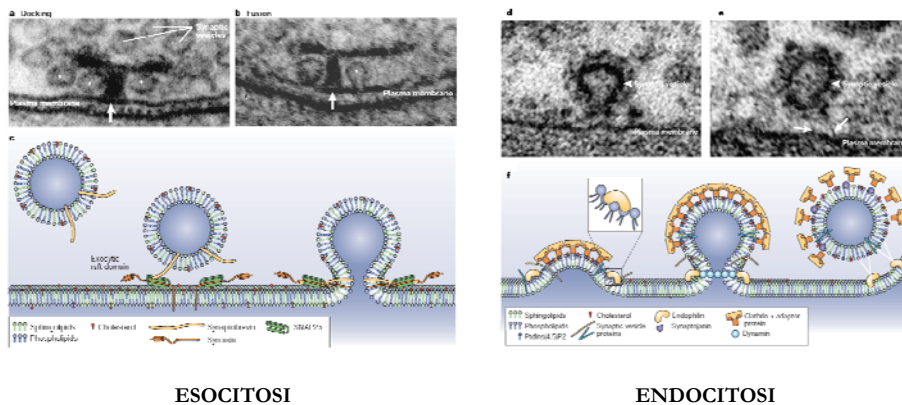


Figura 31 - Domini di membrana classificati in base alla differente composizione lipidica.

In figura A è rappresentata una membrana con le sue diverse componenti strutturali, suddivise in porzioni altamente ordinate e ricche di sfingolipidi (raft) e porzioni minimamente ordinate prive di sfingolipidi (non-rafts). In figura B colorazione per evidenziare la glucosilceramide che segrega in bolle caveolari, le quali protrudono dagli elementi endosomiali di *recycling*. In figura C Immagini ottenute al microscopio elettronico a trasmissione delle caveolae [56]



ESOCITOSI

ENDOCITOSI

Figura 32 - Regolazione dei processi di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche da parte dei lipid rafts.

In figura . A, B, C è rappresentato l'evento di esocitosi delle vescicole sinaptiche ed il ruolo dei *lipid rafts* in questo processo. In particolare, in figura A e B immagini al microscopio elettronico di una zona attiva in un bottone sinaptico, ove è presente una T-bar con vescicole sinaptiche in *docking* ed in fusione. In figura D, E, F è rappresentato l'evento di endocitosi delle vescicole sinaptiche. In figura D e E immagini al microscopio elettronico di una vescicola sinaptica in formazione per endocitosi dalla membrana sinaptica [39].

I metaboliti sfingolipidici sono coinvolti nella modulazione dell'eccitabilità del neurone, e del rilascio di neurotrasmettitore (Figura 32). Si è infatti osservato che la S1P contribuisce al rilascio, indotto da depolarizzazione, attraverso l'attivazione dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, che sono invece inibiti dalla sfingosina. Anche la ceramide mostra un'attività in questo senso, influenzando sull'attività di diversi canali ionici [55].

Gli effetti degli sfingolipidi sul rilascio di neurotrasmettitore possono quindi essere conseguenza della modulazione esercitata sui canali, e sul flusso di Ca^{2+} nell'area pre-sinaptica; oppure tali effetti sono dovuti a cambiamenti nella conformazione dei *raft*, che portano ad una facilitazione o inibizione della vescicola contenente il neurotrasmettitore a fondersi con la membrana pre-sinaptica (Figura 33). Ceramide, sfingomieline e relativi metaboliti svolgono funzioni essenziali nell'interfaccia plasmalemma-vescicola; il contenuto di steroli del *raft* serve a regolare la fluidità di membrana e la sua curvatura, parametri molto rilevanti per il ciclo delle vescicole sinaptiche (ciclo che va dal rilascio di una vescicola alla completa maturazione di un'altra). La ceramide e gli altri sfingolipidi probabilmente si trovano anche nelle membrane delle vescicole sinaptiche stesse [39].

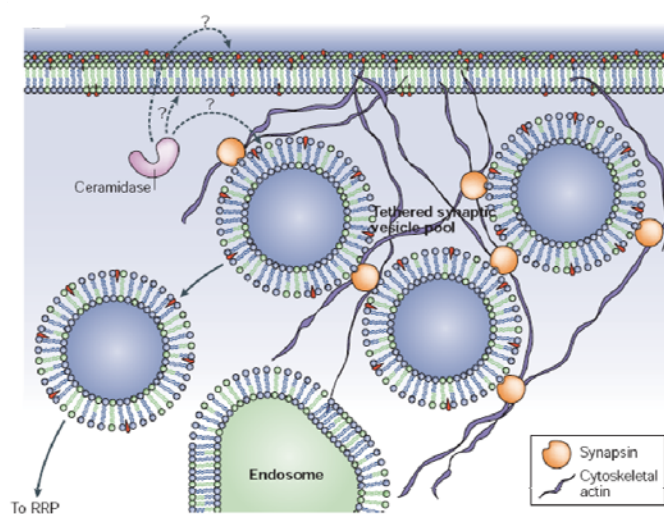


Figura 33 - Regolazione della mobilitazione e dell'immobilizzazione delle vescicole sinaptiche da parte dei *lipid rafts*.

In figura è rappresentata la mobilità delle vescicole sinaptiche all'interno del bottone sinaptico stesso. I rafts lipidici ne regolerebbero la mobilità, l'esocitosi e l'endocitosi [39]

1.2.5. PATOLOGIE UMANE CORRELATE

Patologie correlate a problemi nell'accumulo lisosomiale costituiscono un gruppo di circa 40 distinte malattie genetiche, generalmente determinate da mutazioni a carico di specifiche proteine lisosomiali. Gli individui affetti da tali patologie spesso presentano demenza, problemi psichiatrici, danni cerebrali o ritardo nello sviluppo. Ognuna di queste

patologie da accumulo lisosomiale è causata da singole mutazioni in singoli geni o da un insieme di mutazioni a carico di tutti i geni coinvolti nell'accumulo di specifici materiali nei lisosomi. I siti di accumulo lisosomiali variano a seconda della tipologia del materiale accumulato e dal tipo di tessuto coinvolto. In particolare, queste differenti patologie vengono classificate in base al tipo di materiale erroneamente accumulato e così denominate: quali glicogenosi, oligosaccaridosi e sfingolipidosi.

Le sfingolipidosi (SLs) sono malattie nelle quali vi sono delle alterazioni nelle vie di internalizzazione, trasporto e degradazione degli sfingolipidi ad opera di specifiche proteine od enzimi. In particolare, sono state evidenziate specifiche mutazioni in proteine coinvolte nell'idrolisi e nell'accumulo intracellulare di questi lipidi. Inoltre, nella maggior parte dei casi, l'accumulo degli sfingolipidi deriva da anomalie nel trasporto da/ai lisosomi. Le patologie più comuni sono: la malattia di Gaucher, e di Niemann-Pick [57].

La malattia di Gaucher (GD) è la patologia più comune da accumulo lisosomiale alterato, un sottogruppo delle malattie ereditarie metaboliche. Infatti questa è una rara patologia autosomica recessiva caratterizzata da una deficiente funzionalità dell'enzima catabolico β -glucocerebrosidasi, che determina un accumulo della glucocerebrosidasi nei macrofagi.

Diversi studi genetici hanno dimostrato che il gene della β -glucocerebrosidasi (GBA) è localizzato su cromosoma 1q21 e che le oltre 200 mutazioni a suo carico individuate determinano sintomi patologici associati a GD.

L'enzima β -glucocerebrosidasi catalizza la digestione della glucocerebroside in glucosio e ceramide, l'intermedio principale nella degradazione degli sfingolipidi più complessi. Poiché i macrofagi sono deputati alla digestione e degradazione di cellule presenti nel sangue apoptotiche e senescenti ed i loro precursori sono arricchiti in glucosfingolipidi, non è sorprendente che queste cellule accumulino nei loro lisosomi la glucocerebroside in eccesso, derivante dalla mancata attività degradativa dell'enzima β -glucocerebrosidasi.

I macrofagi rigonfi di lipidi sono denominati cellule di Gaucher e sono caratterizzati da nuclei eccentrici e da un citoplasma tipicamente striato a "seta raggrinzita". I macrofagi localizzano soprattutto a livello del fegato, della milza e del midollo osseo, risultando quindi come siti prediletti per l'accumulo eccessivo di glicolipidi non degradati.

Infine, questa patologia viene suddivisa in tre differenti tipologie in base alla presenza-assenza di sintomi neurologici. La forma più comune è quella di tipo 1 caratterizzata da deformazioni addominali dovuti ad epatosplenomegalia, combinati con anemia, leucopenia, trombocitopenia.

Le forme classificate come di tipo 2 e 3 sono caratterizzate dalla presenza di sintomi neurologici quali: convulsioni, demenza, ritardo mentale spesso associati ad osteoporosi, ipertonia, apnea e macchie cutanee [58][59].

La patologia di Niemann-Pick, in realtà, è classificata in tre differenti malattie da accumulo lipidico: Niemann-Pick A, B e C, causate da alterazioni a due diversi geni determinanti difetti organizzativi e funzionali dissimili.

Le patologie di Niemann-Pick denominate di tipo A e B sono malattie ereditarie derivanti da una funzionalità alterata dell'enzima sfingomielinasi acida (ASM), il quale partecipa, insieme ad altre idrolasi lipidiche, al mantenimento della composizione e conformazione delle membrane cellulari mediante la loro degradazione e turnover.

Studi genetici hanno individuato specifiche mutazioni dell'unico gene (SMPD1, 11p15.4) che codifica per la sfingomielinasi acida (ASM) determinanti le due diverse patologie (A, B) con fenotipi di entità più o meno gravi.

In particolare, queste mutazioni alterano la funzionalità di questo enzima, il quale è coinvolto nel controllo dei livelli di concentrazione della sfingomielina. Infatti, la sfingomielina ASM degrada la sfingomielina in ceramide. La diretta conseguenza di quest'attività catabolica è rappresentata dalla riorganizzazione dei *rafts* lipidici di membrana in piattaforme di dimensioni molto più grandi. Questi cambiamenti conformazionali delle membrane si traducono con la generazione di segnali di apoptosi o di senescenza cellulare.

In generale, la patologia di tipo A insorge nei primi 6 mesi di vita ed è caratterizzata da fegato e milza ingrossati e alterazioni neurologiche. Spesso questi fenotipi patologici sono associati a affezioni polmonari. Inoltre, la neurodegenerazione avanza molto velocemente da condurre alla morte del soggetto affetto entro i tre anni di vita. Al contrario, la patologia di tipo B è caratterizzata da modesta o addirittura assente neurodegenerazione e generalmente i pazienti sopravvivono fino all'età adulta. I fenotipi patologici tipici di questa malattia sono fegato e milza ingrossati, complicazioni respiratorie ed un'elevata concentrazione di grassi, quali trigliceridi e colesterolo (LDL e HDL) nel sangue [60].

La forma di tipo C (NPC) è una lipidosi autosomica recessiva determinata da una funzionalità alterata o della proteina NPC1, o della proteina NPC2, entrambe responsabili dei movimenti e della distribuzione del colesterolo all'interno della cellula.

In particolare, questa malattia è causata per circa il 95% dei casi da mutazioni a carico del gene NPC1, mentre il restante 5% da mutazioni a carico del gene NPC2.

Nonostante i continui studi, non è ancora chiaro quale sia esattamente il ruolo e la funzione di queste due proteine. Queste, infatti, localizzano ambedue nei lisosomi, la prima come proteina integrale di membrana, la seconda come proteina del lume lisosomiale.

Entrambe sembrano essere coinvolte nella corretta distribuzione del colesterolo nelle differenti strutture cellulari.

In base alla sua struttura proteica, che suggerisce la presenza di un sito d'interazione con il colesterolo, sono state ipotizzate diverse funzioni per la proteina NPC1 quali: flippasi, permeasi di acidi grassi, trasportatrice di gangliosidi e sensore del colesterolo stesso. Al contrario, la struttura della proteina NPC2 suggerisce un ruolo esclusivamente di trasportatrice del colesterolo. Si è quindi ipotizzato che queste due proteine agiscano in realtà insieme, e che la prima, NPC1, sia in realtà un sensore del colesterolo, mentre la seconda, NPC2, sia un semplice trasportatore del colesterolo stesso.

Le manifestazioni cliniche tipiche di questa patologia sono paralisi facciale verticale, atassia e distonia. Generalmente, queste insorgono già nei primissimi anni di vita e conducono il soggetto alla morte entro i primi dieci anni di vita. Inoltre, spesso questi bambini presentano fegato e milza ingrossati. In realtà, la manifestazione peculiare, a livello anatomico, di questa patologia è la progressiva perdita di cellule neuronali, in particolar modo quelle di Purkinje nel cerebellum.

Infine, l'unica patologia, fino ad ora riscontrata, determinata da danni a carico della via biosintetica stessa degli sfingolipidi è la Neuropatia Sensoriale Ereditaria di tipo 1 (HSN1). Questa è una malattia degenerativa umana determinata da alterazioni del metabolismo sfingolipidico [61]. Si tratta di una neuropatia che colpisce prevalentemente gli arti, a cominciare dalle loro estremità: i primi sintomi sono la perdita di sensibilità a temperatura e dolore ed una progressiva formazione di ulcere; si giunge a lesioni cancrenose delle dita, che spesso devono essere amputate. Si ha poi anche la degenerazione dei motoneuroni, e la denervazione dei muscoli distali degli arti, che porta ad un'atrofia secondaria.

La HSN1 è una malattia autosomica dominante, e ne sono state trovate tre varianti genetiche; una di queste presenta una mutazione missenso nel gene *SPTLC1*, che codifica la subunità LCB1 della serina-palmitoil-CoA transferasi (l'enzima chiave della sintesi degli sfingolipidi). In uno studio recente [61] si è riscontrato che nei pazienti affetti da HSN1 l'attività specifica della SPT è ridotta del 50% circa, e nei loro linfoblasti, posti in coltura, si ha una ridotta sintesi di sfingolipidi. Tuttavia non è ancora stabilito precisamente quali (e quanti) aspetti del metabolismo sfingolipidico siano coinvolti nella determinazione di questa grave e dolorosa malattia; si ipotizza che vi sia una relazione, ancora da chiarire tra varie mutazioni enzimatiche della via sintetica e gli effetti sul sistema nervoso.

L'utilizzo di organismi modello come topo o *Drosophila* può rivelarsi utile in questo senso: sarebbe ad esempio possibile condurre esperimenti di vario tipo sui ceppi mutanti di *Drosophila*, focalizzate sullo sviluppo e la funzione del sistema nervoso, sia mediante test comportamentali (che forniscono informazioni sulla funzionalità di recettori sensoriali, dei

circuiti di elaborazione centrali, eccetera), sia mediante analisi morfologiche (ad esempio del sistema nervoso centrale e delle giunzioni neuromuscolari).

Inoltre, il recente sequenziamento del genoma di *Drosophila melanogaster* fornisce la possibilità di rilevare se in esso è presente una controparte genetica di alcune malattie ereditarie umane; ed in effetti si è trovato che almeno il 62% dei geni umani causanti diverse patologie, sembra essere conservato nel moscerino [62].

1.2.6. SFINGOLIPIDI IN DROSOPHILA

Drosophila è uno degli organismi su cui sono stati condotti studi *in vivo* per ottenere informazioni sulle funzioni fisiologiche degli sfingolipidi, e degli enzimi della loro via metabolica.

Come nei mammiferi, le membrane cellulari degli insetti contengono sfingolipidi semplici e glicosfingolipidi; in *Drosophila* sono importanti componenti strutturali del plasmalemma, strettamente in relazione a microdomini simili ai *raft*, come in altri sistemi eucariotici.

Tuttavia ci sono alcune differenze rispetto ai mammiferi nella composizione sfingolipidica: le membrane di *Drosophila*, come in molti altri ditteri, sono prive di sfingomieline, e presentano invece fosfoetanolamina-ceramide. L'organismo contiene comunque gli elementi basilari per la sintesi degli sfingolipidi [63][64].

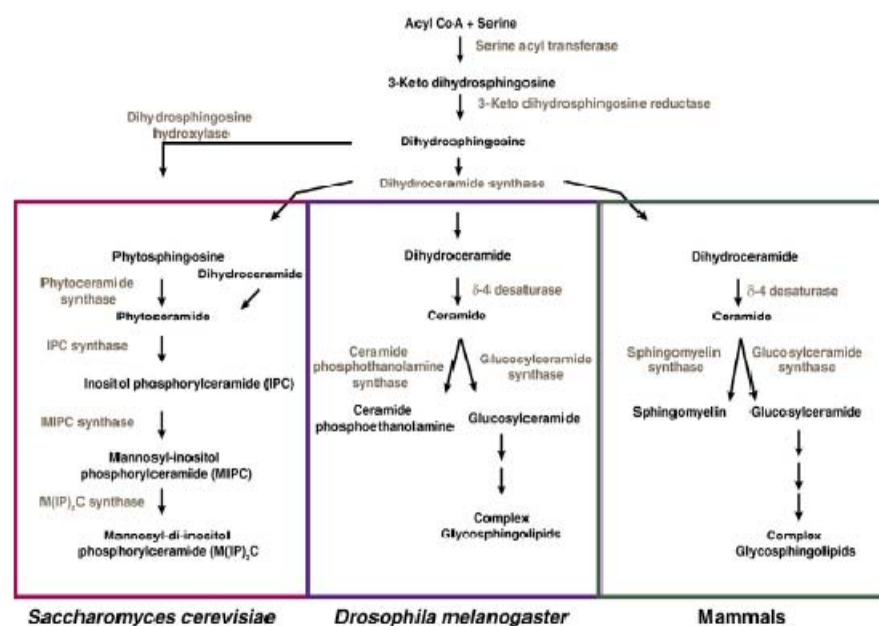


Figura 34 - Sfingolipidi in differenti organismi modello.

In figura è riportata la sintesi de novo degli sfingolipidi in lievito, nei mammiferi e in *Drosophila* [65].

Inoltre, nel moscerino della frutta e vari ditteri, le principali basi sfingoidi sono a catene di 14 e 16 atomi di carbonio, mentre nei mammiferi predominano quelle a C18. Queste catene più brevi di sfingolipidi (ed anche fosfolipidi) indicano che le membrane di *Drosophila* hanno una temperatura di fusione più bassa, e resterebbero quindi fluide a temperature minori [66].

In uno studio sono stati identificati 31 geni del moscerino della frutta, omologhi delle loro controparti di mammifero; si tratta di enzimi del metabolismo della S1P e dell'acido lisofosfatidico [67].

1.3. IL MUTANTE PER IL GENE *SPLY*

La sfingosina -1-fosfato (S1P) assume funzioni di molecola lipidica bioattiva che agisce non solo a livello extracellulare ma anche a livello intracellulare. In particolare, a questo livello, la sua concentrazione viene finemente regolata dall'azione sinergica di due enzimi: uno di sintesi: la sfingosina chinasi, ed uno di degradazione: la sfingosina-1 fosfato liasi (SPL). In considerazione del loro ruolo fondamentale nel regolare la concentrazione cellulare della S1P, degli sfingolipidi e dei glicerosfingolipidi, risulta evidente come questi enzimi siano direttamente coinvolti nel *signalling* cellulare stesso.

1.3.1. L'ENZIMA S1P-LIASI (SPL)

La S1P-liasi (SPL) catalizza la degradazione irreversibile della sfingosina-1-fosfato (S1P) ad etanolamina-fosfato e una base a lunga catena (satura o insatura) (Figura 35).

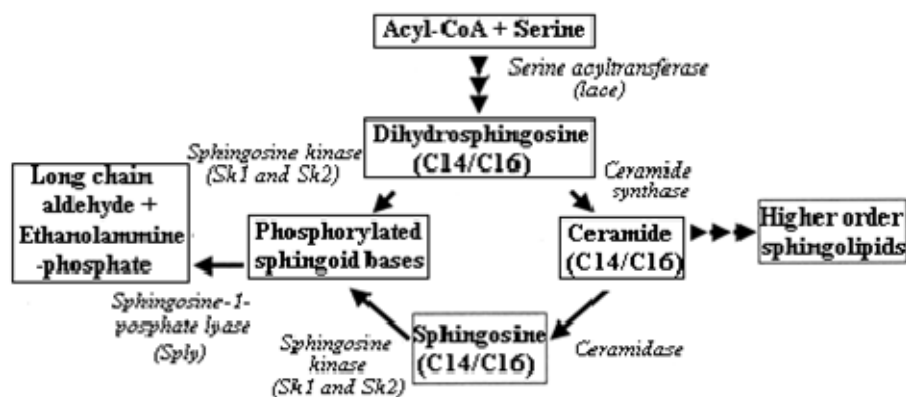


Figura 35 - Mutanti per diversi enzimi degli sfingolipidi in *Drosophila*.

In figura è riportata la sintesi de novo degli sfingolipidi in *Drosophila* con evidenziati i differenti enzimi coinvolti nella stessa. Inoltre, sono segnalati di diversi mutanti *SK2*, *lace* e *Sply* presenti nel nostro laboratorio [68].

Nel topo, la SPL è chiaramente localizzata nel ER. L'associazione tra SPL e membrana del ER è estremamente forte, in quanto resistente a trattamenti con alcali, urea e sali, suggerendo quindi che questa proteina sia in realtà una proteina integrale di membrana. Inoltre, la digestione con proteinasi K rivela che la maggior parte della proteina è esposta verso e nel citosol.

Infatti, la SPL è costituita da un unico segmento transmembrana al suo N-terminale e da un unico grande dominio C-terminale rivolto al citosol. In particolare, la porzione N-terminale è localizzata nel lume del ER, mentre la porzione C-terminale, contenente il sito attivo dell'enzima, si trova nel citosol cellulare [69].

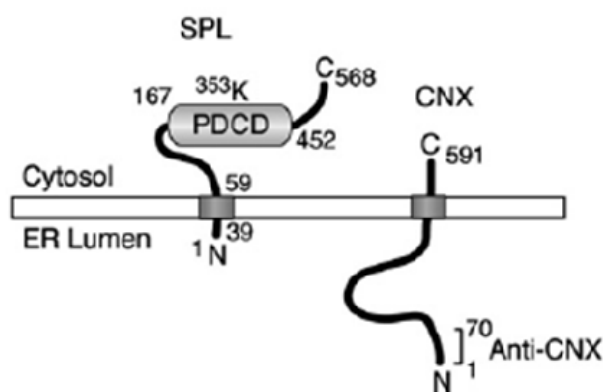


Figura 36 - Modello per la struttura e localizzazione dell'enzima SPL.

In figura è riportato il modello per la struttura dell'enzima SPL e la sua localizzazione sulla membrana del ER con i due terminali disposti alternativamente lungo il ER [69].

Studi effettuati su *Dictyostelium discoideum* [70] e su *Caenorhabditis elegans* [71] indicano l'importanza fondamentale di questo enzima nello sviluppo degli organismi; il suo malfunzionamento provoca un forte accumulo di sfingolipidi fosforilati e non fosforilati, che è deleterio.

In topo, la SPL è stata identificata come prodotto degli *immediate early gene* (IEG) attivato dal fattore PDGF. In generale, sono stati creati dei topi knock-out per 12 di questi IEG, compreso SPL, i quali però evidenziano un fenotipo difficilmente correlabile ad una singola proteina. Infatti, questi i topi mutanti presentano una vitalità variabile che li conduce però tutti alla morte entro l'ottava settimana di vita. I mutanti, appena nati, si presentano sottosviluppati in termini di peso e grandezza rispetto ai corrispettivi dei controlli. Inoltre, questi mutanti sono caratterizzati da numerose emorragie e microaneurismi [65].

1.3.2. L'ENZIMA S1P-LIASI (SPL) IN DROSOPHILA

Il gene *Sply* di *Drosophila* codifica una SPL funzionale; è posizionato nel braccio destro del cromosoma II, regione 53F8-12, ed ha un alto grado di omologia di sequenza (49% di identità e 68% di similarità) con la SPL umana (Figura 37).

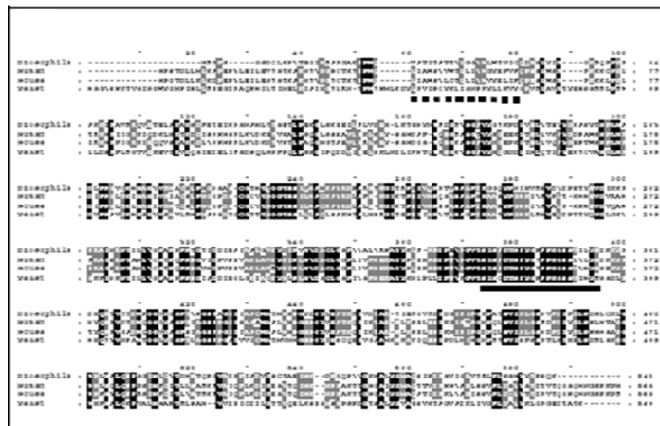


Figura 37 - Il gene *Sply* in *Drosophila*.

In figura è riportato l'allineamento per il gene *Sply* [68].

La sua espressione (Figura 38) è regolata con lo sviluppo. Infatti, se ne osserva un livello temporaneo nelle prime fasi embrionali, dovuto al contributo materno. Successivamente il livello d'espressione declina soprattutto dopo le 8-12 ore dell'embriogenesi, per poi aumentare notevolmente con un picco nel tardo embrione. Infine un secondo picco si è osservato all'inizio della metamorfosi (nella pupa), con il ritorno a livelli basali nell'adulto, indipendentemente dal sesso [68].

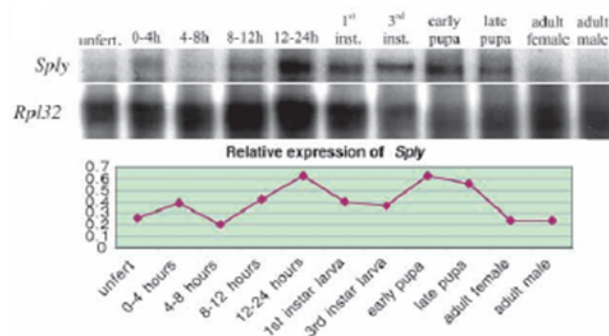


Figura 38 - Espressione del gene *Sply* in *Drosophila*.

In figura è riportato il profilo d'espressione del gene *Sply* durante la vita di *Drosophila*. [68].

1.3.3. CREAZIONE DEL MUTANTE *SPLY*

La mutagenesi tramite elementi-P è un metodo comune di inserire nel genoma di *Drosophila*, in un punto casuale, determinati elementi trasponibili, per interrompere la sequenza di un gene. L'elemento-P può successivamente essere exciso, portando alla reversione dell'effetto dato dalla mutazione; se exciso imprecisamente però, può generare la delezione delle sequenze adiacenti, con diverse possibili combinazioni, e si può produrre una serie allelica di mutanti. In particolare il mutante *Sply* di *Drosophila* è il risultato di un'inserzione di un elemento-P che compromette seriamente la funzione del gene stesso (Figura 39).



Figura 39 - Mutagenesi del gene *Sply* in *Drosophila*.

In figura è riportato l'inserimento di un elemento P nell'*open reading frame* gene *Sply* [68].

In particolare, il transposone è localizzato nel nucleotide +269 relativamente al sito d'inizio del trascritto più grande, LP04413, posizionandosi nella regione codificante di entrambi i trascritti predetti.

L'analisi con *Northern blot* del RNA totale ottenuto dal mutante *Sply* omozigote conferma la totale assenza d'espressione del gene *Sply* (Figura 40). Il mutante *Sply* così ottenuto è definibile quindi come un allele nullo.

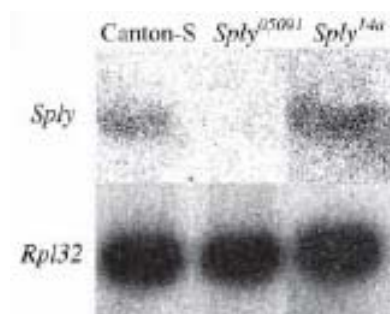


Figura 40 - Espressione del gene *Sply* nel mutante nullo per *Sply*.

In figura è riportato il *Northern blot* fatto per valutare l'effettivo silenziamento del gene *Sply*. [68].

1.3.4. CARATTERIZZAZIONE DEL FENOTIPO ADULTO

I moscerini mutanti omozigoti per l'allele *Sply*⁰⁵⁰⁹¹ non sono distinguibili dai controlli Canton S. Infatti, due adulti provenienti dai due diversi ceppi, mutante e di controllo, sono fenotipicamente uguali. In particolare, non si rilevano degli evidenti difetti o alterazioni nelle strutture anatomiche esterne durante i diversi stadi di sviluppo: da quello larvale a quello adulto.

La perdita completa dell'espressione del gene *Sply* dovrebbe determinare, come primissimo effetto, una variazione notevole nella concentrazione degli sfingolipidi negli animali mutanti rispetto a quelli di controllo. Infatti, nei moscerini *Sply* si riscontra un accumulo di basi sfingoidi a lunga catena (C14 e C16), di sfingosina e di idrosfingosina; in quanto gli individui mutanti non riescono a catabolizzare metaboliti fosforilati endogeni, al contrario dei moscerini di controllo. In particolare, i mutanti adulti mostrano un accumulo di basi non fosforilate 8 volte superiore rispetto ai controlli, e 20 volte superiore per quanto riguarda le basi fosforilate. E' interessante sottolineare che l'accumulo si osserva già alle 12 ore di embriogenesi, risultando quindi in un'alterazione fisiologica molto precoce.

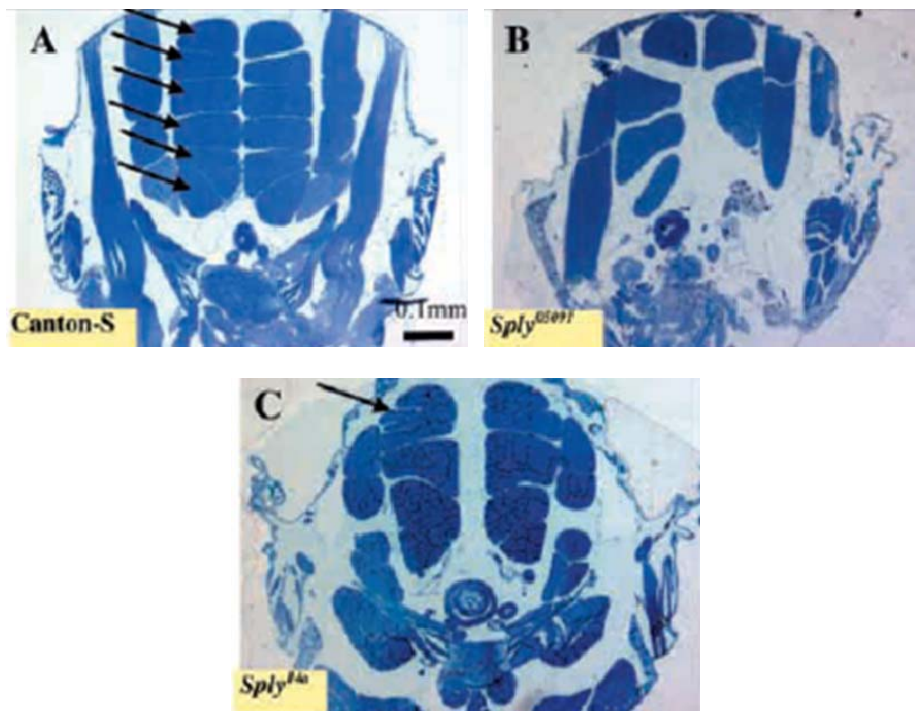


Figura 41 - Sezioni toraciche trasversali.

In figura A è riportata una sezione toracica di un moscerino adulto di controllo, nella quale si osserva chiaramente il pattern simmetrico dei sei muscoli toracici del volo (DML). In figura B è riportata una sezione toracica di un mutante *Sply*, nella quale si nota come venga perso il pattern simmetrico in quanto vi sono solamente 4 fibre DLM. In figura C è riportata una sezione toracica del revertante 14A, nella quale il pattern muscolare DLM è completamente ristabilito [68].

Altra caratteristica peculiare, dei mutanti *Sply* adulti, riguarda la loro ridottissima capacità di volare (il 91% della popolazione ha ottenuto punteggio 0 in test per la performance di volo). Risulta interessante inoltre, il fatto che questi gravi difetti locomotori sembrano coinvolgere esclusivamente le fibre muscolari del volo (DML), mentre la funzionalità di tutti i restanti gruppi muscolari, quali quelli del salto e delle zampe, permane intatta.

L'incapacità di volo sembra essere direttamente correlata ad alterazioni a carico dei muscoli del volo stessi. Infatti, si riscontrano evidenti anomalie nel pattern dei muscoli dorsali longitudinali (DLM) del volo (Figura 41). Nei moscerini *wild-type* il torace contiene sempre 6 paia simmetriche di fibre muscolari; mentre i mutanti omozigoti *Sply* invece presentano una generica mancanza di alcune di queste (da analisi quantitative: 4.15 fibre per emitorace).

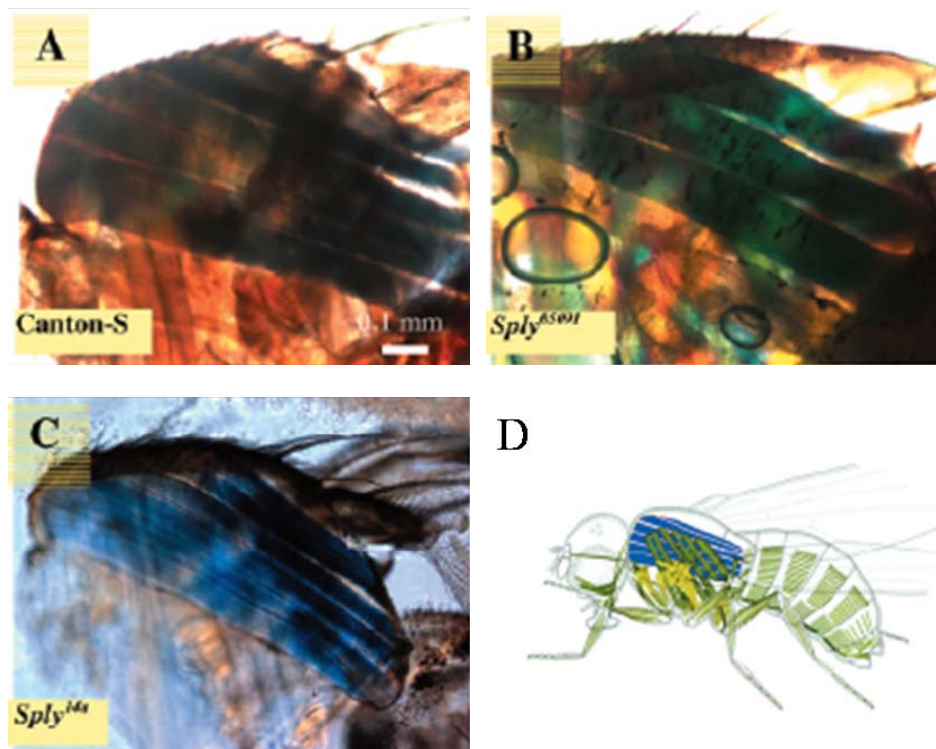


Figura 42 - Sezioni toraciche laterali.

In figura A è riportata una sezione toracica laterale di un moscerino adulto di controllo, nella quale si osserva chiaramente il pattern simmetrico dei sei muscoli toracici del volo (DML). In figura B è riportata una sezione toracica laterale di un mutante *Sply*, nella quale si nota come venga perso il pattern simmetrico in quanto vi sono solamente 3 fibre DLM ipertrofiche. In figura C è riportata una sezione toracica laterale del revertante 14A, nella quale il pattern muscolare DLM è completamente ristabilito. In figura D disegno di una *Drosophila* adulta dove in blu sono evidenziati i muscoli toracici del volo [68].

Il pattern muscolare delle fibre DLM viene completamente ristabilito nei revertanti 14A. Questi animali sono stati ottenuti mediante l'excisione perfetta dell'elemento-P dalla sequenza del gene *Sply*.

Inoltre, nei mutanti *Sply* non solo viene completamente perso il pattern simmetrico di 6 fibre muscolari DLM, ma quelle poche presenti sono chiaramente caratterizzate da ipertrofia (Figura 42). caratteristica non osservata né nei controlli, né nei revertanti 14A.

Altra peculiarità dei mutanti è rappresentata da una progenie notevolmente ridotta rispetto ai controlli, di circa il 10%. Questa perdita è riconducibile a diversi fattori: a un numero minore di uova deposte e/o una minore capacità di sopravvivenza degli embrioni e delle larve. In particolare, la sopravvivenza è influenzata da alti livelli di apoptosi nell'embrione, soprattutto nel disco genitale, e dall'alta mortalità negli stadi larvali. Inoltre, è stato dimostrato che il numero di uova deposte è circa 1/3 rispetto ai controlli e che questa riduzione è indipendente dalla fertilità maschile e femminile.

La fecondità dei maschi e delle femmine *Sply* è notevolmente ridotta a causa di evidenti alterazioni morfologiche alle gonadi. Anomalie a carico di questi organi fondamentali si riscontrano anche durante gli stadi larvali, a carico dei dischi genitali.

In particolare, i dischi genitali dei mutanti *Sply* mostrano una riduzione nelle dimensioni di circa il 39% rispetto a quelli dei controlli. Questa notevole riduzione risulta a carico esclusivamente di queste strutture, mai a carico delle strutture (dischi imaginali) che successivamente daranno origine alle ali, alle zampe. Durante lo sviluppo, i dischi genitali si trasformano nelle strutture interne che interconnettono gli ovari dell'adulto ed i testicoli, racchiudendo il tessuto delle gonadi che successivamente darà origine alle gonadi stesse. La stessa riduzione in termini di dimensione è stata determinata anche per le gonadi delle larve *Sply*.

Tali anomalie morfologiche a carico delle gonadi larvali si ripercuotono anche sulle gonadi mature dello stadio adulto sia nei maschi che nelle femmine *Sply*.

Le femmine *Sply* sono caratterizzate da ovari pesantemente degenerati o assenti (Figura 43-B). In generale, animali con deficienze a carico delle gonadi, spesso evidenziano ovari completamente mancanti. Nel caso delle *Sply*, invece, si riscontrano non solo femmine senza ovari ma soprattutto femmine con un ovario degenerato ed uno mancante, o uno degenerato ed uno normale.

Nella porzione finale distale dell'ovidotto comune di *Drosophila* vi sono delle strutture derivanti dai dischi genitali larvali che normalmente fungono da sede di immagazzinamento degli spermatozoi: un singolo ricettacolo seminale ed un paio di spermateche. Sorprendentemente, tre o quattro spermateche sono state spesso riscontrate nelle femmine mutanti *Sply* (Figura 43-E, E').

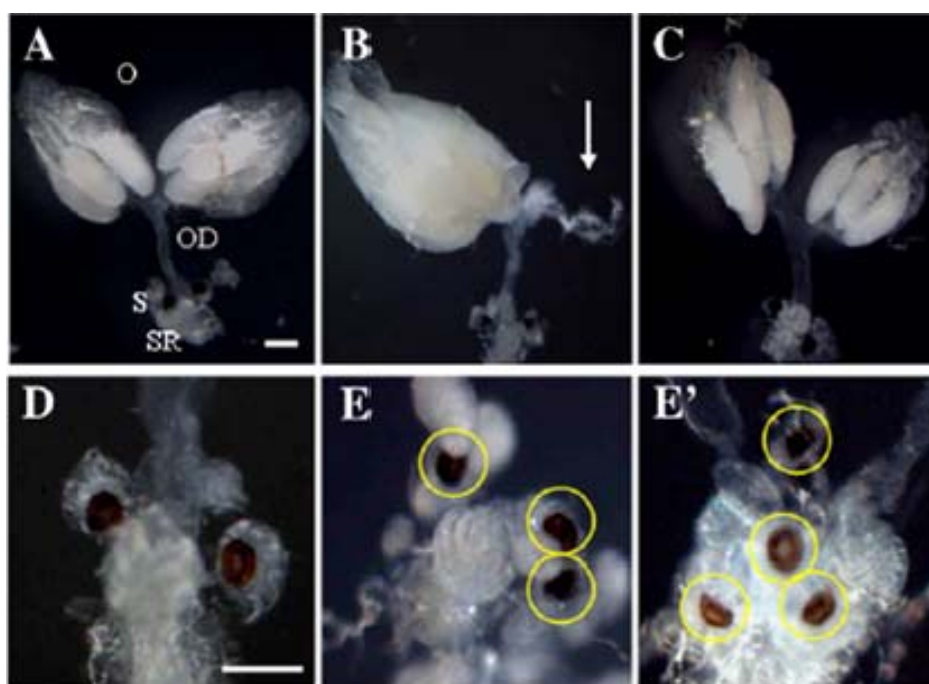


Figura 43 - Ovari in adulti di controllo, mutanti e revertanti.

In figura A, B, C sono riportati gli ovari maturi provenienti da femmine adulte di 4 giorni dissezionati e fotografati. È evidenziato l'ovidotto comune (OD), i ricettacoli seminali (SR) e le spermateche (S). Canton S (A), *Spby* (B) e 14A (C). Le femmine *Spby* mostrano ovari degenerati (B, freccia) e spermateche soprannumerarie (E e E'). Barra dimensionale 200 μ m [72].

Evidenti difetti a carico delle strutture riproduttive non sono esclusivamente limitate alle femmine mutanti *Spby*, ma il 41% della loro controparte maschile è caratterizzato da testicoli drasticamente ridotti e raggrinziti (Figura 44-C e C').

Confrontando, il tipico doppio set di testicoli lunghi ed elicoidali dei controlli (Figura 44-A) e dei revertanti 14A (Figura 44-B), con il set dei mutanti si nota il palese fenotipo degenerativo a carico di un singolo o di ambedue i testicoli.

In *Drosophila* i dischi genitali presenti nella fase larvale, daranno origine, sia nei maschi che nelle femmine adulti, a tutte le strutture costituenti i genitali esterni ed interni. Risulta quindi evidente, come una netta riduzione in termini dimensionali dei dischi genitali e delle gonadi nello stadio larvale, si traduca in un fenotipo anormale a carico degli ovari, dei testicoli e dei tessuti associati, quali spermateche, ovidotti e paragonadi, nei mutanti adulti.

Queste pesanti alterazioni a carico delle strutture riproduttive sono direttamente correlati alla ridotta capacità riproduttiva evidenziata per i mutanti *Spby*.

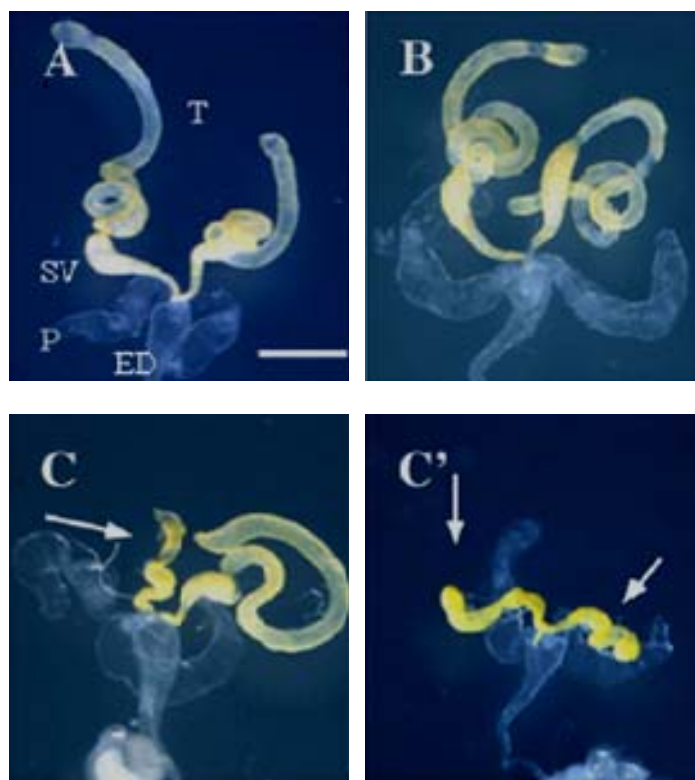


Figura 44 - Testicoli adulti in controlli, mutanti e revertanti.

In figura A, B, C, C' sono riportati i testicoli adulti (T) provenienti da maschi adulti di 4 giorni dissezionati e fotografati. Sono evidenziati: le vescicole seminali (SV), paragonadi (P) e il dotto eiaculatore (ED). Canton S (A), *Sph* (C e C') e 14A (B). I mutanti *Sph* mostrano un testicolo ridotto (C, freccia) e due testicoli ridotti (C'). Barra dimensionale 200 μ m [72]

2. SCOPO

L'importanza degli sfingolipidi come componenti fondamentali di tutte le membrane biologiche è stata considerata esclusivamente nel ventesimo secolo, quando sono state scoperte diverse patologie umane congenite correlate ad alterazioni nel metabolismo e nella degradazione di questi particolari lipidi.

La generazione del mutante *Sply* in *Drosophila* ha condotto alla possibilità di studiare, in un organismo *in toto* gli effetti derivanti da alterazioni a carico del metabolismo degli sfingolipidi. L'innovazione di questo progetto consiste nel fatto di poter direttamente studiare le conseguenze di tale alterazione e che per ora non ha ancora riscontro in alcuna patologia umana.

In particolare, lo scopo generale, di questo progetto di dottorato, è consistito nella caratterizzazione fenotipica di larve del mutante *Sply*. L'impiego della larva come modello di studio permette l'utilizzo di diverse e versatili tecniche d'indagine biologica *in vivo* oltre ai tradizionali approcci basati sulla microscopia a fluorescenza, confocale ed elettronica, che rendono la larva un organismo estremamente più versatile dell'adulto. Infatti, mediante la dissezione, le larve vengono aperte e ripulite, ottenendo uno specifico preparato, denominato *Body wall*, nel quale gli apparati muscolari e nervosi permangono integri e vitali.

In questo modo, è possibile analizzare direttamente l'apparato muscolare, valutandone la struttura e la morfologia anche a livello delle singole fibre che lo compongono. Inoltre, è possibile considerare direttamente la morfologia e funzionalità dei componenti dell'apparato contrattile e degli organelli costituenti (come ad esempio i mitocondri).

La stessa plasticità d'analisi può essere applicata anche all'intero Sistema Nervoso. In particolare, è possibile osservare direttamente il cervello e le strutture che lo compongono, valutandone, mediante l'ausilio di specifici marcatori, le possibili alterazioni strutturali.

A livello del Sistema Nervoso Periferico è possibile analizzare la funzionalità e l'organizzazione sinaptica, andando a studiare direttamente la giunzione neuromuscolare. In particolare, è possibile impiegare tecniche su materiale fissato ed *in vivo* che permettono di valutare: l'organizzazione e la struttura dei complessi pre- e post-sinaptici e l'attività degli stessi. Grazie alle molteplici possibilità d'analisi, la giunzione neuromuscolare di *Drosophila* si pone come ottimo modello di studio per la sinapsi di tipo glutammatergico. La giunzione neuromuscolare larvale di *Drosophila* quindi presenta caratteristiche che la rendono molto simile alle sinapsi di sistema nervoso centrale di mammifero.

Risulta quindi evidente, come l'insieme di queste notevoli potenzialità d'indagine, offerte dallo studio delle larve mutanti *Sply*, possa fornire uno strumento molto utile e potente per rispondere ai molti quesiti riguardanti l'influenza degli sfingolipidi sui meccanismi sinaptici e muscolari.

3. MATERIALI E METODI

3.1. ORGANISMO MODELLO

3.1.1. CICLO VITALE DI *Drosophila melanogaster*

Il ciclo vitale di *Drosophila melanogaster* (Figura 45) è molto breve: di sole 2 settimane a 25°C (la durata è circa doppia a 18°C), in confronto a quello di molti altri organismi pluricellulari. Una sola coppia parentale può produrre una progenie di centinaia di individui. Queste caratteristiche permettono di confrontare in tempi relativamente rapidi le modalità di trasmissione ereditaria in generazioni successive e di reperire fenotipi rari per costruire mappe geniche.

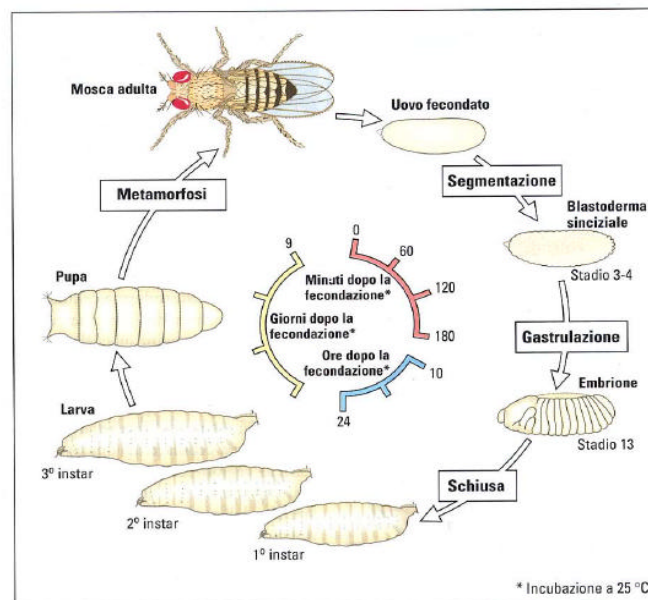


Figura 45 - Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*.

Nello schema sono rappresentate le diverse fasi vitali del moscerino della frutta [6].

Le uova, il cui diametro è di circa 0,5 millimetri, si schiudono dopo 24 ore dalla deposizione. Le larve risultanti iniziano immediatamente a nutrirsi, mangiando i microorganismi che decompongono la frutta e gli zuccheri della frutta stessa, ingrandendosi velocemente per un giorno (larva 1° stadio). I tre stadi larvali (L1, L2 e L3) durano rispettivamente 24, 24 e 48 ore; ad ogni muta (due in tutto) la cuticola, l'armatura boccale e gli spiracoli sono ricostruiti, e si formano le strutture tipiche dello stadio successivo. Gli organi interni puramente larvali, come le ghiandole salivari, si accrescono per aumento di

dimensioni delle singole cellule, mentre i dischi immaginali, da cui deriveranno le strutture dell'adulto, si accrescono per moltiplicazione cellulare [6]. La seconda muta porta alla formazione delle larve 3° stadio, le quali dopo 7 giorni smettono di nutrirsi, cercano un luogo asciutto e si incapsulano in una pupa dove passano altri 5 giorni utilizzando il cibo accumulato per effettuare una metamorfosi. La *Drosophila* selvatica di solito si impupa quando è buio: il corpo si accorcia, si ha l'eversione degli spiracoli anteriori e l'indurimento della cuticola larvale. Appena formato, il pupario è soffice e bianco. Durante questo periodo si ha il processo che comporta la formazione di strutture dell'adulto all'interno della pupa, mediante ulteriore duplicazione cellulare e differenziazione. Infine, emerge il moscerino adulto mobile da un'apertura nella parte anteriore del pupario (opercolo): da questo momento non si hanno più divisioni cellulari, eccetto che negli organi riproduttivi. Abbandonato l'involucro l'individuo adulto sarà pronto ad accoppiarsi nel giro di 12-14 ore.

3.2. MANTENIMENTO DELLE LINEE DI DROSOPHILA IN LABORATORIO

I ceppi di *Drosophila* sono mantenuti in tubi di polistirolo cristallizzato atossico (diametro: 3,5cm, altezza: 8cm) tappati con gommapiuma, contenenti circa 10mL di terreno nutritivo. Tale mezzo è costituito da 12g di agar, 44g di estratto di lievito e 44g di zucchero per litro d'acqua; viene autoclavato per 20 minuti a 120°C e, dopo il raffreddamento in agitazione, alla temperatura di 37°C, viene addizionato di Nipagina (metil-4-idrossibenzoato, 4g in 40mL etanolo 95%), che agisce da conservante alimentare. Il terreno nutritivo viene versato nei tubi, successivamente chiusi con appositi tappi in gommapiuma, per limitare l'infiltrazione di acari e parassiti, permettendo allo stesso tempo il passaggio dell'aria. I ceppi di *Drosophila* devono essere periodicamente trasferiti in tubi contenenti terreno fresco, circa ogni 15 giorni, in base alla temperatura di crescita. Questo viene fatto per evitare un sovraffollamento di individui all'interno dei tubi e per prevenire l'insorgenza di infezioni batteriche, della crescita di muffe ed acari. Nel caso si riscontri la presenza di batteri, acari o muffe all'interno dei tubi, vengono tempestivamente trasferiti i ceppi infettati in nuovi tubi contenenti antibiotico (Ampicillina, Cloramfenicolo [7mg/ml in EtoH 50%]). E' importante indicare su ogni tubo di coltura la data dell'ultimo trasferimento e le informazioni riguardo il genotipo del ceppo presente al suo interno.

