

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia

Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche
Indirizzo Farmacologia, Tossicologia e Terapia
XXIII Ciclo

**Functional analysis of EFHC1, a gene
involved in Juvenile Myoclonic Epilepsy,
in *Drosophila***

Direttore della Scuola: Prof. Rosa Maria Gaion
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia
Università degli Studi di Padova

Coordinatore d'indirizzo: Prof. Rosa Maria Gaion
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia
Università degli Studi di Padova

Supervisore: Dott. Andrea Cignarella
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia
Università degli Studi di Padova

Supervisore esterno: Dott. Andrea Daga
IRCCS E. Medea Associazione "La Nostra Famiglia"

Dottoranda : Erica Zanarella

INDICE

ABSTRACT	p 1
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Epilessia	5
1.2 Epilessia Mioclonica Giovanile	7
1.3 Ruolo di <i>Efhc1</i>	8
1.4 <i>Drosophila melanogaster</i> : modello sperimentale	10
1.5 Microtubuli	14
1.6 Struttura della sinapsi neuromuscolare	16
1.7 Microtubuli e sinapsi	18
2. MATERIALI E METODI	21
2.1 Biologia Molecolare	21
2.1.1 Clonaggio del gene <i>Defhc1</i> in pBluescript® II Phagemid Vectors (BSSKII)	21
2.1.2 Clonaggio Gateway del gene <i>Defhc1</i> in pUast	25
2.1.3 Clonaggio Gateway del gene <i>Defhc1</i> in pTWG	29
2.1.4 Generazione del mutante knock out del gene <i>Defhc1</i>	30
2.1.5 Clonaggio CG8959 in pcDNA 3.1	31
2.2 Biologia Cellulare	33
2.2.1 Culture cellulari	33
2.2.2 Trasfezioni di plasmidi	33
2.2.3 Analisi immunocitochimica	35
2.3 Tecniche di Biochimica	36
2.3.1 Binding dei microtubuli	36
2.4 Generazione ed analisi di <i>Drosophilae</i> transgeniche	37
2.4.1 Preparazione del DNA per la microiniezione	37
2.4.2 Ciclo vitale di <i>Drosophila</i>	37
2.4.3 Microiniezione	38
2.4.4 Allestimento degli incroci per l'identificazione di individui trasformati	38

2.4.5 Allestimento di incroci per la localizzazione cromosomica e per il bilanciamento dell'inserto	39
2.5 Tecniche per l'analisi dei fenotipi	43
2.5.1 Analisi di Immunoistochimica	43
2.5.2 Anticorpi	43
2.5.3 Software per le immagini e l'analisi	44
Appendice A: Soluzioni	45
Appendice B: Protocolli	48
Appendice C: Vettori	51
3. RISULTATI	53
3.1 Identificazione del gene di <i>Drosophila</i> omologo a EFHC1	53
3.2 Generazione del mutante knock-out del gene <i>Defhc1</i>	55
3.3 Caratterizzazione fenotipica del mutante loss of function del gene <i>Defhc1</i>	57
3.4 Espressione ectopica del gene <i>Defhc1</i>	62
3.5 Analisi elettrofisiologica del mutante loss of function del gene <i>Defhc1</i>	64
3.6 Interazione di <i>Defhc1</i> con i microtubuli <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	66
3.7 Interazione di <i>Defhc1</i> ed i microtubuli del citoscheletro	69
4. DISCUSSIONE	75
5. BIBLIOGRAFIA	80

ABSTRACT

Mutations in the EFHC1 gene, encoding a novel microtubule binding protein, have been linked to juvenile myoclonic epilepsy. EFHC1 has been proposed to regulate cell division by controlling mitotic spindle organization and cerebral cortex lamination by modulating neuroblast migration. To understand EFHC1 function *in vivo* we generated knock-out *Drosophila* for the fly homolog *Defhc1*. We found that the NMJ synapse of *Defhc1* mutants display an increased number of satellite boutons and increased spontaneous neurotransmitter release. *Defhc1* binds to microtubules *in vitro* and overlaps *in vivo* with axonal and synaptic microtubules. Elimination of *Defhc1* from synaptic terminals reduces the number of microtubule loops, whose presence correlates with halted bouton division, suggesting that *Defhc1* is a negative regulator of bouton division. These results suggest that *Defhc1* functions as an inhibitor of neurite growth by finely tuning the microtubule cytoskeleton dynamics and that EFHC1-dependent JME may result from augmented spontaneous neurotransmitter release due to overgrowth of neuronal processes.



ABSTRACT

Mutazioni nel gene *EFHC1*, che codifica per una proteina in grado di legarsi ai microtubuli, sono state correlate con l'insorgenza dell'Epilessia Mioclonica Giovanile (JME). Il gene *EFHC1* è stato proposto come regolatore della divisione cellulare attraverso il controllo dell'organizzazione del fuso mitotico e come modulatore della migrazione dei neuroblasti nella corteccia cerebrale. Per comprendere *in vivo* la funzione del gene *EFHC1* abbiamo generato il mutante knock-out per il gene omologo *Defhc1* in *Drosophila*. Le sinapsi di giunzioni neuromuscolari (NMJ) di larve mutanti per *Defhc1* mostrano un maggior numero di bottoni satellite e l'aumento del rilascio spontaneo di neurotrasmettitore. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che la proteina Defhc1 si lega ai microtubuli e che *in vivo* colocalizza con i microtubuli sinaptici e assonali. In seguito all'eliminazione di Defhc1 dalle terminazioni sinaptiche è stata osservata una diminuzione del numero di loops formati dai microtubuli, la cui presenza è correlata con il blocco della divisione dei bottoni sinaptici, suggerendo che il gene *Defhc1* possa essere un regolatore negativo della divisione dei bottoni sinaptici. Questi risultati suggeriscono che Defhc1, attraverso una fine regolazione della dinamicità dei microtubuli del citoscheletro, agisca da inibitore della crescita delle terminazioni sinaptiche tramite e che la JME dipendente da mutazione di *EFHC1* potrebbe dipendere da un aumento del rilascio spontaneo di neurotrasmettitore conseguente all'eccessiva crescita sinaptica.

1. INTRODUZIONE

1.1 Epilessia

L'Epilessia è una condizione neurologica cronica caratterizzata da ricorrenti e improvvise crisi. Questa malattia prende il nome dal greco *epilambanein* che significa “essere sopraffatti, essere colti di sorpresa”. Infatti questa malattia, o meglio questo insieme di malattie, è caratterizzata dall'improvvisa insorgenza di crisi epilettiche che colgono il paziente di sorpresa. L'Epilessia affligge circa 50 milioni di persone nel mondo, e nel 40% dei casi l'eziologia sembra avere una componente genetica. Questa condizione è contraddistinta da frequenti crisi dovute ad una iperattività delle cellule nervose cerebrali e da altre manifestazioni di tipo motorio, sensitivo, psichico e neurovegetativo. In questo particolare stato patologico si verifica, infatti, un eccesso di attività elettrica del sistema nervoso: alcune cellule del cervello iniziano a lavorare ad un ritmo superiore al normale, producendo la cosiddetta scarica epilettica e di conseguenza la crisi (Renganathan et al. 2003). L'Epilessia può manifestarsi con un aspetto clinico vario: sia con disturbi convulsivi accompagnati da perdita di coscienza, sia con manifestazioni non convulsive associate o meno ad alterazione dello stato di coscienza. Attualmente, gli attacchi epilettici vengono distinti in quelli che originano da un solo emisfero cerebrale, dette anche crisi parziali o locali, e quelli che coinvolgono simultaneamente entrambi gli emisferi, denominate crisi generalizzate. Le crisi generalizzate comprendono sia le crisi di tipo tonico-cloniche, dette “grand mal”, sia la brusca perdita di coscienza per periodi, in genere, di pochi secondi, dette “petit mal”. Solitamente le crisi del tipo “grand mal” sono precedute da una fase prodromica (aura: irritabilità, ansia, cefalea) indicante la sede di origine della crisi. L'attacco convulsivo vero si manifesta con perdita di coscienza e caduta a terra. Questo stato è seguito da una fase tonica, con intense contrazioni dei muscoli degli arti, e da una fase clonica, con scuotimenti simmetrici degli arti come risultato di contrazioni e rilasciamenti alternati. Diversamente, le crisi del tipo “petit mal” sono caratterizzate clinicamente da assenze semplici con improvvisi episodi di perdita di coscienza, che si

1. INTRODUZIONE

manifestano tipicamente in età infantile e scolastica, della durata di 5-15 secondi, senza fenomeni motori.

Le Epilessie costituiscono un gruppo di patologie molto eterogeneo, pur rimanendo accomunate dalla ricorrenza di crisi epilettiche. Tuttavia questi disordini neurologici, sia che siano caratterizzati da crisi generalizzate sia da crisi parziali, possono comunque essere classificate in due grandi categorie: Epilessie Sintomatiche ed Epilessie Idiopatiche Generalizzate.

Nelle Epilessie Sintomatiche il disturbo è in genere parte di un fenotipo alterato più complesso. L'Epilessia può essere secondaria a lesioni cerebrali, malformazioni vascolari, tumori cerebrali, oppure essere associata a malattie metaboliche o difetti congeniti. In questo gruppo di epilessie la componente genetica è assente o comunque minoritaria. Le Epilessie Idiopatiche, invece, sono caratterizzate da crisi che si manifestano all'interno di un quadro clinico apparentemente normale, ma studi epidemiologici hanno rilevato l'importanza del ruolo giocato da fattori genetici nel determinare la predisposizione a questa forma di malattia. La maggior parte delle Epilessie Idiopatiche Generalizzate sono ereditate con modalità multifattoriale e l'espressione del fenotipo patologico può essere amplificato da fattori ambientali.

La farmacoterapia dell'Epilessia impiega farmaci antiepilettici, che con diversi meccanismi stabilizzano le proprietà elettriche della membrana delle cellule nervose, impedendo così le scariche elettriche spontanee. Si tratta però di una terapia sintomatica che non elimina la causa della malattia. Tuttavia, il 20% delle epilessie non è sufficientemente controllato dall'impiego di farmaci ed in questo caso si ricorre alla terapia chirurgica che asporta la regione cerebrale (nella maggior parte dei casi il lobo temporale medio) in cui originano le crisi epilettiche. Recentemente è stato introdotto un nuovo approccio terapeutico che consiste nella stimolazione del nervo vago. Questa tecnica è indicata in casi di Epilessia farmaco-resistente in cui le altre terapie non siano possibili o controindicate.

1.2 Epilessia Mioclonica Giovanile

L'Epilessia Mioclonica Giovanile (JME), detta anche sindrome di Janz, è una malattia genetica ereditaria, a carattere autosomico dominante, i cui meccanismi patogenetici sono ancora largamente sconosciuti. L'Epilessia Mioclonica Giovanile è una comune forma di epilessia appartenente alla famiglia delle Epilessie Idiopatiche Generalizzate (IGEs), ed è responsabile del 5-10% dei casi di epilessia. La JME si distingue tra queste ultime per il particolare pattern di sintomi che sono clinicamente distinti rispetto alle altre forme epilettiche. La principale caratteristica è l'insorgenza precoce: le prime crisi epilettiche si verificano in età adolescenziale, infatti, i primi sintomi possono essere diagnosticati entro i primi 12-18 anni di vita. Tuttavia l'Epilessia Mioclonica Giovanile risulta essere anche la forma di Epilessia Idiopatica Generalizzata più comune negli adulti, soprattutto nella popolazione femminile. I sintomi più ricorrenti sono principalmente due: scosse miocloniche, rapide, bilaterali e simmetriche, accompagnate da contrazioni muscolari sincrone delle spalle e delle braccia che si presentano dopo il risveglio mattutino, in caso di fatica eccessiva, privazione del sonno ed astinenza prolungata da alcool, ed episodi di assenza nel 40% dei pazienti. Le crisi generalizzate tonico-clonico si sviluppano, nella maggior parte dei casi, all'età di 15 anni, mentre i casi di perdita di coscienza si manifestano attorno ai primi 5-16 anni di vita. Da ciò è stato possibile stimare che, approssimativamente, il 3-8% dei casi di assenza epilettica in età infantile coinvolge pazienti affetti da Epilessia Mioclonica Giovanile (Zifkin et al. 2005).

Finora l'Epilessia Mioclonica Giovanile è stata correlata con diverse mutazioni tra cui: una mutazione a carico del gene GABRA1, gene localizzato sul cromosoma 5q34-q35, riscontrata in una famiglia nel Quebec (Cossette et al., 2002); una mutazione nel gene CACNB4, localizzato sul cromosoma 2q22-q23; una mutazione nel gene CLCN2, gene presente sul cromosoma 3q26, presente in una famiglia in Germania (Haug et al., 2003) e 2 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel gene BDR2, gene localizzato nel cromosoma 6p21, riscontrati in famiglie americane ed europee di New York (Pal et al., 2003).

Nel 2004, Suzuki ed i suoi collaboratori hanno identificato 6 mutazioni missenso nel gene *EJMA1*, localizzato sul cromosoma 6p12 che risultano strettamente correlate all'insorgenza dell'Epilessia Mioclonica Giovanile, in famiglie messicane, tedesche, americane ed europee. Questo gene codifica per una proteina chiamata EFHC1 o Mioclonina.

1.3 Ruolo di EFHC1

EFHC1 è un gene che codifica per la proteina EFHC1 (o mioclonia 1) del peso di 70 kDa costituita da 640 amminoacidi. Nella sua struttura quaternaria sono presenti tre domini DM10, a funzione sconosciuta, ed un motivo EF-hand tipico dei modulatori del calcio (Fig. 1).