3.3. CEPPI DI *Drosophila melanogaster* UTILIZZATI

3.3.1. CANTON-S: CANTON SPECIAL

Il ceppo deriva da una popolazione di moscerini *wild type* originaria di Canton, Ohio. Lo stock *Wild-type* Canton S (BL-1) ci è stato fornito dal professor C.P. Kyriakon (Università di Leicester) [40].

3.3.2. SPLY

Il ceppo mutante *Sply* (BL-11393) proviene dal “Bloomington *Drosophila Stock Center*” presso l’Università dell’Indiana, e ci è stato donato dal prof. Harris del Dipartimento di Biologia dell’Università di San Diego (California) [68][72].

3.3.3. 14A

Il ceppo revertante 14A ci è stato donato dal prof. Harris.

3.4. MANIPOLAZIONE DI LARVE DI *Drosophila melanogaster*

Le tecniche di immunoistochimica, impiegate in questo lavoro, vengono applicate direttamente ai tessuti muscolari e nervosi della larva di *Drosophila*

Per fare ciò, larve al terzo stadio vengono dissezionate, disponendole su di un piano, esponendo tutte le strutture muscolari ed il sistema nervoso completamente intatti (Figura 46). Le larve così manipolate vengono definite *Body wall*.

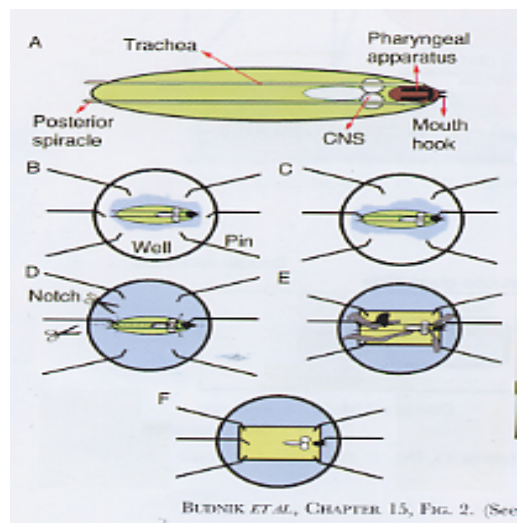


Figura 46 - Dissezione di una larva di *Drosophila*.

Nello schema sono rappresentate le diverse fasi di dissezione.

3.4.1. MATERIALE OCCORRENTE

- microscopio ottico binoculare;
- due micro pinzette;
- piastra petri per colture cellulari (35×10mm) con il fondo ricoperto di silicone (Sylgard 184, Dow Corning USA);
- scissore “Vannas”;
- spilli da entomologia.

3.4.2. SOLUZIONI

- HL3A.

L'intera dissezione viene effettuata in HL3A (haemolymph-like saline-3) [73]. Questa è una soluzione salina che mima la soluzione fisiologica della larva, ed è necessaria durante la dissezione per mantenere i tessuti freschi più a lungo. E' composta da :

- $MgCl_2$, 20 mM;
- KCl, 5 mM;
- NaCl, 70 mM;
- $NaHCO_3$, 10 mM;

- HEPES, 5 mM;
- Saccarosio, 115 mM;
- Trealosio-2H₂O, 5 mM.

3.4.3. PROCEDURA

Viene prelevata dalla parete del tubo di coltura una larva terzo stadio e viene posizionata col dorso rivolto verso l'alto, riconosciuto dalla presenza delle tracheole, sul silicone di una piastra petri ed idratata con circa 300µl di HL3A.

La larva viene immobilizzata fermandola con due aghi, uno infilato tra gli uncini buccali e l'altro fra i due spiracoli posteriori. Gli aghi sono maneggiati con le micropinzette. Vengono aggiunti ancora alcune centinaia di microlitri di HL3a in modo da ricoprire completamente la larva (Figura 47-A). Con lo scissore "Vannas" si pratica un taglio obliquo sulla cuticola dorsale posteriore della larva, partendo dagli spiracoli posteriori fino alla metà del corpo. I lembi della cuticola tagliata vengono aperti, tirati con le pinzette ed infine fissati al silicone con 2 aghi. Si prosegue con il taglio fino all'altezza degli uncini buccali, e, sempre aiutandosi con le micropinzette, si eseguono gli stessi passaggi nella parte anteriore, aprendo così completamente la larva (Figura 47-B). A questo punto, è necessario ripulire la larva dagli organi interni, asportando le tracheole partendo sempre dagli spiracoli posteriori verso quelli anteriori, tagliando una ad una le loro diramazioni principali, in modo da eliminare contemporaneamente anche gli organi interni (Figura 47-C).

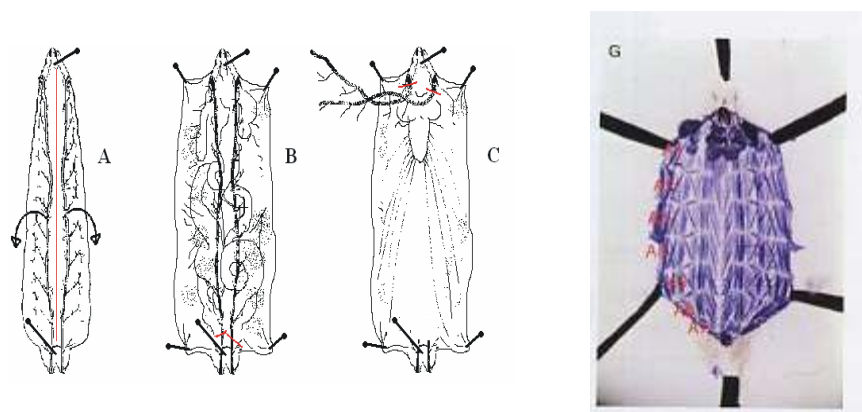


Figura 47 - Body wall di larva di *Drosophila*.

In figura sono riportate le diverse fasi della dissezione. In particolare, in figura A è rappresentata la fase in cui la cuticola della larva viene tagliata lungo l'asse antero-posteriore. In figura B, è disegnata un larva completamente aperta e fissata ai lati mediante spilli da entomologia. Si nota l'apparato digestivo e tutte le tracheole. In figura C la fase finale, nella quale vengono completamente eliminate le interiora e le tracheole. In figura G è fotografato un *Body wall*.

È necessario porre una particolare attenzione a livello del cervello, al fine di mantenerlo intatto e non tranciare i diversi nervi che da esso dipartono per raggiungere le differenti fibre muscolari. L'obiettivo infatti è quello di mantenere la struttura muscolare ed il sistema nervoso perfettamente conservati (Figura 47-C). Infine si riempie la piastra petri di HL3A per non far disidratate e degradare i tessuti.

3.5. COLORAZIONE CON RODAMINA-FALLOIDINA

Per l'individuazione della struttura muscolare e in particolare dell'apparato contrattile di *Drosophila* è stata impiegata una colorazione con Rodamina-Falloidina (Invitrogen). La Rodamina è un fluoroforo che permette la visualizzazione del segnale ottenuto al microscopio confocale (λ_{ab} :540nm; λ_{em} :565nm) la Falloidina è una tossina isolata dal fungo *Amanita phalloides* in grado di legare l'actina-F (filamentosa) [74][75].

3.5.1. MATERIALE OCCORRENTE

- piastra 24 pozzetti;
- tavolino oscillante;
- vetrino portaoggetti (76×26mm);
- vetrino coprioggetti (24×40mm con indice di rifrazione 1);
- micropinzette.

3.5.2. SOLUZIONI:

- PFA 4% (PFA 4% in PBS1X);
- PBST 0,05% (Triton allo 0,05% in PBS1X);
- PBST 0,3% (Triton allo 0,3% in PBS1X);
- PBSTA 0,1% (Triton allo 0,05% BSA allo 0,1% in PBS1X);
- Metilcellulosa 3% in PBS1X.

3.5.3. PROCEDURA

Dopo essere state dissezionate, larve CS e larve *Sph* vengono fissate per 40 minuti PFA 4% , la quale fissando tutte le membrane, determina un irrigidimento delle larve.

Successivamente, le larve vengono spillate e trasferite in pozzetti di una piastra per colture cellulari ove si effettuano tre lavaggi da 15 minuti con PBST 0,05%, su un tavolino oscillante in una stanza a 5°.

Si passa successivamente alla fase di permeabilizzazione con PBST 0,3% per 30 minuti sempre a 5°C su tavolino oscillante.

A questo punto i campioni sono stati incubati con PBSTA 0,1% per 60 minuti. Tale soluzione contiene la BSA la cui funzione è quella di legare i siti aspecifici all'interno del tessuto che in tal modo non vengono riconosciuti da altre sostanze.

Si effettuano altri due lavaggi con PBST 0,05% per 15 minuti l'uno.

Si colora con Rodamina-Falloidina (Invitrogen) diluita 1:100 in PBST 0,05% per 30 minuti. Si effettuano ancora tre lavaggi con PBST 0,05% da 15 minuti per eliminare il colorante in eccesso, sempre su tavolino oscillante a 5°C.

Infine campioni vengono disposti all'interno di una goccia di metilcellulosa 3% sopra un vetrino porta oggetti. Grazie all'ausilio delle micro pinzette si dispongono correttamente le larve, chiuse poi dal copri oggetti. Infine, si sigilla il vetrino con dello smalto per unghie trasparente.

3.5.4. MICROSCOPIO CONFOCALE

I campioni sono stati osservati al microscopio confocale BioRad Radiance 2000. In particolare, è stato impiegato un metodo specifico per le fluorescenze rosse, nel quale l'eccitazione del fluoroforo viene fatta ad una lunghezza d'onda di 543nm mediante un laser verde ad Elio-Neon e l'emissione rilevata grazie ad un apposito filtro che rileva tutte le fluorescenze da una lunghezza di 600nm in poi.

Il confocale è stato prima settato su dei campioni di controllo e tali impostazioni sono state mantenute per tutte le osservazioni. Per ogni campione sono state considerate le fibre 6 e 7 del segmento due e tre o di sinistra o di destra. Il segmento è stato prima fotografato al confocale con un ingrandimento 10x e poi successivamente le fibre 6 e 7 con un ingrandimento 40x. In particolare, sono state considerati 2 segmenti per ogni campione analizzato, per un totale di 24 segmenti (12 segmenti due e 12 segmenti 3) nel totale di 12 larve Canton s; per i mutanti sono stati considerati 32 segmenti (16 segmenti due e 16 segmenti tre) nel totale di 13 larve.

Nel caso dell'impiego dell'obiettivo 10x, sono state fatte delle singole foto del segmento completo, con: Iris:2.5, Gain:30, Offset:-10, Velocità:25ips. Nel caso dell'impiego dell'obiettivo 40x, sono stati fatti degli Z-stack lungo l'asse Z con singoli piani di 1 μm delle fibre 6 e 7. Con:Iris:1.5, Gain:30, Offset:-15, Velocità: 25 ips e con uno Zoom:2.

3.5.5. ANALISI DELLE FIBRE MUSCOLARI

Per ogni campione sono stati considerati un le fibre 6 e 7 del segmento due e tre o di sinistra o di destra. Il segmento è stato prima fotografato al confocale con un ingrandimento 10x e poi successivamente le fibre 6 e 7 con un ingrandimento 40x.

Le foto così ottenute sono state analizzate tramite il software ImageJ1.35i. In particolare, per quanto riguarda le foto fatte ad ingrandimento 10x è stato possibile misurare la lunghezza e la larghezza dell'intero segmento preso in considerazione, e la larghezza delle singole fibre 6 e 7- Per quanto riguarda l'analisi dei sarcomeri, sono state considerate solamente due muscoli per larva, la fibra 6 e 7, di uno specifico segmento. Le fibre in questione sono state riprese lungo l'asse z, mediante un Z-stack, in modo da poter considerare dei sarcomeri appartenenti a miofibrille localizzate alla stessa altezza all'interno delle varie fibre. I filmanti ottenuti per le fibre 6 e 7 sono stati analizzati mediante ImageJ, andando a valutare l'intensità della fluorescenza rilasciata dalla Rodamina su un sistema a scala di grigi. In particolare, si è calcolata la grandezza di 8 sarcomeri consecutivi dello stesso muscolo, considerando la distanza tra i diversi picchi di fluorescenza.

3.6. ANALISI DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE ($\Delta\Psi\text{M}$)

L'impiego di specifiche sonde fluorescenti permette di valutare e monitorare il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi\text{m}$), grazie al loro accumulo a livello della matrice mitocondriale. In particolare, variazioni del potenziale di membrana mitocondriale possono essere osservate grazie a cambiamenti a carico dell'intensità della fluorescenza della sonda o dal suo rilascio nello spazio perimitocondriale. La sonda fluorescente TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester) è la sonda più comunemente usata. Questa si accumula all'interno della matrice dei mitocondri polarizzati evidenziandoli grazie alla sua emissione(λ_{ab} :488nm; λ_{em} :580nm.) [76].

La sensibilità di questo approccio è chiaramente documentata dall'impiego del protonoforo FCCP, il quale aggiunto al preparato determina dei piccoli cambiamenti del

potenziale di membrana mitocondriale, evidenziabili dal rilascio graduale da parte del mitocondrio stesso, della sonda TMRM [77].

Inoltre, è possibile valutare esclusivamente le variazioni del potenziale di membrana, e quindi dello status strutturale delle membrane mitocondriali, andando ad bloccare completamente l'ATP sintasi, la quale, è stato dimostrato, in condizioni di anomalie strutturali, opera in modo inverso, concorrendo così direttamente al mantenimento del potenziale di membrana. Tale azione di inibizione completa dell'ATP sintasi viene ottenuta tramite l'impiego dell'antibiotico Oligomicina [78].

3.6.1. MATERIALE OCCORRENTE

- -microscopio confocale;
- -obiettivo 40x ad acqua.

3.6.2. SOLUZIONI

- HL3A;
- TMRM (20nM) in HL3A;
- Oligomicina (5 μ M) in HL3A;
- FCCP (5 μ M) in HL3A.

3.6.3. PROCEDURA

La larva appena dissezionata, viene mantenuta spillata sulla petri, con il fondo di sylgard, immersa in HL3A. In questo modo i tessuti dell'apparato muscolare e del sistema nervoso vengono mantenuti *in vivo*.

In primis, la larva viene incubata per 30 minuti con TMRM in HL3A. Finita l'incubazione, vengono fatte delle scansioni continue delle fibre 6 e 7 del segmento 3 o di destra o di sinistra, in modo da valutare direttamente la stabilità del TMRM all'interno dei mitocondri per un intervallo di tempo di 10 minuti.

Successivamente, sempre mantenendo la larva sotto l'obiettivo ad acqua, viene aggiunta tramite l'ausilio di una micro pipetta, l'oligomicina, monitorando costantemente le fibre 6 e 7 per altri 25 minuti consecutivi.

Infine, viene aggiunto il protonoforo FCCP e monitorate le fibre d'interesse per altri 25 minuti, durante i quali si assiste ad un'alterazione del potenziale di membrana con conseguente rilascio, da parte dei mitocondri, del TMRM.

L'intero protocollo viene svolto in una stanza buia.

3.6.4. MICROSCOPIO CONFOCALE

Ogni singola larva è stata monitorata in vivo in ogni singola fase di questo protocollo sperimentale. In particolare è stato usato un metodo nel quale, mediante l'ausilio di un laser ad Argon, il TMRM è stato eccitato ad una lunghezza d'onda specifica a 488nm e il suo segnale evidenziato da filtri capaci di selezionare le fluorescenze nel rosso (filtro 570/ 700).

Per ogni larva sono stati fatti tre filmati, il primo di 10 minuti consecutivi per monitorare la stabilità del TMRM a livello mitocondriale, il secondo di 25 minuti dopo l'aggiunta dell'Oligomicina ed il terzo di 25 minuti dopo l'aggiunta del FCCP. Ogni filmato è composto da una serie di foto delle fibre d'interesse scattate ad una frequenza di 10 secondi, scattate con Iris:4, Gain:20, Offset:30, Velocità: 166ips con Zoom:2.

Sono state analizzate 5 larve per i controlli e 5 larve per i mutanti *Sph*.

3.6.5. ANALISI DELLO STATUS MITOCONDRIALE

Per ogni larva sono state monitorate esclusivamente le fibre 6 e 7 o del segmento di sinistra o del segmento di destra. In particolare, per ogni larva sono stati fatti tre filmati riguardanti le tre diverse incubazioni con TMRM, con Oligomicina e con FCCP. Ogni filmato è composto da una serie di foto delle fibre d'interesse scattate ad una frequenza di un 10 secondi.

I filmati sono stati analizzati tramite il programma Spotlight8. Grazie a questo software è stato possibile unire i tre filmati in un unico filmato continuo e valutare la variazione del potenziale di membrana mitocondriale analizzando l'intensità del segnale fluorescente del TMRM. In particolare, per ogni fibra sono state selezionate delle zone rettangolari d'interesse di piccole dimensioni, caratterizzate da un'alta concentrazione mitocondriale. All'interno di queste zone è stata valutata l'intensità della fluorescenza, su una scala di grigi, del TMRM durante tutto l'arco temporale dell'esperimento.

L'analisi di ogni singola zona è stata poi riunita in un foglio Excel e valutata la variazione d'intensità della fluorescenza d'insieme.

3.7. COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE

BODIPY-FL C₅ – Ceramide (Molecular Probes) è un colorante composto dal fluoroforo BODIPY [boron dipyrromethene (4,4-difluoro-5,7-dimetil4—bora-3°,4°-diazas-indacene)] e da una molecola di ceramide.

Questo composto è specifico per colorazioni *in vivo* ed in fissato per l'apparato del Golgi e per lo studio della sintesi e del trasporto degli sfingolipidi lungo i *pathways* secretori in colture cellulari di mammifero. In particolare, in colorazioni in vivo, questo colorante rende non solo visibili le dinamiche del Golgi stesso, ma anche viene metabolizzato ed accumulato dalle cellule vive come la sua controparte endogena [79].

Il fluoroforo BODIPY permette di evidenziare gli accumuli di ceramide e di altri lipidi simili a livello delle membrane cellulari e all'interno di strutture più complesse. Infatti, questo fluoroforo, che viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 470 nm, rende visibili basse concentrazioni di accumuli sfingolipidici emettendo ad una lunghezza d'onda nel verde. In presenza però di accumuli di notevoli dimensioni, vi è un passaggio ad una lunghezza d'onda osservabile nello spettro del rosso. Questo colorante, grazie a queste sue intrinseche caratteristiche, permette quindi di discernere tra regioni caratterizzate da concentrazioni di sfingolipidi differenti. Infatti, il BODIPY è un molecola non polare e neutrale capace di intercalarsi perfettamente all'interno del doppio strato lipidico seguendo il percorso compiuto dalla ceramide stessa [80].

3.7.1. MATERIALE OCCORRENTE

- piastra 24 pozzetti;
- tavolino oscillante;
- vetrino portaoggetti (76×26mm);
- vetrino coprioggetti (24×40mm con indice di rifrazione 1);
- micropinzette.

3.7.2. SOLUZIONI

- HL3A;
- Shields and sang M3 insect medium (Sigma);
- BODIPY-FL C₅– Ceramide (1μM);
- PFA 4%;

- PBS 1x;
- Confocal Matrix ® (Micro-tech-lab).

3.7.3. PROCEDURA

Le larve per i controlli e per i mutanti vengono dissezionate in HL3A come precedentemente descritto. Il *Body-wall* spillato e “vivo” viene incubato per 1 ora e 15 minuti con BODIPY-FL C₅– Ceramide (1µM) in terreno di coltura per cellule d’insetto su tavolino oscillante a 5°C al buio [81].

Successivamente, i campioni vengono lavati velocemente sempre con del terreno di coltura e incubati per 3 ore su tavolino oscillante a temperatura ambiente cambiando il terreno ogni 30 minuti.

Infine, i campioni vengono fissati per 20 minuti con PFA4% a temperatura ambiente, spillati e riposti in una piastra a 24 pozzetti. Vengono fatti alcuni lavaggi con semplice PBS a 5°C su tavolino oscillante. Per concludere, si montano i vetrini impiegando come mezzo di inclusione Confocal matrix. [82].

3.7.4. MICROSCOPIO CONFOCALE

Mediante questo protocollo sono stati preparati 5 campioni per i controlli e 6 campioni per i mutanti *Sph*. Ogni campione è stato osservato al microscopio confocale eccitando il BODIPY-FL C₅– Ceramide a 488nm e selezionando le fluorescenze nel verde (filtro 530/560).

Per ogni larva è stato analizzato il cervello e le fibre muscolari 6 e 7 del segmento 3 o di sinistra o di destra. In particolare, in primis è stato fotografato il cervello completo con un obiettivo 10x e successivamente, sono state fatti degli Z-stack lungo l’asse z con l’obiettivo 40x per tutto lo spessore completo dei singoli lobi e del ganglio ventrale. Infine, sono stati fatti degli Z-stack con obiettivo 60x delle fibre 6 e 7 del segmento tre.

Nel caso dell’impiego dell’obiettivo10x, sono state fatte delle singole foto con: Iris:1, Gain:30, Offset:-15, Velocità:25ips. Nel caso dell’impiego dell’obiettivo 40x, sono stati fatti degli Z-stack lungo l’asse Z con singoli piani di 1 µm con:Iris:1, Gain:30, Offset:-15, Velocità:25 ips. Infine, nel caso dell’impiego dell’obiettivo 60x ad olio, sono stati fatti degli Z-stack lungo l’asse Z con singole scansioni di 1 µm con:Iris:1, Gain:30, Offset:-15, Velocità: 25 ips e Zoom:2.

3.7.5. ANALISI DEL CERVELLO E DELLE FIBRE MUSCOLARI

Le foto ed i filmati così ottenuti sono state analizzati tramite il software ImageJ 1.35i.

3.8. COLORAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA CON ANTI-HRP

Gli studi immunocistochimici eseguiti in questo lavoro sono stati finalizzati alla caratterizzazione della giunzione neuromuscolare dei mutanti *Sph*. In primis, infatti, è stata fatta un'analisi della morfologia bidimensionale dell'intera giunzione neuromuscolare di mutanti *Sph*, considerando come riferimento la giunzione dei controlli Canton S. A tal fine, è stato impiegato l'anticorpo primario anti-HRP (Jackson Immunoresearch) specifico per l'intero sistema nervoso di *Drosophila melanogaster*. In realtà, questo anticorpo riconosce la perossidasi di rafano, ma è stato chiaramente dimostrato, anche se i motivi restano ancora oscuri, come sia anche un marcatore altamente specifico e molto efficace per l'intero sistema nervoso di *Drosophila melanogaster* [84]. Inoltre, questo anticorpo primario è direttamente coniugato alla molecola fluorescente Cianina 3 (Cy3) che ha assorbanza massima a 550nm ed

3.8.1. MATERIALE OCCORRENTE

- piastra 24 pozzetti;
- tavolino oscillante;
- vetrino portaoggetti (76×26mm);
- vetrino coprioggetti (24×40mm con indice di rifrazione 1);
- micropinzette.

3.8.2. SOLUZIONI

- PBS 0,05% (Triton allo 0,05% in PBS1X);
- PBS 0,03% (Triton allo 0,03% in PBS1X);
- PBSTA 0,1% (Triton allo 0,05%, BSA allo 0,1% in PBS1X);
- PBSTA 1% (Triton allo 0,05%, BSA al 1% in PBS1X);

- PFA 4% (PFA 4% in PBS 1X);
- Metilcellulosa 3% in PBS1X.

3.8.3. PROCEDURA

Dopo la dissezione, i *Body wall* ancora spillati vengono velocemente lavati con del PBS1X e fissati per 20 minuti a temperatura ambiente con PFA4%

Successivamente, le larve fissate vengono de spillate e trasferite in una piastra a 24 pozzetti. Vengono compiuti alcuni lavaggi da 15min con PBST 0,05% a 5°C e in agitazione su tavolino oscillante. I campioni vengono permeabilizzati mediante un incubazione di 30mn in PBST allo 0.3% sempre a 5°C su tavolino oscillante. Inoltre, sono state inattivate mediante incubazione con PBSTA1% per 1 ora, sempre a 5°C e in agitazione su tavolino oscillante.

Le larve così trattate vengono incubate *overnight* con l' anticorpo Cy3-anti-HRP (1:100) (primari in PBSTA 0,1 sempre a 5°C e in agitazione su tavolino oscillante al buio [85].

Infine, vengono fatti alcuni lavaggi da 15min l'uno in PBST' allo 0.05% sempre a 5°C e in agitazione su tavolino oscillante al buio. Le larve sono, poi, prelevate una alla volta e poste su un vetrino portaoggetti(76x26cm) su cui è stata posta una goccia di metilcellulosa 3%, coperte con un vetrino portaoggetti(24x40 con indice di rifrazione 1) e sigillate con dello smalto. I vetrini così preparati vengono posti in frigorifero per tutta la notte prima di poter essere osservati al microscopio confocale.

3.8.4. MICROSCOPIO CONFOCALE

Mediante questo protocollo sono stati preparate e analizzate 24 larve Canton S 23 larve *Spy*. Ogni campione è stato osservato al microscopio confocale impiegando un metodo specifico per le fluorescenze rosse, nel quale l'eccitazione del fluoroforo viene fatta ad una lunghezza d'onda di 543nm mediante un laser verde ad Elio-Neon e l'emissione rilevata grazie ad un apposito filtro che rileva tutte le fluorescenze da una lunghezza di 600nm in poi.

Il confocale è stato prima settato su dei campioni di controllo e tali impostazioni sono state mantenute per tutte le osservazioni. Per ogni campione sono state considerate le giunzioni localizzate sulle fibre 6 e 7 del segmento tre di sinistra e di destra. Ogni giunzione è stata analizzata con l'obiettivo 40x, facendo uno Z-stack lungo l'asse Z con singoli piani di 0,20 µm con: Iris:2, Gain:30, Offset:-15, Velocità:25 ips e con uno Zoom:1.5.

3.8.5. ANALISI MORFOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

I filmati così ottenuti sono stati analizzati tramite il software ImageJ 1.35i. In particolare, è stata creata la proiezione totale di ogni singolo filmato. Valutando la bontà delle proiezioni ottenute, sono state prese in considerazione per l'analisi morfologica solo le giunzioni migliori. Per questo motivo sono state selezionate 32 giunzioni per i controlli e 30 giunzioni per i mutanti *Sph*.

La prima analisi morfologica ha riguardato una valutazione del numero di bottoni presenti in ogni singola giunzione e la loro dimensione e forma. In particolare, mediante ImageJ, sono stati contati e dimensionati un totale di 5804 bottoni per le giunzioni di controllo e 3734 bottoni per le giunzioni *Sph* [86][87][88][89].

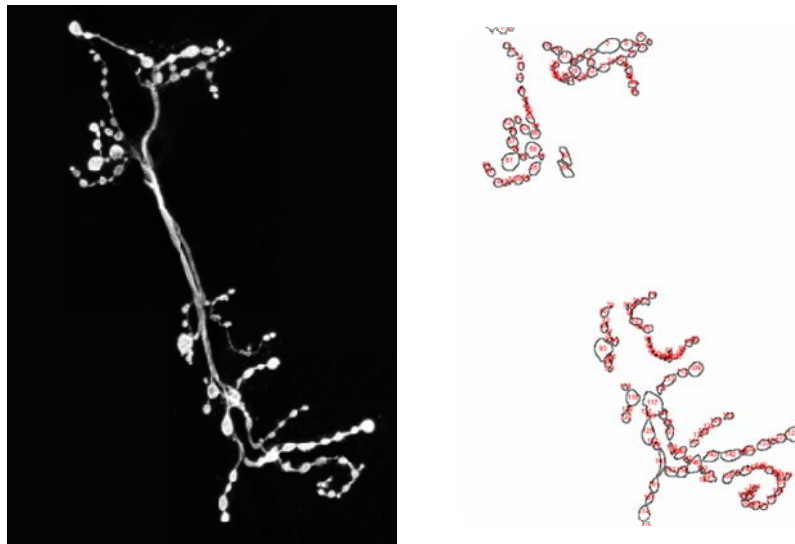


Figura 48 - Stima e dimensionamento dei bottoni presenti in una giunzione.

Elaborazione grafica del software ImageJ per stimare e dimensionare i bottoni presenti in una giunzione neuromuscolare.

La seconda analisi morfologica ha riguardato una caratterizzazione bidimensionale della giunzione stessa. Infatti, sempre tramite ImageJ, è stata calcolata la lunghezza e l'area totale delle singole giunzioni. Inoltre, è stato valutato lo sviluppo bidimensionale della giunzione d'interesse andando a valutare le sue ramificazioni. In particolare, è stato considerato come livello 0 o "assone" la porzione finale del nervo, che costituisce la base stessa della giunzione, dal quale dipartono le ramificazioni primarie. In base a ciò, tutte le ramificazioni successive sono state catalogate come secondarie, terziarie, quaternarie ecc. [90].

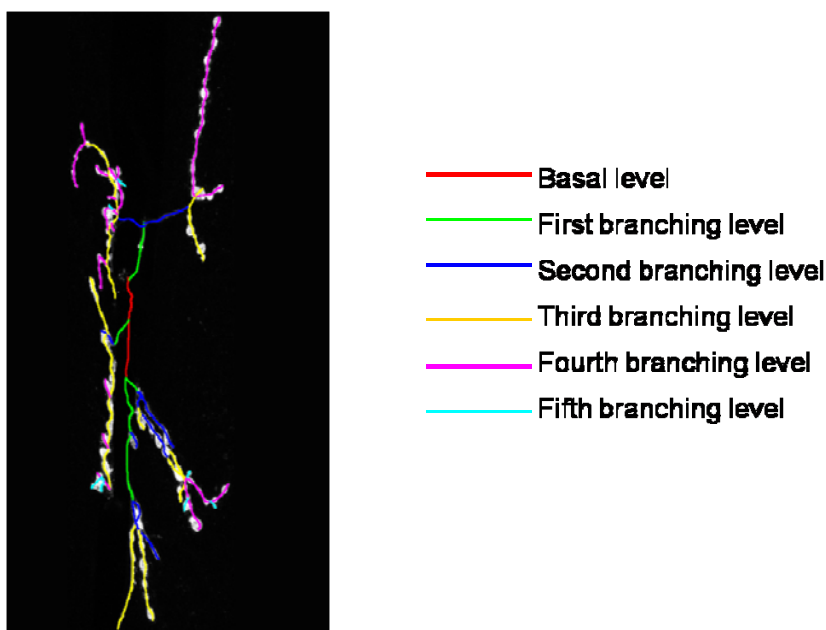


Figura 49 - Catalogazione ed dimensionamento delle singole ramificazioni presenti in una giunzione.

Elaborazione grafica del software ImageJ per la stima ed il dimensionamento delle diverse braccia presenti in una giunzione.

Per ogni singola giunzione è stata quindi catalogata e dimensionata ogni singola ramificazione. Infine, i dati morfologici di ogni giunzione sono stati rapportati a quelli delle altre giunzioni e sui dati totali è stata fatta un'analisi mediale e statistica.

3.9. COLORAZIONI IMMUNOISTOCHEMICHE STRUTTURALI

Gli studi immunohistochimici strutturali eseguiti in questo lavoro sono stati finalizzati alla caratterizzazione dei complessi pre- e post-sinaptici dei bottoni sinaptici presenti nella giunzione neuromuscolare dei mutanti *Sply*. In particolare, sono stati impiegati due diversi anticorpi contro la SINAPSINA e contro NC82 per evidenziare il complesso pre-sinaptico, ed un anticorpo contro il DLG per evidenziare il complesso post-sinaptico. Questi anticorpi sono primari monoclonali sintetizzati in topo (Developmental Studies Hybridoma Bank), specifici per le proteine Sinapsina, Nc82 e DLG di *Drosophila melanogaster*. Per poter visualizzare il legame degli anticorpi (α Sinapsina, α Nc82 e α DLG) è stato scelto un secondario (Goat-anti.mouse, Jackson Immunoresearch) coniugato alla Cianina 2 (Cy2), la quale assorbe a 492nm ed emette a 510nm.

E' stato inoltre utilizzato l'anticorpo anti HRP (Jackson Immunoresearch) capace riconoscere senza discriminazioni tutto il sistema nervoso.

3.9.1. MATERIALE OCCORRENTE

- piastra 24 pozzetti;
- tavolino oscillante;
- vetrino portaoggetti (76×26mm);
- vetrino coprioggetti (24×40mm con indice di rifrazione 1);
- micropinzette.

3.9.2. SOLUZIONI

- PBS 0,05% (Triton allo 0.05% in PBS1X)
- PBS 0,03% (Triton allo 0,03% in PBS1X)
- PBSTA 0,1% (triton allo 0,05%, BSA allo 0,1% in PBS1X)
- PFA 4% (PFA 4% in PBS 1X)
- Metilcellulosa 3% in PBS1X

3.9.3. PROCEDURA

Dopo la dissezione, i *Body wall* ancora spillati vengono velocemente lavati con del PBS1X e fissati per 20 minuti a temperatura ambiente con PFA4%

Successivamente, le larve fissate vengono de spillate e trasferite in una piastra a 24 pozzetti. Vengono compiuti alcuni lavaggi da 15min con PBST 0,05% a 5°C e in agitazione su tavolino oscillante. I campioni vengono permeabilizzati mediante un incubazione di 30mn in PBST allo 0.3% sempre a 5°C su tavolino oscillante. Infine, vengono bloccati mediante incubazione con PBSTA 1% per un ora, sempre a 5°C in agitazione su tavolino oscillante.

Le larve così trattate vengono incubate *overnight* con gli anticorpi primari d'interesse. In particolare, gli anticorpi primari sono diluiti in una soluzione di PBSTA 0,1%, a concentrazioni determinate: anti-Sinapsina (1:10), anti-DLG (1:50), anti-Nc82 (1:50), su tavolino oscillante 5°C [24][26][36][91][92].

Terminata l'incubazione, vengono fatti alcuni lavaggi da 15 min l'uno in PBST allo 0.05%. e successivamente incubate per 3ore con l'anticorpo secondario (1:50) e l'anti-HRP (1:100) in PBSTA 0,1% sempre su tavolino oscillante, a 5°C ed al buio.

Infine, vengono fatti alcuni lavaggi da 15min l'uno in PBST' allo 0.05%. Le larve sono, poi, prelevate una alla volta e poste su un vetrino portaoggetti (76x26cm) su cui è stata posta una goccia di metilcellulosa 3%, coperte con un vetrino portaoggetti (24x40 con indice di rifrazione 1) e sigillate con dello smalto. I vetrini così preparati vengono posti in frigorifero per tutta la notte prima di poter essere osservati al microscopio confocale.

3.9.4. MICROSCOPIO CONFOCALE

Mediante questo protocollo sono stati preparate e analizzate diversi campioni Canton S, *Sply* e 14A. Ogni campione è stato osservato al microscopio confocale impiegando un metodo specifico per evidenziare la presenza contemporanea di due differenti fluorofori. In particolare, il secondario Cy2-anti-mouse viene eccitato a 488nm e selezionate le fluorescenze nel verde (filtro 530/560). Sequenzialmente, viene eccitato l'anticorpo Cy3-anti-HRP a 543nm e selezionate le fluorescenze nel rosso (filtro 600/700).

Per ogni campione preparato sono state analizzate esclusivamente le giunzioni localizzate a livello delle fibre 6 e 7 dei segmenti due o tre. Da ogni campione sono state fotografate, tramite l'obiettivo 60x ad olio, 4 singole braccia primarie di differenti giunzioni. In particolare, ogni ramificazione primaria è ricostruita bidimensionalmente mediante uno Z-stack lungo l'asse Z con sezioni di 0,25 µm, con: Iris:1, Gain:30, Offset:-30, Velocità:25 ips e con uno Zoom:4. La ripresa è stata fatta con metodo sequenziale.

Per i diversi anticorpi primari considerati sono stati fatti un numero differente di campioni. Infatti, per l'anti-Sinapsina sono stati analizzati 6 campioni di controllo per un totale 24 braccia finali, 5 campioni *Sply* per un totale di 20 braccia finali e 5 14A per un totale di 20 braccia finali. Per l'anti-DLG sono stati analizzati 8 campioni di controllo per un totale 32 braccia finali, 5 campioni *Sply* per un totale di 20 braccia finali e 5 14A per un totale di 20 braccia finali. Infine, per l'anti-NC82 sono stati analizzati 10 campioni di controllo per un totale 40 braccia finali, 8 campioni *Sply* per un totale di 32 braccia finali e 5 14A per un totale di 20 braccia finali.

3.9.5. ANALISI STRUTTURALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

I filmati così ottenuti sono state analizzati tramite il software ImageJ1.35i. In particolare, è stata creata la proiezione totale di ogni singolo filmato nel canale del verde e nel canale del rosso. Le due proiezioni finali sono state sovrapposte per creare il *merge* e valutare l'effettiva struttura e sviluppo dei complessi pre- e post-sinaptici.

Inoltre, sono stati, casualmente, scelti alcuni bottoni delle differenti giunzioni ed in questi, mediante ImageJ, è stata valutata la specifica localizzazione, distribuzione ed intensità della fluorescenza dei due diversi anticorpi all'interno/esterno degli stessi.

Infine, per quanto riguarda tutte le porzioni giunzionali scansionate per l'anticorpo anti-Nc82, sono state campionate e dimensionate le singole zone attive presenti nei singoli bottoni sinaptici e rapportate ai bottoni stessi.

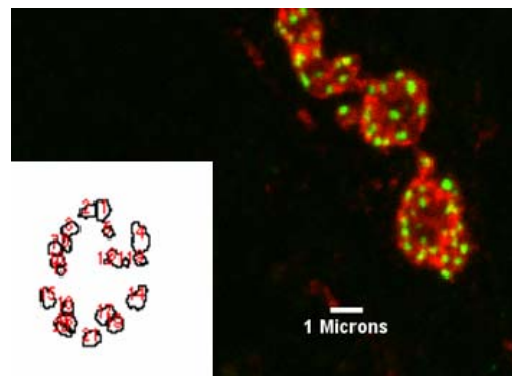


Figura 50 - Catalogazione ed il dimensionamento delle singole zone attive presenti in un singolo bottone.

Elaborazione grafica del software ImageJ per la stima e dimensionamento delle zone attive di un bottone.

3.10. METODO COLORIMETRICO CON FM1-43

FM1-43 Fix (Molecular Probes) è un colorante lipofilico che lega i lipidi delle membrane plasmatiche e dei bottoni sinaptici, indipendentemente dalla presenza del neurotrasmettitore all'interno delle vescicole o dalla sensibilità della cellula post-sinaptica. Fu scoperto da Betz e Bewick [93] e la metodologia fu adattata per le NMJ delle larve III stadio di *Drosophila melanogaster* da Ramaswami [94]. In questo studio viene utilizzata appunto questa procedura per studiare il ciclo vescicolare nelle NMJ dei muscoli 6-7 dei segmenti addominali A2-A3 della larva III stadio di *Drosophila melanogaster* (in wild type e mutanti *Sply*). Le giunzioni su questi muscoli sono infatti caratterizzate solo da bottoni di tipo I che, a differenza di quelli di tipo II e III (presenti nelle NMJ di altri muscoli), sono più grandi e rilasciano, come neurotrasmettitore, esclusivamente il glutammato. Queste caratteristiche rendono i bottoni, degli "indicatori" ottimali ai fini della valutazione del ciclo vescicolare che avviene al loro interno.

3.10.1. MATERIALE OCCORRENTE

- microscopio confocale;
- obiettivo 40x ad acqua.

3.10.2. SOLUZIONI:

- FM1-43 (4 μ M) in HL3B;
- HL3A;
- HL3B.

È una soluzione salina simile a HL3 tipo A. L'unica differenza con l'HL3 tipo B è che quest'ultimo contiene calcio che provoca la contrazione delle fibre muscolari.

E' composta di:

- CaCl₂, 1 mM;
- MgCl₂, 20 mM;
- KCl, 60 mM;
- NaCl, 15 mM;
- NaHCO₃, 10 mM;
- HEPES, 5 mM;
- Saccarosio, 115 mM;
- Trealosio-2H₂O, 5 mM.

3.10.3. PROCEDURA

La larva appena dissezionata, viene mantenuta spillata sulla petri, con il fondo di sylgard, immersa in HL3A. In questo modo i tessuti dell'apparato muscolare e l'intero sistema nervoso vengono mantenuti *in vivo*.

In primis, la larva viene incubata per 5 minuti con FM1-43 (4 μ M) in HL3B. Durante questo intervallo temporale, il potassio contenuto nella soluzione d'incubazione stimola l'attività sinaptica a livello dei bottoni sinaptici, determinando quindi eventi di endocitosi, che condurranno all'endocitosi del colorante all'interno dei terminali pre-sinaptici.

Finita l'incubazione, viene eseguito un ciclo di lavaggi con HL3A ed infine il campione viene immediatamente analizzato con microscopio confocale. Questa prima fase viene definita comunemente: FASE DI CARICO.

La fase successiva consiste nella valutazione diretta degli eventi conseguenti di esocitosi. Questa seconda fase viene definita comunemente: FASE DI SCARICO. In particolare, si incuba nuovamente il campione solo con HL3B, determinando quindi una nuova stimolazione sinaptica che si tradurrà in nuovi eventi di endocitosi e conseguenti eventi di esocitosi. Questa seconda fase di stimolazione sinaptica è stata eseguita a diversi intervalli temporali: a 1 minuto, 5 minuti e 10 minuti. In questo modo infatti è stato possibile seguire gli eventi di *recycling* vescicolare presenti in archi stimolatori brevi, medi e a medio-lungo termine. La valutazione del *recycling* vescicolare è resa possibile dal continuo turn-over del FM1-43 all'interno dei bottoni. Finita l'incubazione, viene eseguito un ciclo di lavaggi con HL3A ed infine il campione viene immediatamente analizzato con microscopio confocale [95][96][97].

L'intero protocollo sperimentale viene svolto in una stanza buia.

3.10.4. MICROSCOPIO CONFOCALE

Ogni singola larva è stata monitorata in vivo in ogni singola fase di questo protocollo sperimentale. In particolare è stato usato un metodo nel quale il colorante FM1-43 è stato eccitato 488nm e il suo segnale evidenziato da filtri capaci di selezionare le fluorescenze nel rosso (filtro 570/ 700).

In particolare, per ogni singola larva è stata monitorata esclusivamente la giunzione localizzata nelle fibre 6 e 7 del segmento 3 di sinistra o di destra. Per quanto riguarda l'esperimento con la fase di scarico lunga 1 minuto, sono stati filmati 8 larve Canton S e 12 larve *Sph*. Per l'esperimento con la fase di scarico lunga 5 minuti, sono stati filmati 10 larve Canton S e 10 larve *Sph*. Infine, per l'esperimento con la fase di scarico lunga 10 minuti, sono stati filmati 6 larve Canton S e 7 larve *Sph*.

Alla fine di ogni fase del protocollo sperimentale, la giunzione d'interesse è stata fotografata con: Iris:2, Gain:30, Offset:-15, Velocità:25 ips. La ripresa è stata fatta con metodo sequenziale tra controlli e mutanti.

3.10.5. ANALISI DEL *RECYCLING* VESCICOLARE

Il *recycling* vescicolare attivo nei diversi bottoni sinaptici che compongono ogni singola giunzione, può essere monitorato seguendo la localizzazione e la variazione del segnale fluorescente del FM1-43.

Per fare ciò, le foto delle singole giunzioni scattate durante le diverse fasi del protocollo sperimentale vengono visualizzate tramite ImageJ1.35i. Per ogni singola giunzione sono stati scelti ed analizzati 10 bottoni, i quali sono stati indagati sia alla fine della fase di carico, che alla fine della fase di scarico.

L'analisi del segnale del FM1-43 consiste nella valutazione dell'intensità della fluorescenza complessiva presente all'interno del bottone. In toto, sono stati analizzati per quanto riguarda l'esperimento con la fase di scarico lunga 1 minuto, 80 bottoni Canton S e 120 bottoni *Sply*. in ogni singola fase; per l'esperimento con la fase di scarico lunga 5 minuti, sono stati valutati 100 bottoni Canton S e 100 bottoni *Sply*. in ogni singola fase; ed infine, per l'esperimento con la fase di scarico lunga 10 minuti, sono stati analizzati 60 bottoni Canton S e 70 bottoni *Sply* in ogni singola fase. Nel complesso l'analisi della fluorescenza è stata fatta per un totale di 1100 bottoni.

Tramite questa analisi è stato possibile ottenere degli indici medi di Carico e Scarico per i controlli e per i mutanti ed valutare gli effettivi eventi di *recycling* vescicolare e correlate anomalie.

3.11. COLORAZIONE CON OIL RED O

Il colorante Oil Red O è un lisocromo comunemente impiegato per rendere direttamente visibili i grassi. Infatti, l'Oil Red O colora trigliceridi neutrali e lipidi in colture cellulari, su sezioni animali congelate o incluse in paraffina. Si presenta come una polvere rossa.

3.11.1. MATERIALE OCCORRENTE:

- piastra 24 pozzetti;
- tavolino oscillante;
- vetrino portaoggetti (76×26mm);
- vetrino coprioggetti (24×40mm con indice di rifrazione 1);
- micropinzette.

3.11.2. SOLUZIONI

- PFA 4% (PFA 4% in PBS1X);

- PBS 1X;
- ISOPROPANOLO;
- OIL RED O (0.5g in 100ml di Isopropanolo);
- Acqua Distillata;
- Confocal Matrix ® (Micro-tech-lab).

3.11.3.PROCEDURA

Dopo la dissezione, i *Body wall* ancora spillati vengono velocemente lavati con del PBS1X e fissati per 20 minuti a temperatura ambiente con PFA 4%

Terminata la fissazione, le larve fissate vengono despillate e trasferite in una piastra a 24 pozzetti. Vengono compiuti alcuni lavaggi con PBS1x a 5°C in agitazione su tavolino oscillante.

Successivamente vengono fatti alcuni lavaggi, sempre a 5°C ed in agitazione su tavolino oscillante, con Acqua distillata e diverse concentrazioni graduali di Isopropanolo. Infine, si incubano i campioni per 20 minuti con Oil Red O.

Questo colorante è stato precedentemente sciolto in una soluzione satura di Isopropanolo (0.5g in 100ml di Isopropanolo), successivamente diluita con 40 ml di acqua distillata. La soluzione così ottenuta è stata filtrata mediante una siringa sterile con filtro da 0,20 µm in modo da eliminare completamente piccoli accumuli di colorante non disciolti.

Infine, vengono fatti alcuni lavaggi con semplice acqua distillata a 5°C su tavolino oscillante. Per concludere, si montano i vetrini impiegando come mezzo di inclusione Confocal matrix [82][98].

3.11.4.MICROSCOPIO OTTICO

Mediante questo protocollo sono stati preparati 10 campioni per i controlli, 8 campioni per i mutanti *Spy*, 6 campioni per i revertanti 14A. Ogni campione è stato osservato al microscopio ottico composto Leica DMR nel visibile. In particolare, per ogni campione sono state fatte delle foto mediante la fotocamera Leica Dc 500del cervello con l'ausilio di obiettivi 20x e 40x.

3.11.5.ANALISI DEL CERVELLO

Le foto così ottenuti sono state analizzati tramite il software ImageJ1.35i.

3.12. ANALISI STRUTTURALE

Il microscopio elettronico permette di ottenere ingrandimenti di molto superiori al microscopio ottico e consente l'osservazione di sezioni sottili di tessuto

3.12.1.MATERIALE OCCORRENTE

- piastra 24 pozzetti;
- stampini per inclusione campioni;
- vetrino portaoggetti (76×26mm) ;
- pipette pasteur in vetro;
- micro pinzette;
- stufetta a 60°C;
- ultramicrotomo;
- micro seghette;
- bunsen;
- retini da microscopia elettronica;
- porta retini;
- lastre fotografiche Kodak®;
- trans illuminatore per lastre fotografiche;
- Scanner;
- Microscopio elettronico.

3.12.2. SOLUZIONI:

- Gluteraldeide 3% in Cacodilato Na pH7.25;
- Cacodilato 0,1% pH7,25 e saccarosio 4%;
- EtOH assoluto;
- EtOH 95% in acqua;
- EtOH 75%;

- EtOH 50%;
- Acetone;
- RESINA.

3.12.3. PROCEDURA

Il protocollo di preparazione dei campioni per la microscopia richiede diversi passaggi: 1. dissezione, 2. fissazione, 3. disidratazione, 4. infiltrazione, 5. inclusione, 6. taglio, 7. colorazione. Tale procedura richiede un arco di tempo di circa una settimana per essere portata a termine.

Dopo aver dissezionato la larva, come precedentemente descritto, questa viene subito fissata in glutaraldeide 3% per circa un'ora. La fissazione ha il compito di mantenere inalterate, per quanto possibile, le caratteristiche strutturali del campione. La glutaraldeide fissa bene le strutture proteiche ma per preservare le strutture lipidiche ed in particolare le membrane, è necessario effettuare una seconda fissazione, o post-fissazione, usando il tetrossido di osmio, un colorante lipidico altamente tossico che penetra molto più lentamente rispetto alla glutaraldeide. Entrambi i fissativi utilizzati sono stati diluiti in un tampone cacodilato, necessario affinché non ci siano diversità di pH fra il tessuto e la soluzione fissativa.

A questo punto il campione viene disidratato mediante lavaggi seriali con soluzioni di etanolo presente in concentrazioni via via crescenti. Completata la disidratazione l'acqua contenuta nel campione è stata totalmente eliminata e sostituita dal solvente.

Successivamente, durante la fase di infiltrazione, il solvente di disidratazione viene sostituito da acetone, un solvente delle resine. L'acetone viene lasciato agire per circa mezz'ora, terminata la quale il campione viene prima trasferito in una soluzione 1:1 acetone-resina per un'ora ed infine posto in resina pura. Generalmente si utilizzano resine epossidiche che polimerizzano a 60°C.

Il campione viene quindi prelevato dalla resina e posto all'interno di apposite formelle poste in stufetta a 48°C e lasciate a indurire per due giorni.

Una volta ottenuto il campione incluso in resina, con una lama di vetro affilata si procede con l'eliminare la resina in eccesso per creare una piramide più adatta al taglio all'ultramicrotomo.

La fase di taglio all'ultramicrotomo prevede l'utilizzo di una lama di vetro necessaria a produrre fettine dello spessore di 1µm. Si pongono le fettine tagliate su un vetrino portaoggetti, immerse in una goccia d'acqua che viene fatta evaporare sopra la fiamma del bunsen. Dopodiché si colora a caldo con il blu di toluidina ed il campione è pronto per

l'osservazione al microscopio ottico. Tale passaggio è utile per individuare il livello desiderato da osservare al microscopio elettronico.

Una volta stabilita la sezione esatta della larva da esaminare si procede col preparare le fettine più sottili, dello spessore di 80-90nm, per l'osservazione al microscopio elettronico. Si inserisce quindi nell'ultramicrotomo (ULTRATOME III LKB) la lama di diamante (DIATOME) annessa ad una vaschetta riempita d'acqua in cui confluisce la serie di fettine tagliate. Osservandole al binoculare dell'ultramicrotomo è possibile selezionare quelle aventi lo spessore desiderato in quanto appaiono di colore dorato.

Le si raccolgono nei retini che vengono fatti asciugare e poi colorati con coloranti a base di sali di metalli pesanti: il citrato di piombo e l'acetato di uranile.

I campioni sono così pronti per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione TEM (Tecnai G 12 Fei Company).

Data la possibilità che offre il TEM di imprimere le immagini osservate su di una lastra fotografica, si sono fatte diverse "foto" delle strutture di maggior interesse.

Lo sviluppo delle lastre (Kodak electron image film SO-163) avviene all'interno di una camera oscura; vengono disposte ben distanziate le une dalle altre su un rack per fotografie e immerse in sequenza in quattro soluzioni.

I passaggi sono:

- sviluppo in soluzione basica (Kodak D19) per un tempo che va da 2,5 a 5 minuti;
- bloccaggio in acqua per 30 secondi;
- fissaggio 1 in soluzione acida (AGEFIX) per 5 minuti;
- fissaggio 2 in soluzione acida (AGEFIX) per 5 minuti;
- lavaggio sotto acqua corrente per 15 minuti.

Al termine di queste operazioni si mettono le lastre ad asciugare per 90 minuti a 20°C.

Una volta asciutte sono pronte per essere acquisite al computer mediante il programma COREL PHOTO PAINT X3 V.3.60.

Questo ha il vantaggio di rendere l'immagine in positivo e quindi dà la possibilità di visualizzare l'esatta colorazione elettrondensa delle strutture osservate al microscopio.

3.12.4. MICROSCOPIO ELETTRONICO

Il microscopio elettronico a trasmissione fornisce informazioni circa la struttura interna del campione analizzato. Nel nostro caso è stato impiegato Tecnai G 12 Fei Company.

Il fascio elettronico è prodotto da un filamento di tungsteno riscaldato, situato nella parte alta della colonna sotto vuoto; tale fascio viene accelerato verso il basso della colonna tramite alto voltaggio (75-120 KV) e condensato da lenti elettromagnetiche.

In particolare, sono stati preparati ed analizzati 3 campioni per i controlli e 3 campioni per i mutanti *Sply*. L'attenzione è stata focalizzata nella porzione superiore di ogni larva preparata, andando ad indagare soprattutto l'ultrastruttura delle fibre muscolari 6 e 7 dei segmenti 2 e 3, dei bottoni sinaptici e del cervello.

3.12.5. ANALISI DEL CERVELLO E DELLE FIBRE MUSCOLARI

Le lastre fotografiche sono state acquisite al computer mediante il programma COREL PHOTO PAINT X3 V.3.60.

Questo ha il vantaggio di rendere l'immagine in positivo e quindi dà la possibilità di visualizzare l'esatta colorazione elettrondensa delle strutture osservate al microscopio.

Infine, una volta digitalizzate le foto sono state analizzati tramite il software ImageJ1.35i

3.13. ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica per tutti i differenti protocolli impiegati è stata fatta mediante un t-test con $p=0,05$.

4. RISULTATI

Nel lavoro svolto da Harris [68] ed i suoi collaboratori, si è caratterizzato il mutante *Sphy* principalmente durante lo stadio adulto e non vi è alcuna informazione riguardante lo stadio larvale. Per questo motivo, in questo lavoro, si è cercato di qualificare e descrivere il fenotipo *Sphy* nella fase larvale.

Una prima valutazione di *Sphy* durante lo stadio larvale, si è basata su studi comportamentali atti alla comprensione delle sue capacità motorie. Infatti, si è dimostrato come larve *Sphy* siano caratterizzate da una ridotta capacità locomotoria (Laboratorio Zordan: dati non pubblicati).

4.1. APPARATO MUSCOLARE

In considerazione di questi dati preliminari, riguardanti la ridotta capacità locomotoria delle larve mutanti, è stato necessario cercare di evidenziare possibili anomalie o danni o a carico dell'intero apparato muscolare, o a carico di singole fibre muscolari specifiche.

4.1.1. ANALISI DELLA MORFOLOGIA MUSCOLARE

Una prima analisi in questa direzione è stata eseguita mediante la colorazione dell'intero apparato muscolare con il colorante Rodamina-Falloidina. La Falloidina è una tossina prodotta dal fungo *Amanita phalloides*, capace di riconoscere e legarsi ai filamenti di F-actina che compongono l'ultrastruttura del sarcomero. Il legame di questa tossina con un fluoroforo quale la Rodamina permette di evidenziarne la localizzazione.

4.1.1.1. Analisi dell'apparato muscolare

Il composto Rodamina-Falloidina permette di osservare al microscopio ottico o confocale, mediante la fluorescenza emessa dopo eccitazione con raggi UV, tutte le fibre muscolari che compongono una larva. In questo modo, è possibile, analizzare l'intero apparato muscolare larvale, utilizzando bassi ingrandimenti.

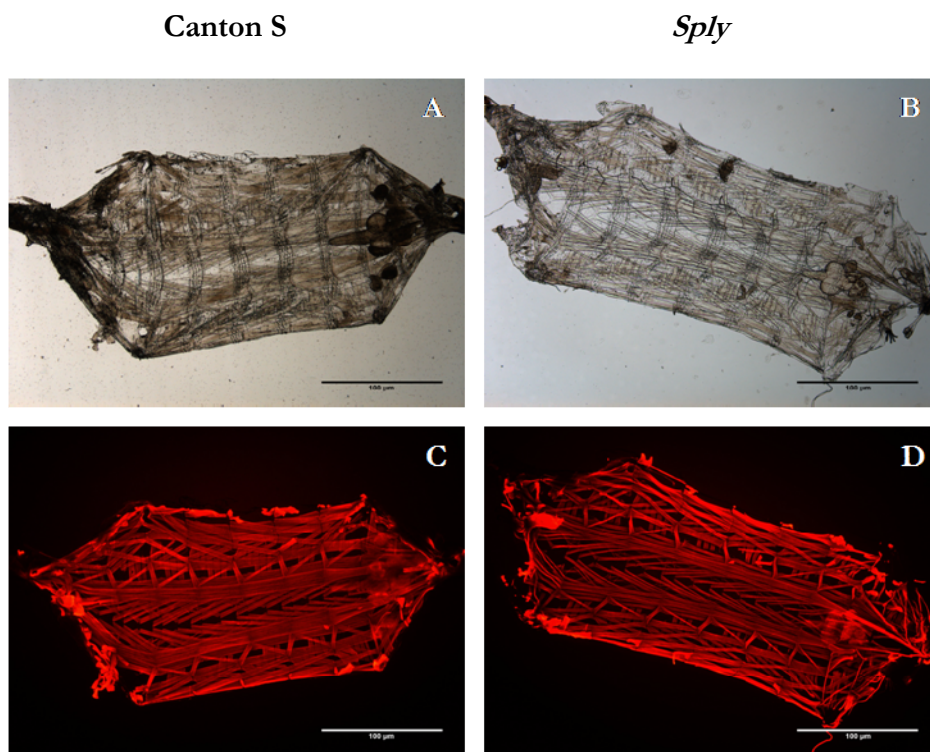


Figura 51 - *Body wall* con Rodamina-Falloidina.

Nella foto A è riportata una larva di controllo trattata con Rodamina-Falloidina vista a luce polarizzata. Nella foto C, la medesima larva è vista in fluorescenza rossa in cui è in evidenza la colorazione con Rodamina-Falloidina. Nella foto B, una larva *Sply* vista a luce polarizzata. Nella foto D, la medesima larva è vista mediante raggi UV. I due preparati sono molto simili tra loro. L'apparato muscolare della larva *Sply* non evidenzia alcuna alterazione o danno.

La colorazione non ha evidenziato alcun tipo di alterazione o danno a carico dell'intero apparato muscolare. Infatti, questo è completo e morfologicamente normale, in quanto tutte le fibre muscolari, che lo compongono, sono presenti (Figura 51).

4.1.1.2. Analisi dei segmenti muscolari

La ridotta capacità locomotoria delle larve *Sply* potrebbe però essere causata da particolari modificazioni morfologiche a carico della struttura delle singole fibre muscolari. Per questo, è stata analizzata la struttura bidimensionale delle fibre 6 e 7 dei segmenti 2 e 3 di larve mutanti e larve di controllo. Nel dettaglio, è stata valutata la lunghezza di ogni singolo segmento considerato (e quindi la lunghezza delle fibre 6 e 7 che lo compongono), la larghezza totale del segmento e la larghezza delle singole fibre (Figura 52).

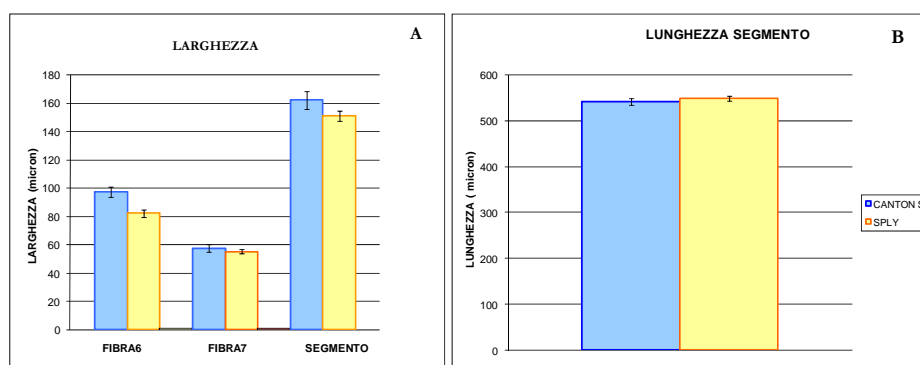


Figura 52 - Valori medi delle larghezze e delle lunghezze.

Nel grafico A sono riportati i valori medi per le larghezze calcolate per le singole fibre 6 e 7 e per la larghezza totale dei segmenti. Fibra6, CS=97±4 con n=24; Sph =82±3 con n=32; Fibra7, CS=57±3 con n=24; Sph =55±2 con n=32. Segmento, CS=162±6 con n=24; Sph =150±3 con n=32. Per tutte le misurazioni è stato fatto un t-test con $p \leq 0,05$. Non vi sono differenze significative. (Fibra6: $p=0,02$. Fibra7: $p=0,4$. Segmento: $p=0,11$). Nel grafico B sono riportati i valori medi per le lunghezze dei diversi segmenti. CS=541±7 con n=24; Sph =548±6 con n=32. Per tutte le misurazioni è stato fatto un t-test con $p \leq 0,05$. Non vi sono differenze significative. ($p=0,48$).

La valutazione delle singole larghezze per le fibre 6 e 7 dei segmenti 2 e 3 non riscontra alcuna significativa differenza. Lo stesso risultato è stato individuato per la valutazione della lunghezza totale dei diversi segmenti considerati.

Infine, è stato calcolato, come indice morfologico, il rapporto tra larghezza e lunghezza del singolo segmento. In questo modo è possibile evidenziare facilmente delle alterazioni morfologiche bidimensionali a carico delle fibre 6 e 7 (Figura 53).

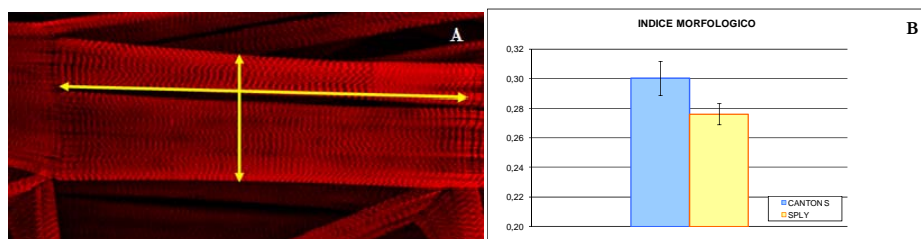


Figura 53 - Indice Morfologico

Nella figura A sono presentate due fibre 6 e 7 di un segmento 2 di sinistra di una larva di controllo con evidenziato i parametri di valutazione larghezza-lunghezza. Nel grafico B è riportato il valore medio dell'indice morfologico dato dal rapporto dei singoli valori di larghezza e lunghezza del segmento. CS=0,3±0,01 con n=24; Sph =0,27±0,007 con n=32. t-test con $p \leq 0,05$. Non vi sono differenze significative. ($p=0,08$).

L'indice morfologico calcolato per i controlli e per i mutanti *Sply* è molto simile. Infatti, l'analisi statistica non individua alcuna differenza statistica significativa. In base a questi dati morfologici preliminari, le larve mutanti sembrano essere caratterizzate da un apparato muscolare intatto, composto da fibre muscolari morfologicamente comparabili a quelle delle larve controllo. Infatti, non sono state riscontrate alterazioni in termini di lunghezza o larghezza. La struttura bidimensionale delle fibre muscolari *Sply* rientra quindi all'interno dei parametri di controllo.

4.1.1.3. Analisi delle singole fibre muscolari

La colorazione con Rodamina-Falloidina, permette, inoltre, una valutazione della struttura dell'apparato contrattile che costituisce la fibra muscolare stessa. Infatti, mediante l'analisi del segnale fluorescente della Rodamina, è stato possibile stimare la lunghezza dei diversi sarcomeri che compongono l'apparato contrattile stesso (Figura 54).

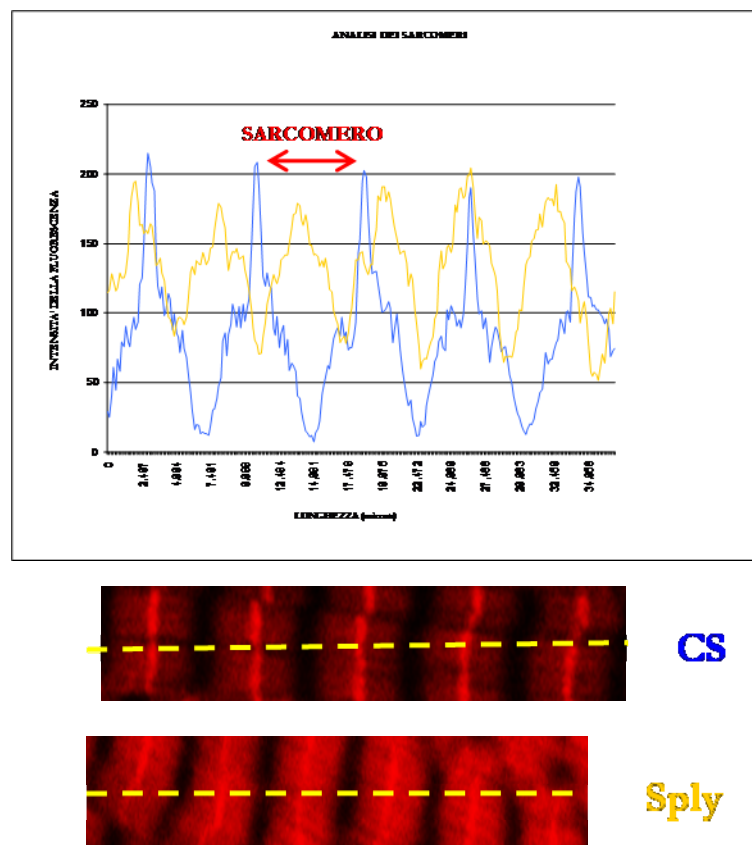


Figura 54 - Analisi della lunghezza dei singoli sarcomeri.

Sono stati considerati otto sarcomeri consecutivi e lungo la loro linea mediana è stata valutata la distribuzione delle fluorescenza in termini di intensità in rapporto alla distanza in micron. I picchi d'intensità maggiore corrispondono alle linee Z.

In particolare, si è visto che il segnale della Rodamina è estremamente intenso a livello della Linea Z, come è visibile dalla Figura 54. Mediante l'ausilio del software ImageJ, è stata calcolata la grandezza di 8 sarcomeri consecutivi dello stesso muscolo, considerando la distanza in μm tra i diversi picchi di fluorescenza (Figura 55).

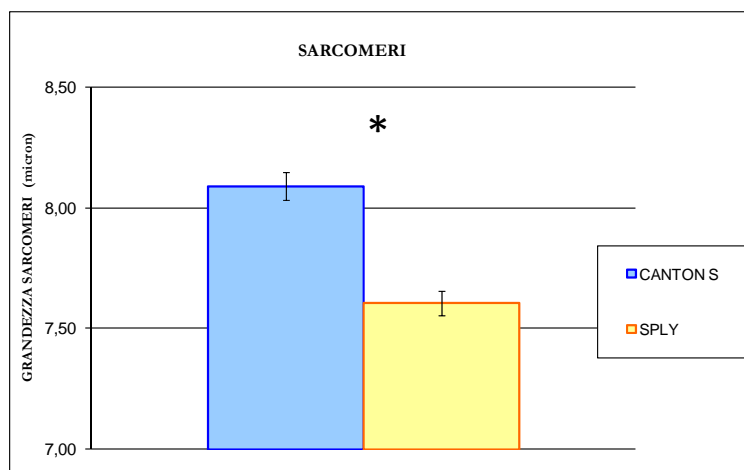


Figura 55 - Grandezza media dei sarcomeri.

Nel grafico sono riportati i valori medi calcolati per le lunghezze dei sarcomeri. CS= $8 \pm 0,06$ con $n=333$; *Sply*= $7,7 \pm 0,05$ con $n=380$. Per tutte le misurazioni è stato fatto un t-test con $p \leq 0,05$, il quale indica una differenza significativa tra controlli e mutanti ($p=3,5E-10$).

L'analisi, delle lunghezze dei diversi sarcomeri, ha evidenziato significative anomalie in termini di grandezza dei sarcomeri tra controlli e mutanti. Infatti, i sarcomeri *Sply* considerati sono, in termini dimensionali, significativamente più corti dei sarcomeri Canton S (Figura 55).

In base ai dati ottenuti mediante l'utilizzo della colorazione con Rodamina-Falloidina, i mutanti *Sply* sembrano non presentare particolari anomalie a carico dell'intero apparato muscolare ed a carico delle singole fibre. Queste infatti appaiono, in base bidimensionale, perfettamente normali. Specifiche alterazioni sono state riscontrate invece a carico dei sarcomeri che compongono le fibre stesse. Precisamente, i sarcomeri *Sply* sono di dimensioni inferiori rispetto ai sarcomeri di controllo. Inoltre, questa modificazione dimensionale dei sarcomeri risulta particolarmente interessante in quanto è completamente mascherata o invisibile alla valutazione morfologica complessiva della fibra intera. Questa interazione potrebbe essere spiegata da un aumento, all'interno della fibra, del numero di sarcomeri, aumento che la renderebbe inalterata dal punto di vista macroscopico.

4.1.2. ANALISI DELLO STATUS MITOCONDRIALE

La colorazione con Rodamina-Falloidina ha evidenziato esclusivamente delle anomalie a carico della grandezza dei sarcomeri. La presenza, nelle fibre muscolari *Sph*, di sarcomeri, di dimensioni inferiori ma presenti probabilmente in numero maggiore, sembra non poter essere l'unica ed esclusiva causa della ridotta capacità locomotoria dei mutanti *Sph*.

Infatti, questa ridotta motilità potrebbe essere espressione di un ridotto apporto nutrizionale al tessuto muscolare, determinato da alterazioni a carico dei mitocondri. Di fatto, questi organelli sono responsabili dell'apporto energetico delle singole cellule, e conseguentemente degli interi tessuti. Risulta evidente, quindi, come danni a carico dei mitocondri siano molto più evidenti in tessuti quali quello muscolare e nervoso, che per vivere e funzionare correttamente richiedono un dispendio energetico notevole.

Inoltre, i mitocondri sono formati principalmente da membrane, le quali dipendono, come tutte le membrane biologiche, in termini di composizione e di conformazione dagli sfingolipidi. Una presenza massiccia o una completa assenza di questi particolari lipidi a livello delle membrane mitocondriali potrebbe avere degli effetti rilevanti.

In base a queste considerazioni preliminari, è stato necessario cercare di evidenziare possibili anomalie o danneggiamenti a carico dei mitocondri stessi. In tale ottica, si è ricorsi all'impiego di specifiche sonde fluorescenti, metodo che permette di valutare e monitorare il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), grazie all'accumulo a livello della matrice mitocondriale delle sonde stesse. In particolare, variazioni del potenziale di membrana mitocondriale possono essere osservate grazie a cambiamenti a carico dell'intensità della fluorescenza della sonda o dal suo rilascio nello spazio perimitocondriale.

In questo caso, è stata utilizzata la sonda fluorescente TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester), la quale si accumula all'interno della matrice dei mitocondri polarizzati. L'azione del protonoforo FCCP, il quale aggiunto successivamente al preparato, determina dei piccoli cambiamenti del potenziale di membrana mitocondriale, evidenziabili dal rilascio graduale, da parte del mitocondrio stesso, della sonda TMRM. Inoltre, è possibile valutare esclusivamente le variazioni del potenziale di membrana, e quindi dello status strutturale delle membrane mitocondriali, andando a bloccare completamente l'ATP sintasi, la quale, è stato dimostrato, in condizioni di anomalie strutturali, opera in modo inverso, concorrendo così direttamente al mantenimento del potenziale di membrana. Tale azione di inibizione completa dell'ATP sintasi viene ottenuta tramite l'impiego dell'antibiotico Oligomicina.

Questo protocollo sperimentale è stato testato sequenzialmente su larve di controllo e su larve mutanti. Per ogni campione, sono state monitorate le fibre 6 e 7 del

segmento 3 di destra ed osservata la variazione del segnale della sonda per tutta la durata dell'esperimento.

Al termine del periodo d'incubazione previsto, la sonda TMRM è stata completamente internalizzata dai mitocondri presenti nella fibra muscolare osservata, rendendoli chiaramente visibili. In particolare, analizzando i mitocondri localizzati all'interno della fibra, si nota come questi si dispongano in modo estremamente ordinato ai lati della linea Z, rendendola così perfettamente individuabile. Al contrario, i mitocondri, presenti sulla superficie esterna della fibra, sembrano distribuirsi in modo omogeneo lungo la stessa, seguendo probabilmente la struttura del sarcolemma. Confrontando le fibre delle due tipologie di animali, si nota chiaramente come non vi siano differenze né per quanto riguarda l'intensità, né la distribuzione della fluorescenza (Figura 56-A,B; Figura 57-A,B).

L'azione d'inibizione completa dell'ATP sintasi mediante l'impiego dell'Oligomicina non è direttamente visibile, poiché il segnale della sonda TMRM permane inalterato in termini di intensità e di localizzazione all'intero dei mitocondri. La presenza e l'attività di questo antibiotico non è quindi rilevabile. Infatti, la situazione all'interno della fibra sembra rimanere inalterata (Figura 56-C, D; Figura 57-C, D).

Infine, l'aggiunta del protonforo FCCP causa, come previsto, piccoli cambiamenti a carico del potenziale di membrana mitocondriale. Queste variazioni sono direttamente rilevabili, in quanto, corrispondono ad un rilascio graduale e molto lento della sonda TMRM da parte dei mitocondri stessi. Con il passare del tempo, il protonforo FCCP viene completamente internalizzato dai mitocondri e contemporaneamente, la sonda TMRM viene totalmente liberata nello spazio perimitocondriale (Figura 56-E, F).

L'avvento e lo svolgimento di questo processo sono stati osservati sia nei controlli che nei mutanti *Sph*. Infatti, nel complesso, il processo di rilascio della sonda TMRM sembra essere molto simile tra controlli e mutanti. Terminato però completamente il rilascio della sonda, le fibre *Sph*, contrariamente a quelle di controllo, permangono fluorescenti.

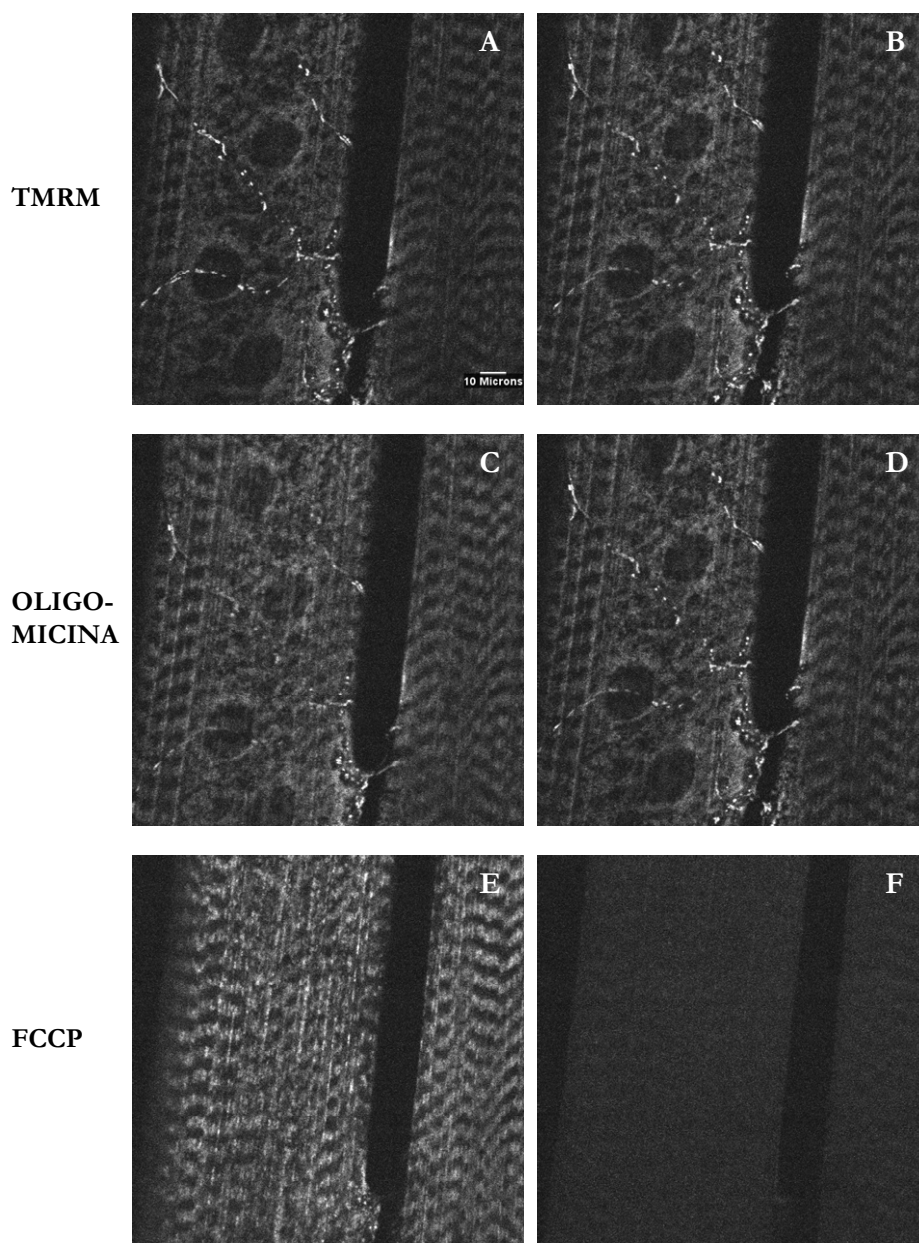


Figura 56 - Analisi status mitocondriale in fibre Canton S.

In figura sono riportate sezioni di fibra muscolare durante le varie fasi del protocollo sperimentale. In figura .A e B inizio e fine della fase TMRM. In figura C e D inizio e fine della fase con Oligomicina. In figura .E e F inizio e fine della fase con FCCP.

Sembra, infatti, che queste non liberino la sonda TMRM nello spazio circostante, ma al contrario, la trattengano al loro interno, ridistribuendola. In base a questo nuovo meccanismo, le fibre acquistano una nuova fluorescenza basale diffusa omogeneamente in tutta la fibra, caratterizzata però da particolari accumuli molto intensi di forma circolare (Figura 57-E, F).

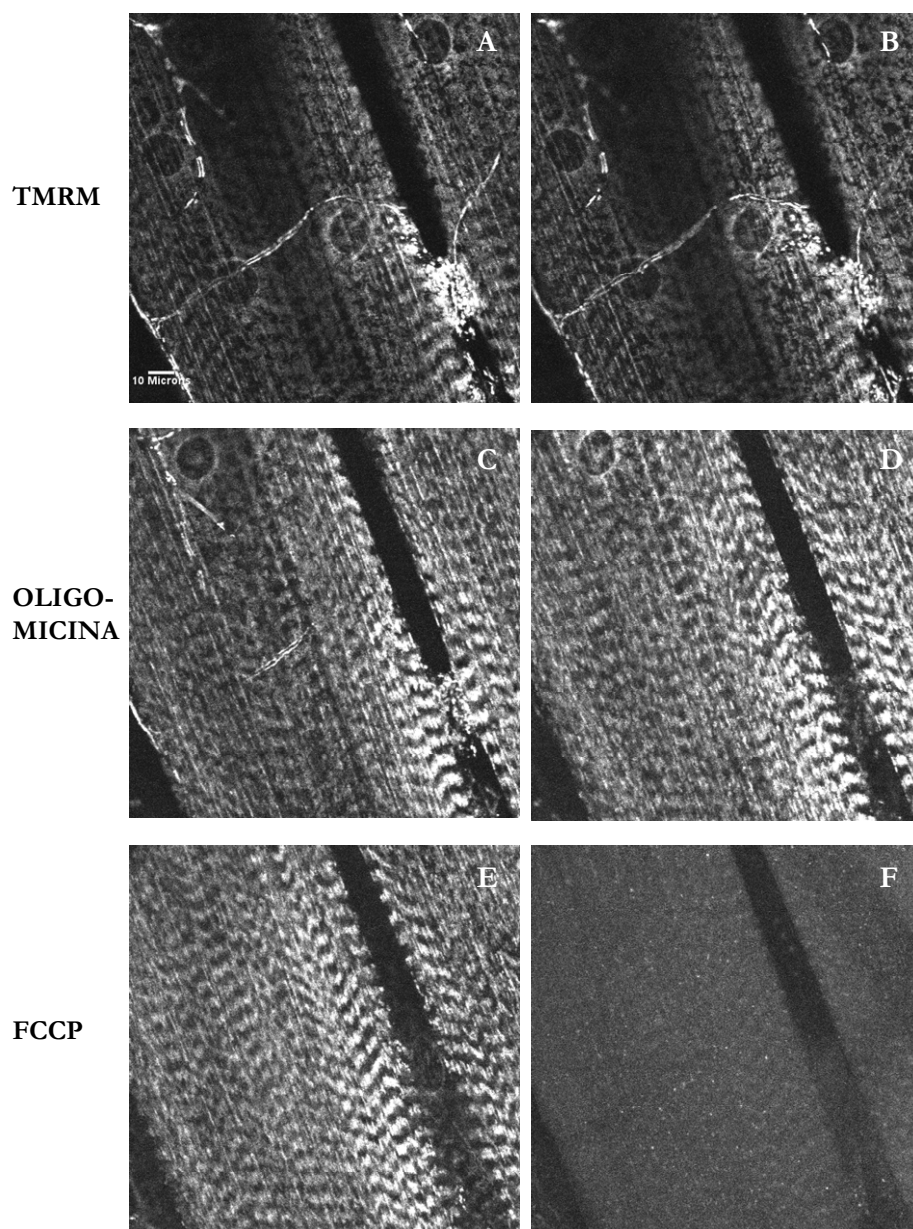


Figura 57 - Analisi status mitocondriale in fibre *Sply*.

In figura sono riportate sezioni di fibra muscolare durante le varie fasi del protocollo sperimentale. In figura .A e B inizio e fine della fase TMRM. In figura .C e D inizio e fine della fase con Oligomicina. In figura .E e F inizio e fine della fase con FCCP.

Inoltre, il segnale fluorescente della sonda TMRM è stato monitorato e valutato per l'intero arco temporale del processo, considerando le variazioni del segnale stesso in termini di cambiamenti di intensità della fluorescenza.

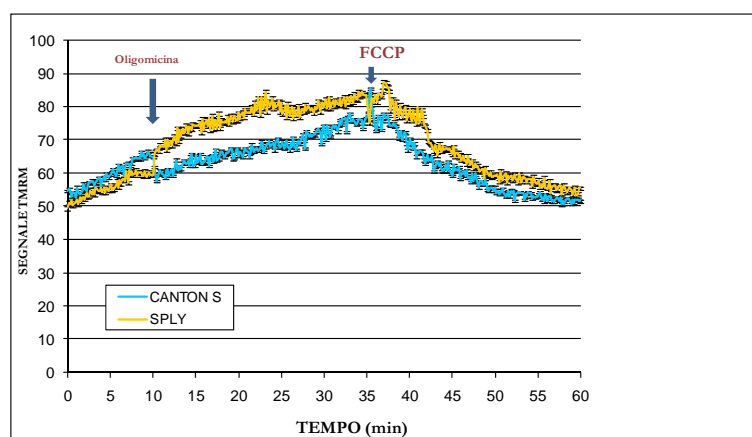


Figura 58 - Analisi segnale TMRM.

In questo grafico è riportata la variazione in termini di intensità del segnale fluorescente della sonda TMRM durante l'arco temporale totale del protocollo sperimentale. Le variazioni per i controlli e per i mutanti sono state sottoposte ad un t-test. Non è emersa una differenza statistica significativa ($p \geq 0,05$).

L'analisi dei valori di intensità della fluorescenza conduce a dati che collimano perfettamente con ciò che era stato osservato visivamente. Infatti, confrontando tali dati non sono emerse particolari e significative differenze (Figura 58).

Considerando i dati ottenuti da questo protocollo sperimentale *in vivo*, non risultano alterazioni strutturali a carico dei mitocondri dei mutanti *Sply*. Infatti, questa tipologia di protocollo sperimentale può dare esclusivamente informazioni riguardanti la struttura dei mitocondri, ovvero una valutazione sull'integrità delle membrane mitocondriali. La similarità tra le variazioni di segnale dei mutanti e dei controlli, è chiaramente espressione di uno status mitocondriale strutturale perfettamente nella norma.

Inoltre, il mancato rilascio del TMRM all'esterno della fibra ed il suo conseguente trattenimento all'interno della stessa, con il successivo accumulo in specifici loci, propone una nuova visione della struttura della fibra muscolare stessa, ovvero la possibilità di accumuli lipidici in essa. Infatti, questi *spots* estremamente fluorescenti potrebbero, in realtà, corrispondere a degli ammassi lipidici presenti sulla superficie della fibra, che fungerebbero da secondo polo attrattivo per la sonda TMRM, in quanto molecola lipofila. In base alla localizzazione finale del TMRM, non è possibile però determinare se vi siano effettivi accumuli ed ove questi siano effettivamente localizzati, se all'interno o sulla superficie della fibra.

4.1.3. COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE

L'analisi del potenziale di membrana mitocondriale non ha rilevato alterazioni a carico dei mitocondri, ma ha evidenziato la possibile presenza nelle fibre muscolari di accumuli lipidici. Questo metodo *in vivo* non permette però né di dimostrare l'effettiva presenza di questi ammassi, né la loro corretta localizzazione nella fibra, né la loro composizione.

L'utilizzo del composto BODIPY-FL C₅ -Ceramide potrebbe confermare o confutare la presenza di questi accumuli lipidici e rispondere ai quesiti di localizzazione e composizione. Infatti, il fluoroforo BODIPY permette di evidenziare gli ammassamenti di ceramide e di altri lipidi simili a livello delle membrane cellulari e all'interno di strutture più complesse.

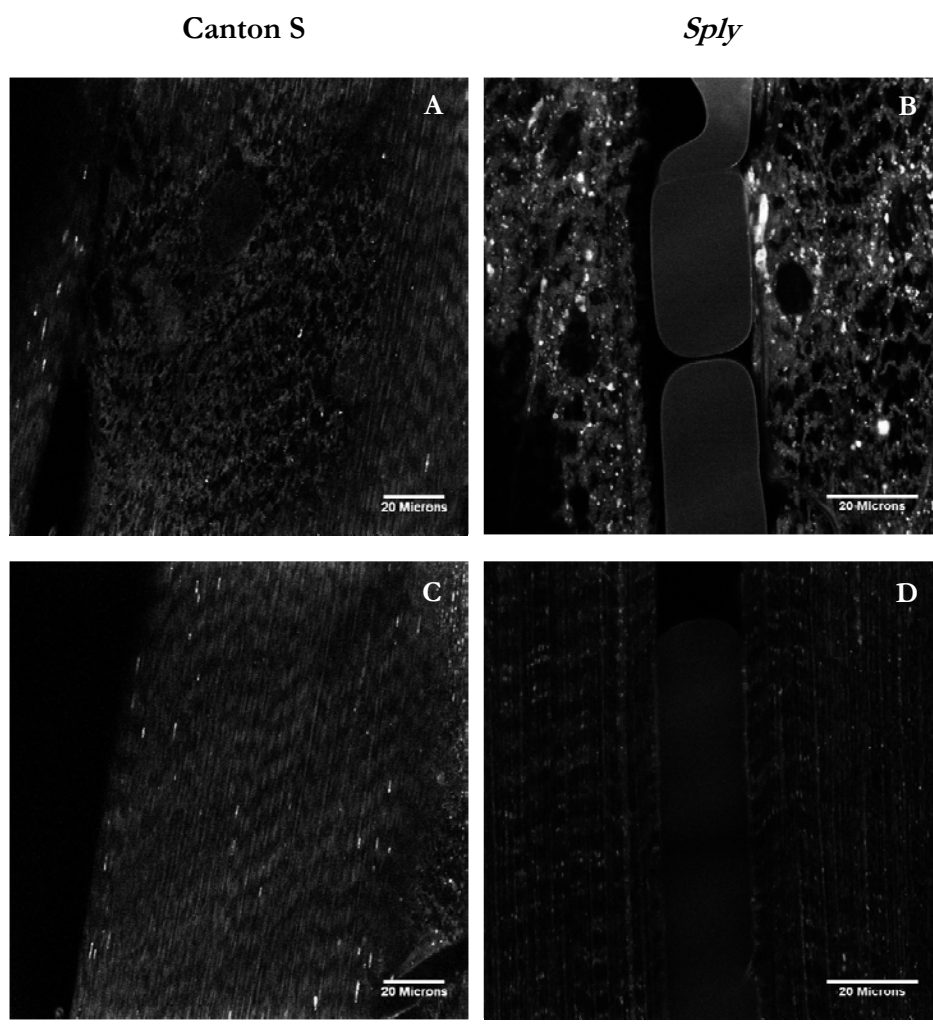


Figura 59 - Colorazione con BODIPY-FL C₅ - Ceramide.

In figura sono riportate sezioni di fibra muscolare dopo trattamento con BODIPY-FL C₅ -Ceramide. In figura A e C sono riportate due sezioni (superficiale ed interna) di una fibra di controllo. In figura B e D sono riportate due sezioni di una fibra *Sply*.

La colorazione con BODIPY-FL C₅ – Ceramide ha evidenziato, nelle fibre di controllo, una presenza di ceramide molto esigua ma estremamente organizzata in termini di localizzazione. Infatti, le fibre dei controlli Canton S sono caratterizzate da un segnale fluorescente della ceramide marcata estremamente debole seppur chiaramente presente. In particolare, questa, nelle zone superficiali della fibra, sembra localizzarsi a livello del sarcolemma, con una distribuzione specifica (Figura 59-A). Nella zona centrale della fibra, ove si trova l'apparato contrattile in sé, il segnale fluorescente della ceramide è notevolmente ridotto e leggermente visibile a livello delle linee Z. Inoltre, si notano dei piccoli *spots* luminosi intercalanti delle linee Z (Figura 59-C).

Nei mutanti *Sply*, la colorazione risulta estremamente più marcata e discernibile, soprattutto nella porzione superiore dorsale della fibra. A questo livello, infatti, è chiaramente visibile la struttura del sarcolemma con specifici accumuli di ceramide marcata di diverse dimensioni e forma, localizzati lungo il sarcolemma stesso e soprattutto nelle zone perinucleari. Il segnale fluorescente è in questo caso molto intenso (Figura 59-B). Come riscontrato nei controlli, il segnale del marcatore si riduce notevolmente nella porzione centrale della fibra. Infatti, anche nei mutanti *Sply*, nella porzione centrale, la ceramide marcata è caratterizzata da un segnale debole e si distribuisce lungo le linee Z con alcuni cumuli molto ridotti (Figura 59-D).

Questa metodica *in vivo* ha permesso quindi di confermare la presenza di accumuli lipidici nelle fibre muscolari dei mutanti *Sply*. Infatti, il composto BODIPY-FL C₅ – Ceramide ha evidenziato, nelle fibre muscolari mutanti, quello che pensiamo possano essere accumuli lipidici di differenti dimensioni e forma, soprattutto a livello del sarcolemma. Inoltre, considerando non solo le dimensioni ma l'elevata intensità del segnale fluorescente, è possibile ipotizzare che questi accumuli lipidici siano effettivamente rilevanti. Considerazioni precise in questa direzione però non possono essere apportate da questo tipo di colorazione. Si rende necessaria, quindi, un'analisi specifica ed approfondita della struttura della fibra muscolare *Sply*.

4.1.4. ANALISI STRUTTURALE DELLE FIBRE MUSCOLARI

I dati ottenuti fino ad ora, indicano chiaramente delle possibili anomalie strutturali a carico delle fibre muscolari *Sply*. Infatti, mediante la colorazione con Rodamina-Falloidina è stata evidenziata una morfologia bidimensionale della fibra perfettamente nella norma, a discapito di sarcomeri di dimensioni inferiori a quelli di controllo. Inoltre, mediante metodiche *in vivo* quali l'impiego della sonda TMRM e della ceramide marcata, si sono riscontrati, soprattutto a livello del sarcolemma, probabili accumuli lipidici di differenti dimensioni e forma.

Un'analisi strutturale delle fibre muscolari, mediante microscopio elettronico, potrebbe sopperire alle informazioni mancanti al fine di comprendere completamente la struttura e le sue alterazioni delle fibre muscolari *Sph.* Inoltre, una volta individuate le specifiche anomalie strutturali, sarebbe possibile correlarle ai relativi deficit motori e comportamentali delle larve mutanti.

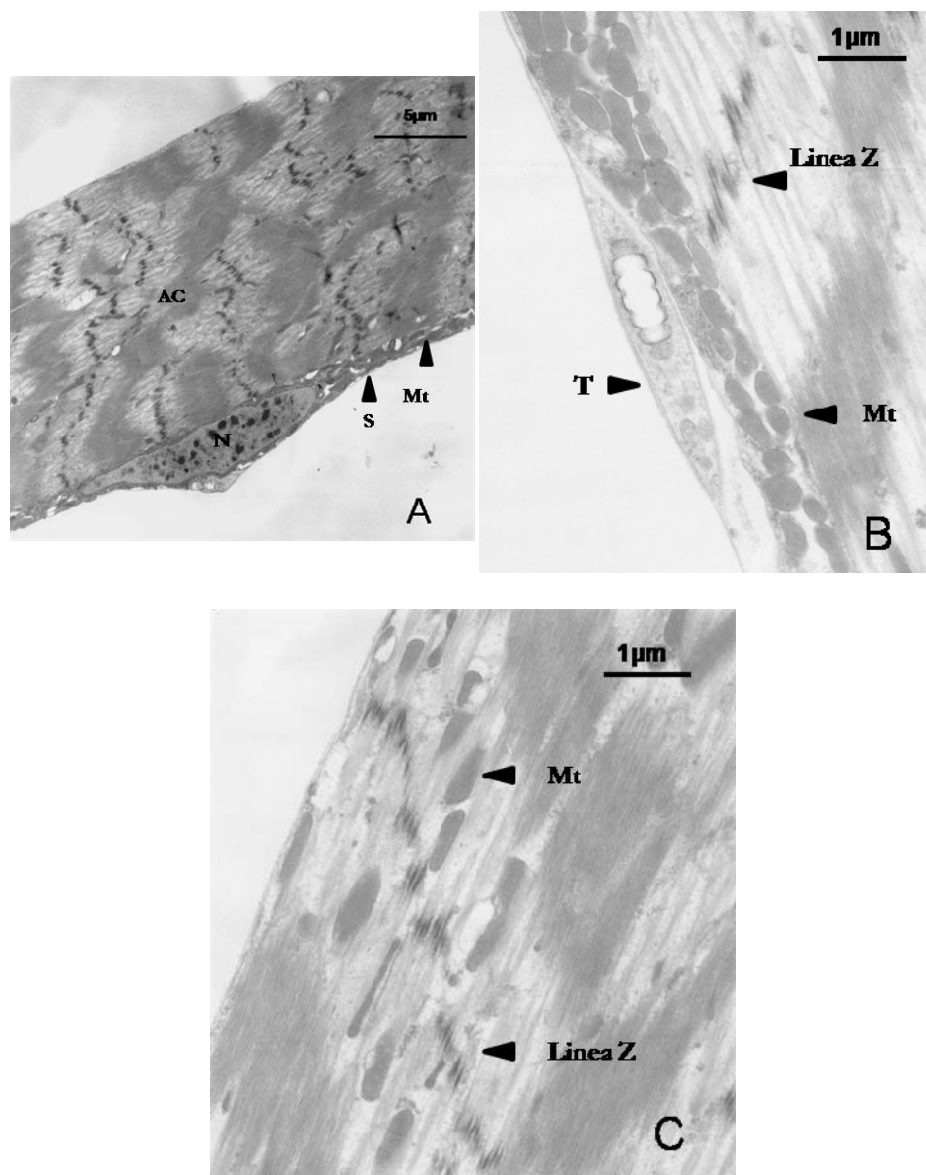


Figura 60 - Struttura delle fibre muscolari Canton S.

In figura A è riportata una fibra muscolare di controllo a basso ingrandimento. Sono visibili: il sarcolemma (S), i mitocondri (Mt), nucleo (N) e apparato contrattile (AC). In figura B, linea Z in porzione superficiale della fibra, con mitocondri sarcolemmali e tracheola (T). In figura C linea Z circondata da mitocondri nella zona interna della fibra.

L'osservazione al microscopio elettronico delle fibre muscolari Canton S permette di individuare tutte le strutture che la compongono. Infatti, sono facilmente identificabili il sarcolemma, i mitocondri, i nuclei e l'apparato contrattile. Inoltre, è evidente come la fibra muscolare stessa sia in qualche modo polarizzata, poiché presenta un lato superficiale, quello dorsale, molto più sviluppato e ricco di componenti, rispetto a quello inferiore, ventrale, estremamente limitato (Figura 60-A). Il sarcolemma ricopre e racchiude esternamente la fibra muscolare. In particolare, si nota come questo sia notevolmente sviluppato nella porzione superiore della fibra muscolare, ove include i nuclei. Nella porzione esterna opposta della fibra, il sarcolemma appare invece estremamente ridotto, molto simile ad una semplice membrana di confine.

I nuclei si ritrovano esclusivamente nella porzione superiore dorsale della fibra, inglobati all'interno del sarcolemma e perfettamente allineati gli uni con gli altri (come si era precedentemente notato con le colorazioni *in vivo*). Questi sono caratterizzati da forma ovoidale, con le estremità leggermente schiacciate. Al loro interno sono facilmente riconoscibili i nucleoli.

Ai lati dei nuclei, all'interno del sarcolemma, vi sono moltissimi mitocondri. Questi sono caratterizzati da differenti dimensioni, ma tutti dotati della classica forma a fagiolo. Inoltre, s'identificano altri mitocondri anche all'intero dell'apparato contrattile. Questi, infatti, si dispongono in prossimità e parallelamente alle linee Z, fungendo da rifornitori energetici durante l'attività contrattile (Figura 60-A, B, C).

Infine, l'apparato contrattile si dispone all'interno della fibra stessa, racchiuso dal sarcolemma. Sono facilmente identificabili tutte le strutture che lo compongono: i sarcomeri, le linee Z, i filamenti di actina e miosina. In particolare, è possibile notare come le linee Z appaiano come delle micro-piattaforme scure perfettamente allineate le une con le altre, dalle quali dipartono, lateralmente da entrambi i lati, e i filamenti di actina. Questi, a loro volta, s'incrociano con i filamenti di miosina, che appaiono di colore più scuro (Figura 60-B, C). Inoltre, le linee Z sembrano essere supportate dalla presenza dei mitocondri esclusivamente in porzioni centrali o inferiori della fibra.

L'osservazione al microscopio elettronico delle fibre muscolari *Sph* permette di individuare tutte le strutture che la compongono.

In particolare, a livello del sarcolemma, spesso in prossimità dei nuclei, si notano degli accumuli di piccole dimensioni di materiale diversamente elettrondenso. (Figura 61-A). Questi micro-accumuli sembrano quindi essere composti di materiale diverso (grigio chiaro con forma micellare) da quello che costituisce il sarcolemma stesso (grigio scuro ed omogeneo) e la loro presenza determina uno spostamento dei mitocondri nelle zone limitrofe.

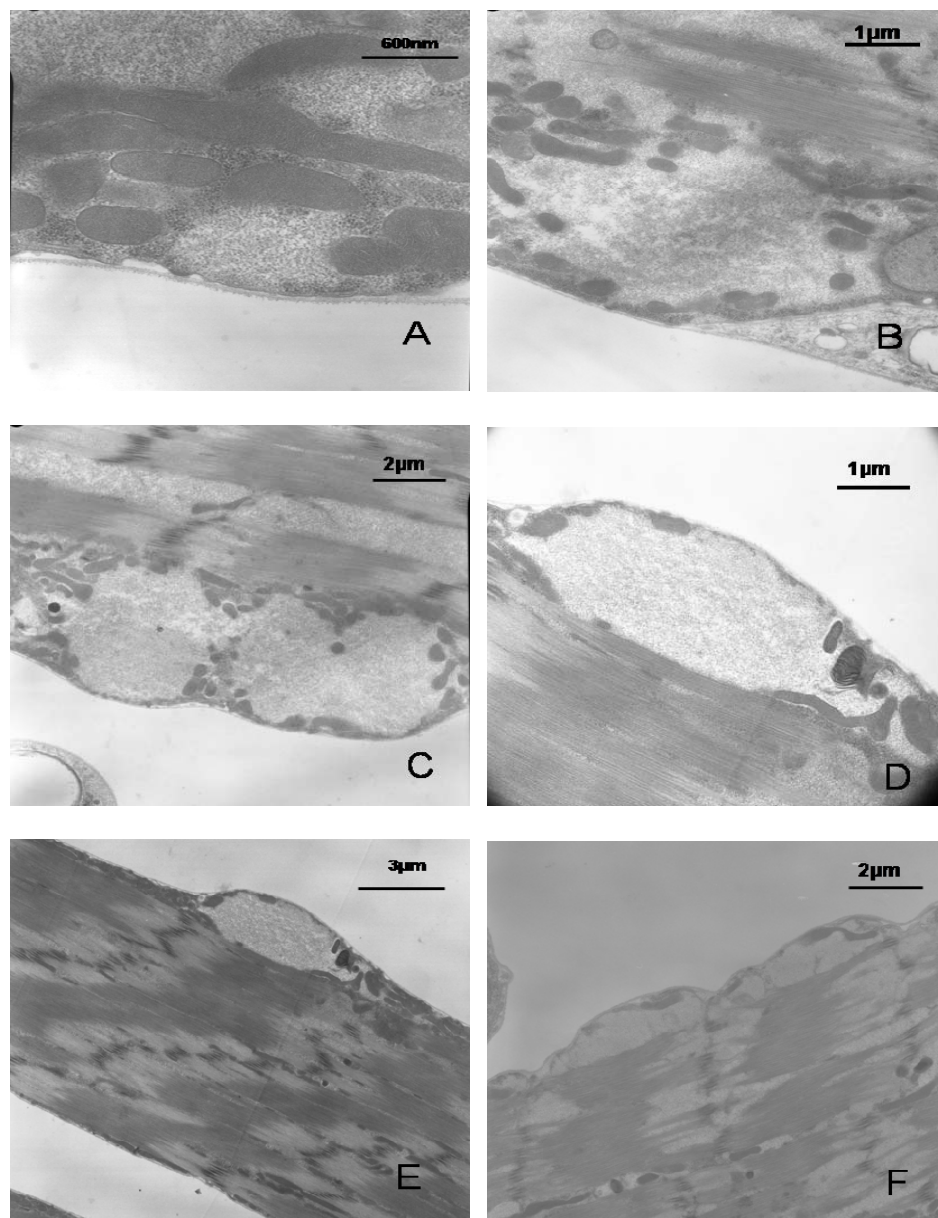


Figura 61 - Accumuli ridotti in fibre muscolari *Sply*.

Accumuli ridotti di differenti dimensioni e localizzazioni a livello del sarcolemma delle fibre muscolari *Sply*.

Inoltre, potrebbe esserci una progressione temporale e spaziale di questi ammassi. Infatti, si notano accumuli di dimensioni differenti. In particolare, ogni fibra è caratterizzata da uno o più accumuli dello stesso tipo, mai da accumuli di diverse dimensioni e contenuto. In base a ciò, si potrebbe supporre una progressione temporale in termini di rimodellamento morfologico degli accumuli presenti su un'unica fibra. La larva è quindi costituita da diverse fibre caratterizzate da cumuli con una progressione temporale differente. Infatti si nota come dai micro-accumuli iniziali se ne formino di altri di

dimensioni molto maggiori, costituiti sempre dallo stesso materiale e conseguente spostamento dei mitocondri (Figura 61-B).

Spesso, questi agglomerati si formano in zone contigue, e, sviluppandosi, iniziano a protrudere dal sarcolemma stesso, determinando un'alterazione della superficie esterna del sarcolemma stesso, rendendola non più liscia ed omogenea ma curvilinea. Al loro interno, questi accumuli continuano ad accrescersi, spingendo esternamente e lateralmente le porzioni restanti di sarcolemma che li racchiude ed i mitocondri stessi. Inoltre, agglomerati contigui sembrano avvicinarsi tra loro (Figura 61-C).

Infine, questi cumuli si trasformano in vere e proprie strutture di notevoli dimensioni che protrudono dal sarcolemma stesso. Queste strutture sono morfologicamente paragonabili a delle bolle sub-sarcolemmali, in quanto sono esternamente delimitate dalla membrana sarcolemmale. Al loro interno, queste bolle sono ripiene dello stesso materiale iniziale che ora però evidenzia il suo carattere micellare. Inoltre, in alcune bolle sembrano permanere dei singoli o pochissimi mitocondri i quali si dispongono ai bordi della bolla stessa e perdono la loro classica forma (Figura 61-D).