Studi di espressione genica nell'uomo hanno evidenziato la presenza del trascritto in vari tessuti, in particolare è stato notato un alto livello di espressione nei tessuti nervosi. In colture primarie di neuroni di topo è stata osservata la presenza della proteina EFHC1 nel soma dei dendriti neuronali, ma non a livello degli assoni (Suzuki et al., 2004).

Cellule neuronali di ippocampo di topo, nelle quali la proteina è stata sovraespressa, mostrano neuriti più corti e meno ramificati rispetto ai controlli; inoltre queste cellule mostrano segni di neurodegenerazione e vanno incontro a morte precoce. Tali effetti sono mitigati dalla contemporanea sovraespressione della proteina contenente la mutazione patologica e dall'azione di SNX-482, un antagonista dei canali per il Ca^{2+} di tipo R voltaggio-dipendenti ($Ca_v2.3$).

Studi di immunoprecipitazione in cellule di cervello di topo, hanno dimostrato che la proteina umana EFHC1 coprecipita con i canali per il Ca^{2+} di tipo R ($Ca_v2.3$). Sono stati, inoltre, svolti esperimenti mediante la tecnica del "Patch-clamp" su cellule renali di cavia (BHK) stabilizzate per l'espressione dei canali del calcio $Ca_v2.3$ nei quali è stato osservato che la sovraespressione della proteina EFHC1 induce un aumento del flusso di corrente ionica attraverso i canali di tipo R. Ancora una volta questo effetto è mitigato dalla presenza della proteina EFHC1 contenente la mutazione patologica. Queste cellule BHK sono state trattate, inoltre, con diversi farmaci in grado di svolgere una azione

antagonista sui canali del Ca^{2+} . Anche in questo caso è stato osservato che solamente i farmaci antagonisti per i canali di tipo R sono in grado di indurre un effetto, ovvero una diminuzione della corrente ionica attraverso questo tipo di canale.

Da questi risultati preliminari si può ipotizzare che la proteina EFHC1 possa avere una attività apoptotica, ma soprattutto che sia in grado di modulare la funzionalità dei canali ionici per il Ca^{2+} causando una destabilizzazione elettrica delle membrane neuronali giustificando così l'insorgenza della malattia.

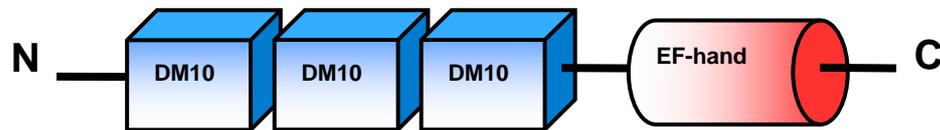


Figura 1. Rappresentazione schematica della proteina EFHC1. Nella della proteina sono presenti 3 domini DM10, a funzione tuttora sconosciuta, ed un motivo EF-hand tipico dei modulatori del Ca^{2+} .

Nel 2006, de Nijs ed i suoi collaboratori, hanno espresso la proteina umana, fusa con una proteina EGFP (Green Fluorescent Protein) in diverse linee cellulari. In questi esperimenti è stato riscontrato che, in cellule in interfase, la proteina di fusione si distribuisce nel citoplasma e nel nucleo, con accumuli specifici nel centrosoma. Diversamente, in cellule in mitosi la proteina umana EFHC1-EGFP è localizzata ai poli del fuso mitotico, mentre, durante la citochinesi, è situata nel corpo centrale del fuso mitotico. Successivamente esperimenti condotti su culture cellulari embrionali renali (HEK 293), con diverse forme tronche della proteina EFHC1-EGFP, hanno suggerito che la proteina EFHC1 potrebbe svolgere un ipotetico ruolo di regolatore della divisione cellulare.

Recenti studi di immunoprecipitazione in cellule embrionali renali (HEK 293), hanno dimostrato che la proteina EFHC1 è in grado di legarsi ai microtubuli, in particolare è stato osservato che la regione N-terminale è fondamentale per questa interazione (de Nijs et al ., 2009). Analogamente è stato

osservato che l'espressione della proteina contenente la mutazione patologica è in grado di generare alterazioni del fuso mitotico, una riduzione della progressione delle cellule in fase M, una riduzione della capacità di interazione con i microtubuli ed un aumento dell'apoptosi.

Esperimenti di elettroporazione in utero ed *ex vivo* su neurocorteccia di ratto hanno evidenziato che l'alterazione della proteina EFHC1 comporta un'alterazione della normale migrazione delle cellule corticali neuronali (de Njis et al., 2009). Queste osservazioni sollevano la possibilità che la proteina EFHC1 abbia un ruolo di regolatore della divisione e della migrazione cellulare. Come queste funzioni ipotetiche della proteina EFHC1 siano effettivamente legate alla patologia restano comunque ancora tutte da chiarire.

1.4 *Drosophila melanogaster*: modello sperimentale

Per molti decenni il moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster*, ha rappresentato il modello d'elezione per studi di genetica classica e negli ultimi anni è diventato un modello importante per decifrare le basi genetiche e molecolari di complessi processi biologici. Il confronto tra il genoma umano e quello di *Drosophila* ha dimostrato come questi due organismi nonostante la divergenza evolutiva condividano numerose famiglie di geni, sia dal punto di vista funzionale che strutturale. Alcune vie molecolari fondamentali per lo sviluppo di un organismo complesso, come l'organogenesi, la formazione del sistema nervoso e il controllo della proliferazione cellulare, sono altamente conservate. Tenendo a mente queste analogie genetiche sono svitati i vantaggi nell'utilizzare *Drosophila* come modello per studiare processi biologici conservati nell'uomo. Innanzitutto, fra gli invertebrati, *Drosophila* mostra la massima omologia con il genoma umano. Inoltre i moscerini della frutta possono essere facilmente allevati in laboratorio, hanno un tempo di generazione breve (circa dieci giorni), e di conseguenza permettono di condurre analisi genetiche. Si tratta di un organismo la cui anatomia e i cui processi di sviluppo sono noti e ben caratterizzati. Il suo genoma è stato interamente sequenziato e si possono facilmente ottenere individui transgenici. *Drosophila* presenta, inoltre, un sistema nervoso altamente evoluto,

con un cervello costituito all'incirca da 10^5 neuroni, con assoni ben sviluppati, sinapsi, neurotrasmettitori e glia.

La disponibilità di numerose tecniche genetiche e molecolari, il sequenziamento completo del genoma di *Drosophila* e l'osservazione del notevole grado di omologia tra i geni umani e quelli di *Drosophila* fanno del moscerino della frutta un organismo ideale in cui applicare l'approccio definito "reverse genetics". Al contrario dell'approccio genetico classico che mira ad identificare i geni che controllano un certo processo biologico, la reverse genetics sfrutta la possibilità di manipolare un gene e di analizzare le conseguenze di queste manipolazioni genetiche per cercare di attribuire al gene una funzione biologica e quindi di inserirlo nel contesto di un preciso processo biologico. Questa strategia è stata frequentemente applicata allo studio di geni responsabili di malattie umane per comprenderne la funzione che per la maggior parte di essi rimane completamente ignota. In pratica per studiare in *Drosophila* un gene malattia si cerca la presenza nel moscerino di un gene omologo e, una volta identificato, se ne alterano geneticamente i normali livelli di espressione. Questa alterazione, che può essere ottenuta abrogando, riducendo o sovra esprimendo il gene in questione, può produrre fenotipi la cui analisi rende possibile la comprensione della funzione della proteina da esso codificata (Muqit e Feany 2002).

Il sistema di espressione binario UAS-Gal4 permette di controllare in maniera tessuto-specifica e temporale la trascrizione di un gene posto sotto il controllo del promotore UAS. Questa tecnica prevede l'utilizzo di due linee transgeniche vitali diverse, una contenente il transgene d'interesse ed una l'attivatore Gal4, che devono essere incrociate per ottenere l'espressione del transgene. Il gene Gal4 codifica per una proteina identificata in *Saccharomyces cerevisiae* come un potente attivatore della trascrizione di geni indotti dal galattosio. Gal4 riconosce in modo specifico una sequenza di DNA chiamata UAS (Upstream Activating Sequences), composta da 4 siti di 17 bp e situata in posizione adiacente ai loci dei geni indotti dal galattosio. E' stato dimostrato che questo fattore trascrizionale può attivare anche in *Drosophila*, come in molti altri sistemi, la trascrizione di un gene posto sotto il controllo dell'elemento UAS (Fischer, 1988). Il sistema quindi è stato sfruttato nell'ambito di studi di funzione genica

1. INTRODUZIONE

(Brand e Perrimon, 1993), ponendo l'espressione del gene di interesse sotto il controllo dell'elemento UAS (Fig. 2). Dato che la trascrizione del gene richiede la presenza di Gal4, l'assenza di questo elemento nella linea transgenica creata per il gene di interesse, lo mantiene silente. Per attivare la trascrizione del gene, è necessario incrociare questa linea con una linea transgenica che esprime Gal4 sotto il controllo di un promotore specifico (linea driver). In questo modo, nella progenie, il gene viene espresso secondo il pattern di espressione dettato dal promotore utilizzato.

L'utilizzo di questo sistema di espressione comporta l'importante vantaggio di mantenere silente il gene di interesse, permettendo così di creare linee transgeniche anche per geni i cui prodotti proteici risultino tossici o letali.

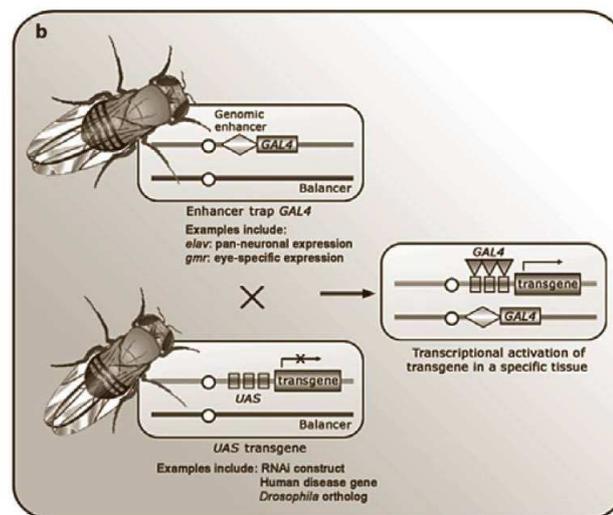


Figura 2. Espressione direzionata di geni in *Drosophila*. Si può generare un transgene che venga trascritto sotto il controllo di GAL4, subclonandolo a valle delle sequenze UAS che vengono riconosciute da questo attivatore trascrizionale. Il vettore più utilizzato a questo scopo è pUAST. Il gene di interesse rimane silente in assenza di GAL4. Perché esso venga attivato in una particolare cellula o tessuto, una mosca transgenica per il gene in questione (UAS-Gene X) dovrà essere incrociata con una mosca che esprima GAL4 (Enhancer Trap GAL4) (Cauchi et al., 2006).

Un approccio di reverse genetics relativamente nuovo in *Drosophila* per generare mutazioni in geni di interesse si basa sull'impiego del gene targeting per ricombinazione omologa. Il gene targeting consiste nella modificazione di una sequenza genomica endogena mediante ricombinazione con un frammento di

DNA esogeno. In *Drosophila* sono state sviluppate le tecnologie per due forme di gene targeting: “ends-in” (insertional gene targeting) e “ends-out” (replacement gene targeting). Seppure laboriosa questa tecnica è molto utile e vantaggiosa poiché permette di rimuovere completamente oppure di modificare in modo specifico un qualsiasi gene interesse (Fig. 3).

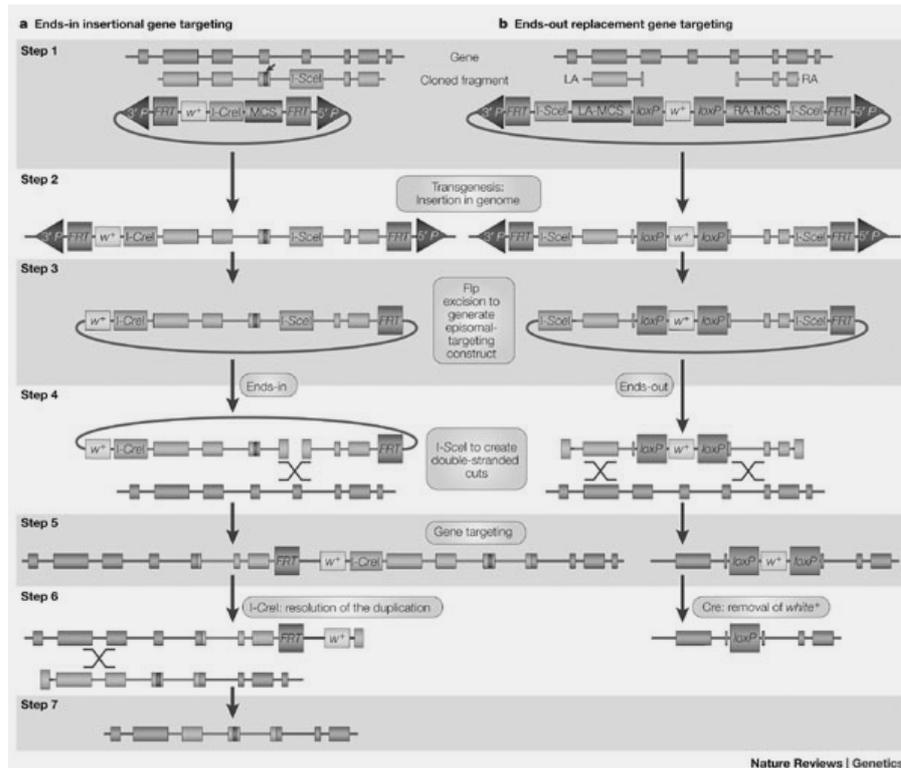


Figura 3. Gene targeting. (a) Ends-in insertional gene targeting . (b) Ends-out replacement gene targeting. Per generare il costrutto donore due regioni omologhe alla regione genomica di interesse (LA eRA) sono clonate *in vitro* all’interno di due multiple-cloning sites (LA-MCS e RA-MCS) di un plasmide (step 1). Questo costrutto è fiancheggiato alle estremità dai siti per I-SceI e FRT. Il gene marker *white⁺*, fiancheggiato dai siti *loxP*, è localizzato tra le regioni di omologia. Il costrutto donore è introdotto nelle linee germinali attraverso microiniezione (step 2). *in vivo* l’enzima FIp excide il costrutto donore generando frammenti extra-cromosomali (step3), e l’enzima I-SceI, linearizza i frammenti (step 4). La ricombinazione con il target endogeno permette l’inserzione del gene *white⁺* nel locus di interesse (step 5). Il gene marker *white⁺* può essere rimosso attraverso la ricombinasi Cre (cyclic AMP-response element) (step6).