Queste bolle sono chiaramente visibili come ovoidali estroflessioni nella porzione superficiale ventrale della fibra muscolare. Spesso si ritrovano anche bolle consecutive (Figura 61-E, F). Non è però possibile determinare, se queste bolle siano derivate dall'unione di accumuli di medie dimensioni contigui fusi insieme o dal continuo accrescimento di un singolo ammasso.

In seguito alla loro formazione, queste bolle sembrano continuare il loro percorso di accrescimento, fino a raggiungere notevoli dimensioni finali. Raggiunta quindi questa struttura morfologica finale, sembrano iniziare nuovi processi evolutivi a carico del materiale interno alle bolle stesse. Questo, infatti, inizia a mutare la sua colorazione e la sua conformazione. In particolare, sono lentamente perse le strutture micellari (Figura 62-A, B).

Infine, questo percorso evolutivo si conclude con la trasformazione delle bolle in bolle apparentemente vuote o comunque ripiene di materiale non rilevabile mediante la microscopia elettronica. Inoltre, si nota, come i mitocondri presenti al loro interno, giunti a questo stadio, abbiano perso completamente la loro morfologia, poiché appaiono di dimensioni notevolmente ridotte e forma estremamente anomala (Figura 62-C, D).

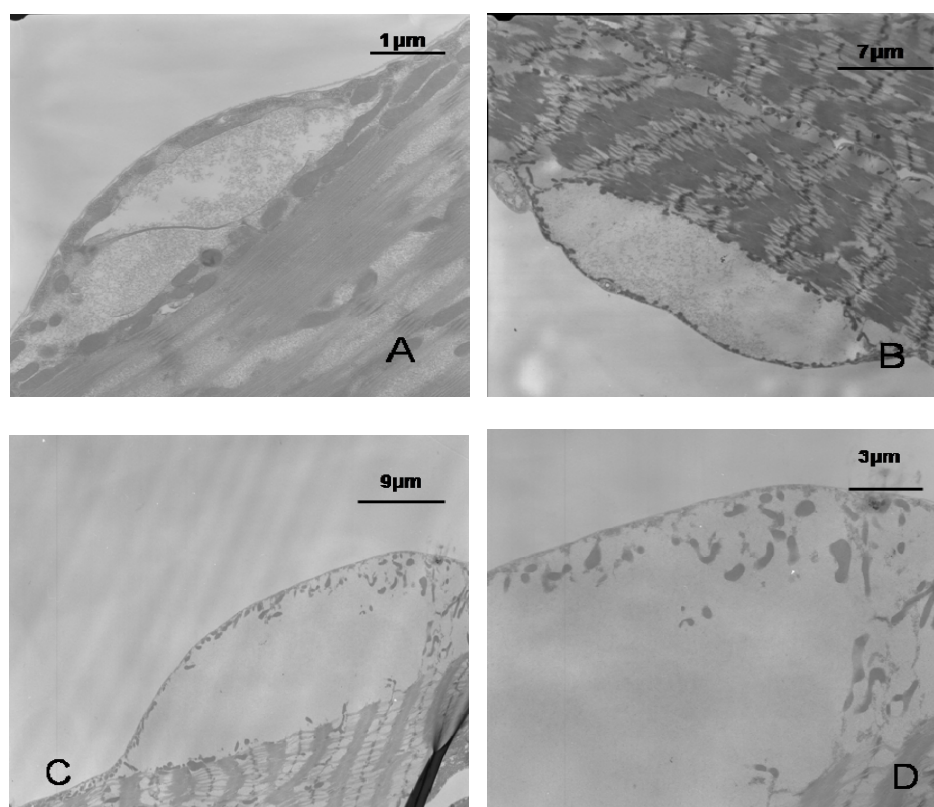


Figura 62 - Accumuli estesi in fibre muscolari *Sph*.

Accumuli estesi di differenti dimensioni a livello del sarcolemma delle fibre muscolari *Sph*.

Le fibre muscolari *Sph* caratterizzate dalla presenza, sulla loro superficie esterna superiore, di numerose bolle di notevoli dimensioni e apparentemente vuote al loro interno, spesso presentano delle strutture ad alveare a livello di medi accumuli fiancheggianti i nuclei (Figura 63-A). La natura, la composizione e la possibile funzione di tali strutture permangono sconosciute.

Inoltre, queste fibre presentano un apparato contrattile notevolmente alterato. Infatti, in queste fibre ricche di bolle enormi, le linee Z appaiono molto più disorganizzate e lasse con perdita dei loro mitocondri di supporto (Figura 63-B).

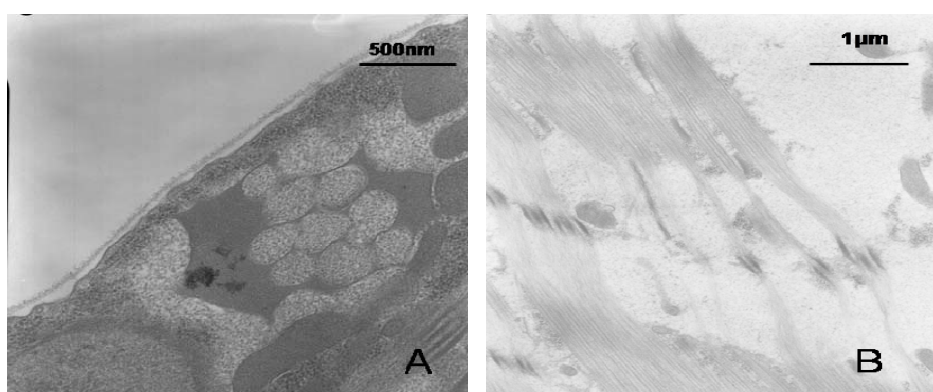


Figura 63 - Struttura delle fibre muscolari *Sply*.

In figura A sono riportati particolari strutture organizzate presenti vicino ai nuclei. In figura B è riportata una linea Z di una fibra muscolare con numerose e grandi bolle sulla superficie.

4.2. SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Gli sfingolipidi sono una componente fondamentale di tutte le membrane lipidiche presenti in un organismo. Questa specifica classe lipidica è determinante per una corretta composizione e conformazione delle membrane stesse.

Inoltre, il loro coinvolgimento nella formazione e mantenimento dei *Lipid Rafts* li rende elemento di causa per alterazioni a carico dei sistemi di endo-esocitosi e nel *recycling* vescicolare. Risulta, quindi evidente, come la mancanza o l'accumulo di sfingolipidi in un organismo possano essere correlati ad anomalie non solo in questi specifici processi, ma anche a carico dei tessuti nei quali avvengono. In base a queste considerazioni, è chiaro come siano prevedibili irregolarità a carico del sistema nervoso periferico, nel quale avviene il *recycling* vescicolare.

4.2.1. ANALISI MORFOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

La giunzione neuromuscolare consiste nell'area di contatto tra la fibra nervosa e la fibra muscolare. Le NMJ sono quindi sinapsi che intercorrono tra gli assoni dei motoneuroni e le fibre muscolari scheletriche. L'assone dei motoneuroni in prossimità della fibra muscolare si ramifica dando origine ad una serie di bottoni pre-sinaptici ravvicinati in una struttura denominata placca.

I *Lipid Rafts* sono una componente fondamentale di questi bottoni sinaptici, in quanto direttamente coinvolti nell'attività di *recycling* vescicolare sinaptico. In base a ciò, una

variazione nella concentrazione degli sfingolipidi dovrebbe tradursi in alterazioni morfologiche, strutturali e dell'attività dei bottoni stessi.

4.2.1.1. *Analisi Morfologica della Giunzione*

Una prima analisi in questa direzione è stata eseguita mediante la colorazione immunostochimica dell'intera giunzione neuromuscolare con l'anticorpo anti-HRP. Mediante questa colorazione, è stato possibile valutare la struttura in toto della giunzione muscolare stessa ed analizzare il numero, la forma e le dimensioni dei bottoni che la compongono.

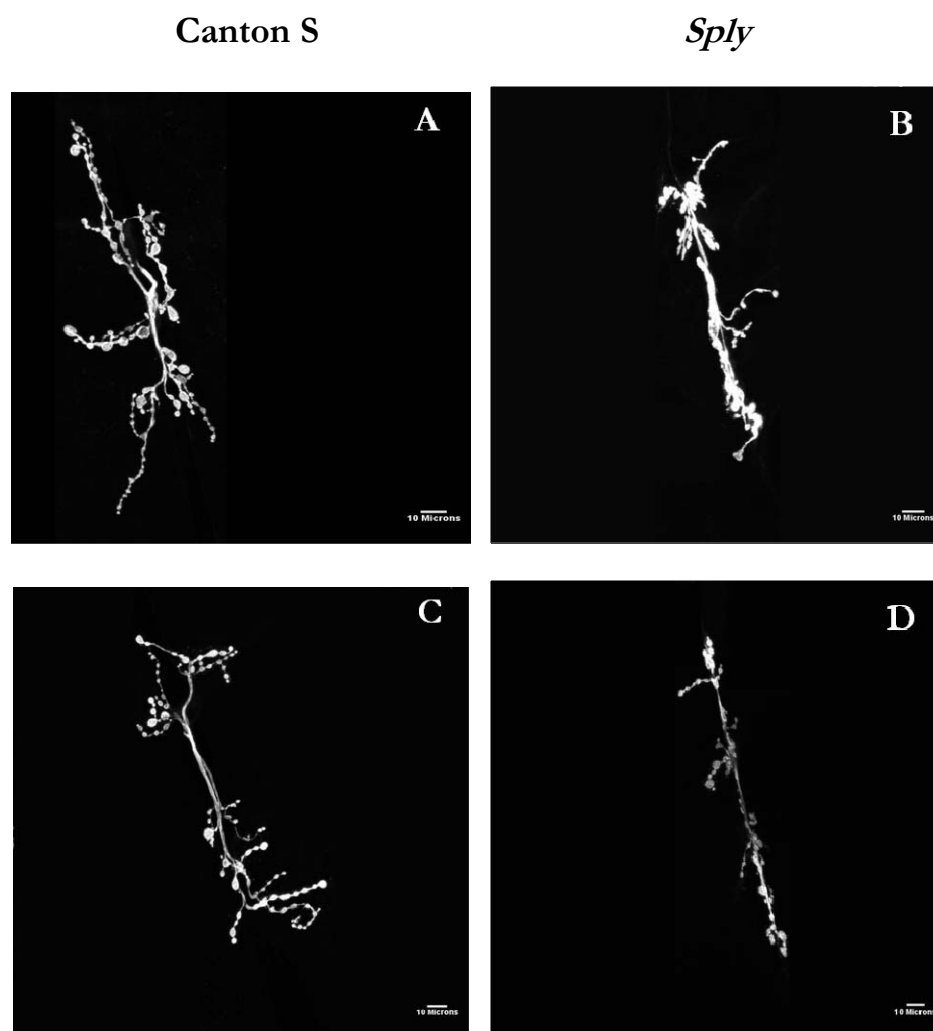


Figura 64 - Giunzioni neuromuscolari.

In figura A, C, sono riportate NMJ di larve di controllo. In figura B, D, sono riportate NMJ di larve mutanti *Sply*.

Sono state considerate esclusivamente le giunzioni neuromuscolari localizzate sulle fibre muscolari 6 e 7 dei segmenti 3. In particolare, le NMJ, osservate nei controlli, sembrano essere composte da un innumerevole numero di ramificazioni secondarie che dipartono dall'assone centrale, pronte a protrudere verso le fibre muscolari stesse. Inoltre, queste braccia secondarie sembrano essere caratterizzate da numerosi bottoni sinaptici prevalentemente di forma circolare. In base a quest'osservazione preliminare, le NMJ CS sembrano essere estremamente sviluppate in termini bidimensionali al fine di contattare e stimolare la maggior area possibile di fibra muscolare (Figura 64-A, C).

Al contrario, le giunzioni neuromuscolari osservate per i mutanti *Sply* appaiono notevolmente sottosviluppate rispetto alle NMJ di controllo. Infatti, sembrano avere delle ramificazioni secondarie inferiori, caratterizzate da bottoni sinaptici non più circolari ma ovoidali (Figura 64-B, D). In base a queste prime considerazioni preliminari, è si è resa necessaria un'analisi morfologica approfondita delle NMJ mutanti.

4.2.1.2. Analisi dei Bottoni Sinaptici

In primis, sono stati valutati i bottoni sinaptici componenti le diverse giunzioni considerate. In particolare, è stato stimato il numero, la forma e le dimensioni dei singoli bottoni per ogni singola NMJ.

In particolare, sono stati conteggiati tutti i bottoni presenti nelle giunzioni considerate e da questo conteggio è stato determinato il numero medio di bottoni sinaptici che compongono una NMJ di controllo o mutante. In base a quest'analisi, risulta evidente come le giunzioni *Sply* siano caratterizzate da una quantità di bottoni inferiore rispetto alle NMJ Canton S (Figura 65).

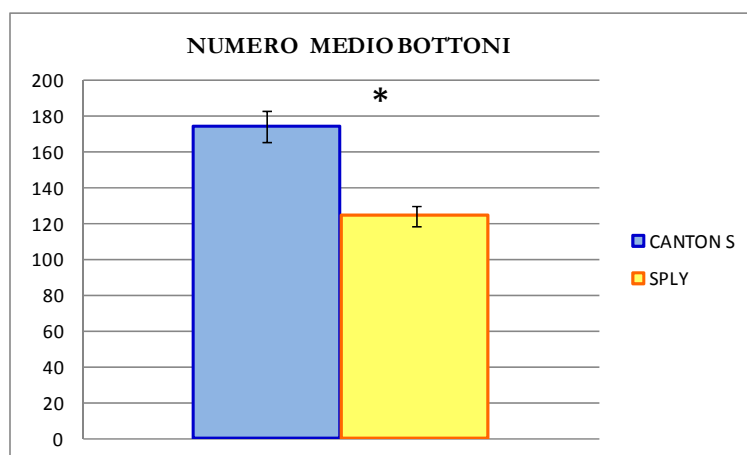


Figura 65 - Numero medio bottoni sinaptici per NMJ.

In questo grafico sono riportati i valori medi del numero totale di bottoni sinaptici presenti in giunzioni di controllo e in giunzioni *Sply*. CS=174±9 con n=5804. *Sply*=125±6 con n=3734. t-test significativo con $p \leq 0,05$ ($p=2,01E-05$).

Inoltre, ogni bottone conteggiato è stato anche dimensionato in termini di area. In questo modo, è stato possibile riportare i singoli bottoni valutati con la propria area espressa in micrometri². In base a questa relazione diretta, appare chiaro come i bottoni sinaptici delle NMJ mutanti siano caratterizzate da dimensioni maggiori rispetto ai bottoni di controllo (Figura 66).

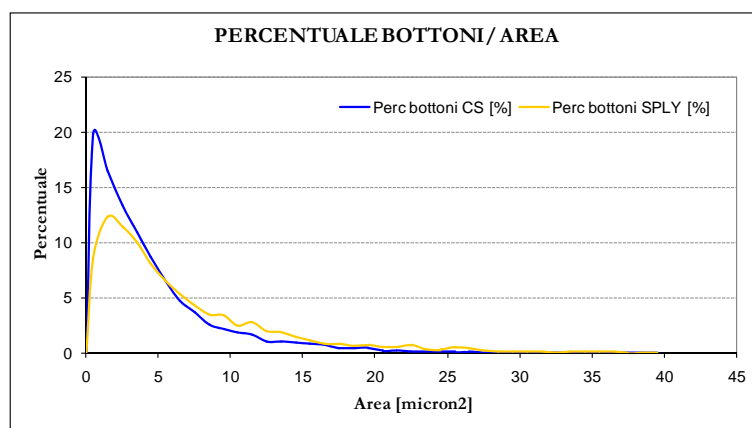


Figura 66 - Distribuzione dei bottoni in dimensioni.

Nel grafico è riportata la distribuzione numerica percentuale dei bottoni sinaptici conteggiati in base alla loro dimensione. t-test significativo con $p \leq 0,05$.

In più, i bottoni sinaptici analizzati si presentavano, da un punto di vista morfologico, con forma abbastanza circolare. Per questo motivo è stato valutato il diametro di ogni bottone. Dal confronto delle distribuzioni cumulative relative ai diametri dei bottoni sinaptici di Canton S e di *Sply*, si confermano i dati precedentemente ottenuti: i bottoni sinaptici *Sply* sono di dimensioni maggiori rispetto a quelli di controllo (Figura 67).

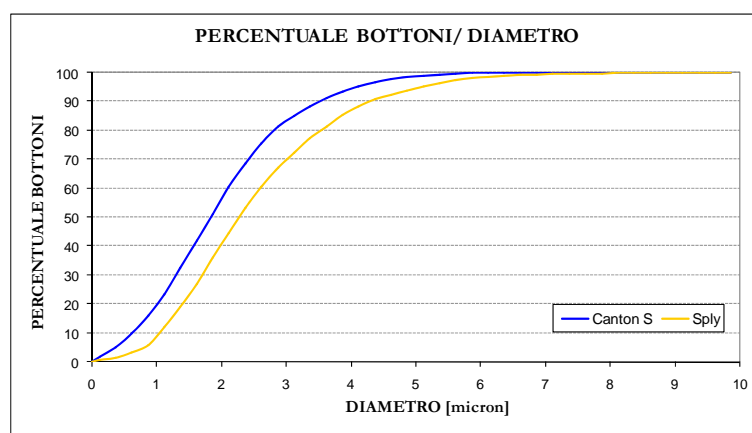


Figura 67 - Distribuzione dei bottoni in base al diametro.

Nel grafico è riportata la distribuzione numerica percentuale dei bottoni sinaptici conteggiati in base al loro diametro. t-test significativo con $p \leq 0,05$.

4.2.1.3. *Analisi Area e Lunghezza della Giunzione*

In base alla prima analisi morfologica effettuata, le giunzioni neuromuscolari osservate per i mutanti *Sply* appaiono notevolmente sottosviluppate rispetto alle NMJ di controllo. Per questo motivo, si è cercato di determinare quest'apparente sottosviluppo in termini bidimensionali misurabili, quali l'area e la lunghezza totale della giunzione stessa.

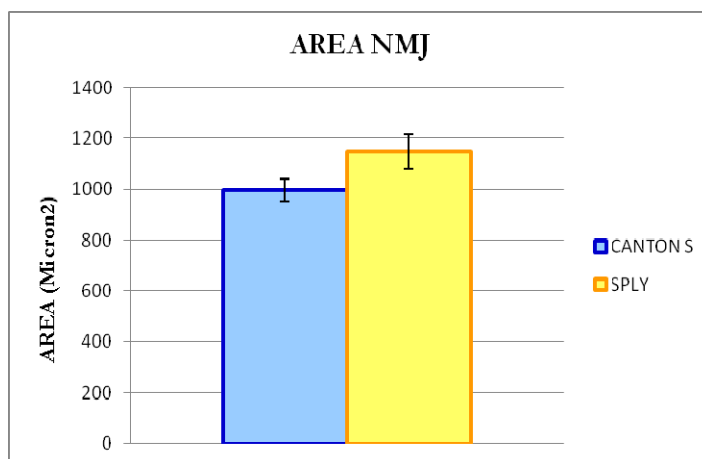


Figura 68 - Area media NMJ.

In questo grafico sono riportati i valori medi delle relative aree totali determinate per le NMJ di controllo e mutanti. CS=998±43 con n=32. *Sply*=1148±68 con n=30. t-test non significativo con $p \geq 0,05$ ($p=0,07$).

Mediante il software ImageJ è stata valutata l'area totale di ogni singola NMJ considerata. In base ai questi valori singoli è stato determinato il valore medio per area totale delle giunzioni di controllo e mutanti. I valori medi ottenuti non hanno evidenziato però alcuna differenza statisticamente significativa tra i due ceppi d'interesse (Figura 68). Ciò significa, che le giunzioni *Sply* riescono in qualche modo a coprire la stessa area muscolare rispetto alle giunzioni di controllo. Tale area di copertura totale *Sply* potrebbe però non corrispondere in termini organizzativi e funzionali a quella di controllo.

Una prima risposta a questa questione potrebbe derivare dall'analisi della lunghezza totale della giunzione stessa. In particolare, è stata considerata come lunghezza totale della giunzione la somma delle lunghezze, espresse in micrometri, di tutte le porzioni che costituiscono la giunzione.

Mediante il software ImageJ è stata valutata la lunghezza totale di ogni singola NMJ considerata. In base ai questi valori singoli è stato determinato il valore medio per lunghezza totale delle giunzioni di controllo e mutanti. I valori medi ottenuti non evidenziano però alcuna differenza statisticamente significativa tra i due ceppi d'interesse (Figura 69).

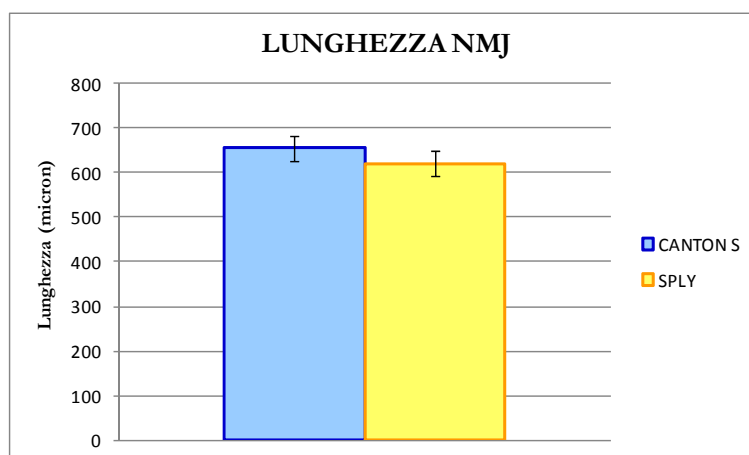


Figura 69 - Lunghezza media delle NMJ.

In questo grafico sono riportati i valori medi delle relative lunghezze totali determinate per le NMJ di controllo e mutanti. CS=655±27 con n=32. *Sply*=620±28 con n=30. t-test non significativo con $p \geq 0,05$ ($p=0,4$).

Questi dati riguardanti l'area e la lunghezza totale della NMJ sembrano contrastare con ciò che era stato determinato mediante l'analisi morfologica della giunzione stessa. Infatti, in base a questi dati bidimensionali le NMJ *Sply* sembrano coprire la stessa area muscolare rispetto alle giunzioni di controllo. Inoltre, permangono i quesiti riguardanti l'organizzazione e la funzionalità della copertura data da una giunzione *Sply*.

4.2.1.4. Analisi delle Ramificazioni Secondarie

L'organizzazione e la funzionalità della giunzione neuromuscolare corrisponde alla sua struttura in termini di ramificazioni secondarie. Queste ramificazioni possono dipartire direttamente dall'assone motore o da altre ramificazioni. Inoltre, queste sono costituite esclusivamente da bottoni sinaptici allineati uno dopo l'altro a formare la placca. Risulta evidente quindi come le porzioni più funzionali della giunzione siano proprio le ramificazioni o braccia, in quanto nei loro bottoni avvengono tutti i processi sinaptici. È quindi evidente, come NMJ strutturalmente sbilanciate, potrebbero non stimolare correttamente la fibra muscolare.

Per rispondere quindi ai quesiti di organizzazione e funzionalità della giunzione *Sply*, è stata eseguita un'analisi a carico delle ramificazioni stesse. In particolare, partendo dall'assone motore stesso sono state catalogate tutte le ramificazioni presenti nelle singole giunzioni considerate fino ad ora.

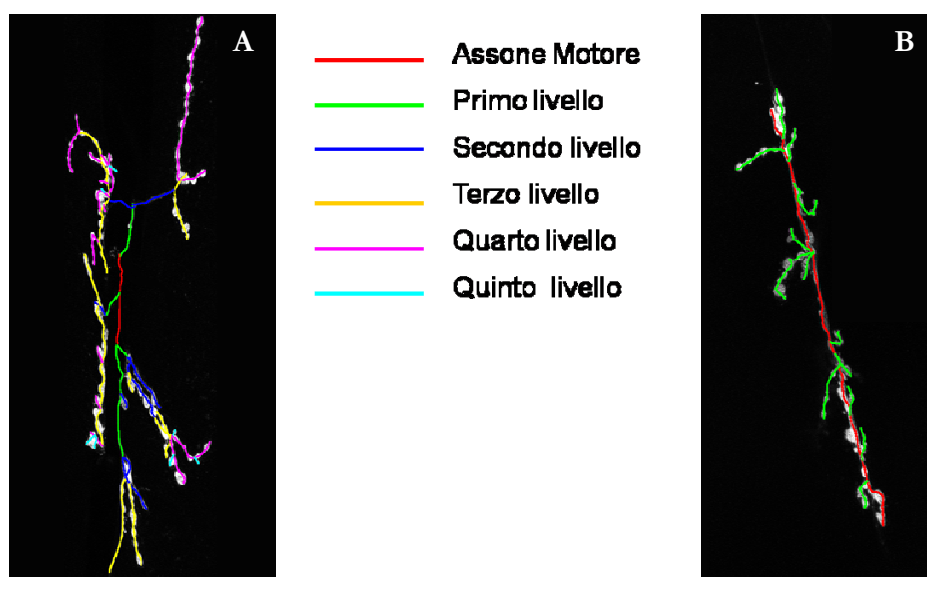


Figura 70 - Catalogazione delle ramificazioni secondarie.

In figura A catalogazione di una NMJ di controllo. In figura B catalogazione di una NMJ mutante.

L'assone motore è stato considerato come il livello basale, evidenziato in rosso. Le ramificazioni che dipartono da questo sono state considerate come “Primo Livello di ramificazione” e colorate in verde. Le ramificazioni, che dipartono da quelle primarie, sono state considerate di “Secondo Livello” ed evidenziate in blu. Le ramificazioni, che dipartono dalle secondarie, sono state considerate di “Terzo Livello” e colorate in giallo. Le ramificazioni, che dipartono dalle terziarie, sono state considerate di “Quarto Livello” e colorate in rosa. Le ramificazioni, che dipartono dalle quaternarie, sono state considerate di “Quinto Livello” e colorate in azzurro (Figura 70).

In base a questa catalogazione, le singole ramificazioni individuate, per ogni giunzione considerata, sono state conteggiate e caratterizzate in termini dimensionali.

Considerando tutte le singole ramificazioni catalogate e conteggiate per ogni singola giunzione, è stato determinato il numero medio di singole ramificazioni appartenenti ad uno specifico livello per le giunzioni di controllo e mutanti (Figura 71). Come riportato nel grafico, le NMJ di controllo sono caratterizzate dalla presenza di ramificazioni che giungono fino al quinto livello, con un numero maggiore di ramificazioni secondarie. Contrariamente, le giunzioni *Sply* posseggono solo ramificazioni primarie, secondarie e terziarie, con un prevalenza numerica per le primarie. In base a questa catalogazione e distribuzione numerica, risulta evidente come le NMJ *Sply* siano sottosviluppate in termini di presenza di ramificazioni rispetto alle NMJ di controllo.

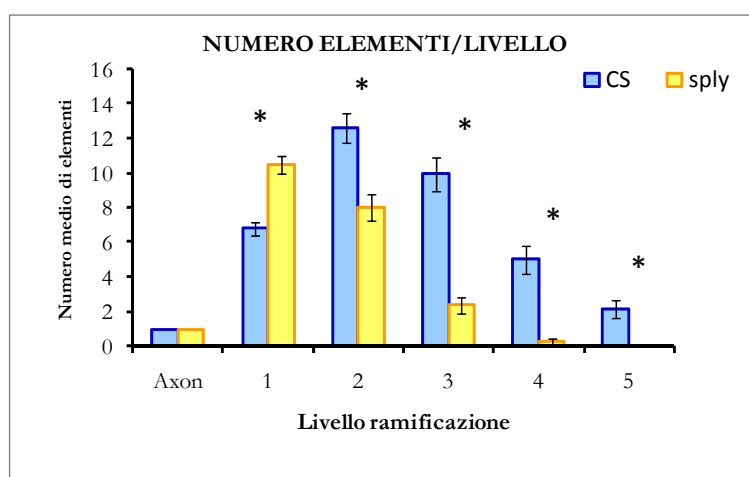


Figura 71 - Distribuzione numerica delle ramificazioni per livello.

Nel grafico sono riportati i numeri medi di singole ramificazioni appartenenti ad un determinato livello di catalogazione. CS: Assone:1; 1°livello=7±0,4; 2°liv=12±0,9; 3°liv=10±1; 4°liv=5±0,8; 5°liv=2±0,5; con n=1202. Sply: Assone:1; 1°livello=11±0,5; 2°liv=8±0,7; 3°liv=2±0,5; 4°liv=1±0,1; 5°liv=0; con n=666. t-test significativo con $p \leq 0,05$. (1°livello: $p=6,2E-07$; 2°liv: $p=0,0002$; 3°liv: $p=8,88E-09$; 4°liv: $p=1,79E-06$; 5°liv: $p=0,0001$).

A questo punto, diventa interessante comprendere anche lo sviluppo dimensionale di queste ramificazioni, in quanto la loro lunghezza corrisponde alla presenza di un numero differente di bottoni sinaptici.

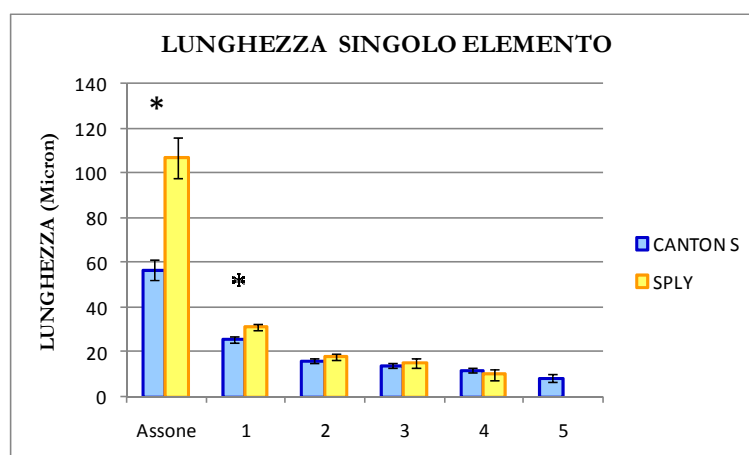


Figura 72 - Lunghezza media della singola ramificazione per livello.

Nel grafico sono riportati i numeri medi delle lunghezze delle singole ramificazioni appartenenti ad un determinato livello di catalogazione. CS: Assone=57±4; 1°livello=25±1; 2°liv=16±0,8; 3°liv=14±1; 4°liv=12±0,9; 5°liv=9±1,6; con n=1202. Sply: Assone=107±8; 1°livello=31±1,3; 2°liv=18±1,2; 3°liv=15±2; 4°liv=10±2; 5°liv=0; con n=666. t-test significativo con $p \leq 0,05$ per Assone e 1°livello. (1°livello: $p=1,01E-05$; 2°liv: $p=0,003$; 3°liv: $p=0,17$; 4°liv: $p=0,64$; 5°liv: $p=0,5$).

Le giunzioni di controllo sono caratterizzate da un assone di circa 60 μm , da ramificazioni primarie di circa 25 μm , ramificazioni secondarie, terziarie e quaternarie di simile lunghezza intorno ai 15 μm ed, infine, ramificazioni di quinto livello di circa 10 μm . Le NMJs dei Canton S sono quindi costituite da un numero bilanciato di ramificazioni di differente livello con dimensioni equilibrate tra loro (Figura 72).

Le giunzioni mutanti sono caratterizzate da un assone di circa 110 μm , da ramificazioni primarie di circa 31 μm , ramificazioni secondarie di circa 20 μm , terziarie e quaternarie di simile lunghezza intorno ai 15 μm . Le NMJ *Sply* sono quindi costituite da un numero sbilanciato di ramificazioni di differente livello con dimensioni disequilibrate tra loro (Figura 72). Le giunzioni mutanti sono, infatti, notevolmente sbilanciate verso strutture assonali e di primo livello, e contemporaneamente sottosviluppate o prive dei livelli superiori.

Le singole anomalie strutturali riscontrate nelle giunzioni mutanti potrebbero però essere ammortizzate o mascherate in termini organizzativi -strutturali complessivi: le differenze potrebbero essere bilanciate all'interno dei singoli livelli.

Considerando le NMJ Canton S, le lunghezze medie totali di ogni singolo livello corrispondono agli andamenti visti considerando le lunghezze delle singole ramificazioni. Infatti, il primo, il secondo ed il terzo livello in termini di lunghezze complessive sono molto equilibrati tra loro (Figura 73).

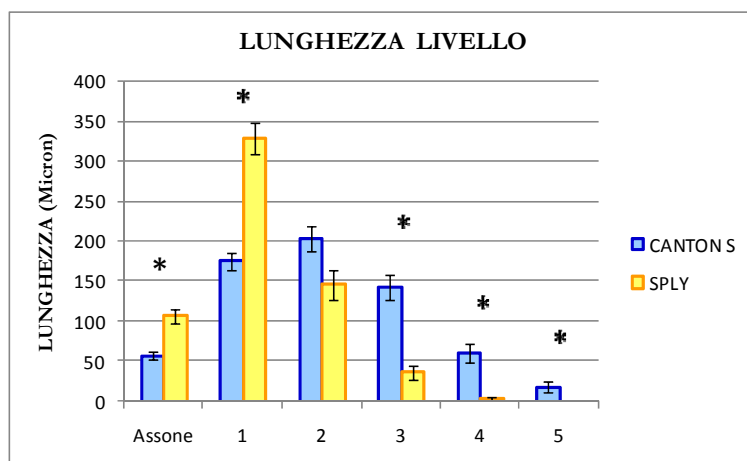


Figura 73 - Lunghezza media complessiva per livello.

Nel grafico sono riportati i numeri medi delle lunghezze complessive di un determinato livello di catalogazione. CS: Assone=57 \pm 4; 1°livello=175 \pm 11; 2°liv=203 \pm 16; 3°liv=142 \pm 11; 4°liv=60 \pm 11; 5°liv=19 \pm 6; con n=1202. *Sply*: Assone=107 \pm 8; 1°livello=329 \pm 19; 2°liv=146 \pm 19; 3°liv=36 \pm 8; 4°liv=3 \pm 2; 5°liv=0; con n=666. t-test significativo con $p \leq 0,05$ escluso per il 2°livello. (Assone: $p=1,01\text{E}-05$; 1°livello: $p=9,38\text{E}-09$; 2°liv: $p=0,02$; 3°liv: $p=3,19\text{E}-07$; 4°liv: $p=2,67\text{E}-05$).

Le singole alterazioni evidenziate nelle NMJ *Sph* permangono anche in quest'analisi complessiva. Infatti, queste risultano nettamente sbilanciate verso le porzioni assonali e di primo livello, a discapito del secondo e del terzo. Inoltre il quarto livello è notevolmente indigente, mentre il quinto è del tutto assente (Figura 73).

In base a questi dati morfologici, le giunzioni mutanti appaiono notevolmente sottosviluppate bidimensionalmente, povere di bottoni anche se caratterizzati da un'area maggiore. La combinazione di queste due caratteristiche morfologiche determina, insieme alla struttura intrinseca dei bottoni, l'attività sinaptica della giunzione neuromuscolare stessa.

4.2.2. ANALISI ISTOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

L'attività sinaptica della giunzione neuromuscolare avviene a livello dei bottoni sinaptici, unica sede degli avvenimenti coinvolti e determinanti il *recycling* vescicolare.

Il processo sinaptico consiste in una serie consecutiva di processi durante i quali si assiste ad una fase di esocitosi, mediante la quale gran parte delle vescicole sinaptiche contenenti il neurotrasmettitore, fondono con la membrana pre-sinaptica rilasciando il neurotrasmettitore nello spazio post-sinaptico. In quest'ultima sede, si trovano i recettori del neurotrasmettitore che una volta attivati trasmetteranno il segnale alla fibra muscolare stessa determinandone la contrazione.

L'avvento del processo sinaptico richiede, quindi, una specifica cooperazione tra differenti attori coinvolti in diverse fasi e mansioni. L'assenza o altre modificazioni a carico di questi specifici attori causerebbero o il blocco o pesanti alterazioni del processo stesso.

La ridotta capacità locomotoria delle larve *Sph* potrebbe essere quindi correlata a modificazioni a carico dei soggetti coinvolti nel processo sinaptico. Per questo motivo, si è pensato di attuare una prima indagine al fine di controllare lo "status strutturale" del complesso pre- e post-sinaptico mediante colorazioni immunoistochimiche. In particolare, per il complesso pre-sinaptico sono state valutate le proteine Sinapsina e Nc82. Per il complesso post- sinaptico, è stato valutato il marcatore DLG.

4.2.2.1. Analisi della proteina Sinapsina

Inizialmente, le larve Canton S e *Sph* sono state sottoposte, attraverso tecniche di immunoistochimica, ad una doppia colorazione al fine di evidenziare interamente le strutture principali del sistema nervoso centrale e periferico di nostro interesse, quali le giunzioni neuromuscolari presenti a livello dei muscoli 6 e 7; ed allo stesso tempo, si sono rese visibili specifiche strutture della zona pre-sinaptica. In particolare, con questa prima colorazione, si è cercato di valutare l'effettiva presenza e localizzazione di una delle

principali attrici responsabili del processo di esocitosi delle vescicole sinaptiche: la Sinapsina.

Studiando le immagini delle NMJ di larve CANTON S, si osserva che l'anti-HRP colora uniformemente di un rosso acceso tutta la giunzione neuromuscolare; riconosce l'intero sistema nervoso centrale, evidenziando le ramificazioni assoniche ed i bottoni sinaptici, i quali risultano rotondeggianti, ordinati e sequenziali a formare le singole braccia della giunzione. Sono presenti inoltre numerosi bottoni di piccole dimensioni e ravvicinati lungo tutta la giunzione. L'anticorpo anti-Sinapsina riconosce e lega la Sinapsina, presente a livello della membrana delle singole vescicole sinaptiche all'interno dei bottoni. Dato il legame con la proteina, l'anticorpo colora con un chiaro segnale verde parte dell'area interna ai bottoni. La colorazione assume una distribuzione non uniforme all'interno degli stessi. Infatti, si nota una maggiore presenza di segnale verde lungo il perimetro dei bottoni rispetto alla parte centrale (Figura 74).

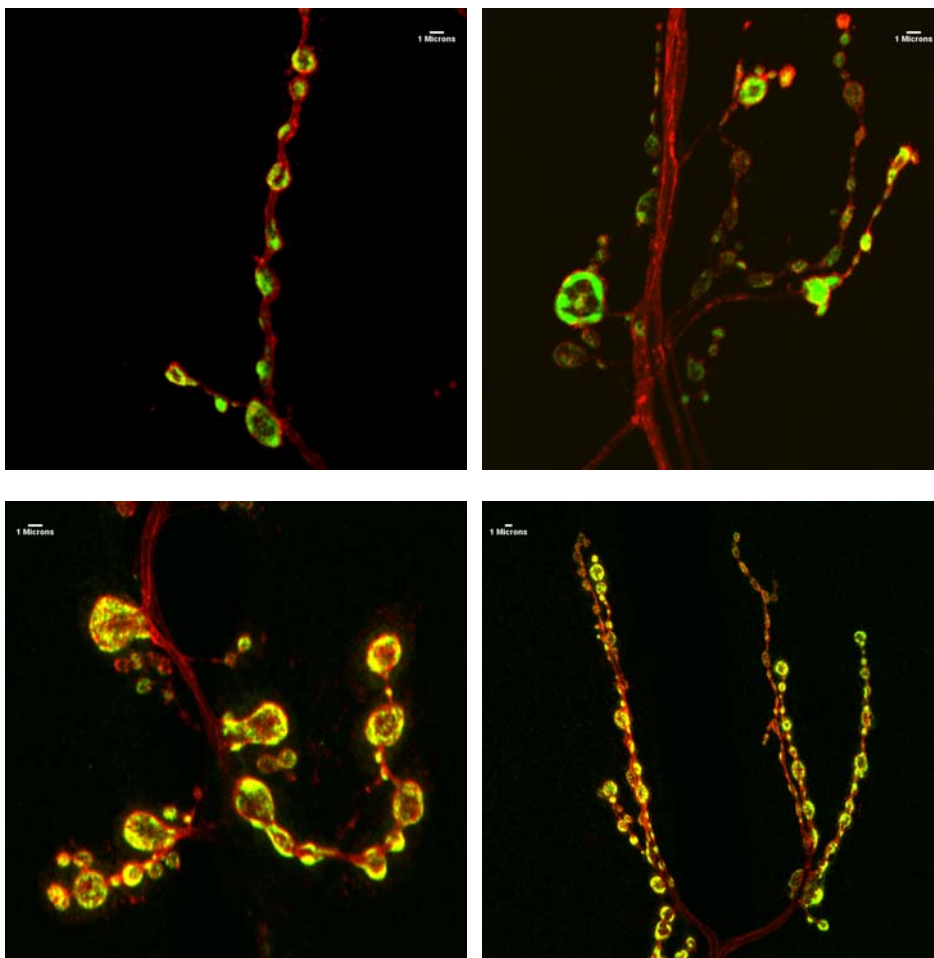


Figura 74 - Giunzioni Canton S trattate con anti-Sinapsina.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-Sinapsina (verde).

Valutando i singoli bottoni, appare evidente come la marcatura verde risulti essere maggiormente intensa lungo la parete e lasci un piccolo cerchio concentrico privo di alcuna colorazione nel centro del bottone stesso. Analizzando gli andamenti dei due differenti anticorpi lungo il diametro dei bottoni, si nota come i due segnali siano uno contenuto nell'altro e caratterizzati dalla stessa intensità. Inoltre, risulta evidente come il segnale della Sinapsina sia localizzato nella zona periferica del bottone stesso, adiacente alla membrana sinaptica. Questo tipo di localizzazione corrisponderebbe alla posizione delle vescicole sinaptiche pronte per l'esocitosi all'interno del bottone (Figura 75).

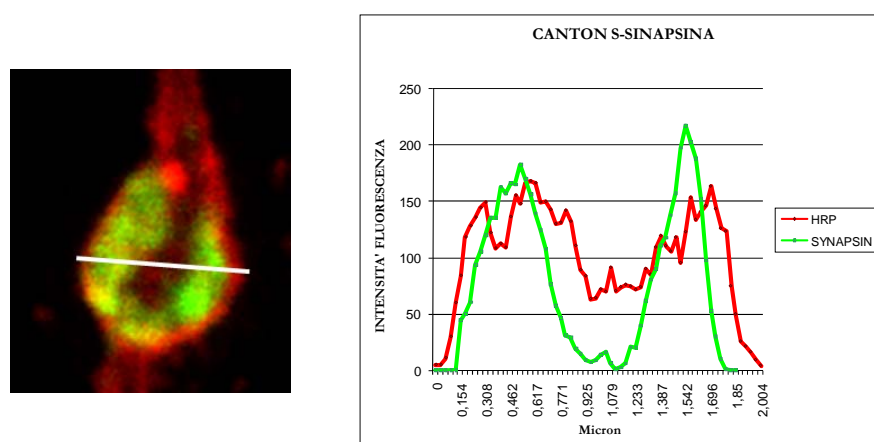


Figura 75 - Analisi della distribuzione della Sinapsina in bottoni Canton S.

Nella foto è riportato un bottone sinaptico tratto da una giunzione di controllo. In rosso la marcatura anti-HRP ed in verde quella anti-Sinapsina. Nel grafico sono riportati: in rosso l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-HRP in termini di intensità della fluorescenza rapportata alla distanza (diametro) misurata in micron. In verde, l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-Sinapsina.

I campioni di larve *Sph*, sono stati sottoposti allo stesso trattamento dei controlli: una doppia colorazione con anti-HRP e anti-Sinapsina (Figura 76). Come nelle NMJ dei controlli, l'anti-HRP risulta evidenziare con un forte segnale rosso tutta la struttura della giunzione, rendendo possibile la visualizzazione di caratteristiche morfologiche differenti nei campioni mutanti *Sph*. I bottoni infatti appaiono più grandi, di forma ovoidale ed in numero minore rispetto ai Canton S. Sembrano essere più distanziati, interposti tra semplici ramificazioni assoniche.

Il segnale dato dall'anti-Sinapsina appare ridotto rispetto a quello presente nei controlli. Infatti, contrariamente alle giunzioni Canton S, sono visibili alcuni bottoni sinaptici completamente privi di segnale verde e contrassegnati esclusivamente dall'anti-HRP. Altri, invece, mostrano una distribuzione casuale e non omogenea. In particolare,

viene persa la tipica struttura a “ciambella” presente nei Canton S, evidenziando un segnale dell’anti-Sinapsina a singoli spot verdi distribuiti all’interno dell’intero bottone.

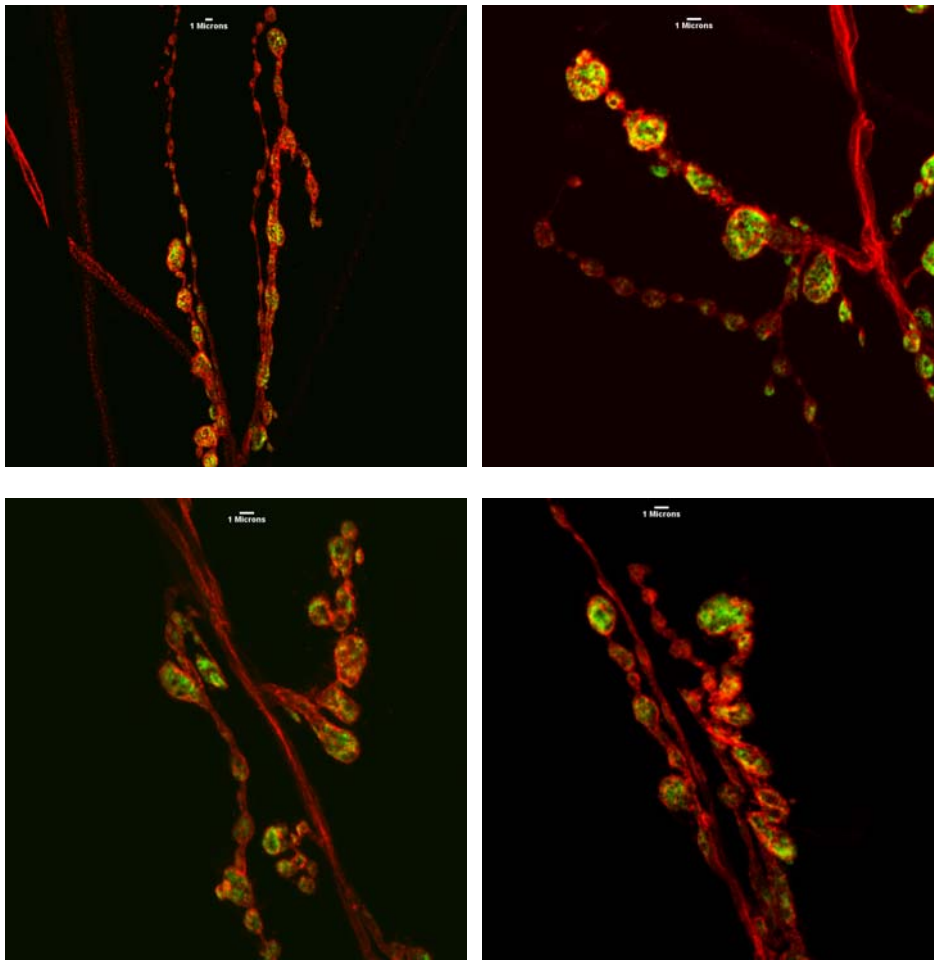


Figura 76 - Giunzioni *Sply* trattate con anti-Sinapsina.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-Sinapsina (verde).

Valutando differenti bottoni di diverse NMJ *Sply*, appare evidente come la marcatura verde risulti essere estremamente disomogenea e delocalizzata. Infatti, è chiaro come il segnale della Sinapsina sia presente soprattutto a livello dei bottoni sinaptici di dimensioni maggiori. In essi, la Sinapsina perde completamente l’organizzazione spaziale, distribuendosi lungo tutta l’area interna del bottone (Figura 77).

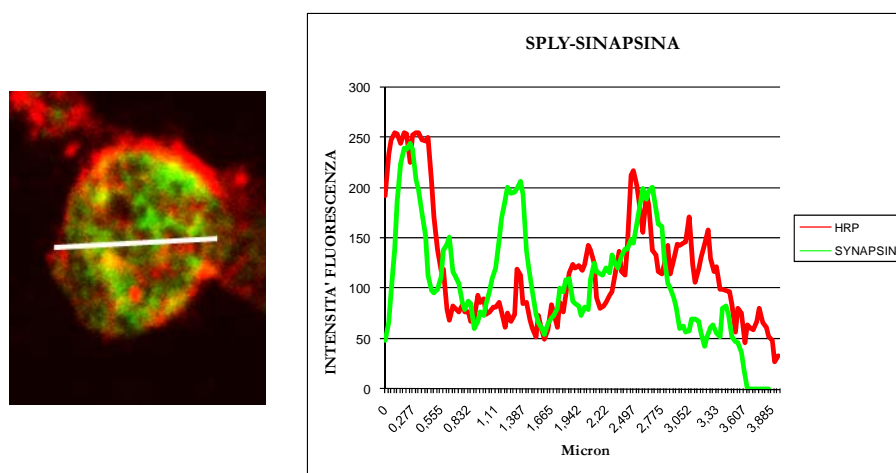


Figura 77 - Analisi della distribuzione della Sinapsina in bottoni *Sply*.

Nella foto è riportato un bottone sinaptico tratto da una giunzione di controllo. In rosso la marcatura anti-HRP ed in verde quella anti-Sinapsina. Nel grafico sono riportati: in rosso l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-HRP in termini di intensità della fluorescenza rapportata alla distanza (diametro) misurata in micron. In verde, l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-Sinapsina.

Inoltre, osservando gli andamenti dei due differenti anticorpi lungo il diametro dei bottoni, si nota come i due segnali non siano più uno contenuto nell'altro, ma siano caratterizzati da una distribuzione spaziale molto simile. Infine, l'analisi dell'intensità della fluorescenza del segnale della Sinapsina rileva come in realtà questa raggiunga gli stessi valori della fluorescenza dell'anti-HRP. In particolare, i singoli *spots* verdi e le "isole rosse" visibili all'interno dei bottoni, non sono espressione di punti nei quali manca uno dei due segnali, ma sono determinate da un differente bilanciamento dei due segnali stessi. Per quanto riguarda le "isole rosse" queste sono presenti in punti nei quali la fluorescenza del segnale della Sinapsina è estremamente debole ma non assente. Idem per gli *spots* verdi. Questi dati confuterebbero l'ipotesi di una minore concentrazione di Sinapsina all'interno dei bottoni *Sply*. Probabilmente questa, mantenendo sempre la stessa concentrazione, è semplicemente distribuita omogeneamente in tutta l'area del bottone (Figura 77).

Questa localizzazione anomala della Sinapsina potrebbe essere, in realtà, espressione di una distribuzione alterata delle vescicole sinaptiche, oppure di cambiamenti morfologici a carico delle stesse.

Per confermare i dati immunostochimici ottenuti, il medesimo trattamento è stato fatto su giunzioni neuromuscolari di larve 14A. Queste NMJ mostrano un pattern identico a quello riscontrato nelle giunzioni di controllo. La Sinapsina, infatti, è presente all'interno di tutti i bottoni con una distribuzione periferica (Figura 78).

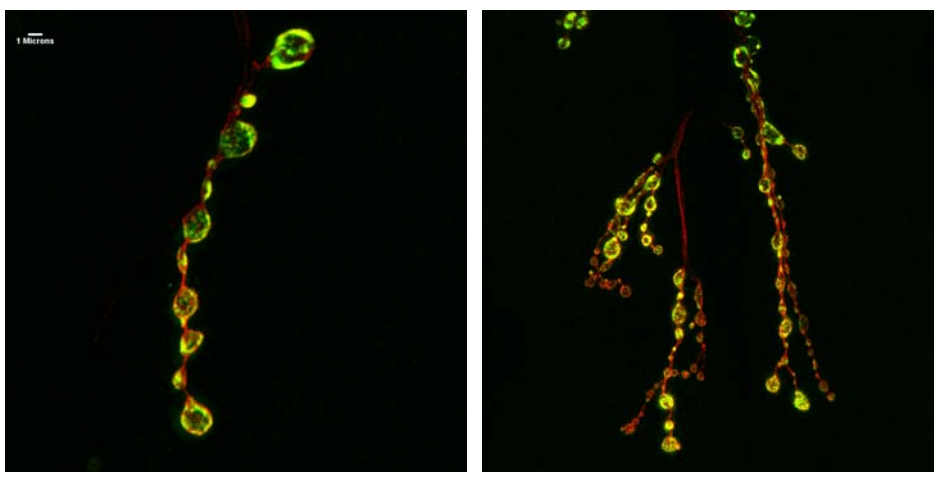


Figura 78 - Giunzioni 14A trattate con anti-Sinapsina.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-Sinapsina (verde).