1.5 Microtubuli

I microtubuli sono polimeri del citoscheletro, si trovano in tutte le cellule eucariotiche e sono coinvolti in numerosi processi cellulari. Essi sono strutture polarizzate composte da eterodimeri di subunità α e β -tubulina assemblate in protofilamenti lineari. L'associazione testa-coda dell'eterodimero α/β rende i microtubuli strutture polari che hanno tassi di polimerizzazione diverse alle due estremità. In ogni protofilamento, gli eterodimeri presentano monomeri β -tubulina all'estremità a crescita più rapida (detta anche estremità positiva) mentre i monomeri α -tubulina sono esposti all'estremità a crescita più lenta (detta anche estremità negativa).

Sia i monomeri di α -tubulina che di β -tubulina sono in grado di legare il GTP, ma la subunità α lo lega così strettamente che il nucleotide è considerato parte integrante della proteina, mentre la subunità β non ha un legame così stretto e può idrolizzare il GTP in GDP. Questo evento di idrolisi fa sì che un nuovo dimero possa legarsi al microtubulo in crescita mediante il legame tra il monomero β -tubulina del protofilamento ed il monomero α -tubulina del nuovo dimero. La crescita di un microtubulo non è, perciò, un processo continuo e lineare, ma il filamento va incontro a fasi di rapida crescita e sfaldamento continuamente alternate. Questo processo va sotto il nome di "instabilità dinamica" ed è fortemente influenzato dalla funzione che i microtubuli stanno svolgendo all'interno della cellula, per esempio, durante la mitosi nella formazione del fuso mitotico, l'instabilità dei microtubuli aumenta molto (Fig. 4) (Conde et al., 2009).

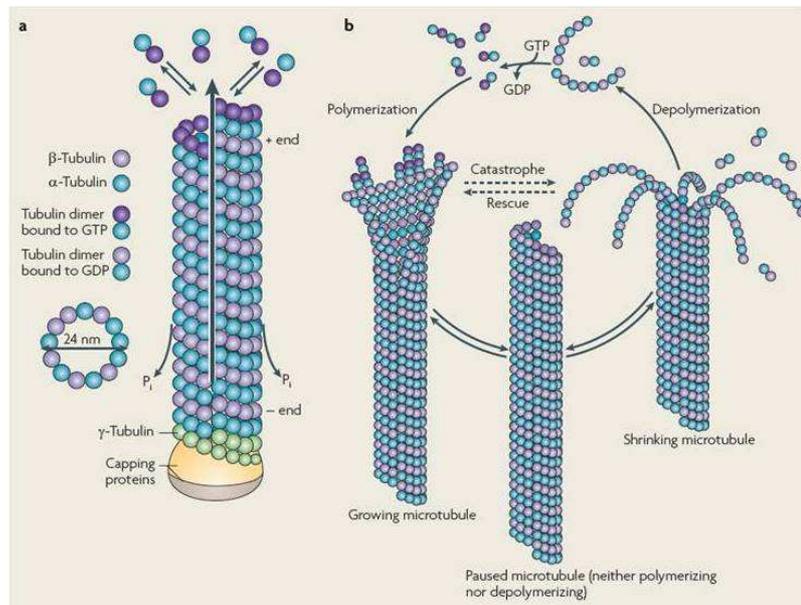


Figura 4. Rappresentazione schematica della struttura dei microtubuli. In particolare è riportata la struttura ed il processo di polimerizzazione e depolimerizzazione GTP-dipendente di un proto filamento (Conde et al., 2009).

Il ruolo dei microtubuli abbraccia una svariata serie di funzioni, infatti, i microtubuli insieme ad altri tipi di strutture (microfilamenti e filamenti intermedi) sono i costituenti del citoscheletro, permettono il trasporto intracellulare di vescicole, contribuiscono al corretto posizionamento degli organelli, partecipano alla mitosi, sono importanti per la motilità cellulare, per la polarizzazione delle cellule e nella formazione del fuso mitotico durante la mitosi. Inoltre, i microtubuli hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel controllo della plasticità neuronale influenzando molteplici aspetti dello sviluppo e della funzionalità dei neuroni, con ruoli di primo piano nella crescita e nel mantenimento degli assoni e dei dendriti. E' inoltre stato dimostrato in vari sistemi sperimentali che il mantenimento e l'equilibrio della dinamicità dei microtubuli è un requisito indispensabile per la crescita e il targeting dei processi neuronali e che alterazioni di questa dinamicità influenzano pesantemente il normale sviluppo degli assoni e dei dendriti (Conde et al., 2009).

1.6 Struttura della sinapsi neuromuscolare

La sinapsi è il sito di contatto tra neuroni o tra neuroni e muscolo ed è indispensabile all'esecuzione della funzione primaria del sistema nervoso, la trasmissione dell'informazione tra cellule. La sua formazione è un processo bidirezionale che coinvolge segnali tra il compartimento presinaptico ed il compartimento postsinaptico al fine di sviluppare strutture altamente specializzate per il rilascio e la captazione del neurotrasmettitore. Questi processi si sono dimostrati molto dinamici e finemente regolati a livello genetico e per questo motivo l'identificazione dei meccanismi molecolari che li regolano rappresentano un obiettivo molto importante per una miglior comprensione dello sviluppo della sinapsi.

La sinapsi più studiata è la giunzione neuromuscolare (NMJ) larvale di *Drosophila* (Fig.5). La sua semplicità ed il suo facile accesso rendono questa struttura un ottimo modello per esperimenti che utilizzano svariate tecniche quali l'elettrofisiologia, Ca^{2+} imaging, immunistochemical e microscopia elettronica. Inoltre la sua natura glutammatergica, come la maggior parte delle sinapsi nel mammifero, ha reso la giunzione neuromuscolare di *Drosophila* un'utile struttura modello in cui affrontare problematiche di interazione e riconoscimento cellulare, per studiare nuovi componenti sinaptici e analizzarne le interazioni, ed infine per studi di neurotrasmissione. Un'ulteriore vantaggio dell'utilizzo di questa struttura risiede nel fatto che ogni giunzione neuromuscolare di *Drosophila* è unica ed identificabile.

La giunzione neuromuscolare rappresenta il sito di contatto e comunicazione tra un neurone motore presinaptico e una cellula muscolare postsinaptica. Nelle sinapsi delle giunzioni neuromuscolari di *Drosophila*, la porzione intracellulare della membrana presinaptica si arborizza in una catena ramificata di bottoni sinaptici circondati da un compartimento membranoso costituito dal muscolo che li circonda. In media in una singola giunzione neuromuscolare sono presenti circa 20-50 bottoni sinaptici e all'interno di ciascuno dei quali sono presenti circa una decina di zone attive, adibite al rilascio del neurotrasmettitore (Collins et al., 2007). Queste sono strutture di materiale

elettron-denso che formano caratteristiche strutture a T sormontate da gruppi di vescicole che contengono il neurotrasmettitore. Nel compartimento presinaptico sono presenti, inoltre, proteine molto importanti, sia nell'organizzazione della struttura sinaptica sia nel traffico vescicolare per il rilascio di neurotrasmettitori, come la sinaptotagmina e Cysteine String Protein (CSP) entrambe indispensabili per il processo di esocitosi. Solitamente le proteine del compartimento postsinaptico sono proteine transmembrana come i recettori ionotropici per il glutammato, i canali potassio voltaggio dipendenti e proteine di adesione cellulare come la Fasciclina II (FasII). Nel compartimento postsinaptico sono presenti, inoltre, proteine del citoscheletro, come la proteina Discs Large (DLG), che riveste un ruolo fondamentale nell'organizzazione di diversi elementi strutturali e sono indispensabili per la corretta localizzazione di altre proteine post-sinaptiche come i canali potassio voltaggio dipendenti, FasII e i recettori del glutammato (Marqués 2005).

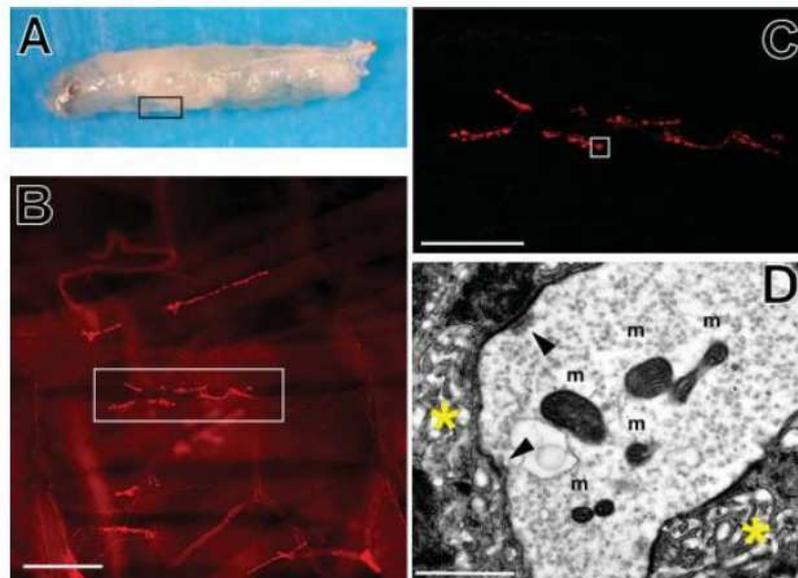


Figura 5. Giunzione neuromuscolare di *Drosophila*. (A) Larva al terzo stadio (lato ventrale in alto, lato dorsale in basso) della lunghezza approssimativa di 4mm. (B) Muscoli ventrolaterali del terzo segmento addominale. Gli organi interni sono stati asportati e le terminazioni sinaptiche sono state marcate con l'anticorpo anti-Csp. Ogni singolo muscolo e sinapsi possono essere facilmente identificate. (C) Ingrandimento della sinapsi del muscolo 6/7. I bottoni sinaptici sono stati marcati con l'anticorpo anti-Csp. (D) Immagine EM di un bottone di tipo Ib. Da notare le zone attive elettron-dense (freccie), che contengono la T-bars. Sono visibili, inoltre, i mitocondri (m) e le vescicole sinaptiche. Scale bars: (B) 100 μ m; (C) 50 μ m; (D) 500 nm. Pannello (D) reperito da Marqués et al. (2002), con permesso da Elsevier.

1.7 Microtubuli e sinapsi

La giunzione neuromuscolare di *Drosophila* (NMJ) si è rivelato un valido modello genetico per analizzare il ruolo dei microtubuli del citoscheletro ed un altrettanto valido modello di analisi del loro ruolo nelle malattie neurologiche ereditarie. In *Drosophila* l'organizzazione e la dinamicità dei microtubuli negli assoni e nei dendriti sono state ampiamente studiate, mentre si sa ancora molto poco sull'organizzazione dei microtubuli all'interno dei bottoni sinaptici nella giunzione neuromuscolare. I dati disponibili hanno permesso di capire che la regolazione dell'architettura dei microtubuli è un evento essenziale nel controllo della morfologia dei coni di crescita e della formazione di nuovi bottoni sinaptici.

Durante la formazione di un nuovo bottone sinaptico i microtubuli si presentano con una distribuzione irregolare e frammentata, mentre la distribuzione dei microtubuli sotto forma di loop è indice di un arresto della divisione dei bottoni. Molte proteina, tra cui Futsch (MAP1b), VAP-33A, a-PKC (Atypical Protein Kinase C) e spastina, sono state indicate come proteine necessarie per l'organizzazione e corretto funzionamento dei microtubuli nei bottoni sinaptici (Conde et al., 2009).

Il gene *Futsch* di *Drosophila* codifica per una proteina, omologa alla proteina MAP1B umana, associata ai microtubuli e che sembra coinvolta nel controllo della crescita sinaptica attraverso la regolazione dei microtubuli del citoscheletro dei bottoni sinaptici. Analisi loss of function del gene *Futsch* hanno dimostrato che durante l'embriogenesi *Futsch* è necessaria per la crescita dendritica ed assonale. Inoltre, esperimenti gain of function hanno evidenziato che la proteina *Futsch* è in grado di interagire con altre proteine MAP. Oltre a ciò, l'analisi di due mutanti del gene *Futsch* ha evidenziato un'alterazione della crescita sinaptica attraverso l'interruzione della corretta localizzazione dei microtubuli e della formazione dei loops, generando una diminuzione del numero di bottoni sinaptici ed un aumento delle loro dimensioni (Fig.6) (Hummel et al., 2000; Roos et al., 2000).

Un'altra proteina proposta come regolatrice della morfologia sinaptica e del rilascio di neurotrasmettitore è la proteina VAP-33A (VAMP-associated

protein of 33 kDa). Studi di loss of function del gene omologo di *Drosophila*, DVAP-33A, hanno evidenziato una drastica diminuzione del numero di bottoni ed un corrispondente aumento delle loro dimensioni. Al contrario, esperimenti di gain of function, a livello presinaptico, hanno dimostrato un vistoso aumento del numero di bottoni ed una conseguente diminuzione delle loro dimensioni. Inoltre, mutanti del gene DVAP-33A hanno dimostrato che la mancanza del gene compromette gravemente l'architettura dei microtubuli nei bottoni sinaptici. Questi studi hanno permesso di proporre un'interazione tra i microtubuli e la membrana presinaptica, mediata dalla proteina DVAP-33A durante lo sviluppo sinaptico (Pennetta et al., 2002).

Il complesso Baz/Par-3-Par-6-aPKC, è un complesso proteico evolutivamente conservato che ricopre un ruolo cruciale per lo sviluppo della polarità nelle cellule epiteliali, nei neuroblasti e negli ovociti. Inoltre, recentemente la proteina aPKC è stata coinvolta anche nella regolazione della plasticità sinaptica, in particolare aPKC sembra in grado di controllare la formazione e la struttura dei bottoni sinaptici regolando la dinamicità dei microtubuli. A livello presinaptico, è stato dimostrato che la proteina aPKC regola la stabilità e la plasticità del citoscheletro, promuovendo l'associazione tra la proteina Futsch ed i microtubuli (Ruiz-Canada et al., 2004).

Un ruolo molto importante nella regolazione della crescita dei bottoni sinaptici attraverso il controllo della plasticità dei microtubuli è rivestito anche dal gene *SPG4*. Questo gene codifica per una proteina chiamata Spastina, che in cellule di mammifero è in grado di legarsi ai microtubuli. Recentemente è stato dimostrato che il suo omologo di *Drosophila* è in grado di regolare la crescita e la struttura sinaptica attraverso il controllo della funzionalità e della stabilità dei microtubuli assonali (Orso et al., 2005; Sherwood et al., 2004; Trotta et al., 2004).

Tutti questi studi indicano che i microtubuli svolgono funzioni essenziali nel controllo della struttura e della corretta funzionalità neuronale e che mutazioni a carico di proteine che regolano i microtubuli possono essere coinvolte nell'insorgenza di malattie neurologiche ereditarie.

1. INTRODUZIONE

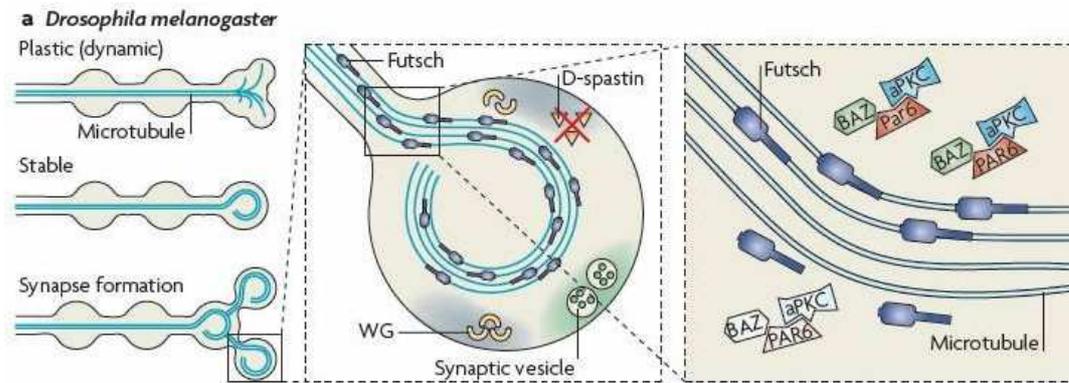


Figura 6. Regolazione dei microtubuli del citoscheletro nelle sinapsi. La regolazione dell'architettura dei microtubuli è un passaggio essenziale per il controllo della morfologia e della motilità dei coni di crescita durante lo sviluppo delle sinapsi. Durante la formazione della giunzione neuromuscolare in *Drosophila melanogaster*, la distribuzione irregolare dei microtubuli indica una terminazione sinaptica in crescita. Diversamente, la presenza di microtubuli assemblati sotto forma di loops è correlata con un arresto della divisione dei bottoni sinaptici. Nell'ingrandimento è visibile un bottone durante la formazione della sinapsi, evidenziando come Futsch co-localizza con i microtubuli. Futsch è una proteina necessaria per l'organizzazione e la stabilizzazione dei loops di microtubuli sinaptici. Le zone attive contengono il macchinario per il rilascio del neurotrasmettitore, contenuto all'interno delle vescicole sinaptiche. Le zone peri-attive contengono proteine coinvolte nella modulazione della stabilità dei microtubuli (per esempio D-spastin). Il complesso BAZ-PAR6-atypical protein kinase C (aPKC) regola la stabilità dei microtubuli promuovendo l'associazione di Futsch con i microtubuli (Conde et al., 2009).

2. MATERIALI E METODI

2.1 BIOLOGIA MOLECOLARE:

2.1.1 Clonaggio del gene *Defhc1* in pBluescript® II Phagemid Vectors (BSSKII)

Estrazione di RNA da *Drosophila*

Per poter ottenere l'RNA di *Drosophila* da utilizzare per gli esperimenti di RT-PCR è stato utilizzato il reagente TRIZOL (Life Technologies) che crea un ambiente di reazione in cui le RNAsi presenti sono inattivate. Per l'estrazione dell'RNA sono state utilizzate le sole teste dei moscerini; per questo motivo dopo aver anestetizzato con CO₂ i moscerini sono state asportate circa 40 teste, successivamente raccolte in una eppendorf. Ad esse sono stati aggiunti 100µl di TRIZOL per passare in seguito all'omogenizzazione dei tessuti mediante un pestello. Una volta aggiunta la rimanente quantità di TRIZOL (1ml/1µg di tessuto), la soluzione ottenuta è stata centrifugata per 2 minuti alla massima velocità; successivamente è stato prelevato il surnatante al quale sono stati aggiunti 0.2 ml di cloroformio ogni ml di TRIZOL. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 4 °C si sono formate due fasi separate: una fase rossa di fenolo-cloroformio e una fase acquosa sovrastante contenente l'RNA. Quest'ultima è stata prelevata per procedere alla precipitazione dell'RNA mediante centrifugazione, dopo l'aggiunta di isopropanolo. Una volta aspirato il surnatante si sono effettuati dei lavaggi con etanolo al 70%. L'RNA, così ottenuto, è stato infine risospeso in H₂O e conservato a -20 °C.

RT-PCR

Questa tecnica permette di retrotrascrivere l'mRNA estratto da un campione biologico di interesse al fine di ottenere il corrispondente cDNA del gene di interesse.

2.MATERIALI E METODI

La RT-PCR consiste di due fasi distinte:

- *Retrotrascrizione*: durante questa fase avviene la sintesi del cDNA a partire dall'RNA estratto ad opera dell'enzima Trascrittasi Inversa grazie all'impiego di primers specifici per il gene o di oligo dT.
- *PCR*: una volta ottenuto il cDNA lo si amplifica mediante la tecnica della "Polymerase Chain Reaction" (PCR).

Per questi esperimenti di RT-PCR è stata utilizzata la ThermoScript™ RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen); per la reazione di PCR è stata utilizzata Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes).

Miscela di reazione:

Oligo(dT) ₂₀ (50 μM)	1 μl
RNA totale	10 pg per 5 μg
10mM dNTPs mix	2 μl

Portato a volume di 12 μl con acqua distillata.

La soluzione è stata incubata a 65°C per 5 minuti e successivamente posta in ghiaccio.

Al contenuto della provetta, dopo centrifugazione, sono stati aggiunti:

5X cDNA Syntesis Buffer	4 μl
0,1M DTT	1 μl
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/μl)	1 μl
Thermoscript RT (15 U/ μl)	1 μl
Acqua distillata	1 μl

La soluzione è stata agitata delicatamente e incubata a 50°C per 30-60 minuti. La reazione è stata completata riscaldando la soluzione a 85°C per 5 minuti. Per rimuovere il template originale di RNA è stato aggiunto 1 μl (2 unità) di *E. coli* RNase H e il tutto è stato incubato a 37°C per 20 minuti. Il cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante una reazione di PCR nella quale è stata utilizzata una polimerasi ad alta fedeltà per evitare l'introduzione di mutazioni.

Miscela di reazione:

5X Phusion High Fidelity Buffer	1X (10 µl)
dNTPs (10mM)	1 µl
primer 5' (10 µM)	1 µl
primer 3' (10 µM)	1 µl
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl
cDNA templatato	2 µl

Portato a volume di 50µl con acqua distillata.

I primer utilizzati per la reazione sono:

For NotIcDna8959

AATTGCGGCCGCTATACAATGCTGCGCATTCTT
NotI

Rev XbaIcDna8959

AATTTCTAGATCAAGCCATGTGCTGTGCGTC
XbaI

Il profilo termico adottato è stato il seguente:

Denaturazione iniziale	98°C 30 secondi	} per 30 cicli
Denaturazione	98°C 10 secondi	
Appaiamento	58°C 30 secondi	
Estensione	72°C 30 secondi	

Estensione finale 10 minuti

La soluzione così ottenuta è stata conservata a 4°C.

Clonaggio

Successivamente il vettore pBbluescript II ed il prodotto della PCR sono stati digeriti con gli enzimi XbaI e NotI i cui siti di taglio sono stati inseriti nelle code dei primers utilizzati per l'amplificazione.

Miscela di reazione per *Defhc1*:

cDNA <i>Defhc1</i>	2µg
NotI (10U/ul)	20U
XbaI (10U/ul)	20U
10X buffer	5µl

Portato a volume di 50µl con acqua distillata.

2.MATERIALI E METODI

Miscela di reazione per il vettore pBbluescript II:

pBbluescript II	2µg
NotI (10U/ul)	20U
XbaI (10U/ul)	20U
10X buffer	5µl

Portato a volume di 50µl con acqua distillata.

Le reazioni sono state incubate a 37°C per un'ora e successivamente sono state separate mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1%. Le bande corrispondenti al cDNA del gene *Defhc1* e del vettore sono state tagliate dal gel e purificate utilizzando il kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Il Dna purificato è stato risospeso in 20 µl di Elution buffer ed utilizzato per la reazione di ligazione.

Miscela di reazione:

pBbluescript II	150ng
cDNA <i>Defhc1</i>	300ng
10X Ligation buffer	1µl
T4 DNA ligase (Biolabs)	1µl

Portato a volume di 10µl con acqua distillata.

La reazione è stata incubata un'ora a temperatura ambiente. Il prodotto della ligazione è stato utilizzato per trasformare i batteri chemiocompetenti DH5α (Invitogen) (appendice B). I batteri sono stati, quindi, piastrati su piastre Petri contenenti LB solido e Ampicillina, che permette di selezionare i batteri contenenti il vettore, ed incubati per una notte a 37 °C. 10 colonie di batteri presenti sulla piastra sono state fatte crescere individualmente a 37°C per qualche ora in 3ml di LB liquido e Ampicillina (appendice A). In seguito si è passati alla purificazione del DNA plasmidico utilizzando il protocollo per le mini-preparazioni (appendice B). Successivamente il DNA ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione di controllo. Il prodotto di digestione è stato sottoposto ad una corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% per verificare che nel plasmide pBbluescript II si fosse inserito il frammento corretto.

2.MATERIALI E METODI

Rev gateway8959 con stop

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAATTGTTGGCTCGCTTTTA

G

cassetta att B

Miscela di reazione:

DNA stampo BS	1 μ l
Enzima Phusion	0.02 U/ μ l
Buffer Phusion 5X	1X
dNTPs (10mM)	200 μ M
Primer 5' (10 μ M)	0.05 μ M
Primer 3' (10 μ M)	0.05 μ M

Portato a volume di 50 μ l con acqua distillata

Il ciclo termico:

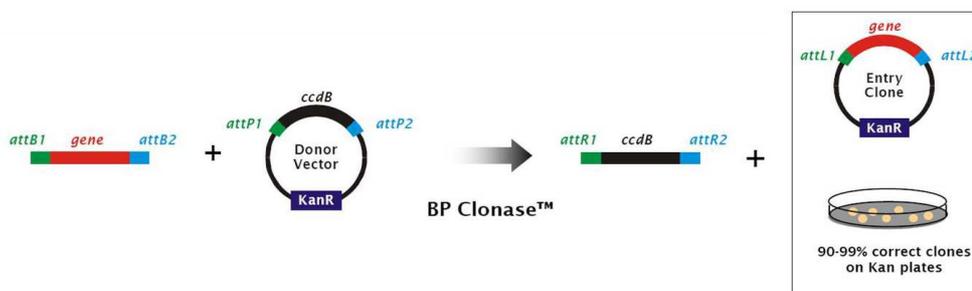
Denaturazione iniziale	98 °C 30 minuti	} per 30 cicli
Denaturazione	98 °C 10 minuti	
Appaiamento	56 °C 20 minuti	
Estensione	72 °C 1 minuto e 30 secondi	

Estensione finale 72 °C 10 minuti

Il prodotto dell'amplificazione è stato quindi purificato con il kit "MinElute PCR Purification Kit" (Qiagen).

Reazione BP

Con il DNA purificato è stata preparata la "BP Reaction" nella quale ha avuto luogo la ricombinazione tra i siti *attB* del gene e i siti *attP* del vettore intermedio pDONR 201 (4470 bp, Invitrogen) in modo tale da creare i siti *attL* necessari per il clonaggio successivo.