4.2.2.2. Analisi della proteina Nc82

Una seconda indagine a carico del complesso pre-sinaptico ha riguardato la catalogazione e la caratterizzazione delle Zone Attive contenute nei bottoni sinaptici delle diverse giunzioni. In particolare, questo studio si è basato sull'impiego di una doppia colorazione immunostochimica con gli anticorpi anti-HRP e anti-Nc82.

Questa proteina, infatti, la cui funzione è ancora parzialmente sconosciuta, si colloca nelle Zone Attive dei bottoni sinaptici, ovvero nei punti in cui le vescicole sinaptiche si raggruppano ed aderiscono alla membrana cellulare per poi fondersi in essa.

Le immagini (Figura 79) mostrano delle giunzioni neuromuscolari di larve di controllo trattate con anticorpo anti-Nc82. Si può notare come tutta la giunzione sia caratterizzata da un colore rosso vivo, dato dall'anticorpo anti-HRP. I bottoni sono ben delineati, ordinati e disposti consecutivamente sui rami delle giunzioni. La colorazione verde data dal legame dell'anticorpo con la proteina Nc82 è visibile sotto forma di *spots* all'interno dei bottoni. La colorazione è molto nitida e si possono perciò visualizzare le singole Zone Attive dei bottoni sinaptici.

Queste appaiono come piccole zone circolari, dai contorni chiaramente delimitati, singolarmente separate e adiacenti le une alle altre. Inoltre, queste Zone Attive sembrano localizzarsi, all'interno dei bottoni, preferibilmente lungo il perimetro dei bottoni stessi, anche se alcune si ritrovano anche nelle porzioni centrali.

Infine, sembra esserci una relazione tra la numerosità delle Zone Attive e le dimensioni dei bottoni. Infatti, all'interno della stessa giunzione, bottoni sinaptici di area maggiore sembrano essere caratterizzati da un numero maggiore di Zone Attive.

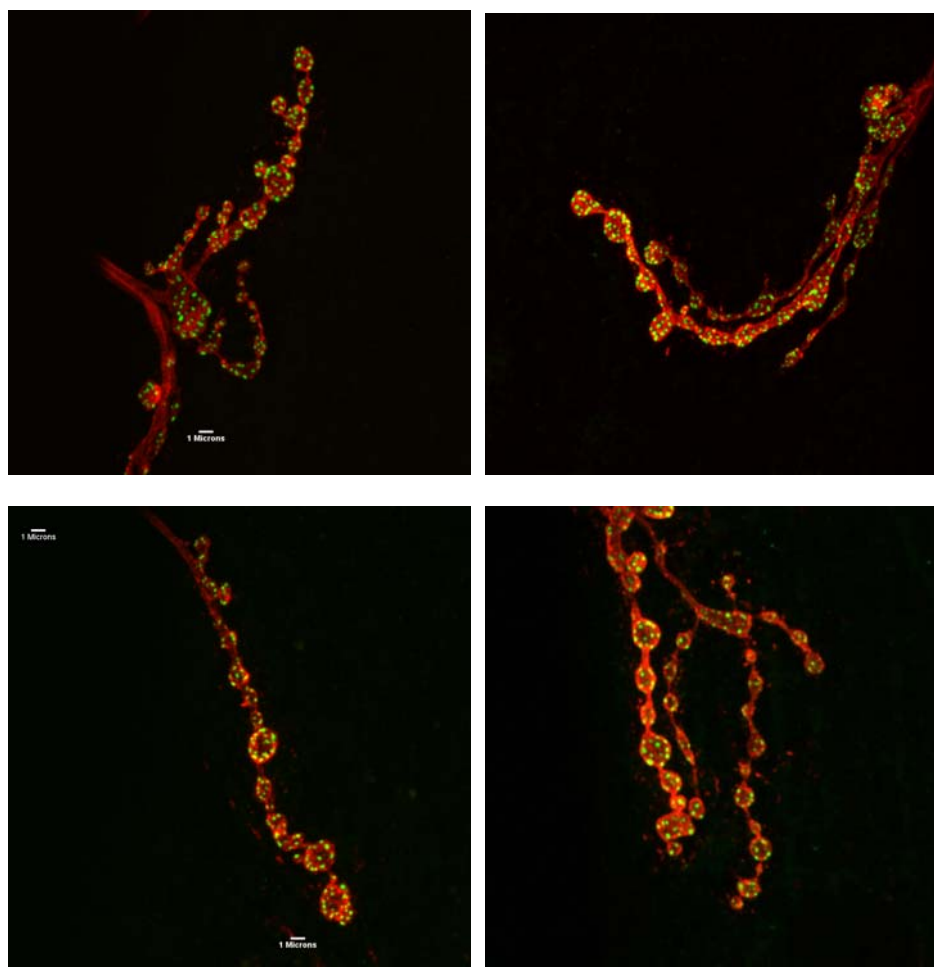


Figura 79 - Giunzioni Canton S trattate con anti-Nc82,
Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-Nc82 (verde).

Le giunzioni neuromuscolari di larve *Sply* sono state trattate con il medesimo protocollo sperimentale: doppia colorazione con gli anticorpi anti-HRP e anti-Nc82. Le NMJ *Sply*, nuovamente, evidenziano un ridotto numero di bottoni, distribuiti in minor grado di ordine rispetto ai controlli e con una morfologia leggermente alterata. La colorazione verde data dall'anti-NC82 è visibile, anche in questo caso, sotto forma di singoli *spots* all'interno dei bottoni. La colorazione è molto nitida e si possono perciò visualizzare le singole Zone Attive dei bottoni sinaptici.

Le Zone Attive *Sply* sembrano essere molto simili a quelle di controllo, essendo infatti circolari, dai contorni chiaramente delimitati, singolarmente separate e adiacenti le une alle altre. Inoltre, l'organizzazione spaziale delle Zone Attive all'interno dei bottoni *Sply*, sembra collimare con quella dei controlli. Le Zone Attive, infatti, si distribuiscono principalmente lungo il perimetro dei bottoni, ove appunto avvengono gli eventi di

esocitosi vescicolare, anche se sono presenti in notevole quantità anche nelle porzioni centrali. In base alla distribuzione spaziale all'interno dei bottoni, osservando le NMJ mutanti, sembra esservi un numero maggiore di Zone Attive nei bottoni sinaptici.

Infine, la relazione tra distribuzione numerica delle singole Zone Attive e le dimensioni dei bottoni sembra essere mantenuta. Infatti, all'interno della stessa giunzione, bottoni sinaptici di area maggiore sembrano essere caratterizzati da un numero maggiore di Zone Attive (Figura 80).

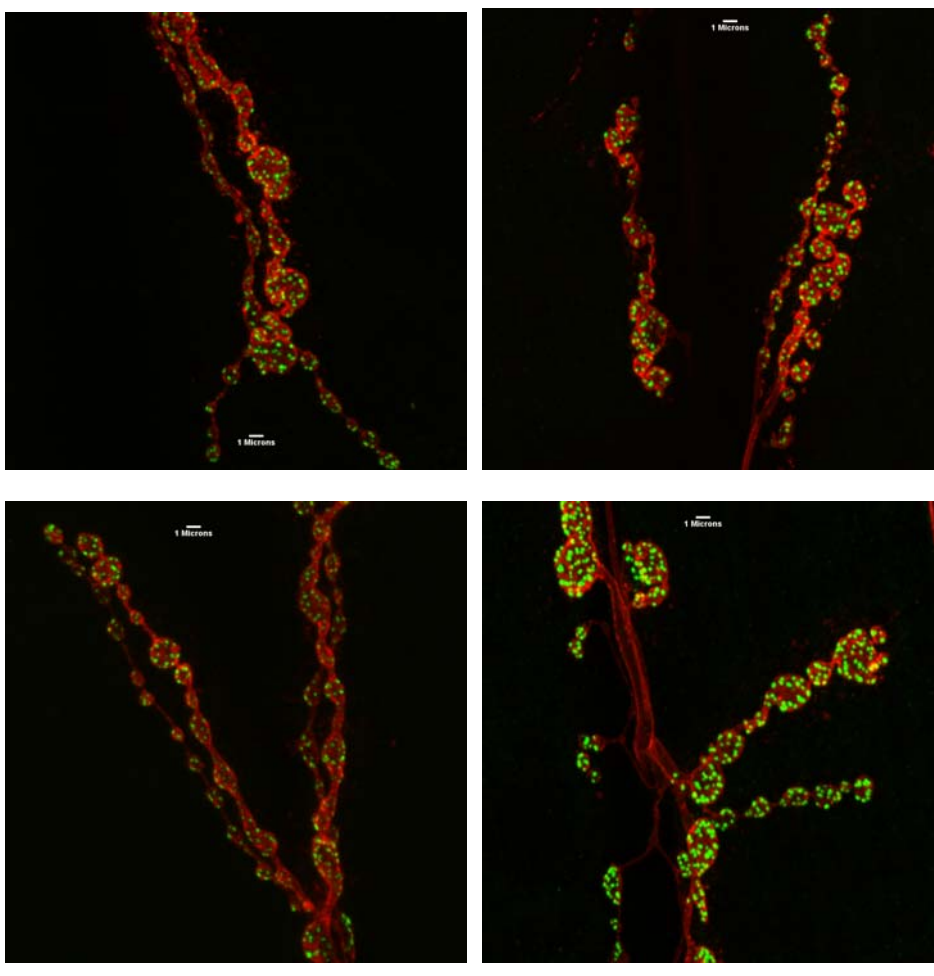


Figura 80 - Giunzioni *Sply* trattate con anti-Nc82.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-Nc82 (verde).

Per confermare i dati immunostochimici ottenuti, il medesimo trattamento è stato fatto su giunzioni neuromuscolari di larve 14A. Queste NMJ mostrano un pattern identico a quello riscontrato nelle giunzioni di controllo. Le Zone Attive evidenziate dalla proteina Nc82 sono ben delineate e numericamente paragonabili a quelle di controllo (Figura 81).

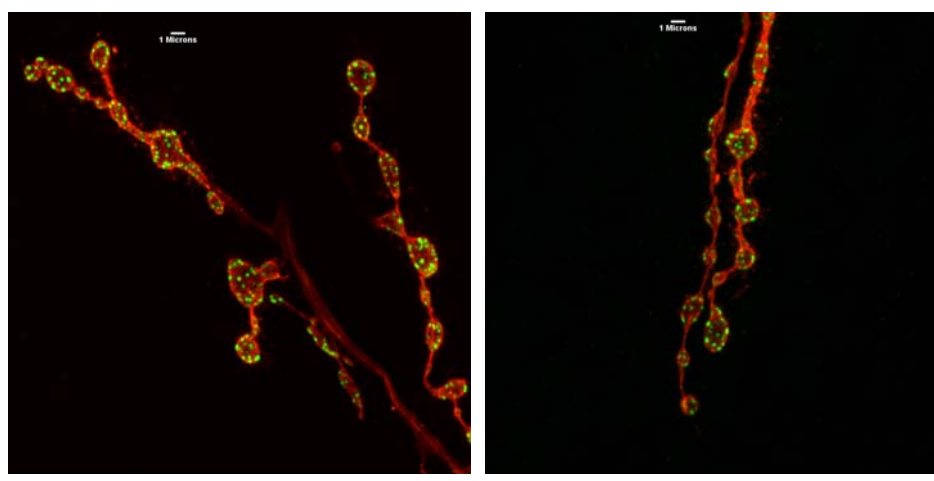


Figura 81 - Giunzioni 14A trattate con anti-Nc82.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-Nc82 (verde).

L'osservazione delle immagini ottenute mediante trattamento immunocitochimico evidenzia possibili differenze tra bottoni di controllo e mutanti in termini di quantità e dimensioni delle singole Zone Attive in essi presenti. Per confermare o confutare una possibile ipotesi di differenza numerica, le Zone Attive di tutte le giunzioni analizzate sono state catalogate, conteggiate ed analizzate morfologicamente.

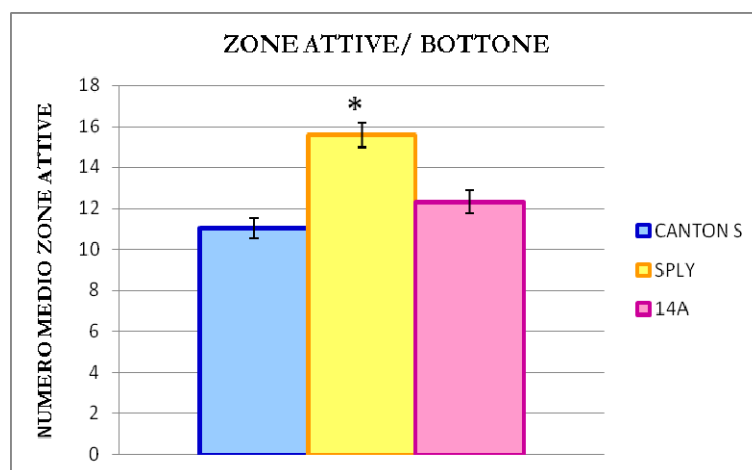


Figura 82 - Numero medio Zone Attive per bottone.

Nel grafico sono riportati i numeri medi di Zone Attive presenti nei bottoni sinaptici. CS=11±0,5 con n=1544. *Sply*=15,6±0,6 con n=2180. 14A=12±0,6 con n=1231. t-test significativo con $p \leq 0,05$ tra i controlli e *Sply*. (CS e *Sply*: $p=1,822E-08$; CS e 14A: $p=0,09$).

Il conteggio delle Zone Attive all'interno dei singoli bottoni sinaptici ha riguardato una valutazione di 140 bottoni sinaptici provenienti da 7 giunzioni neuromuscolari differenti da 7 larve diverse sia per i controlli che per i mutanti, mentre per le 14A sono stati analizzati 100 bottoni provenienti da 7 giunzioni. In questo modo sono state numerate 1544 Zone Attive per i Canton S, 2180 per le *Sply* e 1231 per le 14A.

Inoltre è stato stimato il numero medio di Zone Attive presenti in un bottone di controllo, *Sply* e 14A. In questo modo, è stato possibile confermare l'ipotesi fatta precedentemente: ovvero che i bottoni *Sply* siano caratterizzati da una quantità maggiore di Zone Attive (Figura 82). Le Zone Attive presenti nei bottoni di controllo e nei revertanti sono numericamente molto simili.

Infine è stato quantificato il numero medio di Zone Attive presenti per unità di area del bottone sinaptico espressa in micrometri quadrati (Figura 83).

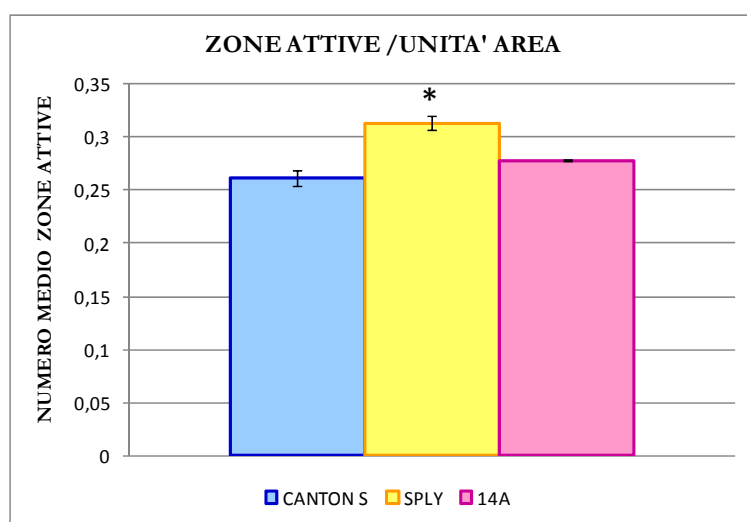


Figura 83 - Numero medio Zone Attive per Unità Area Sinaptica.

Nel grafico sono riportati i numeri medi di Zone Attive presenti per unità di area sinaptica. CS=0,26±0,007 con n=1544. *Sply*=0,31±0,006 con n=2180. 14A=0,27±0,007 con n=1231. t-test significativo con $p \leq 0,05$ tra i controlli e *Sply*. (CS e *Sply*: $p=0,00034$; CS e 14A: $p=0,02$).

In base a quest'analisi, risulta evidente come rispetto all'unità di area sinaptica siano presenti nei bottoni mutanti un numero maggiore di Zone Attive rispetto ai bottoni di controllo e revertanti. Questo dato chiaramente collima con il dato numerico riscontrato precedentemente.

Mediante l'osservazione immunostochimica, si era ipotizzata una relazione tra il numero di Zone Attive e le dimensioni dei bottoni. In forza di tale ipotesi, all'interno della stessa giunzione, bottoni sinaptici di area maggiore dovrebbero essere caratterizzati da un numero maggiore di Zone Attive.

Per confermare tale ipotesi e per valutarne l'andamento nei differenti ceppi animali, è stato rapportato il numero medio delle singole Zone Attive di ogni singolo bottone sinaptico con l'area dello stesso (Figura 84).

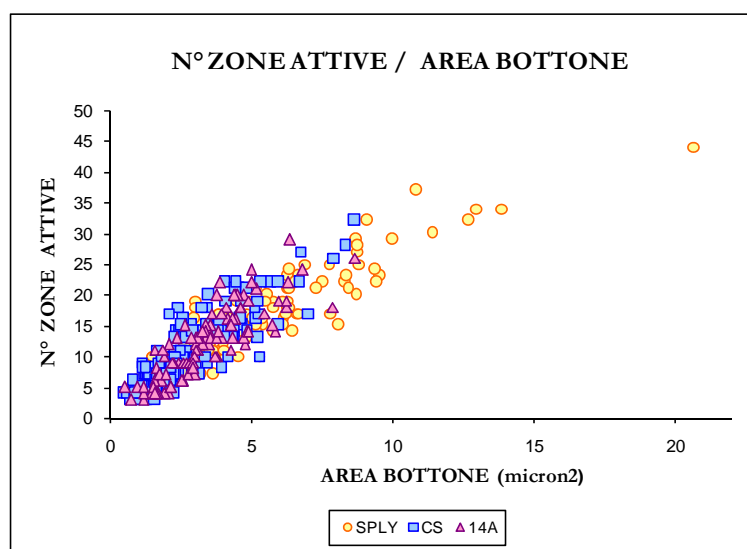


Figura 84 - Numero medio Zone Attive per area del bottone.

Nel grafico, i numeri medi delle Zone Attive conteggiate sono distribuiti in base all'area, espressa in micrometri quadrati, dei bottoni sinaptici di provenienza.

La distribuzione del numero di Zone Attive rispetto all'area dei singoli bottoni di provenienza convalida l'idea di una relazione tra la numerosità delle singole Zone Attive e le dimensioni dei bottoni. Infatti, risulta evidente come il numero di Zone Attive presenti nel bottone aumenti con l'aumentare delle dimensioni del bottone stesso.

Inoltre, si nota come i numeri medi delle Zone Attive dei bottoni di controllo e revertanti siano contenuti all'interno di un intervallo quantitativo e dimensionale molto simile. Contrariamente, numeri medi delle Zone Attive dei bottoni mutanti ricadono all'interno di un intervallo quantitativo e dimensionale spostato rispetto a quello dei controlli. Tale spostamento è in direzione di quantità e dimensioni maggiori.

L'osservazione delle immagini ottenute mediante trattamento immunostochimico evidenzia una maggiore intensità di fluorescenza percepita dalle Zone Attive mutanti rispetto a quelle di controllo. In realtà, maggiore intensità potrebbe essere espressione di

una concentrazione maggiore di proteina. Tale aumento della presenza della proteina nelle Zone Attive potrebbe corrispondere ad alterazioni morfologico/dimensionali delle Zone Attive stesse.

Questo tipo di analisi morfologica ha permesso di determinare l'area delle singole Zone Attive ed il suo valore medio. In base a questi dati, risulta evidente come l'area media delle singole Zone Attive sia maggiore nei mutanti rispetto ai controlli. Inoltre, i valori medi di controlli e revertanti sono simili (Figura 85).

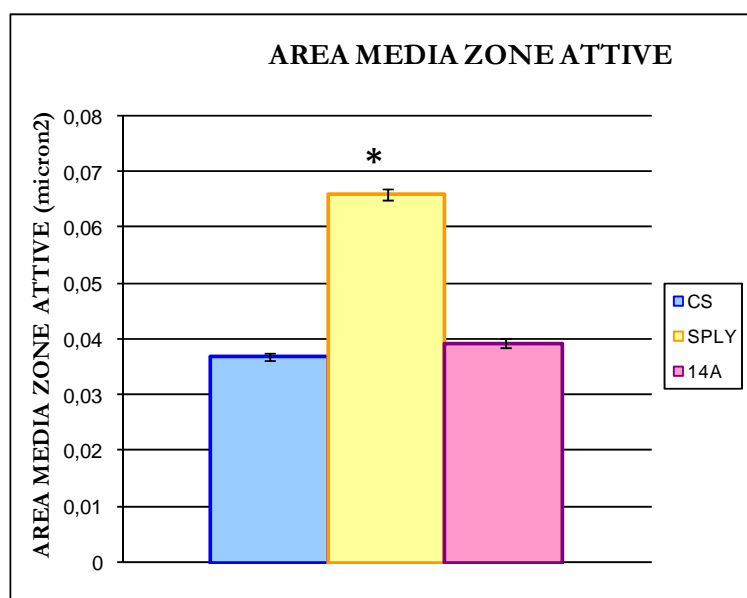


Figura 85 - Area media delle singole Zone Attive.

Nel grafico sono riportati i valori medi delle aree delle singole Zone Attive presenti nei differenti bottoni sinaptici. CS=0,035±0,0005 con n=1544. *Sply*=0,066±0,0008 con n=2180. 14A=0,037±0,0007 con n=1231. t-test significativo con $p \leq 0,05$ tra i controlli e *Sply*. (CS e *Sply*: $p=3,28E-31$; CS e 14A: $p=0,052$).

I singoli valori delle singole aree delle diverse Zone Attive di ciascun bottone sono stati sommati, ottenendo così una misura corrispondente alla "area totale attiva" all'interno del bottone stesso. A ciò corrisponderebbe l'area totale attiva dal punto di vista sinaptico all'interno del singolo bottone (Figura 86).

I valori medi di questa variabile indicano chiaramente come i bottoni *Sply* siano caratterizzati da un'area totale attiva di dimensioni notevolmente maggiori rispetto ai bottoni di controllo. Inoltre, i bottoni di controllo e mutanti evidenziano un'area totale attiva di simile grandezza (Figura 86).

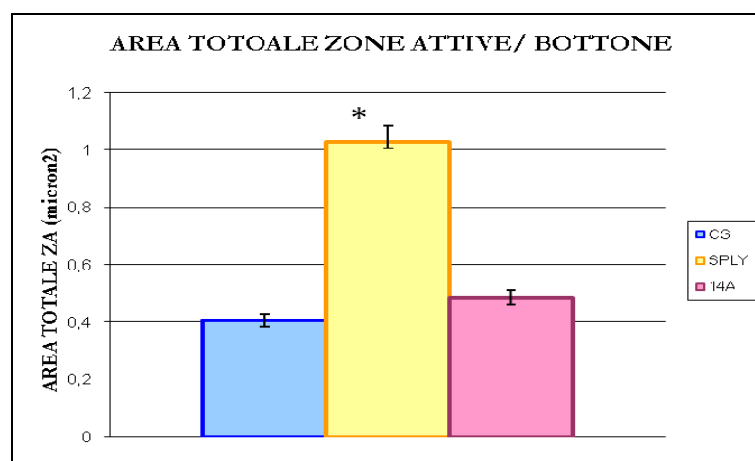


Figura 86 - Area totale delle Zone Attive per bottone.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'area totali delle Zone Attive presenti nei differenti bottoni sinaptici. CS=0,4±0,02 con n=1544. Sply=1,03±0,05 con n=2180. 14A=0,4±0,03 con n=1231. t-test significativo con $p \leq 0,05$ tra i controlli e Sply. (CS e Sply: $p=1,51E-19$; CS e 14A: $p=0,026$).

Le dimensioni dell'area totale attiva potrebbero essere relazionate alle dimensioni del bottone stesso, derivando probabilmente dall'interazione tra il numero di Zone Attive e l'area del bottone. Per questo motivo, è stata valutata la distribuzione delle differenti aree totali attive in relazione con le dimensioni dei rispettivi bottoni sinaptici d'appartenenza (Figura 87).

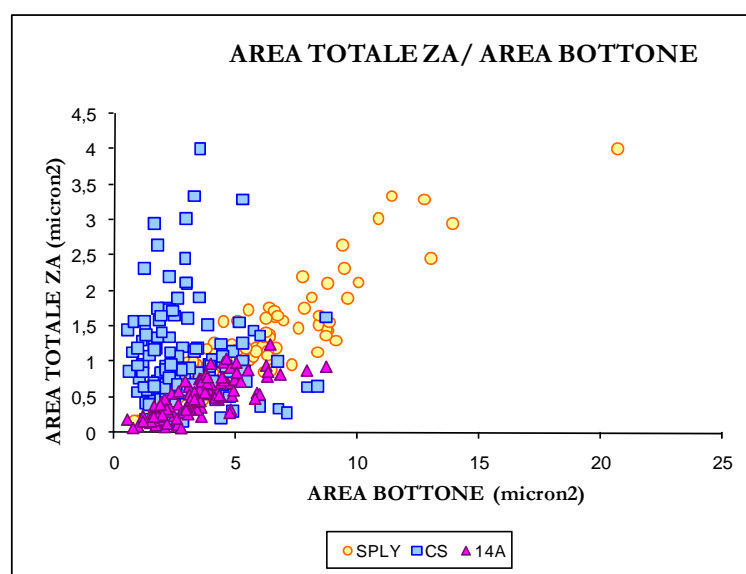


Figura 87 - Area totale Zone Attive per area del bottone.

Nel grafico, le singole aree totali attive conteggiate sono distribuite in base all'area, espressa in micrometri quadrati, dei bottoni sinaptici di provenienza.

In base a tali distribuzioni, risulta evidente come le aree totali attive dei bottoni di controllo e revertanti siano contenute all'interno di un intervallo quantitativo e dimensionale molto simile. Contrariamente, le aree attive totali dei bottoni mutanti ricadono all'interno di un intervallo quantitativo e dimensionale spostato rispetto a quello dei controlli. Tale spostamento è in direzione di quantità e dimensioni maggiori.

Considerando i dati ottenuti, i bottoni sinaptici *Sply* appaiono essere caratterizzati da un numero maggiore di Zone Attive contraddistinte da dimensioni maggiori. La sommatoria delle singole aree attive ha evidenziato un'area totale attiva di membrana notevolmente maggiore rispetto a quella riscontrata nei bottoni di controllo. Questo spostamento verso quantità e dimensioni maggiori delle Zone Attive è chiaramente correlato all'aumento delle dimensioni dei bottoni sinaptici stessi.

Per comprendere se i bottoni mutanti siano effettivamente caratterizzati da un accrescimento dell'area totale attiva e quindi contraddistinti da porzioni maggiori di membrana attiva disponibile ad eventi di eso-endocitosi, è necessario valutare il rapporto di bilanciamento tra porzioni attive ed inattive della membrana stessa. Tale equilibrio può essere espresso come il rapporto tra l'area totale del bottone e l'area totale attiva in esso contenuta. Tale rapporto è stato denominato come "Indice di frazione attiva" del bottone (Figura 88).

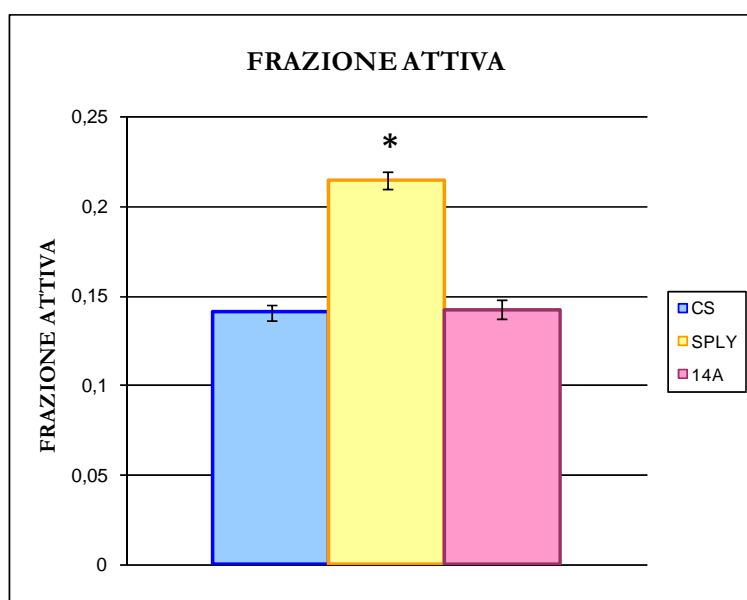


Figura 88 - Indice di frazione attiva.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'indice di frazione attiva per i differenti bottoni sinaptici. CS=0,14±0,004 con n=1544. *Sply*=0,21±0,004 con n=2180. 14A=0,14±0,005 con n=1231. t-test significativo con $p \leq 0,05$ tra i controlli e *Sply*. (CS e *Sply*: $p=8,95E-25$; CS e 14A: $p=1,96$)

L'indice, determinato per le differenti tipologie di animali, designa uno sbilanciamento all'interno dei bottoni mutanti verso una porzione di membrana attiva di dimensioni maggiori rispetto a quella dei controlli. Contrariamente le frazioni attive dei controlli e dei revertanti mostrano valori molto simili.

Questo dato frazionario evidenzia come i bottoni mutanti siano effettivamente caratterizzati da un accrescimento dell'area totale attiva e quindi contraddistinti da porzioni maggiori di membrana attiva disponibile ad eventi di eso-endocitosi.

4.2.2.3. Analisi della proteina DLG

Successivamente all'analisi a carico del complesso pre-sinaptico, si è cercato di valutare specifiche strutture attive nella regione post-sinaptica. Le larve Canton S e *Sph* sono state sottoposte ad un nuovo protocollo immunostochimico per ottenere una doppia colorazione capace di evidenziare le strutture principali del sistema nervoso centrale di nostro interesse, ed allo stesso tempo di rendere visibili specifiche strutture a livello post-sinaptico, in particolare per lo studio della presenza e dello sviluppo del reticolo subsinaptico (SSR). L'SSR è responsabile della corretta localizzazione ed attività di tutti i componenti molecolari coinvolti nell'attività post-sinaptica, come, ad esempio, i recettori del neurotrasmettitore. In particolare, nei tardi stadi larvali, il reticolo subsinaptico è estremamente sviluppato e costituito da un insieme di membrane altamente convolute. Questa specifica struttura membranosa è localizzata nell'intera periferia dei bottoni sinaptici, racchiudendoli tridimensionalmente al suo interno.

Al fine di poter evidenziare l'intera struttura del reticolo subsinaptico e valutarne lo stato di sviluppo e conformazione, è stato utilizzato l'anticorpo anti-DLG. Questo anticorpo riconosce e lega la proteina DLG altamente presente nell'SSR ed indispensabile per una corretta formazione delle strutture sinaptiche. Questa, infatti, costituisce una sorta di impalcatura sulla quale vengono ancorati tutti gli attori coinvolti nell'attività post-sinaptica, primi tra tutti i recettori del glutammato.

Per quanto riguarda le giunzioni di controllo, si osserva, in rosso la totale struttura del sistema nervoso marcata dall'anticorpo anti-HRP che evidenzia le ramificazioni assoniche ed i bottoni sinaptici; mentre in verde, l'anticorpo anti-DLG evidenzia il sistema di membrane dell'SSR, il quale circonda e delimita i singoli bottoni sinaptici. La maggior parte dei bottoni manifesta, infatti, un segnale verde diffuso lungo il perimetro esterno. Questi bottoni risultano essere rotondeggianti, disposti in modo ordinato lungo tutto il braccio della giunzione.

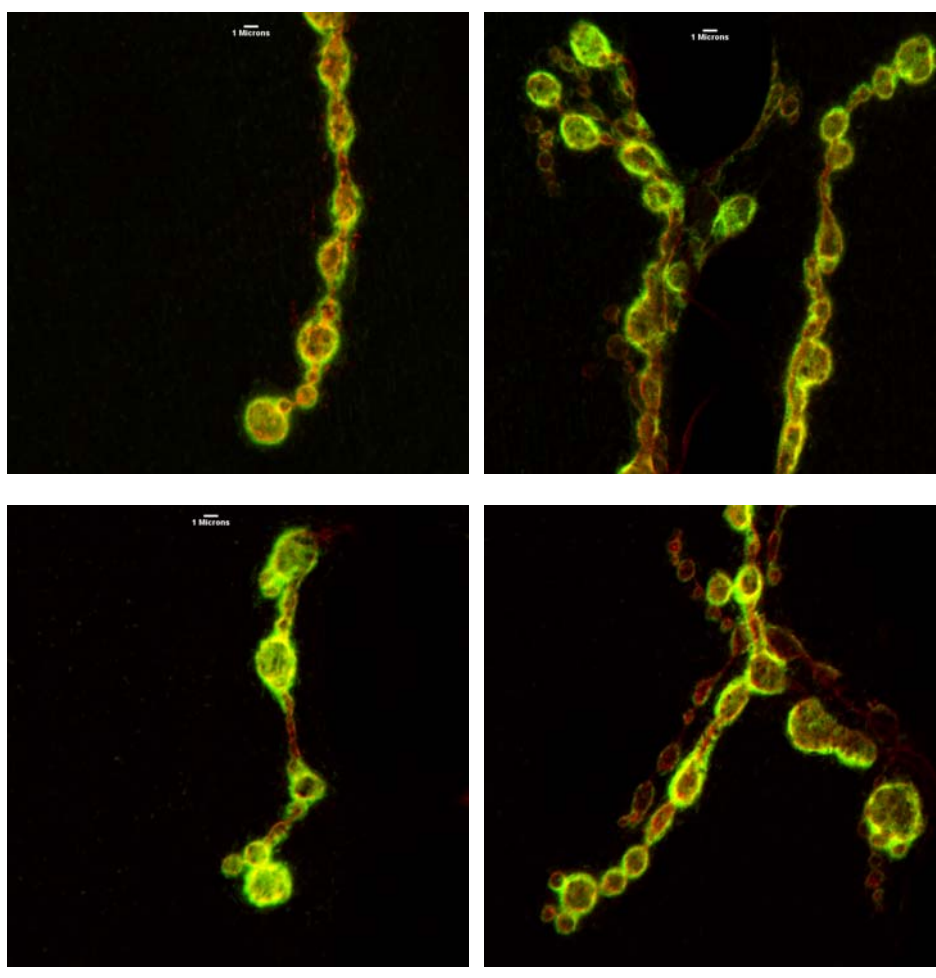


Figura 89 - Giunzioni Canton S trattate con anti-DLG.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-DLG (verde).

Nei diversi campioni entrambi i segnali sono chiari, luminosi, specifici e localizzati: in tutte le giunzioni analizzate, il segnale dell'anticorpo anti-HRP e dell'anticorpo-DLG risultano ben evidenti e definiti. In più, si può notare come i due segnali, a livello dei singoli bottoni, siano concentrici: il segnale dell'anti-DLG contiene quello dell'anti-HRP, risultando essere sovrapposti a livello della superficie esterna del bottone. Questa co-localizzazione produce un segnale di colore giallo, che risulta dalla sovrapposizione della fluorescenza verde a quella rossa.

Valutando i singoli bottoni, appare evidente come la marcatura verde risulti essere maggiormente intensa lungo la parete esterna dei bottoni. Analizzando l'andamento dei due tipi di fluorescenza lungo il diametro dei bottoni, si nota come i due segnali siano uno contenuto nell'altro e caratterizzati dalla stessa intensità. Inoltre, risulta evidente come il segnale del DLG sia localizzato nella zona perimetrale del bottone stesso, adiacente alla membrana sinaptica (Figura 90).

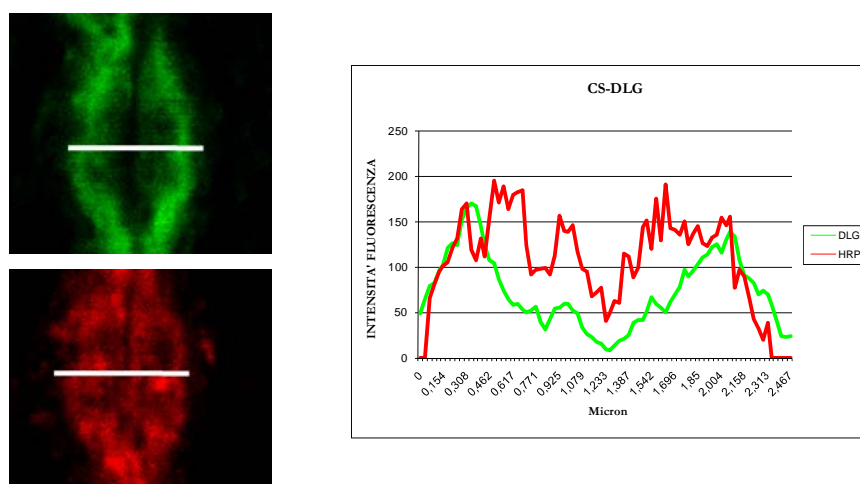


Figura 90 - Analisi della distribuzione di DLG in bottoni Canton S.

Nella foto è riportato un bottone sinaptico tratto da una giunzione di controllo. In rosso la marcatura anti-HRP ed in verde quella anti-DLG. Nel grafico sono riportati: in rosso l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-HRP in termini di intensità della fluorescenza rapportata alla distanza (diametro) misurata in micron. In verde, l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-DLG.

I campioni di larve *Sply*, sono stati sottoposti allo stesso trattamento dei controlli: una doppia colorazione con anti-HRP e anti-DLG (Figura 91). Come nella colorazione precedente, l'anti-HRP, che rende visibile l'intera giunzione colorandola di rosso, evidenzia delle specifiche caratteristiche morfologiche della giunzione neuromuscolare dei mutanti *Sply*. Infatti questa è caratterizzata da bottoni di dimensioni maggiori e di forma morfologica anomala, presenti in numero inferiore e maggiormente distanziati lungo la giunzione

L'anticorpo anti-DLG legato alla proteina DLG, localizzata a livello del sistema di membrane dell'SSR, circonda e delimita i singoli bottoni appartenenti alla giunzione. La maggior parte dei bottoni, però, manifesta un segnale verde relativamente debole e diffuso lungo il perimetro esterno. Contrariamente ai controlli, in questo caso il segnale del DLG si riscontra come una fluorescenza molto meno intensa, meno chiara e poco definita lungo alcuni bottoni di dimensioni maggiori.

La notevole diminuzione del segnale del DLG rende meno visibile la concentricità dei due segnali. Infatti, viene completamente persa la sovrapposizione delle due fluorescenze rilevabile come una colorazione arancione.

Inoltre, in forza di questa riduzione del segnale verde, si riscontra una definizione migliore del contorno dei bottoni *Sply*, determinata dalla nitidezza della marcatura dell'anti-HRP.

Infine, all'interno della stessa giunzione sono presenti bottoni di dimensioni maggiori con la marcatura verde, e contemporaneamente braccia della giunzione con bottoni completamente privi della marcatura verde.

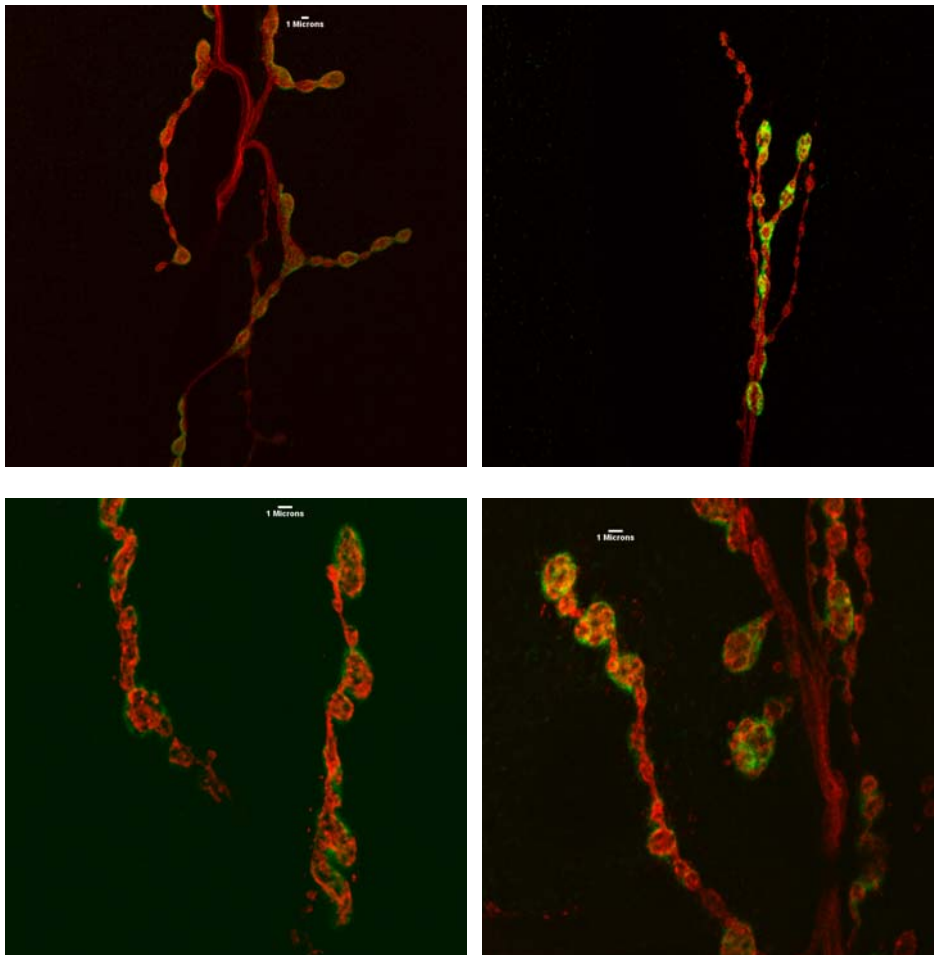


Figura 91 - Giunzioni *Sply* trattate con anti-DLG.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-DLG (verde).

Valutando i singoli bottoni, appare evidente come la marcatura verde risulti essere presente lungo il bordo esterno dei bottoni. In particolare, risulta evidente come il segnale del DLG non sia nitido e chiaramente delimitato all'esterno dei bottoni, andando quindi a perdere la corrispondenza perfetta con la marcatura anti-HRP perimetrale (Figura 92).

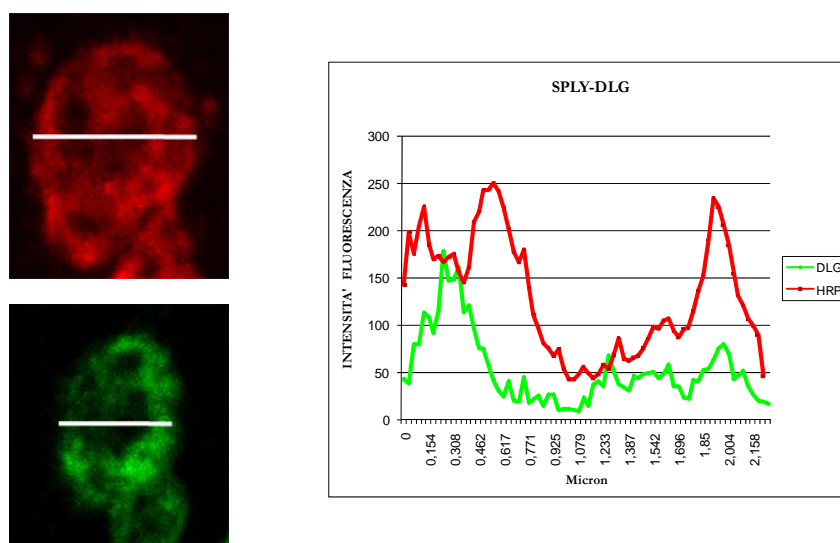


Figura 92 - Analisi della distribuzione di DLG in bottoni *Sply*.

Nella foto è riportato un bottone sinaptico tratto da una giunzione di controllo. In rosso la marcatura anti-HRP ed in verde quella anti-DLG. Nel grafico sono riportati: in rosso l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-HRP in termini di intensità della fluorescenza rapportata alla distanza misurata in micron. In verde, l'andamento del segnale dell'anticorpo anti-DLG.

Infine, analizzando gli andamenti dei due differenti anticorpi lungo il diametro dei bottoni, si nota come i due segnali siano ancora uno contenuto nell'altro, ma non più caratterizzati dalla stessa intensità. Infatti, la fluorescenza verde risulta essere notevolmente ridotta in termini d'intensità, soprattutto nei punti perimetrali ove nei controlli era elevata. Questa, però, è diminuita anche nelle altre zone del bottone. Inoltre, tale diminuzione del segnale è notevole sia rispetto al medesimo segnale nei controlli, sia nei confronti del segnale dell'anti-HRP riscontrato nei stessi bottoni.

Oltre ad una alterazione di intensità si osserva anche una delocalizzazione del segnale DLG dalla zona perimetrale del bottone, che risulta invece distribuito in modo omogeneo in tutta l'area del bottone (Figura 92).

Per confermare i dati immunoistochimici ottenuti, il medesimo trattamento è stato fatto su giunzioni neuromuscolari di larve 14A. Queste NMJ mostrano un pattern identico a quello riscontrato nelle giunzioni di controllo. Il DLG, infatti, è presente all'esterno di tutti i bottoni con una distribuzione periferica (Figura 93).

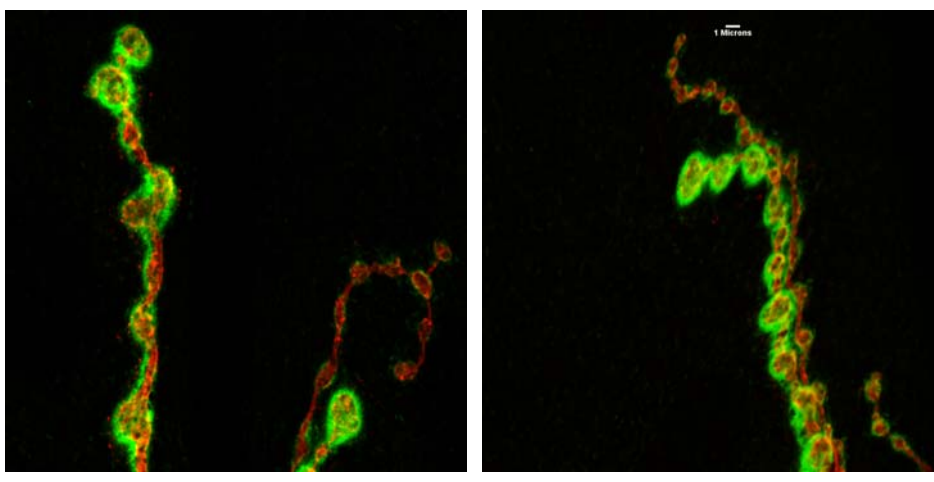


Figura 93 - Giunzioni 14A trattate con anti-DLG.

Le NMJ riportate sono state trattate con anti-HRP (rosso) e con anti-DLG (verde).

4.2.3. ANALISI FUNZIONALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

Il colorante FM1-43 è stato impiegato in un protocollo sperimentale *in vivo* al fine di osservare e valutare il ciclo di endo- ed eso-citosi vescicolare a livello dei bottoni delle giunzioni muscolari localizzate sulle fibre muscolari 6 e 7 dei segmenti 2 e 3. Queste NMJ sono state prescelte in quanto composte esclusivamente da bottoni sinaptici contenenti come unico neurotrasmettitore il glutammato.

I bottoni glutamatergici, abbinati ad una tecnica *in vivo*, risultano, infatti, essere degli ottimi “indicatori” ai fini di una valutazione completa del ciclo vescicolare. Gli eventi, che compongono questo processo, sono direttamente osservabili e monitorabili.

In particolare, la larva appena dissezionata, viene mantenuta spillata sulla piastra petri, con il fondo di sylgard, immersa in HL3A. In questo modo i tessuti dell'apparato muscolare e l'intero sistema nervoso vengono mantenuti *in vivo* (Figura 94).

In primis, la larva viene incubata per 5 minuti con FM1-43 (4 μ M) in HL3B. Durante questo intervallo temporale, il potassio contenuto nella soluzione d'incubazione stimola l'attività sinaptica a livello dei bottoni sinaptici, determinando quindi eventi di endocitosi, che condurranno all'endocitosi del colorante all'interno dei terminali pre-sinaptici.

Finita l'incubazione, viene eseguito un ciclo di lavaggi con HL3A ed infine il campione viene immediatamente analizzato con microscopio confocale. Questa prima fase viene definita comunemente: FASE DI CARICO (Figura 94).

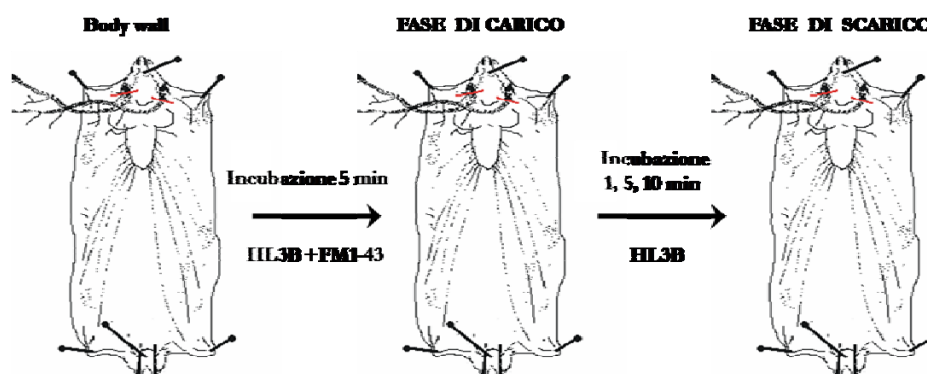


Figura 94 - Analisi funzionale della giunzione neuromuscolare.

Nell'immagine sono riportati le fasi principali di questo protocollo sperimentale: dopo avere ottenuto il *Body wall* della larva mediante dissezione, viene eseguita prima la fase di carico e successivamente quella di scarico.

La fase successiva consiste nella valutazione diretta degli eventi conseguenti di esocitosi. Questa seconda fase viene definita comunemente: FASE DI SCARICO. In particolare, si incuba nuovamente il campione solo con HL3B, determinando quindi una nuova stimolazione sinaptica che si tradurrà in nuovi eventi di endocitosi e conseguenti eventi di esocitosi. Questa seconda fase di stimolazione sinaptica è stata eseguita a diversi intervalli temporali: a 1 minuto, 5 minuti e 10 minuti. In questo modo infatti è stato possibile seguire gli eventi di *recycling* vescicolare presenti in archi stimolatori brevi, medi e a medio-lungo termine. La valutazione del *recycling* vescicolare è resa possibile dal continuo *turn-over* del FM1-43 all'interno dei bottoni. Finita l'incubazione, viene eseguito un ciclo di lavaggi con HL3A ed infine il campione viene immediatamente analizzato con microscopio confocale (Figura 94).

4.2.3.1. Analisi Funzionale con scarico di 1 minuto

I campioni dissezionati, incubati con il colorante FM1-43, vengono stimolati chimicamente mediante l'azione del potassio (concentrazione) disciolto in soluzione per un intervallo temporale di 5 minuti. Quest'azione stimolatrice, a carico delle giunzioni e dei bottoni che la compongono, si traduce nell'attivazione del processo di endo- eso-citosi all'interno dei bottoni stessi (FASE DI CARICO)

La realizzazione dei differenti singoli eventi di endocitosi lungo la membrana sinaptica dei bottoni si manifesta grazie all'internalizzazione del colorante FM1-43 nelle singole vescicole sinaptiche appena gemmate dalla membrana stessa sul lato interno del bottone.

In seguito, dopo avere lavato via l'eccesso di FM1-43, una seconda stimolazione chimica della durata di un minuto, sempre con potassio, si traduce nel rilascio, per esocitosi, del colorante nello spazio esterno ai bottoni sinaptici (FASE DI SCARICO).