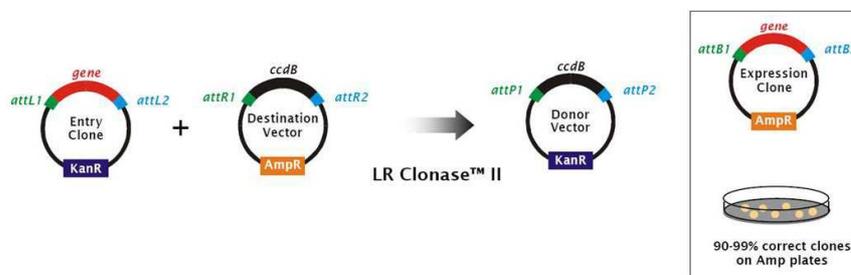
Reazione BP:

DNA da PCR	40-100 femol
Buffer BP 5X	1X
Vettore pDONR	150 ng/ μ l
Enzima Clonasi	4 μ l
Portato a volume di 20 μ l con Buffer TE	

La reazione è stata incubata a 25 °C per 1 ora e in seguito è stata aggiunta un'aliquota di Proteinasi K (2 μ g/ μ l); in fine la miscela è stata incubata a 37 °C per 10 minuti. Il prodotto della ligazione è stato utilizzato per trasformare i batteri competenti mediante il metodo dell'elettroporazione (appendice B). I batteri sono stati, quindi, piastrati su piastre Petri con LB solido e Ampicillina ed incubati per una notte a 37 °C. Successivamente si è proceduto all'allestimento delle mini-preparazioni di controllo. Il DNA così ottenuto è stato digerito con gli enzimi di restrizione BamHI e XbaI per verificare il corretto inserimento del gene nel plasmide pDONR 201.

Reazione LR

Dopo aver verificato, mediante il taglio di restrizione, il corretto inserimento del gene *Defhc1*, è stata allestita la "LR Reaction" che permette di spostare la sequenza di interesse nel vettore di destinazione finale (Fig. 8). In questa fase avviene la ricombinazione sito-specifica tra i siti *attL* del clone intermedio (pDONR+cDNA *Defhc1*) ed i siti *attR* del vettore finale pUAST. Questo particolare vettore viene normalmente utilizzato in *Drosophila* per la creazione di animali transgenici.



2.MATERIALI E METODI

Reazione LR:

Entry clone pDONR	100-300 ng
Destination vector pUAST	300 ng
Buffer clonasi 5X	1X
Enzima Clonasi	4µl
Portato a volume di 20µl con Buffer TE.	

La reazione è stata incubata a 25 °C per 1 ora; in seguito è stata aggiunta Proteinasi K (2µg/µl) ed il tutto è stato incubato a 37 °C per 10 minuti.

Anche in questo caso si è proceduto trasformando i batteri mediante elettroporazione e allestendo le mini-preparazioni e le digestioni di controllo per verificare la correttezza del costrutto finale. Il clone batterico contenente il costrutto esatto è stato fatto crescere per una notte in una beuta con 400 ml di LB liquido ed Ampicillina. Si è quindi utilizzato il “ Plasmid Midi Kit” (Qiagen) per purificare il DNA.

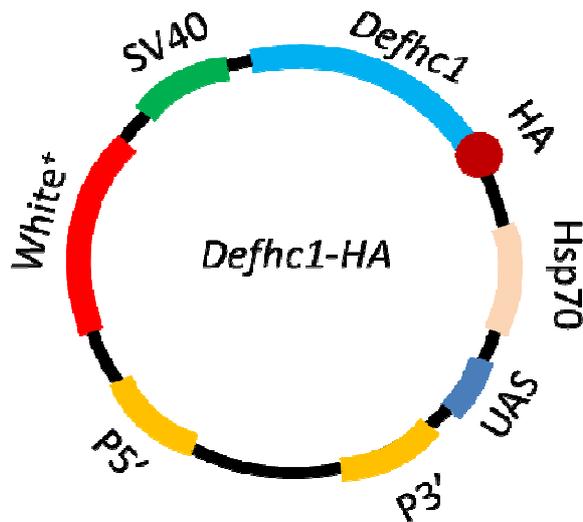


Figura 8. Rappresentazione schematica del costrutto UAS- *Defhc1*-HA

2.1.3 Clonaggio Gateway del gene *Defhc1* in pTWG

Per il clonaggio del gene *Defhc1* nel vettore pTWG (Fig. 9) è stato seguito il protocollo Gateway ed è stata allestita una reazione LR utilizzando il vettore intermedio pDONR 201 (pDONR + cDNA *Defhc1*).

Reazione LR:

Entry clone pDONR	100-300 ng
Destination vector pTWG	300 ng
Buffer clonasi 5X	1X
Enzima Clonasi	4 μ l
Portato a volume di 20 μ l con Buffer TE.	

La reazione è stata incubata a 25 °C per 1 ora; successivamente è stata aggiunta Proteinasi K (2 μ g/ μ l) ed il tutto è stato incubato a 37 °C per 10 minuti.

In seguito si è proceduto trasformando i batteri, allestendo le mini-preparazioni e le digestioni di controllo per verificare la correttezza del costrutto finale. Il clone batterico contenente il costrutto esatto è stato fatto crescere per una notte in una beuta con 400 ml di LB liquido ed Ampicillina. Si è quindi utilizzato il “Plasmid Midi Kit” (Qiagen) per purificare il DNA.

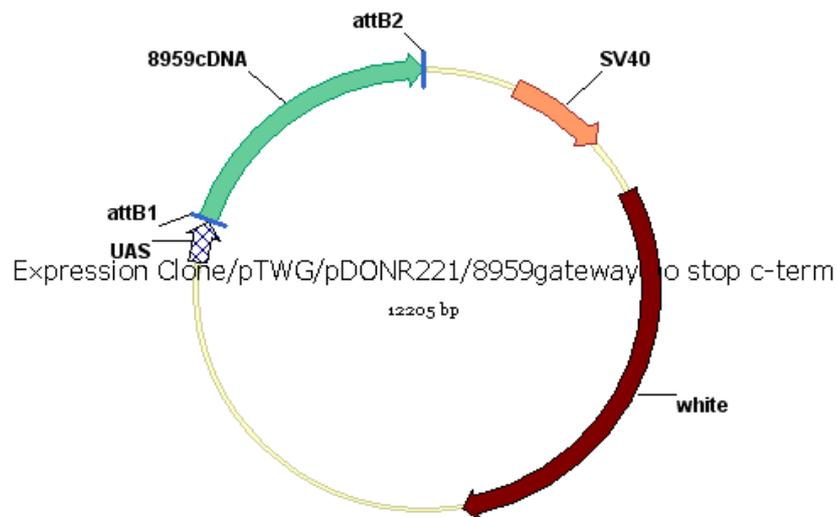


Figura 9. Rappresentazione schematica del vettore per l'espressione del gene *Defhc1* in fusione con la green fluorescent protein (GFP).

2.1.4 Generazione del mutante knock out del gene *Defhc1*

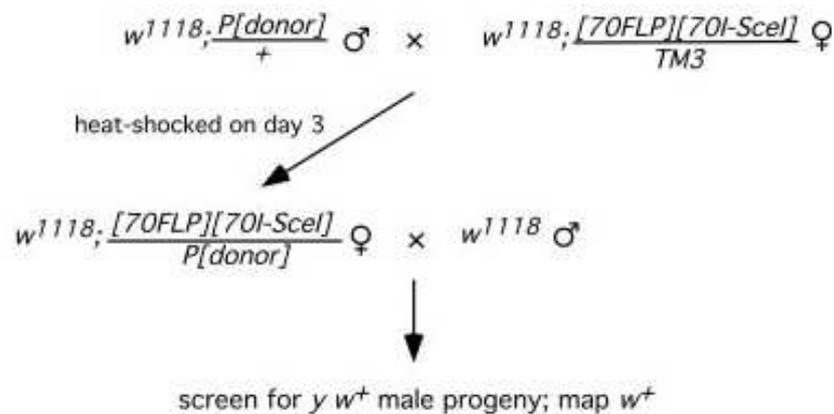
Per generare il mutante knockout del gene *Defhc1* è stata utilizzata la tecnica del replacement gene targeting detta anche “ends out”.

In laboratorio sono state generate delle linee donor nelle quali all’interno del gene *Defhc1* è stato clonato il gene *white*⁺, mantenendo inalterate le estremità del gene, in modo tale da conservare una porzione di omologia tra il gene *Defhc1* ed il genoma di *Drosophila*.

Il costrutto donor così ottenuto presenta alle due estremità dalle sequenze FRT e da siti riconosciuti da I-SceI, un enzima che genera, in presenza della Flippasi, una ricombinazione extracromosomiale.

Cinque diverse linee donor sono state incrociate con linee contenenti una Flippasi heat shock inducibile ed il gene I-SceI.

La progenie è stata incrociata con *Drosophila w*¹¹¹⁸ secondo il seguente schema:



Per verificare l’avvenuta ricombinazione è stato estratto il DNA (appendice B) da moscerini omozigoti che presentavano il gene *white*⁺ (occhi odi colore rosso) e sono state allestite delle PCR utilizzando dei primers specifici per determinare l’effettivo rimpiazzamento del gene *Defhc1* con il gene *white*⁺.

I primers utilizzati sono:

1-ForNotIcDna8959

5' AATTGCGGCCGCTATCTGTGCAAATGATGCGAC 3'

2- Rev KpnI RnaI8959

5' AATTGGTACCGCTGCAGCACCATCAGTATGT 3'

3- For CG8959 new

5' GGAGCTGCCCCCACAACACTGG 3'

4- Rev in White cDNA

5' GACTTCGGGCCCCGACGCAAG 3'

5- For in White cDNA

5' CGCGCTCTCTCGAAGCAACG 3'

6- Rev CG8959 new

5' CATCCGTCCATTCGCCGAGC 3'

Le PCR sono state amplificate utilizzando la taq Hot Master (Eppendorf) secondo protocollo.

Inoltre, per un'ulteriore conferma, è stata allestita una reazione di RT-PCR su individui adulti knock out per il gene *Defhc1*. Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per l'allestimento di PCR di controllo utilizzando primers specifici per verificare l'affettiva assenza del gene *Defhc1*.

I primers impiegati sono:

1- For NotI cDNA 8959

5' AATTGCGGCCGCTATCTGTGCAAATGATGCGAC 3'

2- Rev XbaI cDNA 8959

3' AATTTCTAGATCAAGCCATGTGCTGTGCGTC 5'

3- For 587 cDNA 8959

5' CAC CGA TTG CGA TCC GTT 3'

4- Rev KpnI Rnai 8959

5' AATTGGTACCGCTGCAGCACCATCAGTATGT 3'

5- For 674 cDNA 11048

5' AGTTCCTCAATCGAGCTG 3'

6- Rev KpnI Rnai 11048

5' AATTGGTACCGCTGCAGCACCATCAGTATGT 3'

2.MATERIALI E METODI

2.1.5 Clonaggio CG8959 in pcDNA 3.1

Per gli esperimenti di immunocitochimica il gene *Defhc1* è stato espresso nelle cellule mediante il vettore pcDNA3.1 (5400bp). Per il clonaggio è stata allestita una reazione di PCR utilizzando una polimerasi ad alta fedeltà per evitare l'introduzione di mutazioni. In seguito il cDNA del gene *Defhc1* è stato clonato nel vettore pcDNA 3.1 mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione EcoRI e XbaI, i cui siti di taglio sono stati inseriti nelle code dei primer utilizzati per l'amplificazione. Il primer 3' utilizzato presenta, inoltre, la sequenza per l'epitopo MYC che permette di visualizzare l'espressione della proteina.

I primers utilizzati sono stati i seguenti:

FOR 8959 ECORI

AGCTGAATTCATGCTGCGCATTCCTGGAAT
EcoRI

REV 8959 MYC XbaI

AGCTTCTAGACTACAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGTTCAGCCAT
XbaI MYC

Miscela di reazione:

DNA stampo BS	1 µl
Enzima Phusion	0.02 U/µl
Buffer Phusion 5X	1X
dNTPs (10mM)	200 µM
Primer 5' (10 µM)	0.05 µM
Primer 3' (10 µM)	0.05 µM

Portato a volume di 50 µl con acqua distillata

In seguito si è proceduto trasformando i batteri, allestendo le mini-preparazioni e le digestioni di controllo per verificare la correttezza del costrutto finale. Il clone batterico esatto è stato fatto crescere per una notte in una beuta con 400 ml di LB liquido ed Ampicillina. Si è quindi utilizzato il " Plasmid Midi Kit" (Qiagen) per purificare il DNA.

2.2 BIOLOGIA CELLULARE

2.2.1 Culture cellulari

Le cellule Cos 7 sono linee cellulari immortalizzate derivate da cellule renali di scimmia verde africana. Le cellule sono state mantenute in terreno completo DMEM con 10% di siero ed antibiotico, mantenute a 37°C in incubatore a CO₂.

Le cellule, raggiunta una confluenza pari al 70-80%, sono state propagate con il seguente protocollo:

- Togliere il terreno di cultura, lavare le cellule con una soluzione di PBS sterile, ed incubare con una soluzione di Tripsina ed Edta per 5 minuti.
- Aggiungere 1 ml di terreno completo DMEM per bloccare l'azione della tripsina e spipettare delicatamente per staccare tutte le cellule ancora adese.
- Contare le cellule con Trypan blue (Sigma) in PBS mediante cameretta di Burker o Cell Counter (Invitrogen).
- Seminare il numero di cellule di interesse in terreno completo e mantenere a 37°C in incubatore a CO₂.

2.2.2 Trasfezioni di plasmidi

Per introdurre i plasmidi di espressione nelle cellule Cos 7 è stato utilizzato come agente trasfettante *TransIT-LT1* Transfection Reagent (Mirus Bio Corporation). Questo agente trasfettante è stato disegnato appositamente per il delivery di acidi nucleici in svariati tipi cellulari garantendo un alto grado di efficienza e riproducibilità, un basso tasso di tossicità e semplicità d'uso. *TransIT-LT1* Transfection Reagent è una mix di lipidi istonici e cationici che sono in grado di aderire alla superficie cellulare di cellule in sospensione o adesione anche in assenza di siero. Questi lipidi sono in grado di formare liposomi che presentano una superficie a carica positiva in grado di interagire ed inglobare le molecole di DNA cariche negativamente presenti nella miscela. Il complesso liposoma/DNA ("transfection complex") così formato è in grado di aderire e fondersi con la

2.MATERIALI E METODI

membrana plasmatica delle cellule mediante un evento di endocitosi. Una volta all'interno della cellula il complesso entra nel pathway endosomiale, diffonde nel citoplasma ed entra nel nucleo permettendo così l'espressione genica (Fig. 10).

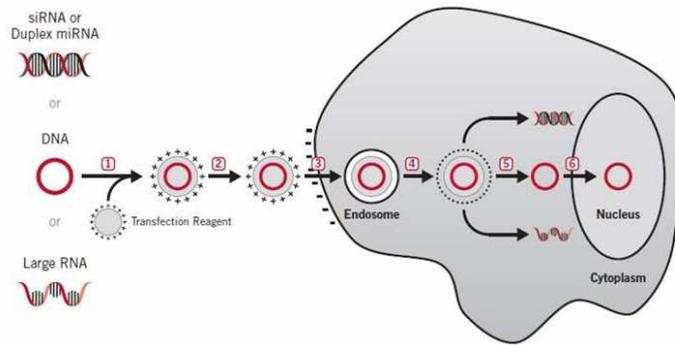


Figura 10. Rappresentazione schematica di una trasfezione chimica di una cellula eucariota.

Il protocollo utilizzato per gli esperimenti di trasfezione è stato il seguente (Fig.11):

- 24 ore prima dell'esperimento seminare $1-3 \times 10^5$ cells/well per una piastra da 6 pozzetti dopo aver posizionato un vetrino in ogni pozzetto.
- Portare TransIT-LT1 Reagent a temperatura ambiente e vortexarlo gentilmente prima dell'uso
- Preparare 250 μ l di terreno DMEM serun free in una eppendorf
- Aggiungere 4 μ l di TransIT-LT1 Reagent
- Spipettare gentilmente per mescolare la mix
- Aggiungere 2 μ g di DNA nella mix
- Incubare a temperatura ambiente per 15-30 minuti
- Aggiungere la mix di DNA-Reagent alle cellule
- Incubare per 24-72 ore

Successivamente le cellule così trattate sono state utilizzate per esperimenti di immunocitochimica o coimmunoprecipitazione.

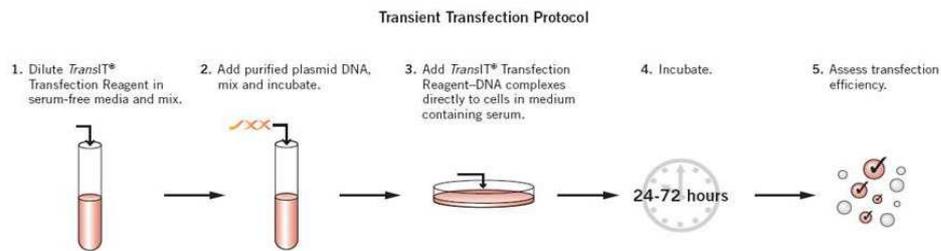


Figura 11. Transient Transfection Protocol

2.2.3 Analisi immunocitochimica

Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state utilizzate per esperimenti di immunocitochimica mediante il seguente protocollo:

- Lavare 3 volte le cellule con una soluzione di PBS.
- Fissare le cellule con una soluzione di paraformaldeide e PBS per 10 minuti.
- Lavare nuovamente per 3 volte le cellule con PBS.
- Permeabilizzare le cellule con una soluzione di PBS e Triton all'1% per 10 minuti.
- Lavare le cellule per 3 volte con PBS.
- Saturare le cellule con una soluzione di PBS e siero al 3 % per 15 minuti.
- Lavare nuovamente per 3 volte con PBS.
- Incubare le cellule così trattate con Anticorpo primario diluito in PBS e siero all'1% per 1 ora a 37°.
- Lavare le cellule 3 volte con PBS.
- Incubare le cellule con anticorpo secondario diluito in PBS per 1 ora a 37°.
- Lavare le cellule 3 volte con PBS.
- Lavare i vetrini, sui quali sono adese le cellule, in acqua bidistillata e montare su vetrini porta oggetto con una goccia di soluzione Mowiol.

2.3 TECNICHE DI BIOCHIMICA

2.3.1 Binding dei microtubuli:

Per gli esperimenti di binding dei microtubuli sono state utilizzate cellule Cos 7 trasfettate con il costrutto Defhc1-Myc ed i microtubuli sono stati stabilizzati con il Tassolo. L'esperimento è stato eseguito secondo il seguente protocollo:

- Lavare le cellule con una soluzione di PBS per togliere tutto il terreno.
- Aggiungere 500µl di buffer di lisi (appendice A) e staccare le cellule con l'aiuto di uno scraper.
- Incubare le cellule in ghiaccio per 30 minuti per favorire la depolimerizzazione.
- Centrifugare per 10 minuti a 610g a 4°C.
- Conservare 30µl del surnatante (LISATO) e conservarlo a -20°C.
- Incubare metà del surnatante con Tassolo 40 µM e GTP 1mM in DMSO e metà solo con DMSO.
- Separare i campioni mediante un "cuscinetto" di agarosio 50% (contenete 80 mM PIPES (pH 7.0), 1 mM MgCl₂ e 0.5 mM EGTA e centrifugare i campioni per 40 minuti a 100000g a 4°C.
- Conservare il lisato, pellet e surnatante per analisi mediante western blot.

2.4 GENERAZIONE ED ANALISI DI *DROSOPHILAE* TRANSGENICHE

2.4.1 Preparazione del DNA per la microiniezione

Il DNA per gli embrioni di *Drosophila*, è stato purificato con il “Plasmid Midi Kit” (Qiagen) che permette di ottenere fino a 100µg di DNA plasmidico partendo da un minimo di 30 ml di coltura batterica con una densità di circa 1×10^9 cellule per ml. Il DNA così ottenuto è stato risospeso nel buffer di microiniezione (appendice A) ad una concentrazione di 1 µg/µl e nella stessa soluzione è stato aggiunto DNA “Helper” ad una concentrazione di 0,5 µg/µl.

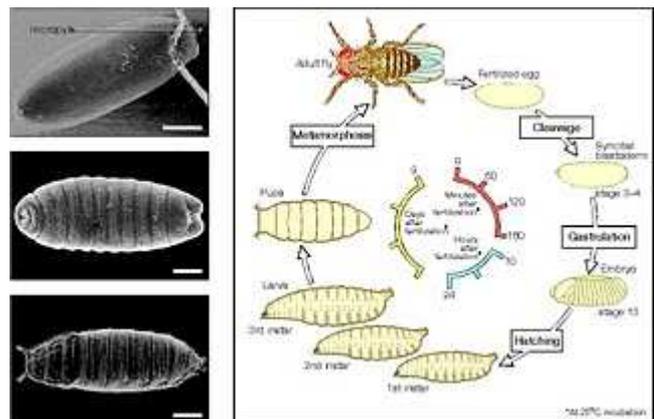
Il vettore “Helper” è un plasmide che produce la Transposasi, l’enzima che catalizza l’integrazione nel genoma di *Drosophila* di qualsiasi DNA esogeno che sia compreso tra due estremità funzionali del trasposone P.

La soluzione contenente DNA e vettore Helper è stata filtrata prima di essere microiniettata con filtri in acetato di cellulosa “Micro-spin Filter Tubes” (Alltech).

2.4.2 Ciclo vitale di *Drosophila*

Il ciclo vitale di *Drosophila* è costituito da una semplice serie di fasi successive:

1. stadio embrionale
2. larva allo stadio primario
3. larva allo stadio secondario
4. larva allo stadio terziario
5. stadio di pupa
6. individuo adulto



Il ciclo riproduttivo che parte dallo stadio embrionale fino all’individuo adulto copre un periodo di tempo di circa 10-12 giorni ad una temperatura di 25°C; l’individuo adulto invece vive circa 50-60 giorni.

2.4.3 Microiniezione

Per la microiniezione è stato utilizzato un microiniettore automatico InjectMan (Eppendorf). Gli aghi impiegati sono stati prodotti a partire da capillari di vetro borosilicato (World Precision Instruments) utilizzando un puller (Flaming/Bown Micropipette Puller-Model P 80/PC) in grado di produrre aghi con punte e dimensioni diverse a seconda delle necessità. Nel caso specifico è stato utilizzato il programma:

HEAT= 414, PULL= 200, VEL= 250, TIME= 150.

Per la microiniezione sono stati utilizzati embrioni w^{1118} . I moscerini sono stati messi in tubi chiusi ad una estremità con piastre Petri da 5 cm, contenenti il medium da deposizione (vedi appendice) con sopra una goccia di lievito sciolto in acqua. Gli embrioni deposti sono stati raccolti ogni 20 minuti circa; sono state poi allineati con l'aiuto di un microscopio ottico su di un vetrino coprioggetto, e successivamente ricoperti di olio minerale ("Halocarbon Oil", Sigma). Quindi si è proceduto alla microiniezione, ovvero all'introduzione del DNA esogeno negli embrioni. Affinché l'integrazione di tale DNA nel genoma delle cellule precursori delle cellule germinali potesse avvenire con successo, tutta l'operazione è stata svolta entro un'ora circa dalla deposizione, prima cioè che si formasse il blastoderma sinciziale. Successivamente gli embrioni sono stati trasferiti in piastre Petri contenenti il medium nutritivo (vedi appendice) e mantenuti a temperatura ambiente.

2.4.4 Allestimento degli incroci per l'identificazione di individui trasformati

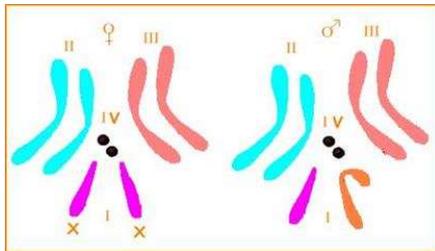
Gli adulti sviluppati dagli embrioni microiniettati sono stati incrociati individualmente con *Drosophila* appartenenti al ceppo w^{1118} , che hanno l'occhio bianco.

Dopo circa due settimane gli individui adulti della generazione F₁ sono stati analizzati allo stereomicroscopio per osservare la pigmentazione dell'occhio; tutti gli individui che presentavano gli occhi bianchi sono stati scartati. Gli individui

con l'occhio pigmentato, dovuto alla presenza del transgene, invece, sono stati singolarmente incrociati con adulti w^{1118} . Gli adulti della generazione F₂, per ciascuna inserzione indipendente, sono stati incrociati con adulti di *Drosophila* che contengono dei cromosomi bilanciatori.

2.4.5 Allestimento di incroci per la localizzazione cromosomica e per il bilanciamento dell'inserito

Il corredo cromosomico di *Drosophila melanogaster* è costituito da 4 coppie di cromosomi con una coppia eteromorfa nei maschi (XX o XY, II, III, IV). Il cromosoma IV è caratterizzato da dimensioni molto minori rispetto agli altri e quindi la probabilità che il costrutto si integri al suo interno è molto bassa. Per questo motivo, gli incroci sono stati allestiti in modo tale da permettere di evidenziare l'eventuale inserzione del plasmide nei cromosomi sessuali o negli autosomi II e III.



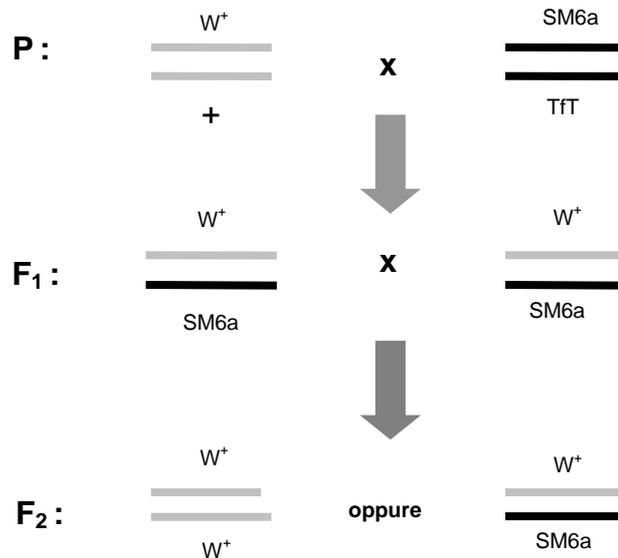
Gli individui transgenici così ottenuti sono stati perciò incrociati con linee di *Drosophila* recanti un bilanciatore, ovvero un cromosoma con inversioni multiple che funge da soppressore della ricombinazione per il cromosoma in esame.