Questo protocollo sperimentale è stato testato sequenzialmente su larve di controllo e su larve mutanti. Per ogni campione, sono state analizzate le NMJ delle fibre 6 e 7 del segmento 2 o 3 di destra e per tutta la durata dell'esperimento è stata monitorata la variazione del segnale della sonda fluorescente.

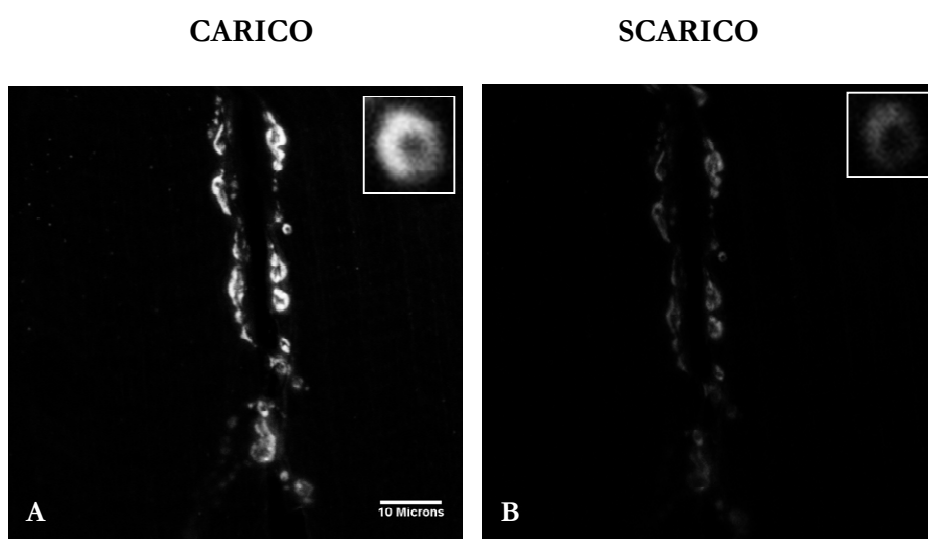


Figura 95 - Funzionalità delle NMJ larvali di Canton S con scarico di 1 minuto.

In figura A è riportata una NMJ di controllo alla fine della fase di carico. In figura B la medesima NMJ alla fine della fase di scarico.

I campioni di controllo, sottoposti a questo protocollo sperimentale, alla fine della fase di carico, mostrano giunzioni neuromuscolari estremamente luminose e facilmente osservabili. In particolare, queste sono caratterizzate da una fluorescenza molto intensa e nitida esclusivamente a livello dei bottoni, (Figura 95-A).

Il segnale del colorante FM1-43 è, quindi, chiaramente limitato all'interno dei bottoni sinaptici, confermando così la specificità del protocollo utilizzato. Infatti, questa specifica localizzazione della sonda è diretta conseguenza della sua internalizzazione determinata da eventi d'endocitosi sinaptica.

I bottoni di controllo si presentano come piccole sfere luminose, caratterizzate da una fluorescenza molto intensa. In particolare, questa, all'interno dei bottoni assume un'organizzazione spaziale specifica. Infatti, il segnale luminoso si distribuisce preferenzialmente lungo i bordi interni dei bottoni sinaptici, lasciando completamente libera la porzione centrale degli stessi. Questa specifica localizzazione corrisponde con la

distribuzione spaziale all'interno dei bottoni del pool di vescicole sinaptiche coinvolte nel *recycling* vescicolare veloce (*Ready Releasable Pool*, RRP).

Alla fine della fase di scarico, le giunzioni di controllo risultano quasi completamente invisibili. Una debole fluorescenza permane, infatti, esclusivamente lungo il perimetro interno dei bottoni. In particolare, il segnale del colorante non solo è caratterizzato da una minore intensità ma anche da una distribuzione spaziale ristretta rispetto a quella alla fine della fase di carico. Contemporaneamente, la porzione centrale completamente scura e libera assume dimensioni maggiori (Figura 95-B).

La variazione del segnale in termini di intensità della fluorescenza ed in termini di distribuzione spaziale all'interno dei bottoni sinaptici è espressione degli eventi di endo-/eso-citosi stimolati dal potassio e coinvolgenti il RRP.

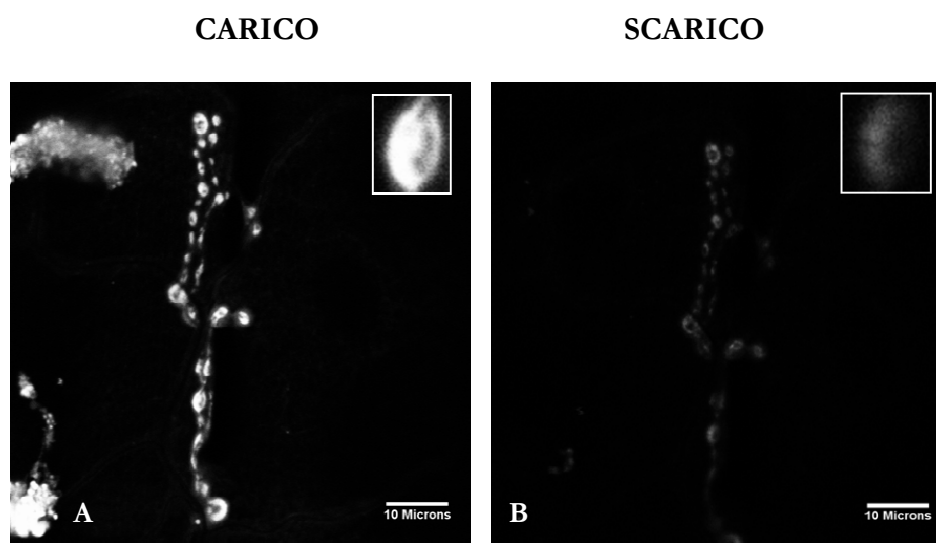


Figura 96 - Funzionalità delle NMJ larvali di *Sply* con scarico di 1 minuto.

In figura A è riportata una NMJ mutante alla fine della fase di carico. In figura B la medesima NMJ alla fine della fase di scarico.

I campioni mutanti, sottoposti a questo protocollo sperimentale, alla fine della fase di carico, mostrano giunzioni neuromuscolari estremamente luminose e facilmente osservabili. In particolare, queste sono caratterizzate da una fluorescenza estremamente intensa e nitida a livello dei bottoni, mentre permangono scure ed invisibili le altre componenti della NMJ (Figura 96-A).

I bottoni mutanti si presentano come piccoli globi luminosi, caratterizzate da una fluorescenza molto intensa. In particolare, questa, all'interno dei bottoni perde l'organizzazione spaziale riscontrata nei controlli. Infatti, il segnale luminoso non si distribuisce preferenzialmente lungo i bordi interni dei bottoni sinaptici, ma riempie

completamente l'area dei bottoni. Questa localizzazione anomala potrebbe corrispondere ad un'alterazione della distribuzione spaziale all'interno dei bottoni del pool RRP di vescicole sinaptiche coinvolte nel *recycling* vescicolare veloce.

Alla fine della fase di scarico, le giunzioni mutanti risultano ancora abbastanza visibili. La fluorescenza, anche se ridotta, permane, infatti, esclusivamente lungo il perimetro interno dei bottoni. In particolare, il nuovo segnale del colorante è caratterizzato da una nuova intensità, nettamente inferiore, ma anche da una nuova distribuzione spaziale rispetto a quella alla fine della fase di carico. Il colorante sembra ora distribuirsi lungo il perimetro interno dei bottoni, evidenziando la porzione centrale scura e vuota (Figura 96-B).

La variazione del segnale in termini di intensità della fluorescenza ed in termini di distribuzione spaziale all'interno dei bottoni sinaptici è espressione degli eventi di endo-/eso-citosi stimolati dal potassio e coinvolgenti il RRP. Risulta evidente, come questa variazione, nei bottoni *Sph*, sia collegata non solo all'azione dello stimolo chimico ma soprattutto ad una probabile anomalia nella localizzazione delle vescicole sinaptiche.

L'osservazione delle immagini ottenute mediante trattamento *in vivo* evidenzia possibili differenze tra bottoni di controllo e mutanti in termini d'intensità e localizzazione del segnale del colorante FM1-43. Per confermare o confutare una possibile ipotesi di differenza tra i due ceppi animali, è stato monitorato il segnale nelle diverse fasi di carico e scarico, valutandolo in termini di intensità complessiva della fluorescenza nel singolo bottone.

I singoli valori ottenuti per i diversi singoli bottoni sono stati, infine, valutati complessivamente, allo scopo di ottenere una valutazione media della fluorescenza alla fine della fase di carico ed alla fine della fase di scarico per i bottoni di controllo e mutanti.

L'analisi della fluorescenza del colorante FM1-43, internalizzato all'interno dei bottoni alla fine della fase di carico, evidenzia una notevole differenza tra bottoni di controllo e mutanti. In particolare, l'intensità della fluorescenza, stimata nei controlli, è stata considerata come indice massimo di internalizzazione e quindi standardizzata ad un valore pari al 100%. Successivamente, i valori medi calcolati nei bottoni mutanti sono stati rapportati al valore massimo percentuale dei controlli (Figura 97).

La comparazione, tra questi valori medi, sottolinea una discrepanza di notevole entità tra controlli e mutanti. Infatti, i bottoni *Sph*, alla fine della fase di carico, sono caratterizzati da una fluorescenza del segnale quasi doppia rispetto ai controlli, probabile espressione di una maggiore internalizzazione del colorante.

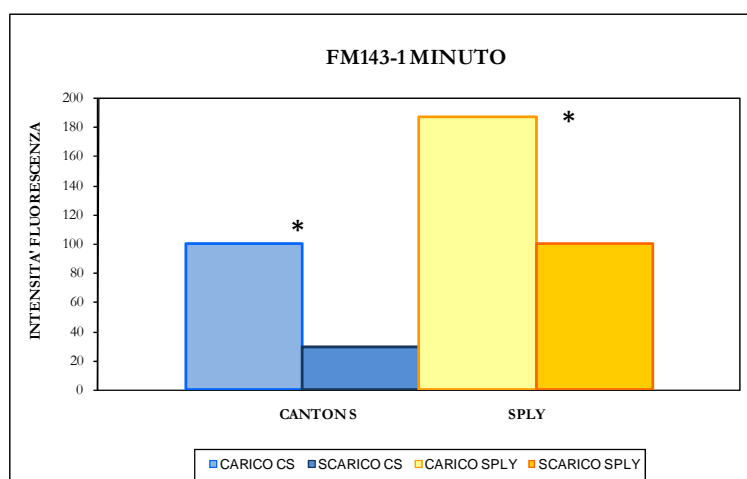


Figura 97 - Funzionalità delle giunzioni NMJ larvali di Canton S e *Sply* con scarico di 1 minuto.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'intensità della fluorescenza per singolo bottone alla fine della fase di carico e di scarico per i controlli e per i mutanti. Carico: CS=100±0,01 con n=80. *Sply*=181,6±0,01 con n=120. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=6,735E-22). Scarico: CS=29,6±0,01 con n=80. *Sply*=99,7±0,01 con n=120. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=4,18E-22).

La medesima valutazione è stata eseguita alla fine della fase di scarico. I valori medi stimati, sia per i controlli che per i mutanti, risultano chiaramente ridotti rispetto alle rispettive fasi di carico. Ciò indica che all'interno di tutti i bottoni si sono verificati eventi di esocitosi che hanno condotto ad una perdita parziale della fluorescenza iniziale.

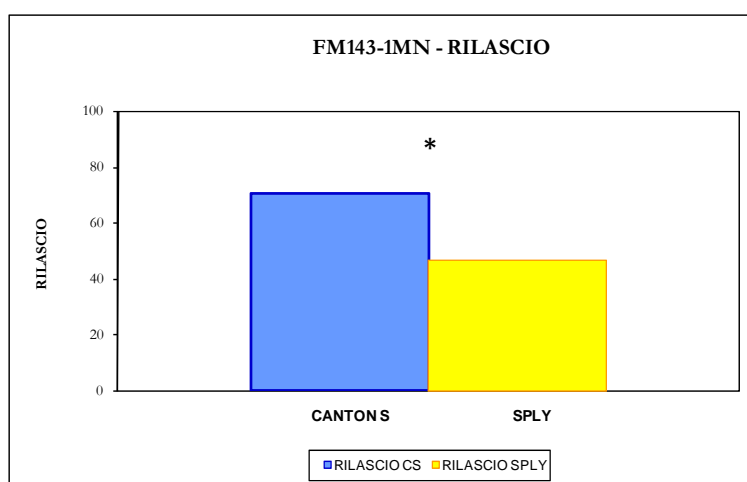


Figura 98 - Valutazione rilasci Canton S e *Sply* dopo scarico di 1 minuto.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'attività di rilascio con scarico di 1 minuto per i controlli e per i mutanti. Rilascio: CS=70,4±0,01 con n=80. *Sply*=45,12±0,01 con n=120. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=0,03).

Per comprendere l'entità complessiva degli eventi di esocitosi stimolati sono stati stimati i valori medi dei rilasci avvenuti nei differenti bottoni di controllo e mutanti.

I valori medi calcolati per il rilascio complessivo nei bottoni di controllo e mutanti, indicano come nei controlli avvengano, a parità di stimolazione, un numero maggiore di singoli eventi d'esocitosi, tradotti in un massiccio rilascio del colorante nell'ambiente esterno, rispetto ai mutanti *Sph*. Questi, infatti, sono caratterizzati da un rilascio nettamente inferiore rispetto ai controlli che determina una limitata riduzione della già elevata fluorescenza iniziale (Figura 98).

4.2.3.2. Analisi Funzionale con scarico di 5 minuti

I campioni dissezionati, incubati con il colorante FM1-43, vengono stimolati chimicamente mediante l'azione del potassio disciolto in soluzione per un intervallo temporale di 5 minuti. Quest'azione stimolatrice, a carico delle giunzioni e dei bottoni che la compongono, si traduce nell'attivazione del processo di endocitosi all'interno dei bottoni stessi (FASE DI CARICO)

In questo particolare protocollo, una seconda stimolazione chimica, sempre con potassio, caratterizzata da un intervallo temporale di media durata pari a 5 minuti, determina l'avvento di processi di esocitosi che si traducono con il rilascio del colorante nello spazio esterno ai bottoni sinaptici, ma allo stesso tempo di nuovi processi di endocitosi, che reintroducono il colorante all'interno dei bottoni stessi (FASE DI SCARICO).

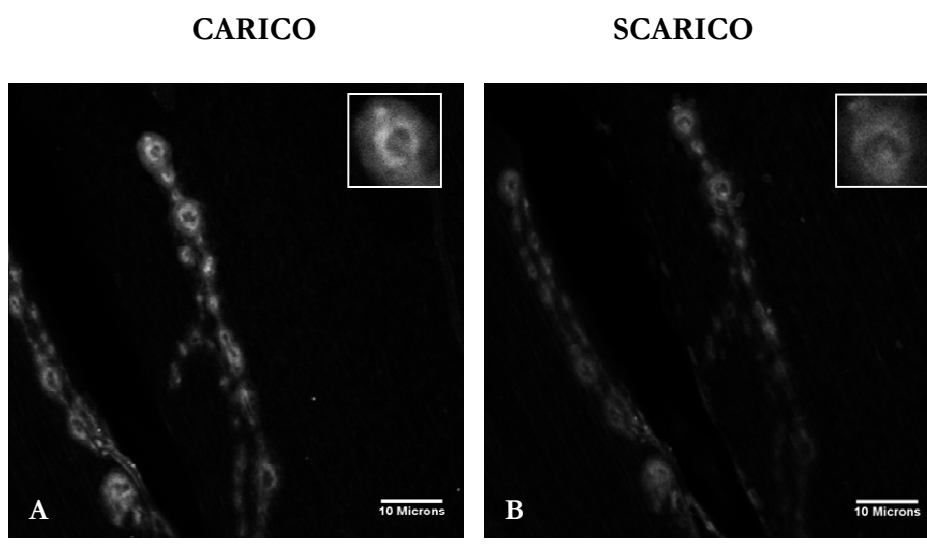


Figura 99 - Funzionalità Canton S con scarico di 5 minuti.

In figura A è riportata una NMJ di controllo alla fine della fase di carico. In figura B la medesima NMJ alla fine della fase di scarico.

I campioni di controllo, sottoposti a questo protocollo sperimentale, alla fine della fase di carico, mostrano giunzioni neuromuscolari estremamente luminose e facilmente osservabili. In particolare, queste sono caratterizzate da una fluorescenza molto intensa e nitida a livello dei bottoni, mentre non sono visibili le altre componenti delle NMJ (Figura 99-A).

I bottoni di controllo, come visto nella fase di carico dell'esperimento precedente, si presentano come piccole sfere luminose, contraddistinte da una fluorescenza molto intensa caratterizzata da un'organizzazione spaziale specifica. Infatti, il segnale luminoso si distribuisce preferenzialmente lungo i bordi interni dei bottoni sinaptici, lasciando completamente libera la porzione centrale degli stessi.

Alla fine della fase di scarico, le giunzioni di controllo risultano essere più visibili rispetto allo scarico dell'esperimento precedente. Una flebile fluorescenza permane, infatti, esclusivamente lungo il perimetro interno dei bottoni. In particolare, alla fine di questo tipo di scarico, che ha una durata temporale maggiore, il segnale del colorante sembra essere caratterizzato da una fluorescenza di media intensità con una distribuzione spaziale meno ristretta rispetto a ciò che si osservava alla fine della fase di scarico della durata di 1 minuto. (Figura 99-B).

Infatti, soprattutto nei bottoni di dimensioni maggiori, permane abbastanza visibile il cerchio fluorescente lungo il perimetro interno del bottone. Questa marcatura fluorescente sembra però essere meno netta e delineata rispetto a quella alla fine della fase di carico. Inoltre, in termini di organizzazione spaziale, l'area del cerchio fluorescente non appare notevolmente diminuita come si era verificato alla fine dello scarico della durata di 1 minuto.

Questa nuova marcatura, rilevata alla fine di una fase di scarico di 5 minuti, è probabilmente espressione di processi di eso-/endo-citosi che avvengono contemporaneamente lungo la membrana sinaptica. Infatti, durante la fase di "scarico" di 5 minuti, è probabile che vengano attivati non solo gli eventi di esocitosi conseguenti alla precedente stimolazione di carico, ma anche nuovi eventi d'endocitosi, i quali controbilancerebbero parzialmente gli effetti della esocitosi.

I campioni mutanti, sottoposti a questo protocollo sperimentale, alla fine della fase di carico, mostrano giunzioni neuromuscolari estremamente luminose e facilmente osservabili. In particolare, queste sono caratterizzate da una fluorescenza estremamente intensa e nitida a livello dei bottoni, mentre permangono scure ed invisibili le altre componenti della NMJ (Figura 100-A).

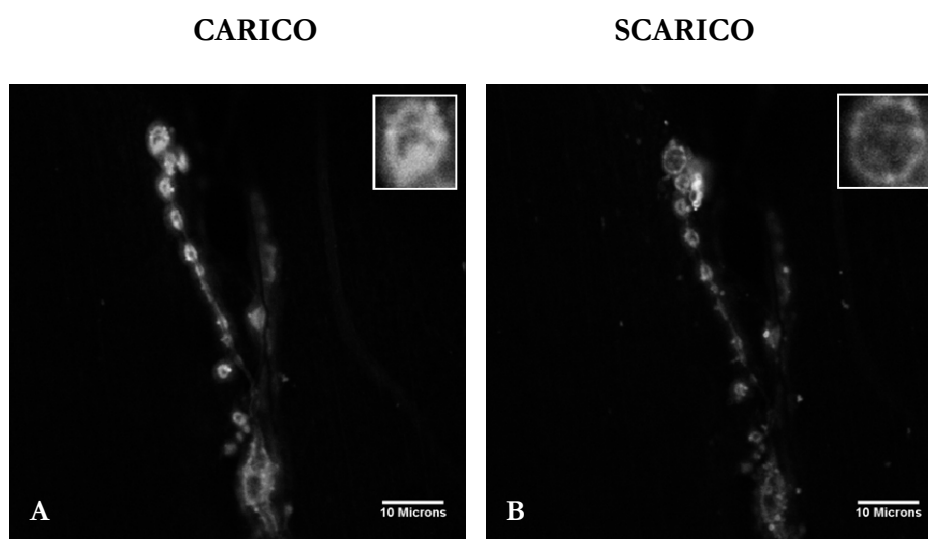


Figura 100 - Funzionalità di NMJ larvali di *Sply* con scarico di 5 minuti.

In figura A è riportata una NMJ mutante alla fine della fase di carico. In figura B la medesima NMJ alla fine della fase di scarico.

I bottoni mutanti, anche in questa fase di carico, si presentano come piccoli globi luminosi, caratterizzati da una fluorescenza molto intensa. In particolare, questa, all'interno dei bottoni perde l'organizzazione spaziale riscontrata nei controlli. Infatti, il segnale luminoso non si distribuisce più preferenzialmente lungo i bordi interni dei bottoni sinaptici, ma riempie completamente l'area dei bottoni.

Alla fine della fase di scarico, le giunzioni mutanti risultano ancora abbastanza visibili. La fluorescenza, anche se ridotta, permane infatti, abbastanza intensa, caratterizzata però da una nuova organizzazione spaziale. Infatti, il colorante sembra ora distribuirsi non solo lungo il perimetro interno dei bottoni, ma anche all'interno dei bottoni stessi (Figura 100-B).

In particolare, si osserva come la marcatura diventi estremamente sottile ma molto intensa soprattutto a livello perimetrale, dove sembra localizzarsi a livello della membrana sinaptica in sé. Inoltre, all'interno del bottone, si notano delle piccole aree circolari luminose. Queste appaiono poco nitide e poco delimitate con una localizzazione casuale all'interno del bottone. La natura di queste nuove marcature all'interno dei bottoni mutanti permane sconosciuta (Figura 100-B).

L'osservazione delle immagini ottenute mediante trattamento *in vivo* evidenzia possibili differenze tra bottoni di controllo e mutanti in termini d'intensità e localizzazione del segnale del colorante FM1-43. Per confermare in maniera quantitativa le differenze tra i due ceppi animali, è stato monitorato il segnale nelle diverse fasi di carico e scarico, valutandone l'intensità complessiva a livello dei singoli bottoni.

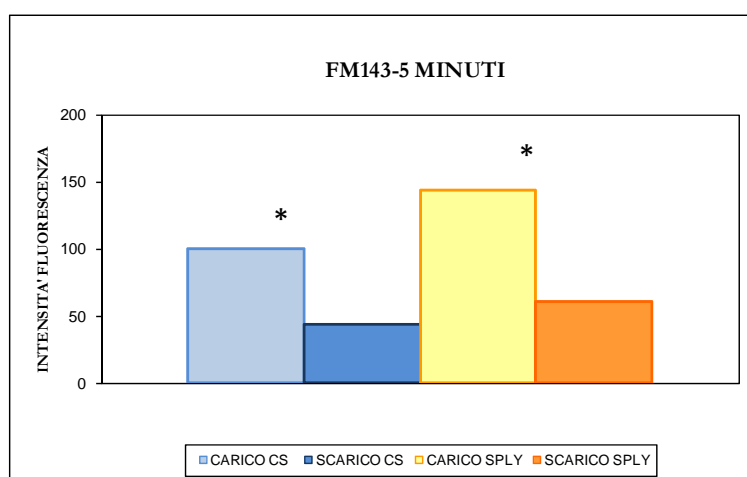


Figura 101 - Funzionalità delle giunzioni NMJ larvali di Canton S e *Sply* con scarico di 5 minuti.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'intensità della fluorescenza per singolo bottone alla fine della fase di carico e di scarico per i controlli e per i mutanti. Carico: CS=100±0,01 con n=100. *Sply*=133,5±0,01 con n=100. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=3,384E-06). Scarico: CS=43,6±0,01 con n=100. *Sply*=60±0,01 con n=100. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=0,00020).

I valori ottenuti per i diversi singoli bottoni sono stati, infine, valutati complessivamente, allo scopo di ottenere una valutazione media della fluorescenza alla fine della fase di carico ed alla fine della fase di scarico per i bottoni di controllo e mutanti.

L'analisi della fluorescenza del colorante FM1-43, internalizzato all'interno dei bottoni alla fine della fase di carico, evidenzia una notevole differenza tra bottoni di controllo e mutanti. In particolare, l'intensità della fluorescenza, stimata nei controlli, è stata considerata come indice massimo di internalizzazione e quindi standardizzata ad un valore pari al 100%. Successivamente, i valori medi calcolati nei bottoni mutanti sono stati rapportati al valore massimo percentuale dei controlli (Figura 101).

La comparazione, tra questi valori medi, sottolinea una discrepanza di notevole entità tra controlli e mutanti. Infatti, i bottoni *Sply*, alla fine della fase di carico, sono caratterizzati da una fluorescenza del segnale quasi doppia rispetto ai controlli, probabile espressione di una maggiore internalizzazione del colorante.

La medesima valutazione è stata eseguita alla fine della fase di scarico. I valori medi stimati, sia per i controlli che per i mutanti, risultano chiaramente ridotti rispetto alle rispettive fasi di carico.

Per comprendere l'entità complessiva, degli eventi d'esocitosi stimolati, sono stati stimati i valori medi dei rilasci dei differenti bottoni di controllo e mutanti.

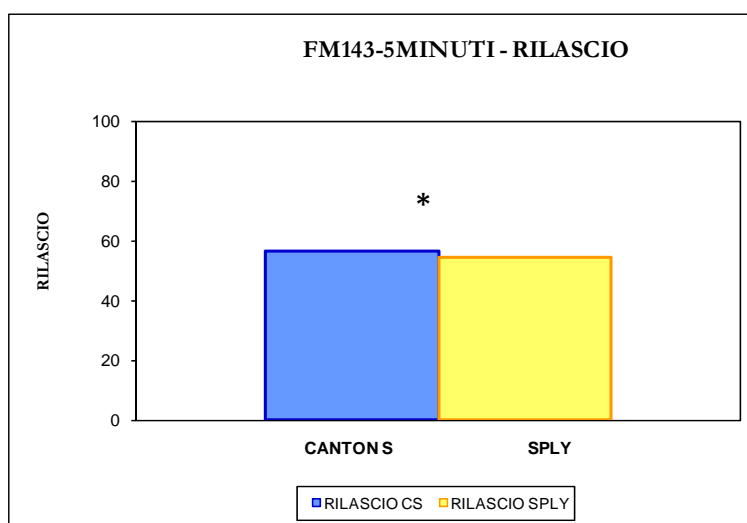


Figura 102 - Valutazione rilasci Canton S e *Sply* con scarico di 5 minuti.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'attività di rilascio con scarico di 5 minuti per i controlli e per i mutanti. Rilascio: CS=56,2±0,01 con n=100. *Sply*=54,3±0,01 con n=100. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=0,0001).

I valori medi calcolati per il rilascio complessivo nei bottoni di controllo e mutanti, indicano apparentemente un simile livello di rilascio per i due ceppi. In realtà, l'analisi statistica evidenzia una differenza significativa tra controlli e mutanti.

Inoltre, questi valori di rilascio sono espressione finale dei continui processi contemporanei di eso-/endo-citosi attivati dalla stimolazione chimica. Tali avvenimenti potrebbero subire delle variazioni in termini temporali, di velocità e consequenzialità nei bottoni mutanti.

4.2.3.3. Analisi Funzionale con scarico di 10 minuti

I campioni dissezionati, incubati con il colorante FM1-43, vengono stimolati chimicamente mediante l'azione del potassio disciolto in soluzione per un intervallo temporale di 5 minuti. Quest'azione stimolatrice, a carico delle giunzioni e dei bottoni che la compongono, si traduce nell'attivazione del processo di endocitosi all'interno dei bottoni stessi (FASE DI CARICO)

Una seconda stimolazione chimica, sempre con potassio, caratterizzata da un intervallo temporale di lunga durata pari a 10 minuti, determina l'avvento di processi di esocitosi che si traducono con il rilascio del colorante nello spazio esterno ai bottoni sinaptici, ma allo stesso tempo di nuovi processi di endocitosi, che reintroducono il colorante all'interno dei bottoni stessi (FASE DI SCARICO).

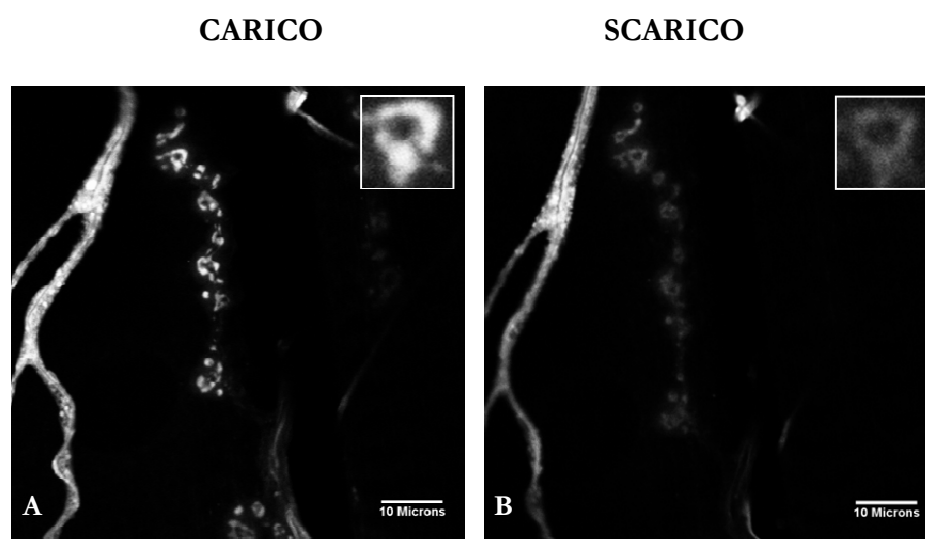


Figura 103 - Funzionalità delle NMJ larvali di Canton S con scarico di 10 minuti.
In figura A è riportata una NMJ di controllo alla fine della fase di carico. In figura B la medesima NMJ alla fine della fase di scarico.

I campioni di controllo, sottoposti a questo protocollo sperimentale, alla fine della fase di carico, mostrano giunzioni neuromuscolari estremamente luminose e facilmente osservabili. In particolare, queste sono caratterizzate da una fluorescenza molto intensa e nitida a livello dei bottoni, mentre permangono scure ed invisibili le altre componenti della NMJ (Figura 103-A).

I bottoni di controllo, come visto nelle fase di carico degli esperimenti precedenti, si presentano come piccole sfere luminose, contraddistinte da una fluorescenza molto intensa caratterizzata da un'organizzazione spaziale specifica. Infatti, il segnale luminoso si distribuisce preferenzialmente lungo i bordi interni dei bottoni sinaptici, lasciando completamente libera la porzione centrale degli stessi.

Alla fine della fase di scarico, le giunzioni di controllo risultano essere meno visibili rispetto a ciò che si osservava dopo una fase di scarico di 5 minuti, ma leggermente più intense rispetto allo scarico di 1 minuto. Infatti, si nota una lieve fluorescenza presente lungo il perimetro interno dei bottoni. In particolare, in seguito a questa fase di scarico temporalmente lunga, il segnale presenta una fluorescenza di intensità debole caratterizzata da una distribuzione spaziale più ristretta rispetto a quella osservata alla fine della fase di scarico della durata di 5 minuti. (Figura 103-B).

Infatti, soprattutto nei bottoni di dimensioni maggiori, permane abbastanza visibile il cerchio fluorescente lungo il perimetro interno del bottone. Questa marcatura fluorescente sembra però essere meno netta e delineata rispetto a quella osservata alla fine della fase di carico. Inoltre, la fluorescenza rilevata alla fine di questa fase di scarico sembra

essere in termini di intensità e di organizzazione spaziale intermedia rispetto a quelle valutate nelle fasi di scarico di durata inferiore.

In particolare, l'intensità e la localizzazione di questa marcatura e' sicuramente maggiore rispetto a ciò che si osservava dopo la fase di scarico di 1 minuto, ma allo stesso tempo d'intensità inferiore a quella osservata alla fine della fase di scarico di 5 minuti.

La marcatura, rilevata alla fine di una fase di scarico di 10 minuti, è chiaramente espressione di processi di esocitosi-endocitosi che avvengono contemporaneamente lungo la membrana sinaptica. Infatti, tale stimolazione, dovrebbe attivare non solo gli eventi di esocitosi conseguenti alla precedente stimolazione di carico, ma anche nuovi eventi d'endocitosi, i quali controbilancerebbero gli effetti della recente esocitosi. In questo specifico caso, però, la lunghezza temporale dello stimolo chimico è così forte da determinare uno sbilanciamento verso gli eventi di esocitosi, determinando così una marcatura residua differente e di più debole intensità.

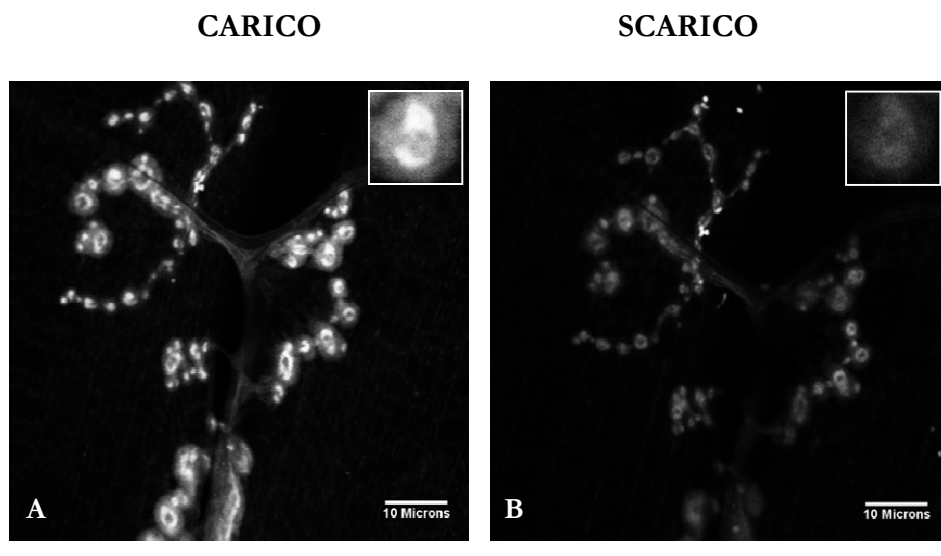


Figura 104 - Funzionalità delle NMJ larvali di *Sply* con scarico di 10 minuti.

In figura A è riportata una NMJ mutante alla fine della fase di carico. In figura B la medesima NMJ alla fine della fase di scarico.

I campioni mutanti, sottoposti a questo protocollo sperimentale, alla fine della fase di carico, mostrano giunzioni neuromuscolari estremamente luminose e facilmente osservabili. In particolare, queste sono caratterizzate da una fluorescenza molto intensa e nitida a livello dei bottoni, mentre permangono scure ed invisibili le altre componenti della NMJ (Figura 104-A).

I bottoni mutanti, anche in questa fase di carico, si presentano come piccoli globi luminosi, caratterizzate da una fluorescenza molto intensa. In particolare, questa, all'interno

dei bottoni perde l'organizzazione spaziale riscontrata nei controlli. Infatti, il segnale luminoso non si distribuisce più preferenzialmente lungo i bordi interni dei bottoni sinaptici, ma riempie quasi completamente l'area dei bottoni.

Alla fine della fase di scarico, le giunzioni mutanti risultano ancora abbastanza visibili. La fluorescenza, anche se ridotta, permane, infatti, abbastanza intensa caratterizzata però da un'organizzazione spaziale che collima perfettamente con quella riscontrata alla fine della fase di carico. Infatti, il colorante sembra non mutare nella sua distribuzione interna al bottone, semplicemente diminuisce l'intensità del suo segnale.

In particolare, risulta evidente come la marcatura si disponga in alcuni bottoni solo esclusivamente nelle porzioni periferiche del bottone stesso mentre in altri la si riscontri per tutta l'area interna del bottone stesso. Questa diversità di localizzazione corrisponde esattamente con le differenze riscontrate nella fase di carico.

Il segnale, quindi, alla fine della fase di scarico, sembra cambiare esclusivamente in termini d'intensità ma non in termini di distribuzione spaziale (Figura 104-B). Queste caratteristiche determinate per il segnale di scarico potrebbero essere espressione di eventi di eso-/endo-citosi che avverrebbero contemporaneamente ma con un contributo relativo differente.

L'osservazione delle immagini ottenute mediante trattamento *in vivo* evidenzia, in modo qualitativo, differenze tra bottoni di controllo e mutanti in termini d'intensità e localizzazione del segnale del colorante FM1-43. Per confermare tale differenza, è stato monitorato quantitativamente il segnale nelle diverse fasi di carico e scarico, valutandone l'intensità complessiva a livello del singolo bottone.

I singoli valori ottenuti per i diversi bottoni sono stati, infine utilizzati allo scopo di ottenere una valutazione media della fluorescenza alla fine della fase di carico ed alla fine della fase di scarico per i bottoni di controllo e mutanti.

L'analisi della fluorescenza del colorante FM1-43, internalizzato dai bottoni alla fine della fase di carico, evidenzia una notevole differenza tra bottoni di controllo e mutanti. In particolare, l'intensità della fluorescenza, stimata nei controlli, è stata considerata come indice massimo di internalizzazione e quindi standardizzata ad un valore pari al 100%. Successivamente, i valori medi calcolati nei bottoni mutanti sono stati rapportati al valore massimo percentuale dei controlli (Figura 105).

La comparazione, tra questi valori medi, sottolinea una discrepanza di notevole entità tra controlli e mutanti. Infatti, i bottoni *Sply*, alla fine della fase di carico, sono caratterizzati da una fluorescenza del segnale quasi doppia rispetto ai controlli, probabile espressione di una maggiore internalizzazione del colorante.

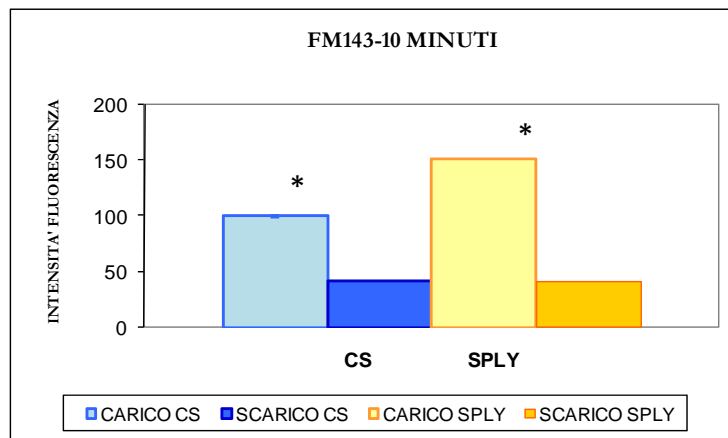


Figura 105 - Funzionalità delle giunzioni NMJ larvali di Canton S e *Sply* con scarico di 10 minuti.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'intensità della fluorescenza per singolo bottone alla fine della fase di carico e di scarico per i controlli e per i mutanti. Carico: CS=100±0,02 con n=60. *Sply*=151,16±0,02 con n=70. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=3,295E-07). Scarico: CS=41,5±0,01 con n=60. *Sply*=78,4±0,01 con n=70. t-test significativo tra i controlli e *Sply*. (p=5,87E-08).

La medesima valutazione è stata eseguita alla fine della fase di scarico. I valori medi stimati, sia per i controlli che per i mutanti, risultano chiaramente ridotti rispetto alle rispettive fasi di carico.

Per comprendere l'entità complessiva, degli eventi di esocitosi stimolati, sono stati stimati i valori medi dei rilasci dei differenti bottoni di controllo e mutanti.

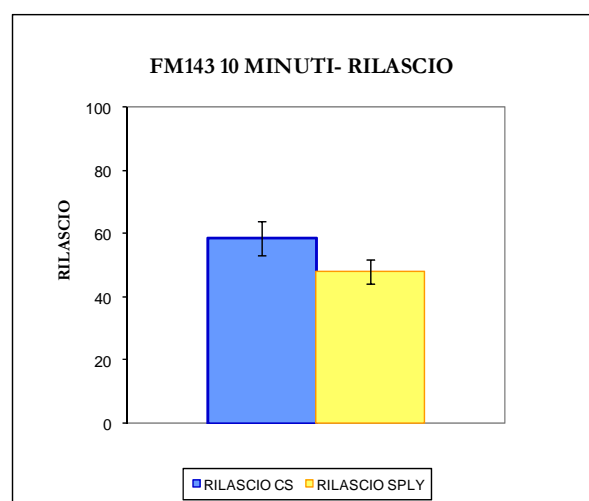


Figura 106 - Valutazione rilasci Canton S e *Sply* con scarico di 10 minuti.

Nel grafico sono riportati i valori medi dell'attività di rilascio con scarico di 10 minuti per i controlli e per i mutanti. Rilascio: CS=58,4±0,01 con n=60. *Sply*=48,07±0,01 con n=70. t-test non significativo tra i controlli e *Sply*. (p=0,07).

I valori medi calcolati per il rilascio complessivo nei bottoni di controllo e mutanti, indicano apparentemente un differente evento di rilascio per i due ceppi animali. In realtà, l'analisi statistica dei singoli dati di rilascio evidenzia una differenza non significativa tra controlli e mutanti. Infatti, i valori medi di rilascio sono da rapportare ai valori medi di carico e di scarico di mutanti e controlli. In base a queste considerazioni, il rilascio dei controlli è molto simile a quello dei mutanti.

In particolare, questi valori di rilascio sono espressione finale dei continui processi contemporanei di eso-/endo-citosi attivati dalla stimolazione chimica. Tali avvenimenti, considerando le stime fatte, sembrerebbero avvenire in modo simile sia nei bottoni di controllo che in quelli mutanti.

In realtà, l'analisi del segnale alla fine delle diverse fasi di stimolazione rende una stima complessiva degli eventi che avvengono lungo la membrana sinaptica. Infatti, mediante questo metodo non è possibile valutare i singoli eventi di eso-/endocitosi ed il loro tasso di velocità, ma soltanto osservare l'effetto finale di tutti questi eventi. In base a ciò, particolari alterazioni funzionali e strutturali potrebbero essere mascherate da un risultato finale perfettamente nella norma.

4.2.4. ANALISI STRUTTURALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

I dati ottenuti fino ad ora, indicano chiaramente delle possibili anomalie strutturali a carico delle giunzioni neuromuscolari *Sply*. Infatti, mediante le diverse colorazioni immunoistochimiche sono state evidenziate anomalie morfologiche a carico della struttura bidimensionale *in toto* della giunzione ed alterazioni morfologiche e strutturali dei bottoni sinaptici. Inoltre, mediante metodiche *in vivo* quali l'impiego del colorante FM1-43, si sono riscontrate irregolarità funzionali forse a causa di danni o alterazioni strutturali delle strutture sinaptiche stesse.

Un'analisi strutturale delle giunzioni neuromuscolari, mediante microscopio elettronico, potrebbe fornire informazioni utili al fine di comprendere meglio la natura delle alterazioni strutturali a carico dei bottoni sinaptici *Sply*. Inoltre, una volta individuate le specifiche anomalie strutturali, sarebbe forse possibile correlarle ai relativi deficit funzionali precedentemente evidenziati.

L'osservazione, al microscopio elettronico, dei bottoni sinaptici delle giunzioni Canton S permette di individuare tutte le strutture che li compongono. Infatti, sono facilmente identificabili il complesso pre- e post-sinaptico con tutte le sue componenti principali (Figura 107).

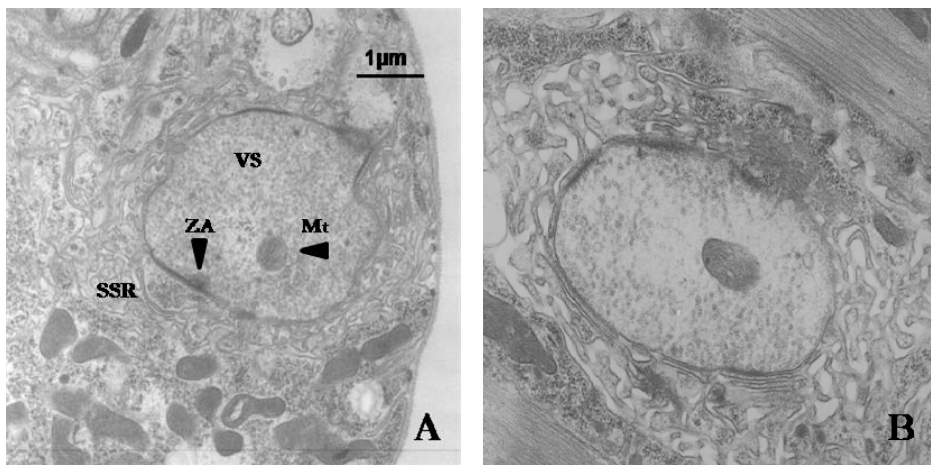


Figura 107 - Struttura dei bottoni sinaptici Canton S.

In figura sono riportati due bottoni sinaptici provenienti da giunzioni neuromuscolari di controllo. Si notano: il complesso pre-sinaptico ed il post-sinaptico (SSR). All'interno dei bottoni si riscontrano: vescicole sinaptiche (VS), un mitocondrio centrale (Mt), Zone Attive (ZA).

In particolare, il complesso post-sinaptico risulta di semplice individuazione in quanto il reticolo subsinaptico (SSR) è chiaramente distinguibile, dato che racchiude completamente l'intero bottone sinaptico. La sua struttura convoluta appare estremamente sviluppata e caratterizzata da un fitto labirinto membranoso molto compatto.

Contemporaneamente sono chiaramente visibili tutte le componenti del complesso pre-sinaptico all'interno del bottone stesso, quali le vescicole sinaptiche, i mitocondri e la membrana sinaptica stessa.

Le vescicole sinaptiche localizzano all'interno del bottone sinaptico, principalmente nella zona perimetrale. Queste sono identificabili come piccole entità circolari elettrondense, caratterizzate tutte dalla stessa dimensione. Questa specifica colorazione elettrondensa, essendo riscontrabile in tutte le vescicole, conferma, quanto già noto dalla letteratura (citazione) e cioè la presenza di un unico neurotrasmettitore in esse contenuto: il glutammato.

Al centro dell'area interna del bottone, generalmente, si distingue un mitocondrio di notevoli dimensioni caratterizzato da una forma ovoidale. Questo è quindi responsabile del supporto energetico del bottone stesso e di tutte le attività riscontrate in esso.

Infine, risulta facilmente identificabile la membrana sinaptica. Questa è chiaramente visibile in quanto ben definita e netta, e delimita l'area del bottone stesso. La membrana appare di colorazione scura apparentemente più spessa rispetto alle altre membrane riscontrabili, per esempio, nel convoluto SSR.

Inoltre, percorrendo il suo perimetro interno, si osserva una notevole quantità di vescicole sinaptiche ad essa confinanti. In particolare, si possono notare delle porzioni di membrana, in corrispondenza delle quali le vescicole sinaptiche sembrano ammassarsi le une sulle altre.

Queste specifiche porzioni di membrana sono le Zone Attive del bottone stesso. In particolare, queste si riscontrano lungo la membrana sinaptica, abbastanza distanziate le une dalle altre. Inoltre, in corrispondenza delle Zone Attive si riscontra un notevole ammasso di vescicole sinaptiche (Figura 108-A,B).

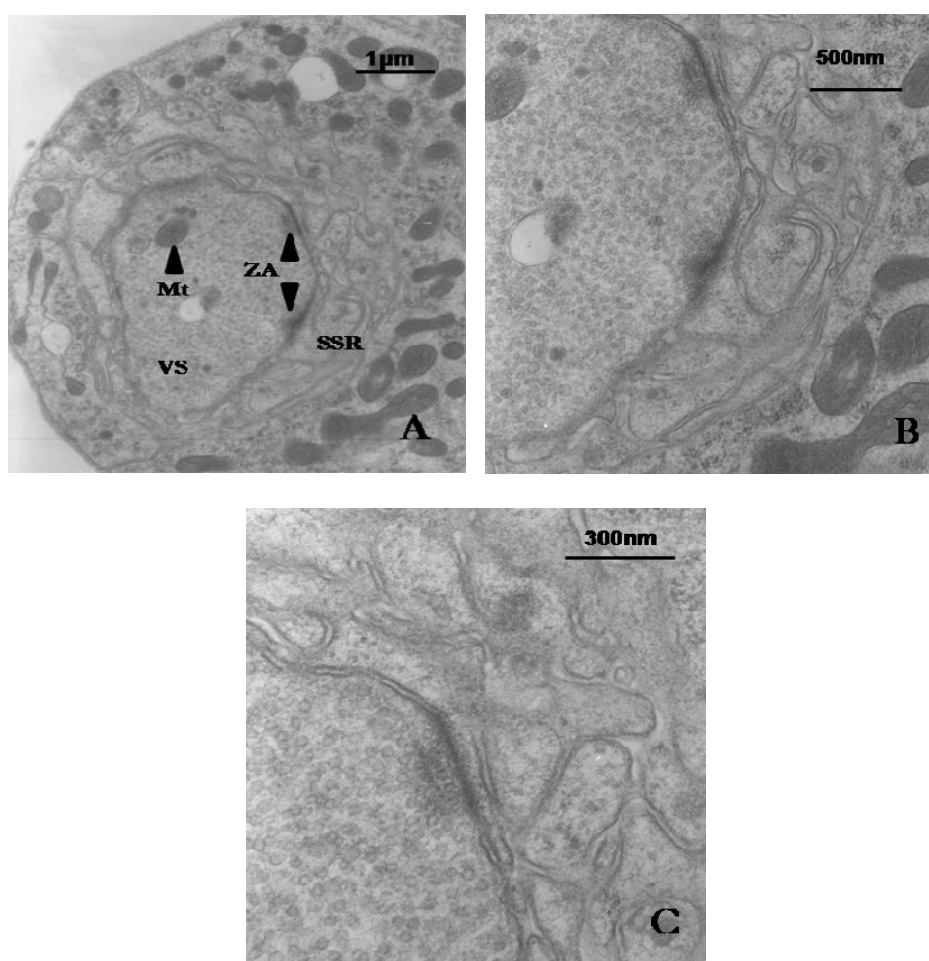


Figura 108 - Zone Attive nei bottoni sinaptici Canton S

In figura A è riportato un bottone sinaptico proveniente da una giunzione neuromuscolare di controllo. Si notano: il complesso pre-sinaptico ed il post-sinaptico (SSR). All'interno dei bottoni si riscontrano: vescicole sinaptiche (VS), un mitocondrio centrale (Mt), Zone Attive (ZA). In figura B, C sono riportate le Zone Attive del bottone considerato ad ingrandimenti differenti.

Osservando le medesime ad ingrandimenti maggiori, è possibile distinguere facilmente, come all'interno dell'accumulo di vescicole, quelle limitrofe alla membrana stessa stiano fondendosi con essa. Sono, quindi, visibili i singoli eventi di esocitosi (Figura 108-C).

In particolare, risulta evidente come a livello delle Zone Attive la membrana sinaptica cambi la propria conformazione. Questa, infatti, nelle porzioni "libere" è caratterizzata da un doppio strato, il quale, in corrispondenza delle Zone Attive, si trasforma in un unico complesso più spesso, supportante tutte le proteine coinvolte nel *docking* e fusione vescicolare.

Anche a livello delle Zone Attive e ad ingrandimenti maggiori, le vescicole sinaptiche mantengono le caratteristiche evidenziate precedentemente. Questo sono, infatti, caratterizzate tutte dalla stessa struttura circolare, dalle identiche dimensioni e dalla medesima colorazione.