Inserzione nel cromosoma II

P: ♀ (o ♂) transgenico w^+ × ♂ (o ♀) Sm6a (Cyo)/Tft

2.MATERIALI E METODI

Dai moscerini nati nella generazione F_1 si scelgono gli individui con fenotipo w^+ (occhio rosso, per la presenza del transgene) e *Cyo* (*curly*, marcatore morfologico del II cromosoma il quale produce un fenotipo “ali arricciate” e risulta letale in omozigosi), che vengono incrociati tra loro:

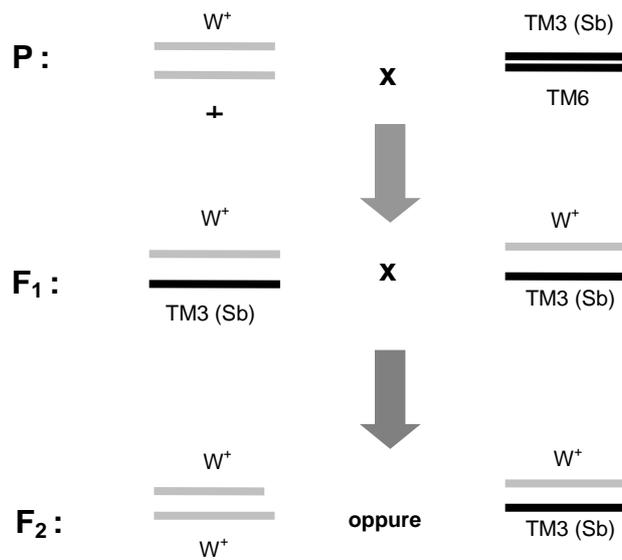


Se l’inserzione del transgene è avvenuta nel II cromosoma, tutti gli individui della generazione F_2 presentano fenotipo w^+ , cioè avranno l’occhio rosso poiché l’allele *Sm6a* è letale in omozigosi. In caso contrario, se compare anche il fenotipo “occhio bianco”, significa che l’inserito si è integrato in un altro cromosoma.

Inserzione nel cromosoma III

P: ♀ (o ♂) transgenico w^+ \times ♂ (o ♀) TM3 (*Sb*)/TM6

Nella generazione F_1 si scelgono gli individui con fenotipo w^+ (occhio rosso) e *Sb*, (*stubble*, marcatore morfologico del III cromosoma bilanciante, il quale produce un fenotipo “setole corte e spesse” ed è letale in omozigosi), che vengono incrociati tra loro.

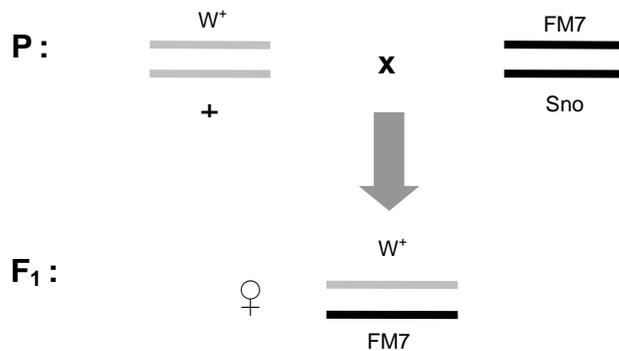


Se il transgene si è inserito nel III cromosoma, tutti gli individui della F₂ presentano il fenotipo w⁺ poiché l'allele Sb è letale in omozigosi. In caso contrario, indica che l'inserto si è integrato in un altro cromosoma.

Inserzione nei cromosomi sessuali

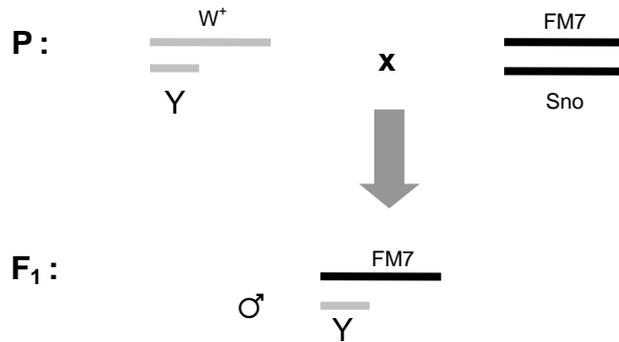
P: ♂ Transgenico w⁺ **x** ♀ FM7/Sno

Osservando la popolazione della generazione F₁, nel caso in cui l'inserzione del transgene sia avvenuta nel cromosoma X, tutte e solo le femmine avranno fenotipo w⁺/FM7 (marcatore del cromosoma bilanciatore X, che produce un fenotipo "occhio a forma di cuore"; le femmine omozigoti sono vitali e fertili):



2.MATERIALI E METODI

Se invece l'inserto è localizzato sul cromosoma Y, tutti e solo i maschi della generazione F_1 presentano fenotipo $w^+/FM7$:



2.5 TECNICHE PER L'ANALISI DEI FENOTIPI

2.5.1 Analisi di Immunoistochimica

Per l'analisi dei tessuti larvali sono state utilizzate larve al terzo stadio cresciute a 25°C. Inizialmente queste sono state dissezionate in una soluzione di PBS ed in seguito i tessuti sono stati fissati per 10 minuti in una soluzione di paraformaldeide al 4% in PBS. Terminato il fissaggio sono stati effettuati tre lavaggi con una soluzione di PBT (PBS e Triton X al 0.3%) di 10 minuti ciascuno. Successivamente i tessuti larvali sono stati incubati overnight a 4°C con l'anticorpo primario diluito in PBT; il giorno seguente si è proseguito con un'ulteriore serie di tre lavaggi con PBT. A questo punto le larve sono state incubate con l'anticorpo secondario diluito in PBT per un'ora a temperatura ambiente. In seguito sono stati effettuati altri tre lavaggi in PBT. Successivamente le larve sono state montate su appositi vetrini con l'ausilio di una soluzione di Mowiol.

Per l'analisi delle arborizzazioni dendritiche sono state utilizzate larve al terzo stadio e sono stati analizzati dendriti del tipo IV DA dei segmenti 4 e 5. la visualizzazione di questo particolare tipo di dendrite è stato possibile mediante un target di membrana mCD8-GFP che permette di esprimere la GFP (Green Fluorescent Protein) in modo sito specifico. Ogni singola larva è stata montata su vetrino porta oggetto con una soluzione di glicerolo 80% e successivamente schiacciata con vetrino copri oggetto in modo da tenere intatta la cuticola larvale, il sistema nervoso periferico e l'apparato muscolare. Di queste larve sono stati analizzati solo i dendriti dei segmenti 4 e 5.

2.5.2 Anticorpi

Gli anticorpi primari utilizzati sono stati: mouse anti-CSP (1:50 DSHB); rabbit anti-Myc (1:200, Santa Cruz Biotechnology); mouse anti-Dlg (1:100, DSHB); mouse anti-22c10 (1:100, DSHB); rabbit anti GluIII (1:1000, Di Antonio); mouse anti tubulin- β (1:100, Sigma), anti-HRP (1:500, Jackson laboratories).

Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati: anti-rabbit Alexa Fluor 488 e anti-mouse Alexa Fluor 488 (1: 1000 Invitrogen).

2.5.3 Software per le immagini e l'analisi

Le immagini sono state acquisite con obiettivi x20 e x60 CFI Plan Apochromat Nikon con microscopio confocale Nikon C1 e sono state analizzate con i software Nikon EZ-C1 (versione 3.70). La quantificazione dei fenotipi nelle giunzioni neuromuscolari e la quantificazione della colocalizzazione sono state effettuate utilizzando il software Volocity (Perkin-Elmer); diversamente la quantificazione dei fenotipi nei dendriti è stata effettuata mediante l'ausilio del software Neurolucida, Autoneuron and Neuroexplorer softwares (MBF Bioscience).

Tutti i pannelli sono stati assemblati con l'utilizzo di Adobe Photoshop CS5.

APPENDICE A: SOLUZIONI**Buffer A per estrazione di DNA genomico da *Drosophila melanogaster*:**

100 mM Tris-Cl pH: 7.5

100 mM EDTA

100 mM NaCl

0.5% SDS

Buffer B per estrazione di DNA genomico da *Drosophila melanogaster*:

5 M Kac

6 M LiCl

Alkaline lysis solution I:

1 M Glucosio

1 M Tris-Cl pH: 8.0

0.5 M EDTA pH : 8.0

Alkaline lysis solution II:

5 M NaOH

20% SDS

Alkaline lysis solution III:

5 M Kac

11.5% V/V Acido Acetico

TE Buffer

Tris-HCl 10 mM (pH 7.5)

EDTA 1 mM

Phosphate Buffered Saline (PBS)KH₂PO₄ 15G/L

NaCl 9G/L

Na₂HPO₄ 8g/L

Buffer per microiniezione:

5 mM KCl

0.1 mM NaH₂PO₄ pH: 7.8

Medium da deposizione:

3% V/V Agar

30% V/V Succo di frutta.

70% V/V Acqua

Medium nutritivo per *Drosophila melanogaster*:

In 600 ml di acqua

7 gr. Agar-Agar

26.4 gr. Lievito

26.4 gr. Glucosio

1.5 gr. Nipagina sciolta in 10 ml di EtOH 96%

Terreno LB:

in 950 ml di acqua

10 gr. NaCl

5 gr. Lievito

10 gr. Triptone

Autoclavare per 20 minuti a 120 °C. Carbamicillina 50 mg/ml → 60 µg/ml

SDS PAGE :Elettroforesi

	<u>Resolving gel</u>	<u>Stacking gel</u>
Acrylamide solution (Fluka)	10% (v/v)	5% (v/v)
Tris-HCl pH 8.8	0.37M	
Tris-HCl pH 6.8		0.125M
Ammonium persulphate	0.1% (w/v)	0.1% (w/v)
SDS	0.1% (w/v)	0.1% (w/v)
TEMED	0.02% (v/v)	0.02% (v/v)

Running buffer 1X

Tris 25mM

Glycine 250mM

SDS 0.1%

Transfer buffer 1X

Tris 25mM

Glycine 192mM

TBS-T buffer 1X

Tris 100mM

NaCl 1,5M

Tween-20 1%

Laemmli buffer 2X

SDS 4%

Glycerol 20%

2-mercaptoethanol 10%

Bromphenol blue 0,004%

Tris HCl 125mM

Buffer di lisi per binding microtubuli

80 mM PIPES (pH 7.0)

1 mM MgCl₂

0.5 mM EGTA

1.0% Triton X-100

inibitori delle proteasi

Drosophila melanogaster

w^{118} , è un ceppo caratterizzato da w (*white*, 1-1.5), un allele recessivo (delezione nel locus *white*) che determina il fenotipo “occhio bianco”. Il gene infatti è coinvolto nella produzione e distribuzione dei pigmenti omocromo (marrone) e pteridine (rosso) presenti negli occhi composti e negli ocelli del moscerino adulto.

APPENDICE B: PROTOCOLLI

Purificazione mini-preparazioni:

- Inoculare ciascuna colonia in 3 ml di LB liquido (con antibiotico) e far crescere per overnight at 37°C.
- Trasferire 1,5 ml di coltura batterica in eppendorf e centrifugare per far sedimentare i batteri (30 secondi a 14.000 rpm). Conservare il rimanente a 4°C.
- Togliere il surnatante senza intaccare il pellet.
- Aggiungere 100 µl di Alkaline lysis solution I (Appendice A) e risospendere il pellet.
- Aggiungere 200 µl di Alkaline lysis solution II (Appendice A); mescolare invertendo i tubi 5-6 volte.
- Aggiungere 150 µl di di Alkaline lysis solution III (Appendice A); incubare in ghiaccio per 3-5 minuti invertendo i tubi 2-3 volte.
- Centrifugare 10 minuti a 14.000 rpm a 4°C.
- Trasferire il surnatante in eppendorf pulita e aggiungere 2 volumi di Etanolo assoluto. Lasciare a temperatura ambiente per 2 minuti.
- Centrifugare 10 minuti a 14.000 rpm a 4°C.
- Rimuovere il surnatante
- Lavare il pellet con 2 volumi di Etanolo 70°.
- Lasciare asciugare il pellet sotto cappa sterile.
- Risospendere in 20-30 µl di H₂O sterile contenente 20 ug/ml DNase-free RNase A.
- Stoccare il DNA a -20°C

Trasformazione delle cellule batteriche competenti mediante shock termico.

- Scongelaire 50 µl di cellule batteriche in ghiaccio.
- Aggiungere 5-7 µl di reazione di ligazione.

- Incubare in ghiaccio per 30 minuti.
- Incubare per 30 secondi a 42°C.
- Incubare nuovamente in ghiaccio.
- Aggiungere 450 µl di S.O.C medium.
- Incubare a 37°C in agitazione per 1 ora.
- Stendere 100 µl su piastra di LB con adeguato antibiotico.

Trasformazione delle cellule batteriche competenti mediante elettroporazione

- Scongellare 50 µl di cellule batteriche in ghiaccio.
- Raffreddare il carrellino dell'elettroporatore in ghiaccio.
- Aggiungere 5-7 µl di reazione di ligazione.
- Elettroporare le cellule nell'apposita cuvetta ad una corrente elettrica di 2500 mV.
- Aggiungere 450 µl di S.O.C medium.
- Incubare a 37°C in agitazione per 1 ora.
- Stendere 100 µl su piastra di LB con adeguato antibiotico.