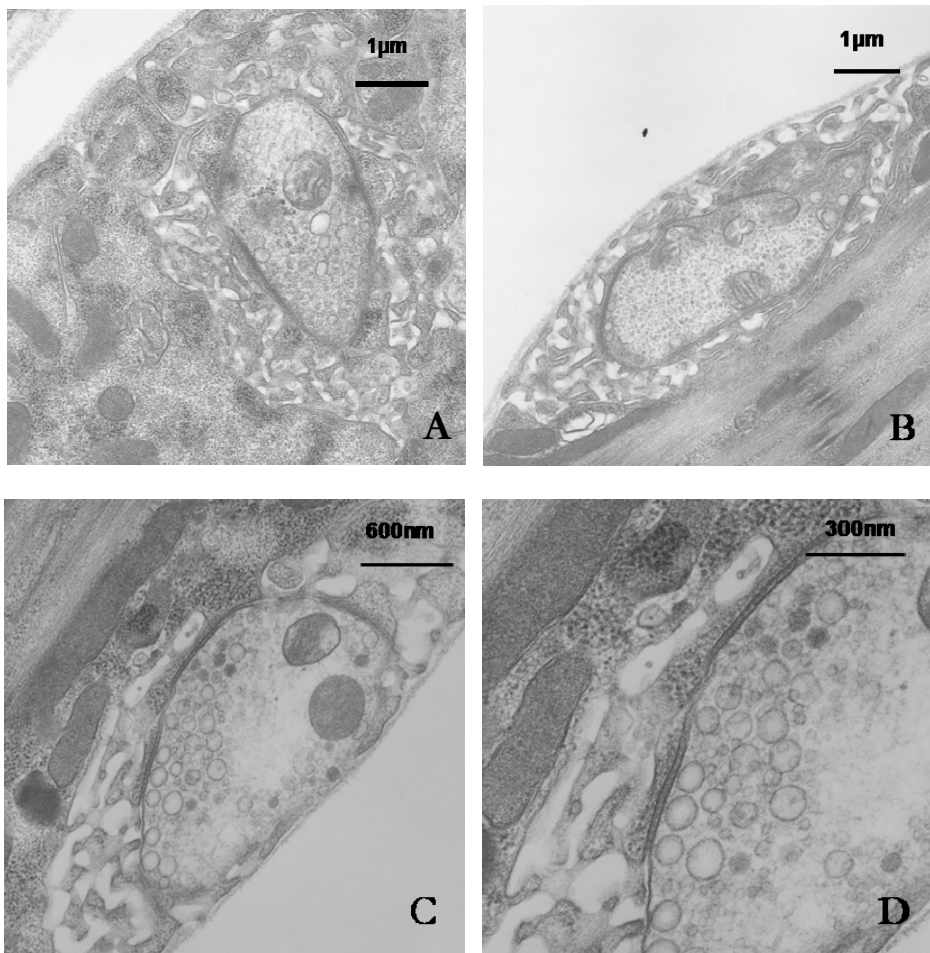


Figura 109 - Struttura dei bottoni sinaptici *Sply*.

In figura sono riportati due bottoni sinaptici provenienti da giunzioni neuromuscolari mutanti. Si notano: il complesso pre-sinaptico ed il post-sinaptico. All'interno dei bottoni si riscontrano: vescicole sinaptiche, mitocondri, Zone Attive.

L'osservazione, al microscopio elettronico, dei bottoni sinaptici delle giunzioni *Sply* permette di individuare tutte le strutture che li compongono. Infatti, sono facilmente identificabili il complesso pre- e post-sinaptico con tutte le sue componenti principali (Figura 109-A, B,C).

In primis però, è possibile notare come vi sia una corrispondenza con l'analisi morfologica condotta precedentemente a livello immunoistochimico. A livello della microscopia elettronica, i bottoni infatti, non sono tondeggianti, ma chiaramente ovoidali e di dimensioni maggiori rispetto ai bottoni di controllo.

In questo caso però, il SSR sembra mantenere la sua grandezza dimensionale, ma contemporaneamente sembra aver perso il suo sviluppo conformazionale. Questa effettiva regressione del SSR e' in accordo con la forte riduzione del segnale fluorescente già osservato nel caso degli esperimenti di immunoistochimica condotti utilizzando l'anticorpo anti-DLG (Figura 109-A, B,C).

Contemporaneamente sono chiaramente visibili tutte le componenti del complesso pre-sinaptico all'interno del bottone stesso, quali le vescicole sinaptiche, i mitocondri e la membrana sinaptica stessa.

In particolare, l'area interna del bottone *Sply* appare completamente ricoperta da vescicole sinaptiche. Queste, quindi, perdono completamente la specifica localizzazione periferica, distribuendosi omogeneamente sull'intera area interna. Oltre all'organizzazione spaziale, le vescicole sembrano perdere completamente tutti quei tratti caratteristici precedentemente descritti. Le vescicole mutanti appaiono, infatti, come un insieme disomogeneo di piccole strutture circolari caratterizzate da dimensioni e colorazioni differenti.

In realtà, si osservano due tipologie di vescicole corrispondenti a due differenti dimensioni e colorazioni. Infatti, soprattutto lungo le zone periferiche del bottone, si notano delle vescicole di notevole grandezza caratterizzate da una colorazione molto chiara. Queste, contrastano nettamente con le restanti vescicole che riflettono tutte le caratteristiche riscontrate per le vescicole di controllo. Considerando queste specificità strutturali e di colorazione, si potrebbe ipotizzare una natura differente per queste vescicole più grandi (Figura 109-C,D).

Altra notevole anomalia, riguarda i mitocondri presenti all'interno dei bottoni mutanti. Questi, infatti, non si riscontrano mai singolarmente, come nei controlli, ma quasi sempre in numero maggiore. Inoltre, morfologicamente appaiono di dimensioni maggiori, circolari e sono chiaramente visibili le creste mitocondriali.

Infine, risulta alterata anche la membrana sinaptica. Questa, infatti, è, come nei controlli, chiaramente visibile e delimita l'area del bottone stesso. In realtà, in questo caso la

membrana appare di colorazione molto più scura e sembra molto più spessa rispetto alle altre membrane sinaptiche dei controlli.

Inoltre, si osserva come nelle porzioni non attive, il doppio strato sembra essere caratterizzato da uno spessore maggiore rispetto ai controlli.

Contemporaneamente, risulta difficile distinguere chiaramente a bassi ingrandimenti le porzioni attive di membrana, in corrispondenza delle quali le vescicole sinaptiche sembrano ammassarsi le une sulle altre, in quanto inframmezzate dalle vescicole di dimensioni maggiori.

Ad ingrandimenti maggiori, le Zone Attive sono comunque individuabili ed analizzabili (Figura 110-A, B, C). In particolare, queste sembrano essere caratterizzate da una membrana sinaptica molto spessa, che in alcuni casi mantiene la struttura a doppio strato invece di complessarsi in un'unica struttura (Figura 110-B).

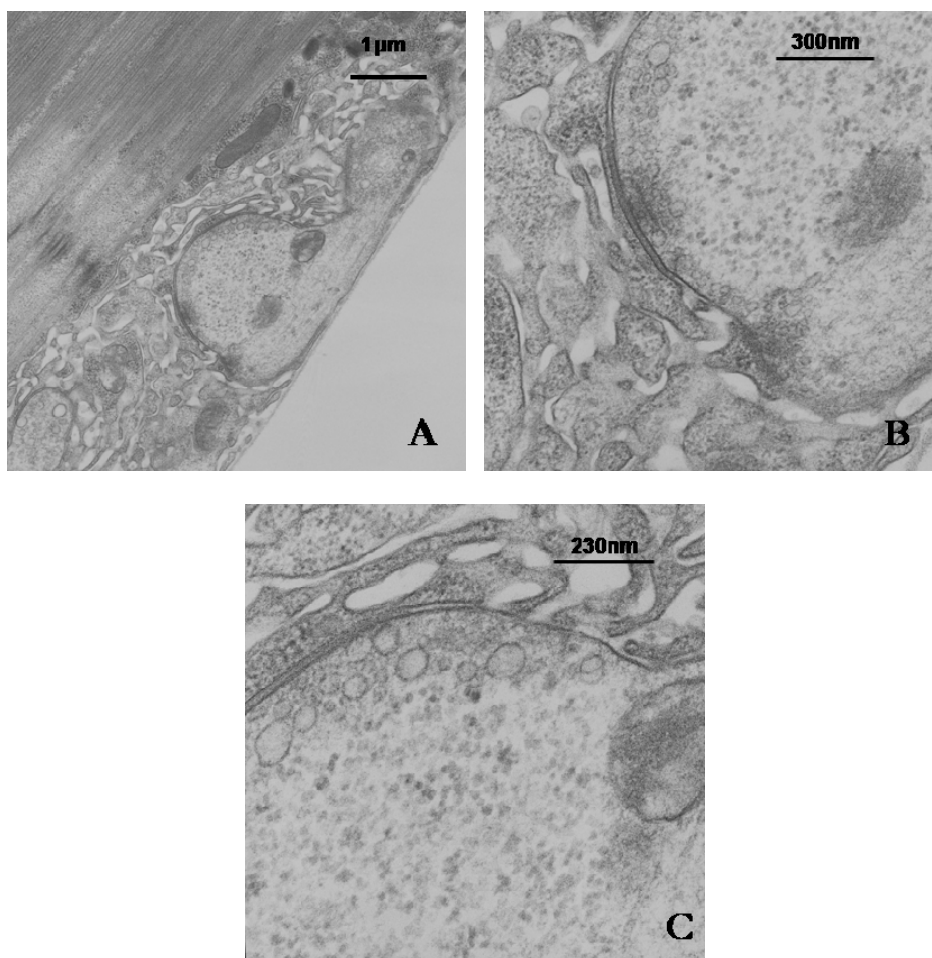


Figura 110 - Zone Attive nei bottoni sinaptici *Sply*.

In figura A è riportato un bottone sinaptico proveniente da una giunzione neuromuscolare mutante. In figura B e in figura C sono riportate le Zone Attive del bottone considerato ad ingrandimenti differenti.

4.3. SISTEMA NERVOSO CENTRALE

Gli sfingolipidi sono responsabili della corretta composizione e conformazione di tutte le membrane plasmatiche in quanto membri fondamentali ed attivi di specifiche piattaforme lipidiche denominate *Lipid Rafts*. Queste piattaforme fungono da sostegno a tutte le proteine di membrana attive nelle differenti vie di segnale intracellulare.

A livello neuronale, queste piattaforme lipidiche sembrano essere direttamente coinvolte nei processi di endo-/eso-citosi costituenti il *recycling* vescicolare sinaptico, in quanto fungono da supporto a tutte le proteine di membrana attive nel *docking* e nella fusione delle vescicole stesse.

Gli eventi di fusione vescicolare con il conseguente rilascio del neurotrasmettitore sono alla base della capacità comunicativa tra motoneurone e fibra muscolare, ma anche tra neurone e neurone. Il corretto passaggio d'informazioni tra i diversi neuroni componenti il *network* neuronale è fondamentale a livello cerebrale.

Alterazioni, riguardanti la concentrazione degli sfingolipidi e quindi la conseguente modificazione delle strutture membranose, potrebbero determinare anomalie funzionali nel corretto passaggio di informazioni tra i diversi neuroni cerebrali. Inoltre, considerando i dati fino ad ora ottenuti, il pesante aumento di sfingolipidi potrebbe tradursi, anche a livello cerebrale, nella formazione di accumuli sfingolipidici o all'interno dei neuroni stessi o nello spazio di connessione tra i vari neuroni. Indipendentemente dalla localizzazione, questi ipotetici ammassi lipidici costituirebbero un elemento estremamente dannoso per il cervello stesso, in termini funzionali e strutturali.

4.3.1. ANALISI ISTOLOGICA DELLA COMPONENTE LIPIDICA DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

L'analisi istologica della componente lipidica del Sistema Nervoso Centrale è stata realizzata mediante l'impiego del colorante Oil Red O. Questo è un lisocromo capace di riconoscere e colorare trigliceridi neutrali e lipidi, rendendoli così direttamente visibili.

Nei campioni di controllo, il colorante Oil Red O determina una tenue colorazione distribuita omogeneamente per tutto il cervello. Infatti, sia i lobi ottici che il ganglio ventrale si presentano completamente colorati da un debole arancione che in alcuni punti sfuma in una tonalità più chiara (Figura 111).

A livello dei lobi ottici, in particolare lungo il loro perimetro esterno, si notano però delle aree, caratterizzate da dimensioni e forme variabili, contraddistinte da una colorazione arancione molto più forte ed intensa.

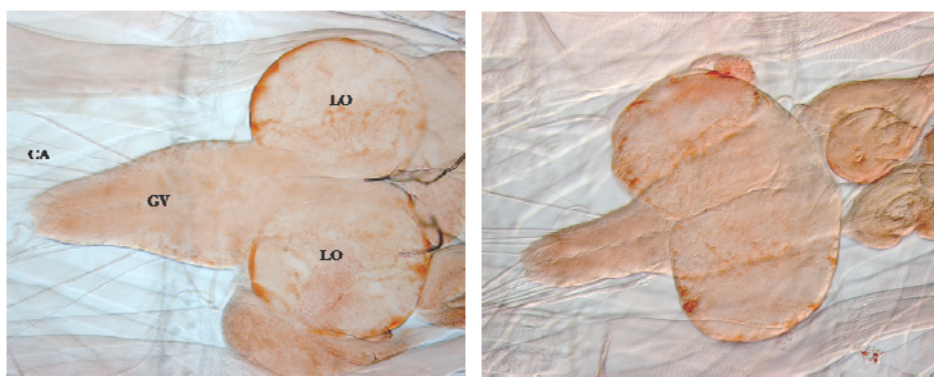


Figura 111 - Analisi lipidica in cervelli Canton S.

In figura sono riportati due cervelli di larve di controllo. Si notano: i lobi ottici (LO), il ganglio ventrale (GV) ed i corpi assonali (CA) dei motoneuroni che da esso dipartono.

Inoltre, queste aree più intense, considerando i differenti campioni valutati, sembrano essere accomunate esclusivamente dalla localizzazione, ma non dalla morfologia e colorazione. Queste, infatti, non assumono forme regolari e non sono caratterizzate da confini chiari e delimitati.

Infine, al loro interno non sono riconoscibili o riscontrabili specifiche marcature o strutture, ma semplicemente una distribuzione disomogenea del colorante stesso.

Questa marcatura intensa è stata però sempre riscontrata solo ed esclusivamente lungo i bordi esterni dei lobi ottici, mai in altre porzioni del cervello.

Nei campioni mutanti, come riscontrato nei controlli, il colorante Oil Red O determina una colorazione basale distribuita omogeneamente per tutto il cervello. Infatti, sia i lobi ottici che il ganglio ventrale si presentano completamente colorati da un arancione basale che in alcuni punti sfuma in una tonalità più chiara (Figura 112). In realtà, la colorazione basale osservata nei mutanti sembra essere caratterizzata da un'intensità di colore maggiore. I cervelli di controllo, appunto, appaiono colorati di un arancione molto debole e tenue, mentre i cervelli *S^{ph}* si presentano colorati da un arancione un po' più intenso e scuro.

Come rilevato nei controlli, anche nei cervelli mutanti, a livello dei lobi, lungo il loro perimetro esterno, si notano delle aree, caratterizzate da dimensioni e forme variabili, contraddistinte da una colorazione, in questo caso non più arancione ma rossa. Queste aree perimetrali marcate sembrano localizzare esattamente con quelle evidenziate lungo i perimetri dei lobi di controllo.

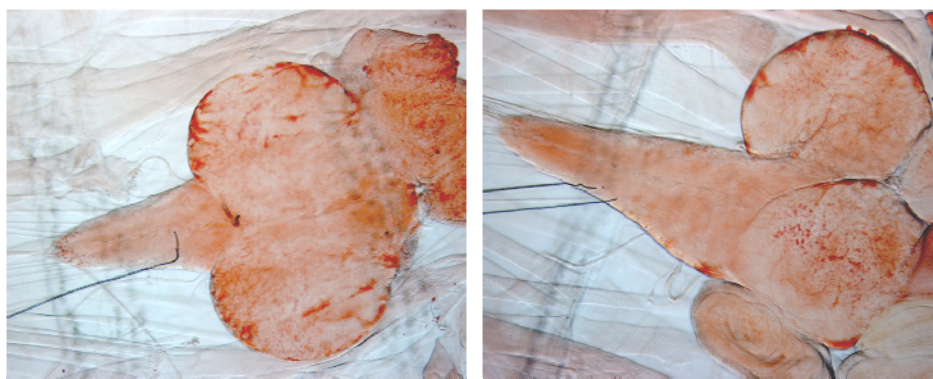


Figura 112 - Analisi lipidica in cervelli *Sply*.

In figura sono riportati due cervelli di larve mutanti. Si notano: i lobi, il ganglio ventrale ed i corpi assionali dei motoneuroni che da esso dipartono.

Nonostante questa chiara sovrapposizione spaziale, queste aree perimetrali mutanti sembrano perdere la morfologia e la colorazione delle rispettive aree osservate nei controlli. Per quanto riguarda la colorazione, le aree perimetrali *Sply* appaiono caratterizzate da una marcatura di colore rosso intenso nel centro dell'area, delimitata da una seconda marcatura arancione scuro. Inoltre, dal punto di vista morfologico, le aree perimetrali colorate dei mutanti *Sply* sembrano protendersi anche verso la porzione centrale del lobo.

Inoltre, i lobi mutanti evidenziano una nuova marcatura non osservata nei lobi di controlli. I lobi *Sply* presentano, infatti, una colorazione rossa intensa nella porzione centrale dei lobi stessi. Questa marcatura appare come una sorta di intreccio di piccole nervature, le quali si colorano intensamente ma in modo puntinato.

Infine, mentre nei controlli, le aree marcate sono state osservate esclusivamente a livello dei lobi, nei mutanti si riscontrano delle aree marcate, non solo a livello dei lobi, ma anche a livello del ganglio ventrale. Infatti, considerando tutti i differenti campioni mutanti valutati, si nota come la porzione finale del ganglio ventrale si colora di rosso, spesso a carattere puntinato.

L'intesa marcatura, riscontrata nei cervelli *Sply*, risultante dalla colorazione con Oil Red O conferma l'ipotesi inizialmente fatta di possibili accumuli lipidici anche a livello cerebrale. Questa colorazione, essendo specifica per trigliceridi neutri e lipidi in generale, non permette però una precisa valutazione a carico dell'alterazione di concentrazione degli sfingolipidi.

4.3.2. COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE

La colorazione con Oil Red O ha confermato la presenza di ammassi lipidici nel cervello dei mutanti *Sph*. Al fine di confermare l'esistenza di questi accumuli lipidici, valutare la loro effettiva localizzazione spaziale a livello dei lobi ottici e nel ganglio ventrale e determinare la composizione sfingolipidica degli stessi, cervelli mutanti e di controllo sono stati sottoposti ad una colorazione con BODIPY-FL C₅-Ceramide.

Il fluoroforo BODIPY permette di evidenziare gli accumuli di ceramide e di altri lipidi simili.

In particolare, i cervelli, trattati con la ceramide fluorescente, sono stati osservati al microscopio confocale al fine di valutare la presenza del colorante d'interesse in diverse sezioni ottiche corrispondenti a differenti porzioni dei cervelli stessi. In base a ciò, sono stati considerati, per ogni campione il lobo ottico destro ed il ganglio ventrale, discriminando tra una sezione superficiale superiore ventrale, centrale e superficiale inferiore dorsale.

I campioni di controllo sottoposti a questo specifico protocollo sperimentale sono caratterizzati da una marcatura estremamente debole, quasi al limite del visibile. L'intensità del segnale della ceramide, infatti, è estremamente ridotto, probabile espressione di una concentrazione sfingolipidica molto bassa.

Analizzando il lobo destro, si nota come questo appaia nel complesso poco visibile (Figura 113-A, C, E). In particolare, nella sezione superficiale superiore, si riscontra una tenue fluorescenza che potrebbe collimare in termini di distribuzione spaziale e morfologica alla struttura della glia superficiale, la quale connette esternamente i lobi ottici con il cerebellum, racchiudendo l'intero cervello (Figura 113-A).

Nella sezione centrale, la marcatura è ancora più debole. Per questo motivo, risulta ancora più difficoltoso comprendere ove esattamente localizza il segnale. In base alla debolissima fluorescenza, si potrebbe supporre che anche a questo livello, la poca ceramide presente sia accumulata sempre a livello della glia. In particolare, sembra essere riconoscibile la glia che supporta la corteccia cerebrale e quella che sostiene il neuropilo centrale. Inoltre, una marcatura molto leggera sembra evidenziare il complesso della lobula (Figura 113-C).

Infine, nella sezione superficiale inferiore, la debolissima marcatura scompare quasi del tutto, restando confinata esclusivamente in una porzione centrale del lobo. Questa sembrerebbe, anche in questo caso, corrispondere alla glia superficiale di connessione (Figura 113- E).

A livello del ganglio ventrale, la situazione sembra essere ancora più complessa da analizzare, in quanto il segnale della ceramide è quasi del tutto invisibile in tutte e tre le

sezioni analizzate. In particolare, anche in questa porzione cerebrale, la marcatura del ceramide-BODIPY sembra corrispondere alla localizzazione della glia. In questo caso però, non è rilevabile la glia di supporto ai corpi neuronali ma esclusivamente quella associata al neuropilo (Figura 113-B, D, F).

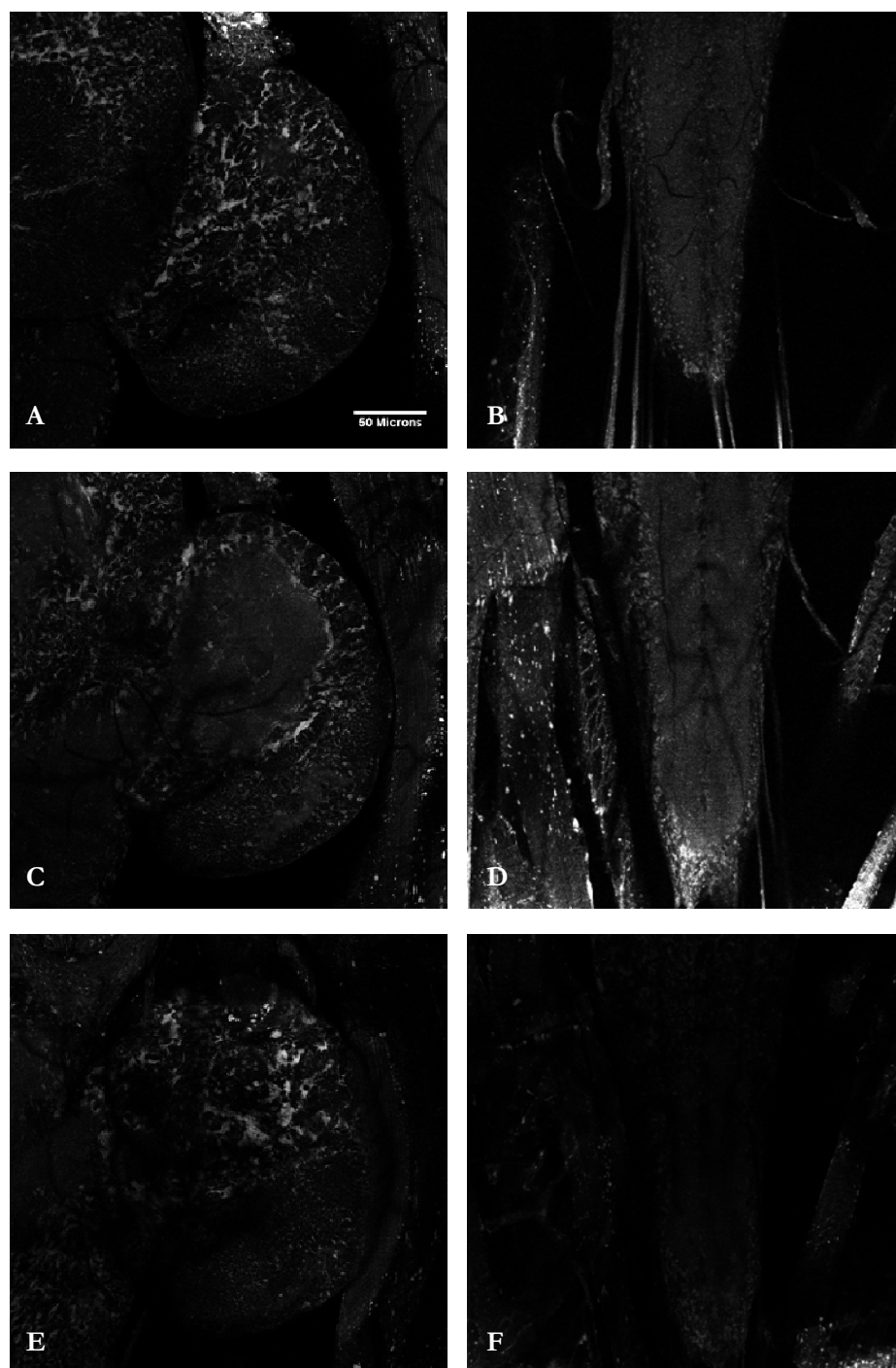


Figura 113 - Colorazione con Ceramide in cervelli Canton S.

In figura sono riportate diverse sezioni di cervello di una larve di controllo Si notano: lobo destro (A, C, E), ganglio ventrale (B, D, E). per ogni porzione è stata fatta una sezione superiore ventrale (A,B), una centrale (C,D) ed una inferiore dorsale (E,F).

In particolare, nella sezione superficiale superiore, si riscontra una debolissima fluorescenza che potrebbe collimare in termini di distribuzione spaziale e morfologica alla glia del neuropilo. Inoltre, lungo le aree perimetrali del ganglio si osserva un segnale molto leggero puntiforme, il quale potrebbe corrispondere alla presenza di ceramidi nella glia associata ai corpi neuronali.

Nella sezione centrale, la marcatura è leggermente più intensa. Per questo motivo, risulta meno difficoltoso comprendere ove esattamente localizza il segnale. Infatti, in questa sezione risulta evidente come la ceramide si accumuli soprattutto nella zona centrale del ganglio ove si trova appunto il neuropilo. Contemporaneamente, si nota molto più distintamente la glia periferica, associata ai corpi neuronali presenti nel ganglio.

Infine, nella sezione superficiale inferiore, la marcatura viene quasi completamente persa. In questa sezione, infatti, la fluorescenza non è quasi individuabile se non come un leggero alone che non permette però di fare alcuna valutazione o constatazione.

La scarsa presenza, nel complesso dei cervelli di controllo, di un segnale fluorescente del colorante BODIPY suggerisce che in condizioni normali vi sia una quasi totale assenza di ceramide accumulata nelle diverse porzioni cerebrali.

I campioni mutanti sottoposti a questo specifico protocollo sperimentale sono caratterizzati da una marcatura estremamente forte, intensa, netta e ben delimitata. L'intensità del segnale della ceramide, è direttamente relazionabile alla concentrazione della ceramide nel tessuto considerato. Una marcatura così evidente nei cervelli *Sply* porta a supporre ad una concentrazione sfingolipidica molto elevata nei cervelli stessi.

Analizzando il lobo destro, si nota come questo appaia chiaramente visibile e luminoso (Figura 114-A, C, E). In particolare, nella sezione superficiale superiore, si riscontra una fluorescenza molto intensa che potrebbe collimare in termini di distribuzione spaziale e morfologica con la struttura della glia superficiale, la quale connette esternamente i lobi ottici con il cerebellum, racchiudendo l'intero cervello (Figura 114-A). Infatti, è facilmente riconoscibile l'organizzazione tipica della cellule gliali superficiali, le quali sono caratterizzate da una particolare forma schiacciata e da un organizzazione strutturale radiale dal centro del lobo verso l'esterno.

Nella sezione centrale, la marcatura è ancora molto forte. Per questo motivo, risulta ancora molto semplice comprendere ove esattamente localizza il segnale. In base alla determinazione della fluorescenza, si potrebbe supporre che anche a questo livello, la ceramide presente sia accumulata sempre a livello della glia. Infatti, è nettamente riconoscibile la glia che supporta la corteccia cerebrale e quella che sostiene il neuropilo. In particolare, è possibile discernere tra la glia che supporta il neuropilo cerebellare e quella associata al neuropilo medullare (Figura 114-C).

Infine, nella sezione superficiale inferiore, la marcatura permane ancora molto intensa e ben delineata. Questa infatti evidenzia non solo, nuovamente la glia associata alla corteccia, ma anche il complesso della lobula. Questo complesso risulta essere facilmente osservabile in quanto perfettamente marcato. Infatti, la sua organizzazione morfologica interna, determinata dalla sua specifica glia, è chiaramente valutabile. In particolare, si possono apprezzare le cellule della glia giganti (Figura 114-E).

A livello del ganglio, la situazione permane ancora facilmente analizzabile, in quanto il segnale della ceramide è inteso e specifico in tutte e tre le sezioni eseguite. In particolare, anche in questa porzione cerebrale, la marcatura del BODIPY sembra corrispondere alla localizzazione della glia. In questo caso però è rilevabile sia la glia di supporto ai corpi neuronali, sia quella associata al neuropilo (Figura 114-B, D, F).

In particolare, nella sezione superficiale superiore, si riscontra una fortissima fluorescenza che potrebbe collimare in termini di distribuzione spaziale e morfologica alla glia superficiale. Questa, infatti, si organizza come un'intricata rete di cellule appiattite che racchiude esternamente tutto il ganglio (Figura 114-B). Inoltre, sempre in questa sezione, si notano degli accumuli sfingolipidici estremamente fluorescenti, dalle dimensioni e morfologia molto casuali.

Nella sezione centrale, la marcatura è ancora molto forte. Per questo motivo, risulta ancora molto semplice comprendere ove esattamente localizza il segnale. In base alla determinazione della fluorescenza, si potrebbe supporre che anche a questo livello, la ceramide presente sia accumulata sempre a livello della glia. Infatti, è nettamente riconoscibile la glia che supporta i corpi neuronali e quella che sostiene il neuropilo. In particolare, la marcatura della glia che sostiene i corpi neuronali localizza nelle aree periferiche del ganglio, contornando il neuropilo. Questa è caratterizzata da un segnale puntiforme, contrariamente alla marcatura del neuropilo che appare abbastanza omogenea (Figura 114-C). Inoltre, anche in questa sezione, si riscontrano degli accumuli sfingolipidici estremamente fluorescenti, dalle dimensioni e morfologia molto casuali.

Infine, nella sezione superficiale inferiore, la marcatura permane intensa come nelle precedenti. In questa sezione, infatti, la fluorescenza è chiaramente individuabile e permette, di associare, anche in questo caso, la marcatura della ceramide con la glia superficiale (Figura 114-F).

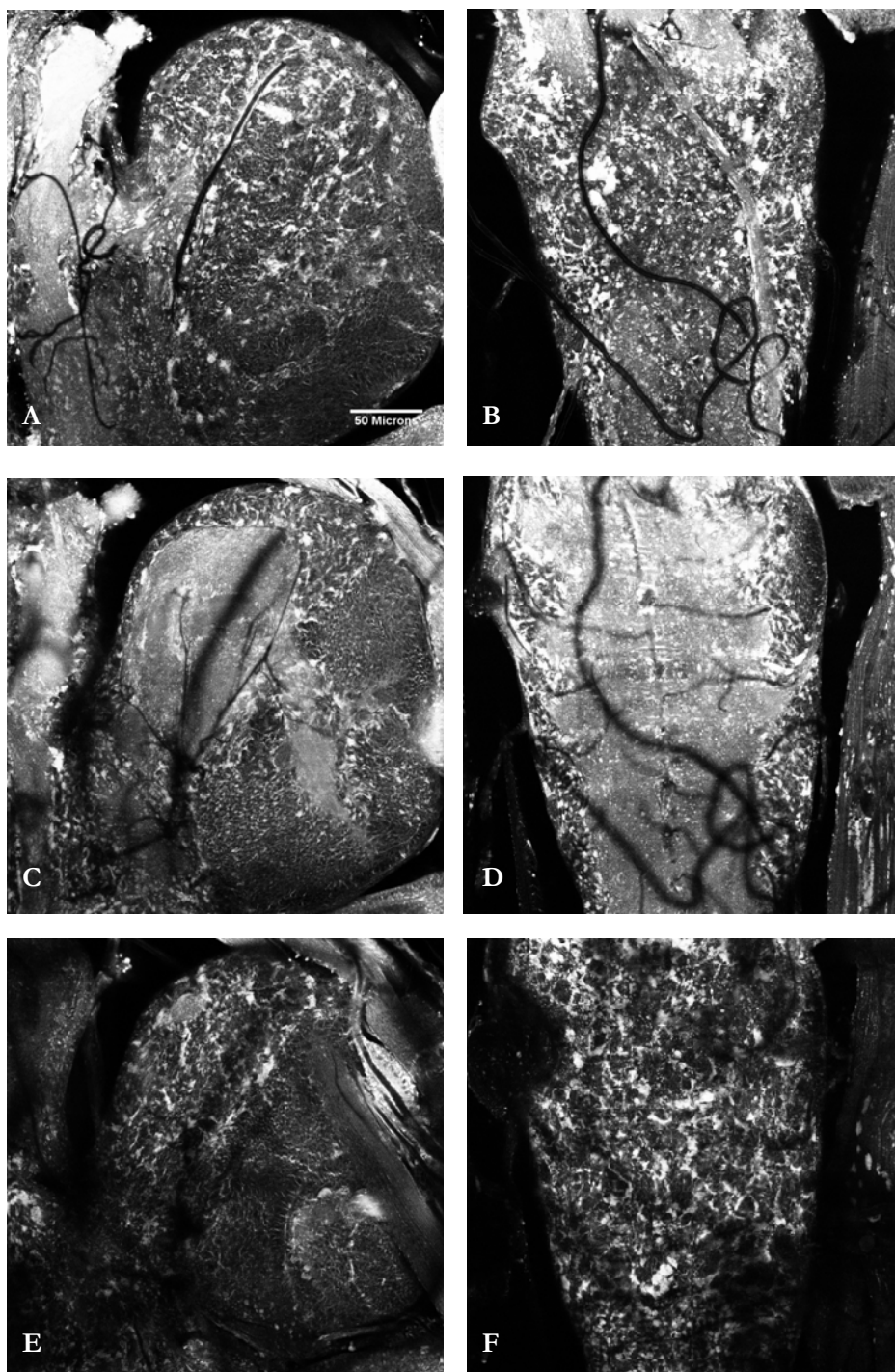


Figura 114 - Colorazione con Ceramide in cervelli *Sply*.

In figura sono riportate diverse sezioni di cervello di una larva mutante *Sply*. Si notano: lobo destro (A, C, E), ganglio ventrale (B, D, E). per ogni porzione è stata fatta una sezione superiore ventrale (A,B), una centrale (C,D) ed una inferiore dorsale (E,F).

Al fine però di confermare l'esatta colocalizzazione della ceramide marcata con le cellule della glia, sarebbe necessario l'impiego di un marcatore specifico per la glia stessa. In letteratura però, esistono dei lavori nei quali la ceramide marcata viene impiegata come marcatore delle cellule gliali [99][100][101].

La massiccia presenza, nel complesso dei cervelli mutanti, di un segnale fluorescente del colorante BODIPY chiaro, netto e molto intenso, conferma l'ipotesi di ceramide accumulata e quindi di probabili ammassi sfingolipidici nelle diverse porzioni cerebrali.

5. DISCUSSIONE

Nelle membrane cellulari dei più diversi organismi animali sono presenti gli sfingolipidi, importante classe lipidica i cui componenti sono noti per agire come primi o secondi messaggeri in diverse vie di segnale cellulare; essi inoltre giocano ruoli vitali nei microdomini di membrana detti *raft* lipidici.

I *raft* lipidici sono microdomini ricchi in sfingolipidi e colesterolo, determinanti nell'orchestrare il ciclo delle vescicole di membrana; ciò è importante soprattutto per quanto riguarda le vescicole sinaptiche: i *raft* neuronali modulano la funzione di molti canali ionici, inclusi i canali del calcio voltaggio-dipendenti, e quindi il passaggio di neurotrasmettitore da un neurone all'altro [39].

Nella complessa via metabolica degli sfingolipidi, regolata a vari livelli da diversi enzimi, i ruoli meglio studiati sono quelli di ceramide, sfingosina e sfingosina-1-fosfato (S1P). La ceramide è il precursore degli altri due (e dei restanti sfingolipidi più complessi) ed è sintetizzata nel reticolo endoplasmatico [45].

L'interesse vivo recentemente suscitato da questi tre metaboliti si deve ai loro effetti biologici opposti in molti sistemi cellulari, dove generalmente la ceramide inibisce la proliferazione cellulare e media l'induzione dell'apoptosi, mentre la S1P stimola la crescita e sopprime la morte cellulare: alcuni fattori di crescita, come il TNF α , attivano infatti la sfingosin-chinasi (SK), enzima che catalizza la sintesi di S1P.

Si intuisce dunque anche il ruolo essenziale degli sfingolipidi nello sviluppo del sistema nervoso; si è dimostrato in topo che il signalling della S1P è critico per la neurogenesi [102].

Le sfingolipidosi (SLs) sono malattie nelle quali vi sono delle alterazioni nelle vie di internalizzazione, trasporto e degradazione degli sfingolipidi ad opera di specifiche proteine od enzimi. In particolare, sono state evidenziate specifiche mutazioni in proteine coinvolte nell'idrolisi e nell'accumulo intracellulare di questi lipidi. Inoltre, nella maggior parte dei casi, l'accumulo degli sfingolipidi deriva da anomalie nel trasporto da/ai lisosomi. Le patologie più comuni sono: la malattia di Gaucher, di Niemann-Pick [57][58][61].

Queste patologie però sono determinate da anomalie funzionali a carico di proteine di enzimi coinvolti nel mantenimento e nella gestione cellulare degli sfingolipidi. Ma cosa succederebbe se si andasse ad alterare il sistema di biosintesi di questi particolari lipidi? Unica patologia in grado di rispondere parzialmente a questo quesito è la neuropatia sensoriale ereditaria di tipo 1 (HSN1), nella quale è completamente inattivato il primo enzima della via biosintetica sfingolipidica, determinando una drastica diminuzione della concentrazione degli stessi [61].

Contemporaneamente, vi sono poche informazioni a riguardanti casi di inattivazione di altri enzimi coinvolti nella medesima via biosintetica. Il blocco di enzimi

attivi negli ultimi passaggi di questa via, responsabili della degradazione finale e totale degli sfingolipidi, condurrebbe ad un notevole aumento della concentrazione di tutti gli sfingolipidi all'interno dell'organismo o solo di alcuni specifici intermedi? Questa massiccia presenza sfingolipidica come si tradurrebbe in termini di alterazioni o danni nell'essere e nella vita di un individuo?

Per rispondere, almeno in parte, a questi interrogativi, si è cercato di caratterizzare il fenotipo del mutante per gli sfingolipidi *Sply*. In particolare, questi individui mutanti sono caratterizzati, durante la fase adulta, da una ridotta vitalità, una diminuita capacità riproduttiva e sono completamente incapaci di volare [68].

Almeno per quanto riguarda il difetto nel volo, la caratterizzazione dell'apparato neuromuscolare degli stadi larvali di questi mutanti potrebbe delucidare, almeno in parte, le cause di queste anomale caratteristiche della fase adulta?

5.1. APPARATO MUSCOLARE

Una prima valutazione di *Sply* durante lo stadio larvale, si è basata su studi comportamentali atti alla comprensione delle sue capacità motorie. Infatti, si è dimostrato come larve *Sply* siano caratterizzate da una ridotta capacità locomotoria (Laboratorio Zordan: dati non pubblicati).

5.1.1. ANALISI DELLA MORFOLOGIA MUSCOLARE

Una prima analisi della morfologia muscolare è stata eseguita mediante la colorazione dell'intero apparato muscolare con il colorante Rodamina-Falloidina. Grazie a questo protocollo sperimentale è stato possibile osservare e valutare direttamente l'intero apparato muscolare delle larve mutanti *Sply*.

La colorazione non ha evidenziato alcun tipo di alterazione o danno a carico dell'intero apparato muscolare. Infatti, questo è completo e morfologicamente normale, in quanto tutte le fibre muscolari, che lo compongono, sono presenti.

In base a ciò, risulta evidente come l'apparato muscolare delle larve mutanti segua regolarmente il suo processo di sviluppo, formandosi correttamente. Infatti è costituito da tutte le fibre muscolari richieste, esattamente localizzate e inserite nei vari segmenti larvali. Inoltre, le fibre evidenziano delle interconnessioni fibrose perfettamente nella norma.

Sempre mediante la colorazione Rodamina-Falloidina è stato possibile attuare un'analisi morfologica delle singole fibre muscolari delle larve mutanti. In particolare, sono

state prese in considerazione come fibre di riferimento le fibre 6 e 7 dei segmenti 2 e 3. L'analisi morfologica non ha evidenziato alcuna alterazione a carico delle fibre mutanti. Queste, infatti, sono caratterizzate da parametri bidimensionali, quali lunghezza e larghezza ed indice morfologico, corrispondenti a quelli riscontrati nei controlli.

In realtà, le fibre muscolari *Sply* sono contraddistinte da una struttura dell'apparato contrattile anomala. Infatti, è stato possibile stimare la lunghezza dei diversi sarcomeri che compongono l'apparato contrattile, evidenziando significative anomalie in termini di grandezza dei sarcomeri stessi. In particolare, i sarcomeri *Sply* risultano in termini dimensionali significativamente più corti dei sarcomeri di controllo.

Considerando i dati dimensionali delle singole fibre e dei sarcomeri che le compongono, è possibile ipotizzare che le fibre muscolari *Sply*, a parità di lunghezza, siano costituite da un numero maggiore di sarcomeri. Questa modificazione della struttura dell'apparato contrattile potrebbe tradursi con un'alterazione della capacità contrattile. Purtroppo però non si hanno ulteriori indicazioni a riguardo di quest'ipotesi.

5.1.2. ANALISI DELLO STATUS MITOCONDRIALE

L'impiego della sonda fluorescente TMRM permette di valutare e monitorare il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), grazie all'accumulo a livello della matrice mitocondriale della sonda stessa. In particolare, variazioni del potenziale di membrana mitocondriale possono essere osservate grazie a cambiamenti a carico dell'intensità della fluorescenza della sonda o dal suo rilascio nello spazio perimitocondriale.

In particolare, è stato possibile valutare esclusivamente le variazioni del potenziale di membrana, e quindi dello status strutturale e funzionale delle membrane mitocondriali, andando a bloccare completamente l'ATP sintasi, la quale, è stato dimostrato, in condizioni di anomalie strutturali, opera in modo inverso, concorrendo così direttamente al mantenimento del potenziale di membrana. Tale azione di inibizione completa dell'ATP sintasi è stata ottenuta tramite l'impiego dell'antibiotico Oligomicina.

Considerando i dati ottenuti da questo protocollo sperimentale *in vivo*, non risultano alterazioni strutturali a carico dei mitocondri dei mutanti *Sply*. Infatti, questa tipologia di protocollo sperimentale può dare informazioni riguardanti la struttura dei mitocondri, ovvero una valutazione sull'integrità delle membrane mitocondriali sul mantenimento della polarizzazione dei mitocondri stessi. In realtà, questo tipo di approccio fornisce indirettamente anche informazioni circa la funzione mitocondriale, dato che per generare un gradiente protonico attraverso la membrana mitocondriale interna è necessario che funzioni correttamente la catena respiratoria. La similarità tra le variazioni di segnale dei

mutanti e dei controlli, è chiaramente espressione di uno status mitocondriale strutturale e funzionale perfettamente nella norma.

In questa direzione, sono stati effettuati dei saggi enzimatici per valutare la funzionalità dei vari complessi enzimatici. Nello specifico, dopo aver isolato i mitocondri da larve di controllo e *Sply*, sono state misurate le attività specifiche del Complesso I, Complesso II, Complesso III, Complesso IV e Complesso V. Inoltre, mediante il saggio della Citrato Sintasi, è stato stimato il contenuto di mitocondri intatti. Infatti, tale enzima, che catalizza la prima reazione del ciclo di Krebs, è utilizzato come indicatore quantitativo di massa mitocondriale. In particolare, dall'analisi delle attività, ottenute misurando la funzionalità dei complessi coinvolti nella catena respiratoria mitocondriale, non si sono riscontrate anomalie tra mutanti e controlli. Inoltre, il saggio della Citrato Sintasi ha stimato un contenuto mitocondriale nella media. (Lab. Zordan, Dott.ssa Da Re, dati da pubblicare).

Inoltre, nel caso dei mutanti *Sply*, il mancato rilascio del TMRM all'esterno della fibra, dopo trattamento con un protonoforo, ed il suo conseguente trattenimento all'interno della stessa, con il successivo accumulo in specifici loci, propone una nuova visione della struttura della fibra muscolare stessa, ovvero la possibilità di accumuli lipidici in essa. Infatti, questi *spots* estremamente fluorescenti potrebbero, in realtà, corrispondere a degli ammassi lipidici presenti sulla superficie della fibra, che fungerebbero da secondo polo attrattivo per la sonda TMRM, in quanto molecola lipofila. In base alla localizzazione finale del TMRM, non è possibile però determinare se vi siano effettivi accumuli ed ove questi siano effettivamente localizzati, se all'interno o sulla superficie della fibra.

Queste considerazioni finali, basate su questo specifico protocollo *in vivo*, permettono di escludere completamente delle possibili alterazioni o anomalie strutturali e funzionali dei mitocondri, quali cause determinanti o concorrenti alla ridotta capacità locomotoria delle larve mutanti *Sply*. Risulterebbe quindi scartabile un'ipotesi di relazione tra accumulo sfingolipidico e malfunzionamento dei mitocondri.

5.1.3. COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE

BODIPY-FL C₅ – Ceramide (Molecular Probes) è un colorante che permette di evidenziare gli accumuli di ceramide e di altri lipidi simili a livello delle membrane cellulari ed all'interno di strutture più complesse.

Questa metodica *in vivo* ha permesso di confermare la presenza di accumuli lipidici nelle fibre muscolari dei mutanti *Sply*. Infatti, il composto BODIPY-FL C₅ – Ceramide ha evidenziato, nelle fibre muscolari mutanti, quello che pensiamo possano essere accumuli

lipidici di differenti dimensioni e forma soprattutto nelle zone perinucleari a livello del sarcolemma.

Tuttavia, questa tecnica non permette di ottenere ulteriori informazioni riguardanti la localizzazione subcellulare di questi accumuli lipidici e l'effetto della loro presenza sull'organizzazione spaziale e funzionale del sarcolemma stesso. Infatti, sarebbe utile comprendere l'effettiva forma, localizzazione e composizione di questi accumuli. Tali indicazioni sono però state ottenute mediante microscopia elettronica.

5.1.4. ANALISI STRUTTURALE DELLE FIBRE MUSCOLARI

La presenza di specifici accumuli lungo il sarcolemma delle fibre muscolari *Sply* è stata chiaramente confermata dall'osservazione al microscopio elettronico. In particolare, quest'analisi ha rivelato come questi accumuli siano caratterizzati da una morfologia e localizzazione peculiari.

Infatti, questi accumuli si rilevano esclusivamente lungo la membrana sarcolemmale dorsale di tutte le fibre muscolari che compongono l'apparato muscolare dei mutanti *Sply*. In particolare, questi cumuli sono contenuti e delimitati dalla membrana sarcolemmale dorsale e si dispongono principalmente lungo le zone perinucleari.

Per quanto riguarda la morfologia, questi accumuli si presentano come delle bolle ovoidali di diverse dimensioni che protrudono dal confine superiore ventrale dell'apparato contrattile verso l'esterno della fibra stessa. Inoltre, si sono osservate differenti tipologie di bolle, classificabili in base alle dimensioni ed al contenuto. Infatti, si riscontra un cambiamento del materiale in esse contenuto in base all'aumento delle dimensioni: bolle di notevoli dimensioni perdono completamente il materiale elettrondenso micellare per acquisirne uno non rilevabile mediante la microscopia elettronica. Contemporaneamente, si assiste ad una modificazione della morfologia dei mitocondri presenti nelle bolle stesse, i quali perdono completamente la forma normalmente rotondeggiante o ovoidale allungata (a seconda del piano della sezione).

L'effettiva composizione delle bolle non è però analizzabile mediante la microscopia elettronica. Le uniche informazioni che abbiamo in tale direzione sono quelle ottenute mediante la colorazione con ceramide marcata. In base alle differenti informazioni deducibili dal confronto di queste due tecniche, è possibile affermare con sicurezza una pesante alterazione strutturale a carico del sarcolemma delle fibre muscolari *Sply*, soprattutto lungo la porzione dorsale delle fibre stesse. Quest'anomalia strutturale consiste nella presenza di notevoli accumuli lipidici, probabilmente sfingolipidi, lungo la membrana sarcolemmale.

E' ipotizzabile che queste bolle sarcolemmali, con il loro probabile contenuto sfingolipidico, possano comportare alterazioni anche a livello della fluidità della membrana sarcolemmale stessa. Non è però possibile determinare l'entità di questa modificazione e come questa si traduca nella funzionalità del sarcolemma stesso, ma ciò potrebbe condurre ad alterazioni nella funzionalità muscolare.

5.1.5. CONCLUSIONI COMPLESSIVE

L'analisi dell'intero apparato muscolare larvale e delle singole fibre che lo costituiscono ha rilevato importanti alterazioni in termini di composizione, conformazione ed organizzazione del sarcolemma muscolare. In particolare, l'aumento della concentrazione sfingolipidica in questa struttura muscolare, si esprime sotto forma di notevoli depositi sfingolipidici lungo il suo lato dorsale.

L'ipotesi che queste anomalie conformazionali del sarcolemma possano in qualche modo influenzare negativamente la sua corretta funzionalità, è stata supportata da esperimenti di elettrofisiologia muscolare eseguiti da un gruppo di ricerca con il quale collaboriamo, quello del prof. U. Rose (Dipartimento di Neurobiologia, Università di Ulm, Germania)

Infatti, questi protocolli sperimentali hanno evidenziato una risposta anomala da parte delle fibre muscolari mutanti ad uno specifico stimolo elettrico. In particolare, si tratta di esperimenti in cui e' stata determinata la relazione voltaggio-tensione. Nel caso di *Sply* la curva voltaggio-tensione e' spostata, per cui per ottenere la stessa tensione nella fibra muscolare e' necessario stimolare con un voltaggio maggiore. Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni di *voltage clamp*, e la tensione misurata dopo diversi *step* di voltaggio. Le fibre muscolari *Sply* mostrano, quindi, una risposta inferiore ad un determinato stimolo elettrico rispetto alle fibre di controllo. Questi dati evidenziano quindi una necessità, da parte delle fibre muscolari *Sply*, di uno stimolo elettrico molto maggiore al fine di ottenere una risposta muscolare paragonabile ad una basale di controllo.

Questa difficoltà nella risposta muscolare, e quindi questa necessità di voltaggi maggiori per ottenere una risposta, potrebbero essere espressione di una rigidità della fibra 6 e7 o di una funzione alterata per quanto riguarda il *coupling elettrico*. Parallelamente, questa ridotta stimolabilità delle fibre muscolari mutanti potrebbe essere alla base dei difetti locomotori osservati.

5.2. SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

La ridotta capacità locomotoria delle larve mutanti potrebbe essere correlata ad alterazioni a carico del sistema nervoso periferico, in quanto gli sfingolipidi, essendo la componente principale dei *lipid rafts*, potrebbero influenzare l'attività del *recycling* vescicolare e quindi del rilascio del neurotrasmettitore stesso.

5.2.1. ANALISI MORFOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

L'analisi morfologica delle giunzioni neuromuscolari mutanti ha evidenziato come queste mantengano caratteristiche di lunghezze e aree totali paragonabili alla giunzioni di controllo. Questi dati dimensionali sembrano contrastare con l'apparente sottosviluppo che si nota osservando superficialmente le NMJ di individui mutanti *Sph*.

Tuttavia, in seguito all'analisi morfologica delle diverse NMJ, basata sulla determinazione, catalogazione, misurazione delle differenti ramificazioni secondarie che costituiscono la giunzione stessa, risulta evidente come le NMJ mutanti siano caratterizzate da un numero di ramificazioni inferiori in termini di numerazione, e di lunghezza. In particolare, queste risultano nettamente sbilanciate verso le porzioni assonali e di primo livello, a discapito del secondo e del terzo. Inoltre il quarto livello è notevolmente carente, mentre il quinto è del tutto assente.

Questi dati morfologici evidenziano come le NMJ *Sph* arrivino a compensare la mancanza di ramificazioni mediante un aumento delle dimensioni delle poche ramificazioni rimanenti. Come risultato ciò porterebbe a coprire e stimolare la stessa area muscolare delle giunzioni di controllo. Al fine di riuscire a mantenere la medesima "copertura di stimolazione" in termini bidimensionali delle NMJ di controllo, le giunzioni mutanti riorganizzano completamente la loro struttura interna. Queste, infatti, tentano di equilibrare la perdita delle ramificazioni secondarie con uno sbilanciamento nello sviluppo delle ramificazioni assonali e di primo livello. Inoltre, si assiste alla scomparsa di tutte le interconnessioni tra un bottone e l'altro.

Contemporaneamente però, le NMJ mutanti devono sopperire alla mancanza di un pool completo di bottoni sinaptici. Infatti, le NMJ *Sph* sono caratterizzate da un numero di bottoni significativamente inferiore rispetto a quelle di controllo. Anche in questo caso, si assiste ad una compensazione della situazione mediante la quale le NMJ mutanti sopperirebbero a tale deficienza con l'aumento dell'area di ogni singolo bottone.

In base a queste interessanti modificazioni strutturali, le giunzioni mutanti mantengono una copertura sinaptica paragonabile a quella dei controlli. Tuttavia, ciò non costituisce in sé un'assicurazione di un'attività sinaptica adeguata. Infatti, i notevoli

cambiamenti morfologici che caratterizzano le NMJ mutanti potrebbero determinare delle alterazioni conformazionali e strutturali dei complessi degli apparati pre- e post-sinaptico con conseguenti anomalie funzionali. Si è quindi resa necessaria una valutazione delle strutture a livello pre- e post-sinaptico e di alcuni dei principali attori coinvolti nell'attività sinaptica.

5.2.2. ANALISI ISTOLOGICA DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

Al fine di controllare lo “status strutturale” del complesso pre- e post-sinaptico mediante colorazioni immunostochimiche, per il primo, sono state valutate le proteine Sinapsina ed Nc82, per il secondo il marcatore DLG.

In particolare, mediante la determinazione della presenza e della localizzazione all'interno dei bottoni sinaptici della proteina Sinapsina, è stato possibile osservare l'organizzazione e la distribuzione spaziale delle vescicole sinaptiche. Infatti, la Sinapsina si lega principalmente alla vescicole sinaptiche appartenenti al RRP (*readily releasable pool*), ovvero guida le vescicole alla membrana sinaptica lungo i microtubuli. Generalmente, le vescicole appartenenti al RRP localizzano lungo il perimetro interno della membrana sinaptica e costituiscono il primo pool di vescicole ad andare in esocitosi in seguito a stimolazione di breve durata.

Nei bottoni mutanti, la Sinapsina è caratterizzata da una localizzazione anomala. Questa, infatti, si distribuisce in modo disomogeneo nell'area interna del bottone stesso. Questa distribuzione alterata della Sinapsina evidenzia una delocalizzazione delle vescicole del RRP all'interno del bottone. Questa ripartizione disomogenea in tutta l'area interna del bottone delle vescicole del RRP come si traduce nell'attività sinaptica stessa? Se a questa delocalizzazione corrisponde anche una perdita, di una grossa porzione del RRP, in che modo viene influenzato il rilascio sinaptico? A queste domande si è tentato di fornire un risposta mediante l'analisi funzionale delle giunzioni, come discusso in seguito.

L'impiego dell'anticorpo anti-Nc82 permette di evidenziare le Zone Attive presenti lungo la membrana sinaptica dei bottoni. Grazie a questa specifica marcatura, sono state identificate e determinate le diverse Zone Attive, rilevando come queste siano in numero maggiore nei bottoni sinaptici mutanti rispetto a quelli di controllo. In particolare, è stato dimostrato che i bottoni *Sply* sono contraddistinti da un numero maggiore di Zone Attive caratterizzate da un'area maggiore. Inoltre, nel complesso, i bottoni mutanti sono costituiti da una frazione attiva più estesa rispetto ai bottoni di controllo.

Questa specificità strutturale dei bottoni *Sply* potrebbe rendere l'attività sinaptica degli stessi molto più facilitata. Infatti, un aumento delle Zone Attive ed un incremento delle porzioni attive di membrana sinaptica potrebbero rappresentare un'agevolazione nella

realizzazione degli eventi di esocitosi sinaptica. In base a ciò, le vescicole sinaptiche, contenute all'interno dei bottoni mutanti, sarebbero notevolmente facilitate nell'esocitosi, in quanto riscontrerebbero una disponibilità strutturale maggiore. in termini di porzioni attive di membrana maggiori.

Questo ampliamento della frazione attiva, potrebbe determinare una serie di alterazioni a carico dell'attività sinaptica. Queste anomalie potrebbero caratterizzare non solo l'eso-endocitosi correlata ad un preciso stimolo sinaptico, ma anche gli eventi casuali e spontanei di esocitosi che avvengono normalmente lungo la membrana sinaptica.

Quest'ipotesi è stata supportata e confermata da esperimenti di elettrofisiologia eseguiti dal prof. Megighian (Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana, Sezione di Fisiologia). In particolare, sono state fatte delle misurazioni elettrofisiologiche in cui vengono misurati i potenziali post-sinaptici miniaturiali in assenza di stimolazione. Tali eventi si chiamano anche "minis" oppure *Miniature End Plate Potentials* (mepps). Infatti, questi protocolli sperimentali hanno evidenziato un incremento degli eventi di esocitosi casuale, ovvero di minis. In particolare, questi esperimenti hanno rilevato un aumento nella frequenza degli eventi casuali nelle giunzioni *Sply*. Inoltre, dall'analisi della distribuzione delle ampiezze dei mepps è stato possibile dedurre che il contenuto quantico, delle vescicole stesse e' paragonabile a quello dei controlli.

Infine, la marcatura con DLG ha mostrato un complesso post-sinaptico notevolmente sottosviluppato.

I bottoni *Sply* presentano, quindi, una conformazione anomala, correlata ad un aumento della frazione attiva del bottone stesso ed ad una contemporanea delocalizzazione e disorganizzazione della distribuzione interna delle vescicole sinaptiche appartenenti al RRP. Tali cambiamenti rilevati a carico del complesso pre-sinaptico sono associati ad un pesante sottosviluppo del complesso post-sinaptico. Risulta quindi necessario valutare come queste alterazioni strutturali si riflettono sulla funzionalità sinaptica stessa.

5.2.3. ANALISI FUNZIONALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

La funzionalità sinaptica di una giunzione neuromuscolare può essere analizzata e valutata mediante specifici protocolli sperimentali di elettrofisiologia. In realtà, importanti informazioni riguardanti l'attività sinaptica ed in particolare il *recycling* vescicolare si possono ottenere anche mediante esperimenti *in vivo* con l'ausilio del colorante lipofilico FM1-43. Infatti, il *recycling* vescicolare attivo nei diversi bottoni sinaptici che compongono ogni singola giunzione, può essere monitorato seguendo la localizzazione e la variazione del segnale fluorescente del FM1-43.

In particolare, sono stati eseguiti tre diversi protocolli sperimentali, tutti effettuati con il medesimo stimolo chimico (K^+ 60 mM) con una prima stimolazione identica in termini temporali (5 min CARICO) ed una seconda differente (SCARICO 1, 5, 10 min). Inoltre, è importante sottolineare che la stimolazione con potassio a queste concentrazioni corrisponde ad una stimolazione di tipo relativamente leggero, paragonabile, ad esempio, ad una stimolazione elettrica con una frequenza di circa 3Hz.

Risulta interessante notare come i bottoni *Sply*, alla fine della fase di carico, siano notevolmente più fluorescenti dei corrispondenti controlli. In particolare, la fluorescenza tra bottoni mutanti e di controllo, si differenzia non solo in termini di intensità del segnale, ma anche in termini di localizzazione nell'area interna dei bottoni stessi. Queste peculiarità dei bottoni caricati *Sply* sono direttamente correlabili alle alterazioni strutturali, precedentemente riscontrate, a carico del complesso pre-sinaptico.

Infatti, la presenza di un numero maggiore di Zone Attive e l'incremento della frazione attiva nei bottoni mutanti potrebbe determinare una notevole agevolazione negli eventi del *recycling* vescicolare. In questo caso particolare, ovvero una stimolazione chimica di 5 minuti, potrebbe provocare, lungo la membrana sinaptica dei bottoni mutanti, un aumento significativo degli eventi di endocitosi, con conseguente incremento nella formazione di nuove vescicole sinaptiche contenenti la sonda fluorescente. Una volta originatesi, queste nuove vescicole, iniziano a delocalizzarsi in modo disomogeneo lungo tutta l'area interna del bottone.

La distribuzione anomala delle vescicole sinaptiche, appartenenti al RRP, nei bottoni mutanti, potrebbe essere la causa di risposte anomale osservate alle successive stimolazioni di scarico, effettuate nei tre differenti protocolli sperimentali.

In particolare, alla fine della stimolazione chimica di scarico di breve durata temporale (1 minuto), i bottoni *Sply* appaiono ancora notevolmente fluorescenti rispetto a quelli di controllo. Anche in questo caso, i bottoni mutanti evidenziano una distribuzione spaziale della fluorescenza stessa molto simile a quella osservabile alla fine della stimolazione di carico nei bottoni di controllo. Infatti, i bottoni mutanti sono caratterizzati da una fluorescenza molto intensa localizzata lungo i bordi interni dei bottoni, lasciando la porzione centrale completamente libera. Questa nuova distribuzione spaziale della sonda evidenzia quindi una nuova distribuzione delle vescicole sinaptiche. Infatti, grazie alla seconda stimolazione (stimolazione di scarico), queste migrano verso la membrana sinaptica per fondersi con essa. Il fatto però che permanga, all'interno del bottone, una fluorescenza ancora molto intensa, indica che solo una parte delle vescicole sinaptiche sono andate incontro ad esocitosi.

Inoltre, il rilascio calcolato per questo protocollo sperimentale, risulta nettamente inferiore per i bottoni *Sply* rispetto ai bottoni di controllo. Questo dato sottolinea come,

probabilmente, la seconda stimolazione chimica, essendo limitata in termini di intensità e di durata temporale, non sia in grado di mobilitare tutto il pool vescicolare RRP. Questa incapacità è però direttamente relazionabile alla delocalizzazione delle vescicole stesse. Infatti, la seconda stimolazione determinerebbe, da una parte l'esocitosi esclusivamente delle vescicole sinaptiche già presenti lungo la membrana sinaptica, e dall'altra la mobilitazione delle restanti vescicole dal centro verso le aree periferiche.

Nel protocollo sperimentale successivo, la stimolazione di scarico è stata caratterizzata da un aumento della durata temporale, passando da 1 minuto a 5 minuti. L'incremento temporale, ma non d'intensità, della stimolazione di scarico, conduce ad nuova intensità e distribuzione della fluorescenza. In particolare, i bottoni *Sply* sono, nuovamente caratterizzati da un'intensità del segnale maggiore rispetto ai bottoni di controllo. Anche in questo caso, i bottoni mutanti evidenziano una distribuzione spaziale anomala, rispetto a quella dei controlli. Infatti, si osserva come la marcatura diventi estremamente sottile ma molto intensa soprattutto a livello perimetrale, dove sembra localizzarsi a livello della membrana sinaptica. Inoltre, all'interno del bottone, si notano delle piccole aree circolari luminose. Queste appaiono poco nitide e poco delimitate con una localizzazione casuale all'interno del bottone.

Questa nuova distribuzione, lungo la membrana sinaptica del segnale luminoso, sottolinea la quasi completa esocitosi di tutte le vescicole sinaptiche caricate (contenenti la sonda) alla fine della fase di carico. Ciò significa che una stimolazione di scarico di pari intensità ma di durata temporale più lunga permette la totale mobilitazione di tutte le vescicole caricate e la loro fusione, con conseguente rilascio del neurotrasmettitore. Probabilmente, il realizzarsi della quasi completa esocitosi vescicolare è supportata dall'incremento della frazione attiva.

Inoltre, in seguito alla totale mobilitazione vescicolare verso la periferia e la conseguente esocitosi, rimangono visibili delle aree circolari luminose distribuite all'interno del bottone. Per comprendere la natura di tali aree è stata in seguito eseguita l'analisi dei bottoni sinaptici *Sply* al microscopio elettronico.

Infine, nel terzo protocollo sperimentale, la seconda stimolazione (fase di scarico) è stata caratterizzata da un aumento della durata temporale, passando da 5 minuti a 10 minuti. Il notevole incremento temporale, ma non d'intensità, della stimolazione di scarico, conduce ad nuova intensità e distribuzione della fluorescenza. In particolare, in queste condizioni i bottoni *Sply* sono caratterizzati da un'intensità del segnale molto simile ai bottoni di controllo. Inoltre, bottoni mutanti evidenziano una distribuzione spaziale della fluorescenza molto simile a quella osservabile alla fine della stimolazione di carico nei bottoni di controllo. Infatti, i bottoni mutanti sono caratterizzati da una fluorescenza leggermente più intensa localizzata lungo i bordi interni dei bottoni stessi, lasciando la

porzione centrale completamente libera. I bottoni mutanti, osservati alla fine di questa fase di scarico, sono molto simili ai bottoni mutanti osservati alla fine della fase di scarico da 1 minuto.

Inoltre, analizzando i rilasci, si nota come in questo caso specifico, i rilasci dei controlli e dei mutanti siano molto simili. Questo dato potrebbe essere espressione di eventi di eso-/endocitosi molto più frequenti lungo le membrane sinaptiche mutanti. In particolare, con l'aumento temporale della stimolazione, questa determina la completa esocitosi delle vescicole sinaptiche, prontamente bilanciata da eventi di endocitosi. Permanendo lo stimolo chimico, il sistema si porterebbe ad una fase stazionaria in cui vi sarebbe un sostanziale equilibrio tra gli eventi di endo ed eso-citosi.

Questo equilibrio dell'intero sistema è tipico di una normale stimolazione sinaptica ed è caratterizzata dall'utilizzo prevalente di vescicole sinaptiche appartenenti al pool RRP il quale pool viene continuamente rinnovato attraverso le vescicole in attiva endocitosi. In questo sistema non interverrebbero quindi altre vie di formazione delle vescicole, che invece vengono generalmente attivate da stimolazioni di maggiore intensità e durata [103].

In realtà, considerando i valori di intensità di fluorescenza iniziale specifici per i bottoni mutanti ed i relativi rilasci, risulta che i bottoni *Sply* siano caratterizzati, in questo protocollo specifico, da un rilascio vescicolare massiccio. Ciò sarebbe supportato non solo dai dati relativi all'intensità e distribuzione della fluorescenza raccolti in questi esperimenti, ma anche dall'incremento della frazione di regione attiva dei bottoni stessi (ottenuta dall'analisi delle Zone Attive, descritta in precedenza) che sarebbe responsabile di una attività di esocitosi aumentata per unità di superficie, rispetto ai controlli. Quest'ipotesi è stata supportata e confermata da esperimenti di elettrofisiologia eseguiti dal prof. Megighian (Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana, Sezione di Fisiologia). Infatti, in questo caso sono stati determinati i potenziali evocati in seguito a stimolazione elettrica dell'afferenza nervosa della placca neuromuscolare. In questo modo si è evidenziato un aumento nell'ampiezza di tali eventi, al quale corrisponderebbe quindi un incremento del rilascio sinaptico evocato.

5.2.4. ANALISI STRUTTURALE DELLA GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE

L'osservazione al microscopio elettronico dei bottoni sinaptici mutanti conferma tutte le valutazioni strutturali evidenziate precedentemente.

In particolare, il reticolo subsinaptico (SSR) sembra mantenere la sua estensione, ma parallelamente sembra carente sviluppo conformazionale (vi sono meno ripiegamenti delle membrane che normalmente costituiscono questa struttura). Questa effettiva regressione del SSR è in accordo con la forte riduzione del segnale fluorescente già

osservato nel caso degli esperimenti di immunoistochimica condotti utilizzando l'anticorpo anti-DLG.

Contemporaneamente sono chiaramente visibili tutte le componenti del complesso pre-sinaptico all'interno del bottone stesso, quali le vescicole sinaptiche, i mitocondri e la membrana sinaptica stessa.

In particolare, l'area interna del bottone *Sply* appare completamente ricoperta da vescicole sinaptiche. Queste, quindi, perdono completamente la specifica localizzazione periferica, distribuendosi omogeneamente sull'intera area interna. Oltre all'organizzazione spaziale, le vescicole sembrano perdere completamente tutti quei tratti caratteristici precedentemente descritti. Le vescicole mutanti appaiono, infatti, come un insieme disomogeneo di piccole strutture circolari caratterizzate da dimensioni e colorazioni differenti.

In realtà, si osservano due tipologie di vescicole corrispondenti a due differenti dimensioni e colorazioni. Infatti, soprattutto lungo le zone periferiche del bottone, si notano delle vescicole di notevole grandezza caratterizzate da una colorazione molto chiara. Queste, contrastano nettamente con le restanti vescicole che riflettono tutte le caratteristiche riscontrate per le vescicole di controllo. Considerando queste specificità strutturali e di colorazione, si potrebbe ipotizzare una natura differente per queste vescicole più grandi. Infatti, queste particolari strutture circolari potrebbero corrispondere a delle cisterne endosomiali.

In un lavoro recente [104], è stato dimostrato che la depolarizzazione prolungata della membrana pre-sinaptica determina la formazione massiva di strutture simili a quelle endosomiali., derivanti dall'invaginazione della membrana sinaptica o dalla fusione tra loro di diverse vescicole. Inoltre, questi piccoli vacuoli e cisterne endosomiali sembrano essere coinvolte nei processi d'esocitosi, in quanto concorrenti in meccanismi responsabili dell'incremento dell'efficienza sinaptica e dell'aumento del rilascio quantale.

La genesi e la presenza di queste cisterne endosomiali nei bottoni *Sply* in condizioni normali (cioè in assenza di specifici stimoli che inducano una depolarizzazione prolungata della membrana sinaptica), potrebbero essere correlate all'incremento della risposta sinaptica.

Comunemente, la formazione di cisterne endosomiali è correlata a situazioni di stress sinaptico a carico dei bottoni, stress che si traduce in una maggiore quantità di eventi di esocitosi e di un incremento della risposta sinaptica. I bottoni *Sply* hanno evidenziato, come loro caratteristica intrinseca, una risposta sinaptica notevolmente aumentata, indipendente dal tipo di stimolazione. Ciò significa che normalmente i bottoni mutanti sono caratterizzati da un'efficienza sinaptica maggiore, come se si trovassero in una situazione di stress continuo.

La presenza di queste cisterne endosomiali, all'interno dei bottoni mutanti, confermerebbe lo status di iperattività dei bottoni stessi e del coinvolgimento della via endosomiale nella formazione di nuove vescicole sinaptiche in grado di mantenere il livello di rilascio sinaptico richiesto.

5.2.5. ANALISI CONCLUSIVA

In base a tutte le informazioni raccolte, la giunzione neuromuscolare *Sply* risulta essere caratterizzata da un'efficienza sinaptica notevolmente maggiore rispetto alla giunzione di controllo.

Questa peculiarità funzionale è espressione di precise e specifiche modificazioni strutturali e conformazionali della NMJ *Sply*. Infatti, questa ha contraddistinto la sua organizzazione trasformandosi in una giunzione nettamente sbilanciata verso strutture assoniche con scarse ramificazioni, composte da bottoni sinaptici di dimensioni maggiori. Le alterazioni più importanti sono state però attuate principalmente a carico dei bottoni sinaptici, Infatti i bottoni risultano modificati strutturalmente, essendo più ricchi di Zone Attive e di strutture (le cisterne endosomiali) capaci di supportare un rilascio sinaptico di entità maggiore mediante la creazione di nuove vescicole sinaptiche in grado di rifornire il pool (RRP) generato dai singoli eventi di eso-/endocitosi.

Tali modificazioni strutturali e conformazionali della NMJ *Sply* potrebbero derivare dall'influenza di due differenti tipologie di stimolazione cellulare con il normale pattern di sviluppo della giunzione stessa.

La prima influenza potrebbe derivare dall'alterazione della composizione delle membrane costituenti la NMJ in formazione. Infatti, l'aumento della concentrazione sfingolipidica cellulare, potrebbe tradursi, in una alterazione nella fluidità delle membrane che renderebbe difficoltoso qualunque evento di ripiegamento o di gemmazione. Tale rigidità costituirebbe un problema soprattutto nelle giunzioni neuromuscolari in formazione, in quanto queste si sviluppano mediante eventi di gemmazione da un bottone ad un altro [105].

La seconda influenza deriverebbe dall'intima relazione e comunicazione tra la NMJ e la fibra muscolare con cui e' in contatto. Queste due entità si formano indipendentemente l'una dall'altra, in quanto la loro formazione è determinata da pattern di attività di geni differenti. Una volta formatesi però, queste due entità richiedono un'intima relazione al fine di poter completare lo sviluppo correttamente. Infatti, le singole ramificazioni secondarie neo-costituite della NMJ vengono confermate, saldate e sviluppate esclusivamente se associate al sarcolemma muscolare [106][107][108][109][110].

Considerando questo profondo rapporto tra NMJ e fibra muscolare e la sua finezza di regolazione, suggerisce la possibilità che una possa adeguarsi all'altra anche in termini funzionali. Per esempio, la richiesta, da parte della fibra muscolare, di uno stimolo sinaptico maggiore per poter attuare una risposta contrattile, potrebbe essere assecondata dalla NMJ mediante delle modificazioni strutturali che le permetterebbero di soddisfare tali richieste di stimolazione.

La giunzione neuromuscolare degli individui *Sply* potrebbe essere andata in contro ad un nuovo equilibrio dato da una risposta compensatoria per permettere alla fibra muscolare di assolvere, almeno parzialmente il suo ruolo contrattile. La ridotta capacità locomotoria delle larve *Sply*, evidenzia comunque, come tale compensazione non sia in grado di sopperire completamente all'alterazione delle normali strutture.

5.3. SISTEMA NERVOSO CENTRALE

L'aumento della concentrazione degli sfingolipidi ha determinato delle importanti modificazioni strutturali e funzionali sia dell'apparato muscolare sia del Sistema Nervoso Periferico delle larve *Sply*. Ci si è quindi chiesti se vi fossero anomalie evidenziabili anche a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC).

5.3.1. ANALISI PRELIMINARE DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE

L'intensa marcatura, riscontrata nei cervelli *Sply*, risultante dalla colorazione con Oil Red O (un colorante specifico per trigliceridi neutri e lipidi in generale) conferma l'ipotesi inizialmente avanzata di possibili accumuli lipidici anche a livello cerebrale.

5.3.2. COLORAZIONE CON CERAMIDE FLUORESCENTE

La notevole presenza, nel complesso dei cervelli mutanti, di un segnale fluorescente del colorante BODIPY, netto e molto intenso, conferma l'ipotesi di ceramide accumulata e quindi di probabili ammassi sfingolipidici nelle diverse porzioni del cervello. Infatti, il cervello dei mutanti appare marcato in tutte le sue strutture: lobi ottici e ganglio ventrale

Ulteriore conferma della presenza di accumuli lipidici nel cervello dei mutanti *Sply* è apportata da dati preliminari ottenuti mediante osservazione al microscopio elettronico. In particolare, sono state fatte delle sezioni di alcuni lobi destri provenienti da cervelli di larve mutanti e di controllo. L'analisi di queste sezioni ha evidenziato la presenza di cumuli

circolari tra i diversi corpi cellulari di neuroni. Inoltre, si è notato come spesso vi siano numerosi corpi cellulari neuronali in cui i nuclei risultano chiaramente apoptotici.

Resta da valutare in modo più approfondito le possibili influenze di tali anomalie sulle funzioni del cervello.

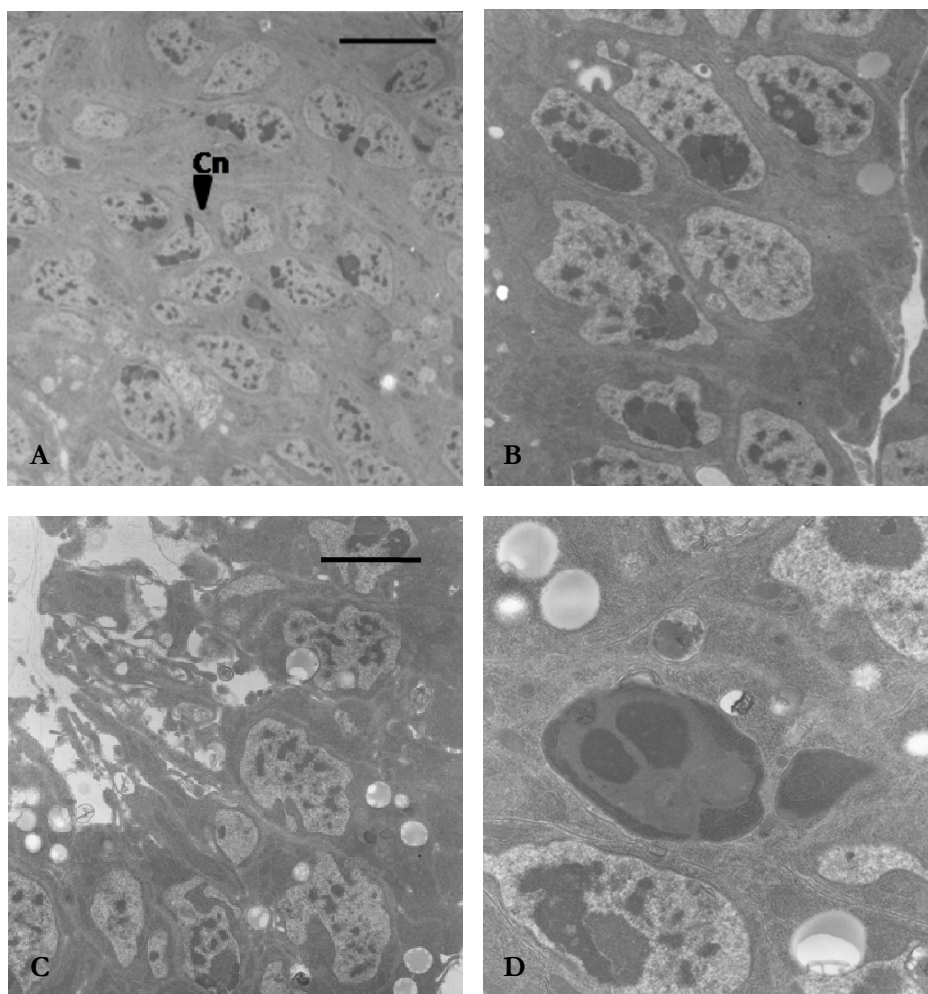


Figura 115 - Accumuli lipidici nel cervello.

In figura sono riportate alcune sezioni di cervello, in particolare di lobo destro, provenienti da larve di controllo e larve *Sph*. In figura A: sezione di lobo destro di una larva Canton S. Sono evidenziati i corpi nucleari. In figura B, C: sezioni di lobo destro di due larve *Sph*. Si notano i corpi nucleari e delle gocce lipidiche. In figura D, lobo destro di una larva *Sph*. nucleo apoptotico. Barra dimensionale: 5 micron.

5.4. CONCLUSIONI FINALI E PROSPETTIVE FUTURE

L'osservazione delle larve mutanti *Sply* ha evidenziato notevoli anomalie strutturali a carico di differenti apparati quali quello muscolare e nervoso. La presenza di queste modificazioni conformazionali determinano a loro volta delle alterazioni funzionali, le quali sono in qualche modo controbilanciate da differenti risposte compensatorie tra i diversi apparati.

In particolare, durante la fase larvale, i mutanti *Sply* sembrano essere colpiti esclusivamente da una capacità locomotoria deficitaria. Ma la presenza di accumuli sfingolipidici in nel cervello, quali effetti può produrre? Ad esempio, questi accumuli potrebbero essere la causa di neurodegenerazione?

In letteratura, sono riportati diversi lavori nei quali si discute il coinvolgimento delle alterazioni nel metabolismo degli sfingolipidi nella patogenesi di specifici processi neurodegenerativi. In tale direzione, è stato dimostrato come l'incremento o il decremento di colesterolo e sfingolipidi, quali componenti principali dei *lipid rafts*, siano direttamente correlati con l'insorgere del morbo di Alzheimer [111][112].

La possibile conferma di un nesso tra accumulo degli sfingolipidi ed insorgenza del morbo di Alzheimer è stata recentemente riscontrata in un recente studio genetico. In particolare, in questo lavoro, è stato analizzato il genoma proveniente da 14 individui Caucasic, malati di Alzheimer, nella sua forma con insorgenza più tardiva (LOAD, Late-Onset Alzheimer's Disease) [113].

In particolare, sono stati valutati 23 geni candidati localizzati sul cromosoma 10. Questi geni sono stati scelti in base alla loro posizione lungo il cromosoma 10 ed il loro possibile coinvolgimento nella patogenesi della malattia di Alzheimer. L'analisi genetica ha evidenziato un'associazione significativa tra il gene SGPL1 con il LOAD, suggerendo che una variazione a carico di questo gene costituirebbe un raro fattore di suscettibilità per il LOAD. E' importante ricordare che il gene umano SGPL1 è omologo del gene *Sply* in *Drosophila*.

Questa evidenza genetica suggerirebbe un diretto coinvolgimento degli sfingolipidi nella patogenesi del morbo di Alzheimer, mediante la modulazione del taglio del APP (proteina progenitrice dell'amiloide). Infatti, è stato dimostrato che l'idrolisi della sfingomieline a livello della superficie cellulare determina il tasso di generazione del peptide β -amiloide ($A\beta$) mediante il coinvolgimento della ceramide come secondo messaggero [114]. Contemporaneamente, un incremento di circa tre volte dei livelli organici di ceramide è stato riscontrato in diversi pazienti affetti dal morbo di Alzheimer [115]. L'aumento dei livelli di ceramide sono generalmente accompagnati da un concomitante decremento del contenuto di sulfatidi nel cervello. Ciò suggerisce che la ceramide in eccesso potrebbe

essere stata prodotta dalla degradazione di queste forme altamente glicosilate di sfingolipidi presenti nel cervello stesso.

Alla luce di questi riscontri genetici derivati da pazienti affetti dal morbo di Alzheimer, si potrebbe ipotizzare che i mutanti *Sph* da noi studiati, possano costituire un modello per studiare aspetti patogenetici della malattia di Alzheimer in *Drosophila*. Le indicazioni preliminari di cui siamo in possesso suggeriscono la possibilità che questo mutante presenti anomalie strutturali a livello cerebrale (larvale) che potrebbero essere in relazione alla patogenesi del morbo di Alzheimer. Tuttavia, servirebbero informazioni simili ottenute da cervelli di adulti per poter stabilire una relazione più precisa.

In ogni caso, questi mutanti sono caratterizzati, già in fase larvale, da modificazioni strutturali e da notevoli accumuli lipidici a carico del SNC. Contemporaneamente, l'analisi degli adulti hanno evidenziato perdita completa della capacità di volo ed una notevole riduzione della vitalità. Entrambe queste caratteristiche potrebbero essere espressione di neurodegenerazione a livello centrale.

Al fine di convalidare definitivamente l'ipotesi di poter utilizzare i mutanti *Sph* come modello per lo studio della patogenesi del morbo di Alzheimer, sarebbe necessario effettuare alcuni esperimenti specifici per valutare l'effettiva neurodegenerazione durante la fase adulta. Questa potrebbe essere evidenziata mediante l'osservazione al microscopio elettronico dei cervelli di adulti *Sph* con età differente. In questo modo, dovrebbe essere possibile monitorare: la presenza di accumuli lipidici, il loro evolversi in termini dimensionali nel tempo, e l'apoptosi con conseguente morte neuronale associata.

Contemporaneamente, mediante test comportamentali atti alla valutazione delle capacità locomotorie, dell'apprendimento e della memoria, sarebbe possibile valutare l'evolversi della neurodegenerazione in termini di funzionalità cerebrale.

In base a queste considerazioni finali, possiamo considerare il mutante *Sph* in *Drosophila* un ottimo modello per lo studio degli effetti di accumuli sfingolipidici nell'organismo stesso. In particolare potrebbe rivelarsi un ottimo modello per la comprensione di alcune cause e delle varie fasi di sviluppo del morbo di Alzheimer. In tal caso, potrebbe quindi risultare una buona sistema per la messa a punto di innovativi trattamenti farmacologici in grado di contrastare specifiche fasi nell'instaurarsi e nella progressione di questa importante patologia.

6. **BIBLIOGRAFIA**

-
- [1] **Rubin GM.** (1988) *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science Jun 10;240(4858):1453-9*
- [2] **Marsh JL, Thompson LM.**(2006) *Drosophila* in the study of neurodegenerative disease. *Neuron Oct 5;52(1):169-78.*
- [3] **Rockenstein E, Crews L, Masliah E.**(2007) Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development. *Adv Drug Deliv Rev Sep 30;59(11):1093-102.*
- [4] **Schwarzel M.** Locating engrams of olfactory memories in *Drosophila*. (2003) *Tesi di dottorato; Università Julius-Maximilian di Bayer.*
- [5] **Sang TK, Jackson GR.** (2005) *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *NeuroRx Jul;2(3):438-46.*
- [6] **Demerec M.** (1950) Biology of *Drosophila*. *CSHL press.*
- [7] **Bate M, Martinez Arias A.** (1993) The development of *Drosophila melanogaster*. *CSHL press.*
- [8] **Clark KA, Bland JM, Beckerle MC.**(2007) The *Drosophila* muscle LIM protein, Mlp84B, cooperates with D-titin to maintain muscle structural integrity. *J Cell Sci Jun 15;120(Pt 12):2066-77.*
- [9] **Peron S, Zordan M, Magnabosco A, Reggiani C, Megighian A.** From action potential to contraction: neural control and excitation-contraction coupling in larval muscles of *Drosophila*. In fase di pubblicazione.
- [10] **Hoang B, Chiba A.** (2001) Single-Cell Analysis of *Drosophila* Larval Neuromuscular Synapses. *Developmental Biology 229, 55-70.*
- [11] **Budnik V, Gorczyca M, Prokop A.** (2006) Selected methods for the anatomical study of *Drosophila* embryonic and larval neuromuscular junctions. *Int Rev Neurobiol 75:323-65.*
- [12] **Budnik V.** (1996) Synapse assembly and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Current Opinion in Neurobiology 6, 858-867.*
- [13] **Keshishian H, Brodie K, Chiba A, Bate M.** (1996) The *Drosophila* neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function. *Annu. Rev. Neurosci. 19, 545-575.*
- [14] **Brodie K, Bate M.** (1993) Development of the embryonic neuromuscular synapse of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience 13, 144-166.*
-

-
- [15] **Monastriani M, Gorczyca M, Rapus J, Eckert M, White K, Budnik V.** (1995) Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology* 356, 275-287.
- [16] **Cantera R, Nassel DR.** (1992) Segmental peptidergic innervation of abdominal targets in larval and adult dipterian insects revealed with an antiserum against leukokinin I. *Cell and Tissue Research* 269, 459-471.
- [17] **Zhong Y, Pena L.** (1995) A novel synaptic transmission mediated by a PACAP-like neuropeptide in *Drosophila*. *Neuron* 15, 2354-2366.
- [18] **Jia X.-X., Gorczyca M, Budnik V.** (1993) Ultrastructure of neuromuscular junctions in *Drosophila*: Comparison of wild type and mutants with increased excitability. *Journal of Neurobiology* 24, 1025-1044.
- [19] **Johansen J, Halpern ME, Johansen KM, Keshishian H.** (1989) Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *Journal of Neuroscience* 9, 710-725.
- [20] **Budnik JV, Gorczyca M.** (1992) SSB, an antigen that selectively labels morphologically distinct synaptic boutons at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Journal of Neurobiology* 23, 1054-1066.
- [21] **Gorczyca M, Augart C, Budnik V.** (1993) Insulin-like receptor and insulin-like peptide are localized at neuromuscular junctions in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 13, 3692-3704.
- [22] **Gramates LS, Budnik V.** (1999) Synapse assembly and maturation. *International review of neurobiology* 43.
- [23] **Prokop A, Meinertzhagen IA.** (2006) Development and structure of synaptic contacts in *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol* 17, 20-30.
- [24] **Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ.** (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 19;312(5776):1051-4.
- [25] **Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürbeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E.** (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* Mar 16;49(6):833-44.

-
- [26] **Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P.** (1999) Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Feb 28;354(1381):269-79.*
- [27] **Schwarz TL.** (2006) Transmitter release at the neuromuscular junction. *Int Rev Neurobiol.75:105-44*
- [28] **Chen K, Featherstone DE.** (2005) Discs-large (DLG) is clustered by presynaptic innervation and regulates postsynaptic glutamate receptor subunit composition in *Drosophila*. *BMC Biol. Jan 8;3:1.*
- [29] **Atwood HL, Govind CK, Wu C-F.** (1993) Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *Journal of Neurobiology 24, 1009-1024.*
- [30] **Fertuck HC, Salpeter MM.** (1974) Localization of acetylcholine receptor by 125I-labeled alpha-bungarotoxin binding at mouse motor endplates. *Proc, Natr, Acad. Sci USA 71, 1376-1378.*
- [31] **Rheuben MB.** (1985) Quantitative comparison of the structural features of slow and fast neuromuscular junctions in *Manduca*. *Journal of Neuroscience 5, 1704-1716.*
- [32] **Rheuben MB, Reese TS.** (1978). Three-dimensional structure and membrane specializations of moth excitatory neuromuscular synapse. *Journal of Ultrastructure Research 65, 95-111.*
- [33] **Atwood HL, Wojtowicz JM.** (1986) Short-term and long-term plasticity and physiological differentiation of crustacean motor synapses. *Internationa Review of Neurobiology 28, 275-362.*
- [34] **Pearce J, Govind CK, Shivers RR.** (1986) Intramembranous organization of lobster excitatory neuromuscular synapses. *Journal of Neurocytology 15, 241-252.*
- [35] **Rheuben MB, Yoshihara M, Kidokoro Y.** (1999). Ultrastructural correlates of neuromuscular junction development. In: Press, A. (Ed.) *Neuromuscular Junction in Drosophila*, pp. 69-92
- [36] **Guan B, Hartmann B, Kho Y-H, Gorczyca M, Budnik V.** (1996). The *drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse. *Curr. Biol. 6, 695-706.*
- [37] **Faeder I, Salpeter M.** (1970) Glutamate uptake by a stimulated insect nerve muscle preparation. *Journal of Cell Biology 46, 300-307.*
- [38] **Pielage J, Fetter RD, Davis GW.** (2007) A postsynaptic spectrin scaffold defines active zone size, spacing, and efficacy at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol. Nov 6;175(3):491-503*
-

-
- [39] **Rohrbough J, Broadie K.** (2005) Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat Rev Neurosci.* Feb;6(2):139-50
- [40] **Sharma P, Asztalos Z, Ayyub C, de Bruyne M, Dornan AJ, Gomez-Hernandez A, Keane J, Killeen J, Kramer S, Madhavan M, Roe H, Sherkhane PD, Siddiqi K, Silva E, Carlson JR, Goodwin SF, Heisenberg M, Krishnan K, Kyriacou CP, Partridge L, Riesgo-Escovar J, Rodrigues V, Tully T, O'Kane CJ.** (2005) Isogenic autosomes to be applied in optimal screening for novel mutants with viable phenotypes in *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet.* 2005 Apr-Jun;19(2):57-85.
- [41] **Hoekstra D, Maier O, van der Wouden JM, Slimane TA, van IJzendoorn SC.** (2003) Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J Lipid Res.* May;44(5):869-77
- [42] **Kidokoro Y, Kuromi H, Delgado R, Maureira C, Oliva C, Labarca P.** (2004) Synaptic vesicle pools and plasticity of synaptic transmission at the *Drosophila* synapse. *Brain Res Brain Res Rev.* Dec;47(1-3):18-32.
- [43] **Bodstein D.** (1950) "The postembryonic development of *Drosophila*" da *Biology of Drosophila*. *CSHL Press*.
- [44] **Pereanu W, Shy D, Hartenstein V.** (2005) Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in *Drosophila*. *Dev Biol.* Jul 1;283(1):191-203
- [45] **Futerman AH, Hannun YA.** (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* Aug;5(8):777-82
- [46] **Acharya U, Acharya JK.** (2005) Enzymes of sphingolipid metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Cell Mol Life Sci.* Jan;62(2):128-42.
- [47] **Ogretmen B, Hannun YA.** (2004) Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer.* Aug;4(8):604-16.
- [48] **Chalfant CE, Spiegel S.** (2005) Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci.* Oct 15;118(Pt 20):4605-12
- [49] **Spiegel S, Milstien S.** (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *Biol Chem.* Jul 19;277(29):25851-4.
- [50] **Payne SG, Milstien S, Spiegel S.** (2002) Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* Oct 30;531(1):54-7.
- [51] **Pyne S, Pyne NJ.** (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J.* Jul 15;349(Pt 2):385-402
- [52] **Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN, Tilly JL.** (2000)

- Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med.* Oct;6(10):1109-14
- [53] **Prieschl EE, Csonga R, Novotny V, Kikuchi GE, Baumruker T.** (1999) The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc epsilon receptor I triggering. *J Exp Med.* Jul 5;190(1):1-8.
- [54] **Toman RE, Spiegel S.** (2002) Lysophospholipid receptors in the nervous system. *Neurochem Res.* Aug;27(7-8):619-27.
- [55] **Rohrbough J, Rushton E, Palanker L, Woodruff E, Matthies HJ, Acharya U, Acharya JK, Broadie K.** (2004) Ceramidase regulates synaptic vesicle exocytosis and trafficking. *J Neurosci.* Sep 8;24(36):7789-803.
- [56] **Hoekstra D, Maier O, van der Wouden JM, Slimane TA, van IJzendoorn SC.** (2003) Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids. *J Lipid Res.* May;44(5):869-77.
- [57] **Pagano RE, Puri V, Dominguez M, Marks DL.** (2000) Membrane traffic in sphingolipid storage diseases. *Traffic.* 2000 Nov;1(11):807-15.
- [58] **Chen M, Wang J.** (2008) Gaucher disease: review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* May;132(5):851-3.
- [59] **de Fost M, Aerts JM, Hollak CE.** (2003) Gaucher disease: from fundamental research to effective therapeutic interventions. *Neth J Med.* Jan;61(1):3-8.
- [60] **Schuchman EH.**(2007) The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis.* Oct;30(5):654-63.
- [61] **Bejaoui K, Uchida Y, Yasuda S, Ho M, Nishijima M, Brown RH Jr, Holleran WM, Hanada K.** (2002) Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. *J Clin Invest.* Nov;110(9):1301-8.
- [62] **Fortini ME, Skupski MP, Boguski MS, Hariharan IK.** (2000) A survey of human disease gene counterparts in the Drosophila genome. *J Cell Biol.* Jul 24;150(2):F23-30.
- [63] **Rietveld A, Neutz S, Simons K, Eaton S.** (1999) Association of sterol- and glycosylphosphatidylinositol-linked proteins with Drosophila raft lipid microdomains. *J Biol Chem.* Apr 23;274(17):12049-54.
- [64] **Dennis RD, Geyer R, Egge H, Menges H, Stirm S, Wiegandt H.** (1985) Glycosphingolipids in insects. Chemical structures of ceramide monosaccharide, disaccharide, and trisaccharide from pupae of *Calliphora vicina* (Insecta: Diptera). *Eur J Biochem.* 1985 Jan 2;146(1):51-8

-
- [65] **Rao RP, Acharya JK.** (2008) Sphingolipids and membrane biology as determined from genetic models. *Prostaglandins Other Lipid Mediat. Feb*;85(1-2):1-16.
- [66] **Acharya U, Patel S, Koundakjian E, Nagashima K, Han X, Acharya JK.**(2003) Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration. *Science. Mar 14*;299(5613):1740-3.
- [67] **Renault AD, Starz-Gaiano M, Lehmann R.** (1980) Metabolism of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid: a genome wide analysis of gene expression in *Drosophila*. *Mech Dev. 2002 Dec*;119
- [68] **Herr DR, Fyrst H, Phan V, Heinecke K, Georges R, Harris GL, Saba JD.** (2003) Sply regulation of sphingolipid signaling molecules is essential for *Drosophila* development. *Development. Jun*;130(11):2443-53
- [69] **Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y.** (2004)Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol. *Biochem Biophys Res Commun. Dec 3*;325(1):338-43.
- [70] **Li G, Foote C, Alexander S, Alexander H.** (2001) Sphingosine-1-phosphate lyase has a central role in the development of *Dictyostelium discoideum*. *Development. Sep*;128(18):3473-83.
- [71] **Mendel J, Heinecke K, Fyrst H, Saba JD.** (2003) Sphingosine phosphate lyase expression is essential for normal development in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem. Jun 20*;278(25):22341-9.
- [72] **Phan VH, Herr DR, Panton D, Fyrst H, Saba JD, Harris GL.** (2007) Disruption of sphingolipid metabolism elicits apoptosis-associated reproductive defects in *Drosophila*. *Dev Biol. Sep 15*;309(2):329-41.
- [73] **Macleod GT, Hegström-Wojtowicz M, Charlton MP, Atwood HL.** (2002) Fast calcium signals in *Drosophila* motor neuron terminals. *J Neurophysiol. Nov*;88(5):2659-63.
- [74] **Haines N, Seabrooke S, Stewart BA.** (2007) Dystroglycan and protein O-mannosyltransferases 1 and 2 are required to maintain integrity of *Drosophila* larval muscles. *Mol Biol Cell. Dec*;18(12):4721-30.
- [75] **Haines N, Stewart BA.** (2007) Functional roles for beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-A in *Drosophila* larval neurons and muscles. *Genetics. Feb*;175(2):671-9.
- [76] **Scaduto RC Jr, Grotyohann LW.** (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J. Jan*;76(1 Pt 1):469-77.

-
- [77] **Floryk D, Houstěk J.** (1999) Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin. *Biosci Rep. Feb;19(1):27-34.*
- [78] **Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, Bernardi P, Bonaldo P.** (2003) Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet. Dec;35(4):367-71.*
- [79] **Pagano RE, Martin OC, Kang HC, Haugland RP.** (1991) A novel fluorescent ceramide analogue for studying membrane traffic in animal cells: accumulation at the Golgi apparatus results in altered spectral properties of the sphingolipid precursor. *J Cell Biol. Jun;113(6):1267-79.*
- [80] **Marks DL, Bittman R, Pagano RE.** (2008) Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. *Histochem Cell Biol. Nov;130(5):819-32.*
- [81] **Rohrbough J, Rushton E, Palanker L, Woodruff E, Matthies HJ, Acharya U, Acharya JK, Broadie K.** (2004) Ceramidase regulates synaptic vesicle exocytosis and trafficking. *J Neurosci. Sep 8;24(36):7789-803.*
- [82] **Kohyama-Koganeya A, Kim YJ, Miura M, Hirabayashi Y.** (2008) A Drosophila orphan G protein-coupled receptor BOSS functions as a glucose-responding receptor: loss of boss causes abnormal energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 7;105(40):15328-33.*
- [83] **Hernandez Y, Castillo C, Roychowdhury S, Hehl A, Aley SB, Das S.** (2007) Clathrin-dependent pathways and the cytoskeleton network are involved in ceramide endocytosis by a parasitic protozoan, Giardia lamblia. *Int J Parasitol. Jan;37(1):21-32.*
- [84] **Snow PM, Patel NH, Harrelson AL, Goodman CS.** (1987) Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in Drosophila and grasshopper embryos. *J Neurosci. Dec;7(12):4137-44.*
- [85] **Ruiz-Canada C, Ashley J, Moeckel-Cole S, Drier E, Yin J, Budnik V.** (2004) New synaptic bouton formation is disrupted by misregulation of microtubule stability in aPKC mutants. *Neuron. May 27;42(4):567-80.*
- [86] **Ashley J, Packard M, Ataman B, Budnik V.** (2005) Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J Neurosci. Jun 22;25(25):5943-55.*
-

-
- [87] **Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V.** (1999) The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci. Sep 15;19(18):7793-803.*
- [88] **Koh YH, Ruiz-Canada C, Gorczyca M, Budnik V.** (2002) The Ras1-mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway regulates synaptic plasticity through fasciclin II-mediated cell adhesion. *J Neurosci. Apr 1;22(7):2496-504.*
- [89] **Packard M, Koo ES, Gorczyca M, Sharpe J, Cumberledge S, Budnik V.** (2002) The Drosophila Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell. Nov 1;111(3):319-30.*
- [90] **Hebbar S, Fernandes JJ.** (2005) A role for Fas II in the stabilization of motor neuron branches during pruning in Drosophila. *Dev Biol. Sep 1;285(1):185-99.*
- [91] **Wucherpennig T, Wilsch-Bräuninger M, González-Gaitán M.** (2003) Role of Drosophila Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol. May 12;161(3):609-24.*
- [92] **Huntwork S, Littleton JT.** (2007) A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth. *Nat Neurosci. Oct;10(10):1235-7.*
- [93] **Betz WJ, Mao F, Bewick GS.** (1992) Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci. Feb;12(2):363-75.*
- [94] **Ramaswami M, Krishnan KS, Kelly RB.** (1984) Intermediates in synaptic vesicle recycling revealed by optical imaging of Drosophila neuromuscular junctions. *Neuron. Aug;13(2):363-75.*
- [95] **Kuromi H, Kidokoro Y.** (1999) The optically determined size of exo/endo cycling vesicle pool correlates with the quantal content at the neuromuscular junction of Drosophila larvae. *J Neurosci. Mar 1;19(5):1557-65.*
- [96] **Fergestad T, Broadie K.** (2001) Interaction of stoned and synaptotagmin in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci. Feb 15;21(4):1218-27.*
- [97] **Delgado R, Maureira C, Oliva C, Kidokoro Y, Labarca P.** (2000) Size of vesicle pools, rates of mobilization, and recycling at neuromuscular synapses of a Drosophila mutant, shibire. *Neuron. Dec;28(3):941-53*
- [98] **Gutierrez E, Wiggins D, Fielding B, Gould AP.** (2007) Specialized hepatocyte-like cells regulate Drosophila lipid metabolism. *Nature. Jan 18;445(7125):275-80.*
- [99] **Bilderback TR, Chan JR, Harvey JJ, Glaser M.** (1997) Measurement of the Rate of Myelination Using a Fluorescent Analogue of Ceramide. *Journal of Neuroscience Research 49:497-507.*

-
- [100] **Ellen Gielen E, Vercammen J, Sýkora J, Humpolickova J, vandeVen M, Benda A, Hellings N, Hof M, Engelborghs Y, Steels P, Ameloot M.** (2005) Diffusion of sphingomyelin and myelin oligodendrocyte glycoprotein in the membrane of OLN-93 oligodendroglial cells studied by fluorescence correlation spectroscopy. *C. R. Biologies* 328 1057–1064.
- [101] **Watanabe R, Asakura K, Rodriguez M, Pagano RE.** (1999) Internalization and Sorting of Plasma Membrane Sphingolipid Analogues in Differentiating Oligodendrocytes. *J. Neurochem., Vol. 73, No. 4, 1375-1383.*
- [102] **Mizugishi K, Yamashita T, Olivera A, Miller GF, Spiegel S, Proia RL.** (2005) Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development. *Mol Cell Biol. Dec;25(24):11113-21.*
- [103] **Teng H, Wilkinson RS.** (2000) Clathrin-mediated endocytosis near active zones in snake motor boutons. *J Neurosci. Nov 1;20(21):7986-93.*
- [104] **Akbergenova Y, Bykhovskaia M.** (2008) Enhancement of the endosomal endocytic pathway increases quantal size. *Mol Cell Neurosci. Nov 5.*
- [105] **Budnik V.** (1996) Synapse maturation and structural plasticity at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Curr Opin Neurobiol. Dec;6(6):858-67.*
- [106] **Fernandes J, Keshishian H.** (1995) Neuromuscular development in *Drosophila*: insights from embryos and pupae. *Curr Opin Neurobiol. Feb;5(1):10-8.*
- [107] **Cash S, Chiba A, Keshishian H** (1992) Alterate neuromuscular target selection following the loss of single muscle fibers in *Drosophila*. *Neurosci. Jun;12(6):2051-64.*
- [108] **Broadie K, Bate M.** (1993) Muscle development is independent of innervation during *Drosophila* embryogenesis. *Development. Oct;119(2):533-43.*
- [109] **Keshishian H, Chang TN, Jarecki J.** (1994) Precision and plasticity during *Drosophila* neuromuscular development. *FASEB J. Jul;8(10):731-7.*
- [110] **Prokop A, Landgraf M, Rushton E, Broadie K, Bate M.** (1996) Presynaptic development at the *Drosophila* neuromuscular junction: assembly and localization of presynaptic active zones. *Neuron. Oct;17(4):617-26.*
- [111] **Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T.** (2007) Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med. May-Jun;11(3): 383-92.*
- [112] **Canevari L, Clark JB.** (2007) Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection. *Neurochem Res. Apr-May;32(4-5):739-50.*
-

-
- [113] **Morgan AR, Turic D, Jehu L, Hamilton G, Hollingworth P, Moskvina V, Jones L, Lovestone S, Brayne C, Rubinsztein DC, Lawlor B, Gill M, O'Donovan MC, Owen MJ, Williams J.** (2007) Association studies of 23 positional/functional candidate genes on chromosome 10 in late-onset Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* Sep 5;144B(6):762-70.
- [114] **Puglielli L, Ellis BC, Saunders AJ, Kovacs DM.** (2003) Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem.* May 30;278(22):19777-83.
- [115] **Han X, M Holtzman D, McKeel DW Jr, Kelley J, Morris JC.** (2002) Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem.* Aug;82(4):809-18.