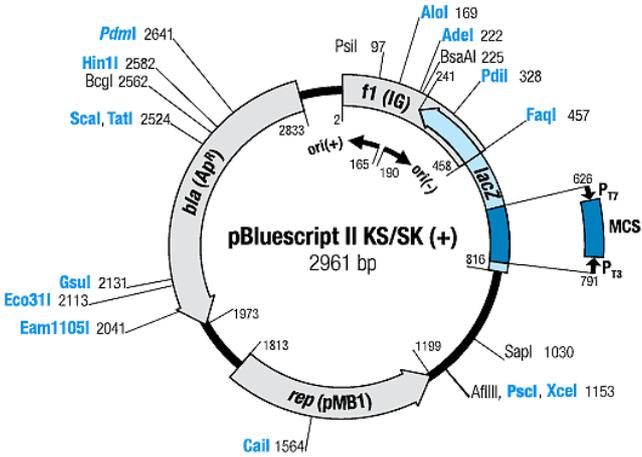
Estrazione DNA genomico da *Drosophila*

- Raccogliere, in ghiaccio, 15-20 moscerini in una eppendorf
- Aggiungere 400 µl di Buffer A (appendice A)
- Schiacciare accuratamente i moscerini con l'apposito pestello
- Incubare a 65°C per 30 minuti
- Aggiungere 800 µl di Buffer B (appendice A)
- Tenere in ghiaccio per almeno un'ora
- Centrifugare 15 minuti a 12000 rpm
- Trasferire 1 ml di surnatante in una nuova eppendorf
- Centrifugare 15 minuti a 12000 rpm
- Prelevare il surnatante ed aggiungere 600 µl di isopropanolo
- Centrifugare 15 minuti a 12000 rpm

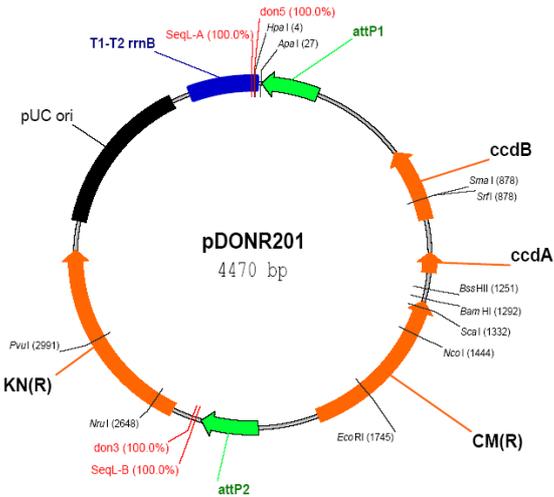
- Eliminare il surnatante
- Lavare il pellet con etanolo 70%
- Centrifugare 15 minuti a 12000 rpm
- Eliminare il surnatante
- Asciugare il pellet
- Risospendere il pellet in 150 μ l di H₂O con RNAsi (2mg/ml).

APPENDICE C: VETTORI:

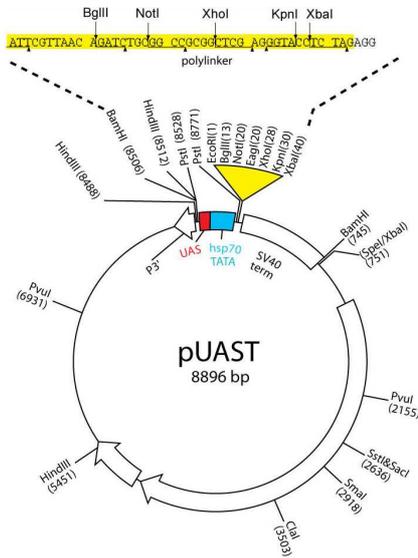
Vettore pBluescript II KS(+)



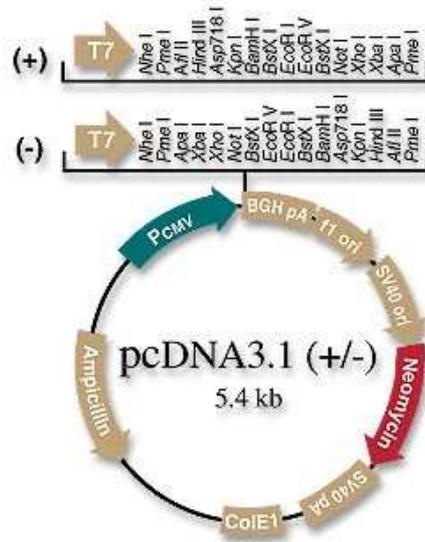
Vettore pDonr201



Vettore pUAST



Vettore pcDNA3.1



Vettore pTWG

Il vettore pTWG utilizzato per questo costrutto contiene:

- Le due estremità dell'elemento P che permettono l'inserimento del transgene nel genoma di *Drosophila*.
- L'allele selvatico "white" (w^+) che funge da marcatore negli individui transgenici conferendo la colorazione rossa alla pigmentazione degli occhi;
- La sequenza UAS che permette la regolazione dell'espressione del transgene inserito mediante il sistema binario UAS/GAL4;
- Il TATA box di *E.coli* sotto il controllo del promotore Hsp70;
- La sequenza SV40, che funziona da segnale di terminazione della trascrizione del transgene.
- Il gene che codifica una green fluorescent protein (GFP)

3. RISULTATI

3.1 Identificazione del gene di *Drosophila* omologo a EFHC1

Mediante una ricerca BLAST nel database del progetto genoma di *Drosophila* (<http://flybase.bio.indiana.edu>) è stato identificato il gene di *Drosophila* omologo al gene umano *EFHC1*. La ricerca è stata eseguita inserendo nel database la sequenza amminoacidica della proteina codificata dal gene umano *EFHC1*. Sono state identificate due proteine, codificate dai geni CG8959 e CG11048, chiamate rispettivamente Defhc1 e Defhc2.

L'allineamento delle sequenze amminoacidiche delle proteine Defhc1 e Defhc2 di *Drosophila* con EFHC1 (Fig.12) ha mostrato che la proteina umana presenta un'omologia del 51% con Defhc1 e del 50% con Defhc2. Entrambe le proteine presentano un'identità del 33% con quella umana.

Il progetto di ricerca attualmente in corso riguarda l'analisi funzionale del gene *Defhc1*.

3. RISULTATI

CG8959 --MLRIPGMPLLPGLFRDVSKGHYPKPQSLANVQGLSMLS-----DRQQPAPVESG
CG11048 --MMRLPGMPMLPGAQFQYDRGKRRHPRQQLMHYQGIQMLS-----DRREPELVEPN
Human MVSNPVHGLPFLPGTSTFKDSTKTAFHRSQTLSTYRNGYAIVRRPTVIGGGDRRLQFNLSQA

CG8959 SVTVDISCPVVGAS--SIYPPRSRGPMPWLA YDKKVLCFHAYFKQTLQEVYHAPYLVRK
CG11048 GIVADPKCPVPAQLNSLWAPKATTKLPPWLA YDKQVLCFNAYFKENLTEIYHAPYQVRK
Human ELDELASKAPVLTYGQPKQAP--PADFI PAHVAFDKKVLKFDAYFQEDVPMSTEEQYRIRQ

CG8959 VKIYYYLEDGTL E IYEP RVDNSGIVQGCVHRQRVQKAPPCDNEFMSLIDLNVDTVQIF
CG11048 VKIIFYLEDTMQVTEPKVENSIGIPQGCLVHRQRIPKAPPTDREFISIFDLNVDTDVQIF
Human VNIYYYLEDDSMSVIEPVVENSIGIQGKLIKRRQLAKNDRGD--HYHWKDLNRGINITY

CG8959 DRQYHITDCDPFTRTFLNKRGI TVPDPVKSPCDPTEEQRKRENQPRSGN----LIPKNHP
CG11048 DRVYHISGCDVFTRQFLNRAGIFVPEAQQEPDPTTEIRKRSGLKQTGNTATSALPKKHA
Human GKTFRVVDCDQFTQVFLSQGIELNPPEKMALDPYTELRKQPLRKYVTP-----SDFDQ

CG8959 FAQFLKYDRQILKFQAYWDD--RTEFGDVRKLELCYYLSDDTIEIKEQHIRNSGRDGPTVF
CG11048 FAQFLEFDRRVLKFQGYWDD--RSEFGDVRKLEVCYYLADDTIDIKKFPNRNSGREGPTTF
Human LKQFLTDFDKQVLRFYAIWDDTDSMYGECRTYIIHYLMDDTVEIREVHERNDGRDPFPLL

CG8959 LKRGRRLAREFEGQLPGQMTPTLLNLVLTGNMNRVRYCVDPLNTGNKEIHYYREKDLQIG
CG11048 LKRGRKLPKEFSGLPLPGQQTAMTLLNLVLTGNMNRVRYVADPLNTGQKEVQHYTDQDLQIG
Human MNRQRVP-----KVLVENAKNFPQCVLEISD--QEVLEWYTAKDFIVG

CG8959 SVINVYGRAVVI TELDPFTQNYRQRYGIQDFTPLP IPARSDDCADHRS---ERQLPPYN
CG11048 AVLNVFGRSVVLTSCDQFTQSYREKYGIQEFSPQPIPERSDIRPYTQGGMGSRRLPPYN
Human KSLTILGRTFFIYDCDPFTRRYKFKFGITDLPRIDVSKR-----EPPPVKQELPPYN

CG8959 GWGSYEDSVGNCISVEPKPKSDFKFKFIKYDRYVLRFGAKMLSTIKANCERIFVISYYLC
CG11048 GWGSHEDSEGNCITVEPKPPQADFKFLFKYDGCILRFGAKLISAIRDNGERDFVISYFLA
Human GFGLVEDSAQNCFTLIPKAPKDKVIMKLVNDNKVLRYLAVLESP IPEDKDRRFVFSYFLA

CG8959 DDTLQIQEIAVRNSGFLGGEFMKRTRLELPGQERFSCKQPQYMPWNFFVGGSTMSLKDFI
CG11048 DDTLQIYETSRNSGFLGGEFMKRARVPLPGQDMYSSSRPEYYRANDFYIGRTMTLKDHI
Human TDMISIFEPPVRNSGIIIGGKYLGRTKVVKP---YSTVDNPVYGPSPDFFIGAVIEVFGRH

CG8959 FHI VSADEYTLMYMEHHPEIFPHANVGVIMEKVKSAQNMAEFVSGVPCDCTDLEKRD
CG11048 FHI VSADEF TLMYMEQHPSEFPVADIQKIMQKIREAVRPDYKQFVLRCKPDG--DLG--DY
Human F I I L D T D E Y V L K Y M E S N A A Q Y S P E A L A S I Q N H V R -----

CG8959 VFVFSFESFKGALISIMG-NQISDHEIISLCRHFSAEKSQPNACDRSTVRAAAHLELKR TL
CG11048 TAVSFETLRSTLLSYLSKDCCLNHEIVTVCRFFSAEQAMPSCDRNRVRAAAQLELKRAL
Human -----KREAPAPEAESKQTEKDPGVQLEALI

CG8959 WNARDDLMEHFHHINPTNQPFLEVKVRSALRGCRLPFSLELIDNILSILNRNECDDIEV
CG11048 WNGMDQLNDHLSHINPACKPYISEGQVRSTLRGCRLPFSLELVEDILMVLQRNGQNEIEV
Human DTIQKQLKDHCKDN-----IREAFQIYDKEASGYVDR

CG8959 CDLMNFIDVSCGKGCMDL PVNHAFELCPKIPFLNKGRVVNFTCFLRELNPLNLPAGGEK
CG11048 RDFLAFFNMRNDQVPDIAPLNIAFELCPKLPFLHKGRLVDFTWFLDYLGIEEELKR---A
Human DMFFKICESLN-----VPVDDSLVKELIRMC SHGEGKINYYNFVRAFSN-----

CG8959 NNDAIAEGGRIMPPSAMPDTDAHKANEDDAQHMA
CG11048 NN-----
Human -----

Figura 12. Allineamento tra le proteine EFHC1 umana e Defhc1 e Defhc2 di *Drosophila*. Le identità tra le sequenze sono evidenziate in rosso.

3.2 Generazione del mutante knock-out del gene *Defhc1*

Per comprendere la funzione biologica di un gene sconosciuto è importante analizzare i fenotipi causati dalla sua assenza. Per questo motivo è stata generata una linea knockout per il gene *Defhc1* (*Defhc1*^{ko}), ovvero una linea transgenica di *Drosophila* nella quale *Defhc1* è stato deletato. La delezione è stata realizzata mediante la strategia dell'ends-out gene targeting, che sfrutta il principio della ricombinazione omologa (Gong and Golic, 2003). Per eseguire il targeting di *Defhc1* sono state generate delle linee transgeniche mediante microiniezione in *Drosophila* di un costrutto "donor". Il costrutto donor contiene un gene marker *mini-white*⁺, che conferisce il colore rosso agli occhi dei moscerini, alle cui estremità sono presenti delle sequenze omologhe alle regioni che fiancheggiano il gene nel genoma di *Drosophila*. In questo modo le sequenze omologhe permetteranno una precisa ricombinazione nel genoma, sostituendo al gene target *Defhc1* il gene marker *mini-white*⁺ (Fig.13 a-b). Le linee donor sono state sottoposte ad uno schema di incroci genetici il cui risultato finale è una linea in cui il gene *Defhc1* è stato interamente sostituito con il marcatore *white*⁺. Questa linea *Defhc1*^{ko} manca quindi sia delle sequenze genomiche corrispondenti a *Defhc1* sia dei trascritti prodotti da questo gene consentendo l'analisi delle conseguenze della perdita di funzione del gene.

Per verificare la corretta ricombinazione sono state allestite delle PCR di controllo, utilizzando diverse coppie di primers disegnate allo scopo di distinguere tra cromosoma wild type e cromosoma knockout. Le coppie di primers utilizzate sono indicate nella figura 13a-c. La coppia 1-2 amplifica l'intera regione genomica corrispondente a *Defhc1*; le coppie 3-4 e 5-6 sono costituite da primers che si legano all'interno del gene *mini-white*⁺, presente solo nella linea knockout, e a sequenze che si trovano rispettivamente a monte e a valle della regione omologa contenuta nel costrutto donor. Se la ricombinazione omologa è avvenuta correttamente, amplificazione del DNA genomico con i primers 1-2 non produce un amplificato mentre un prodotto di PCR specifico è atteso quando si usano le altre due coppie di primers. Al contrario, amplificazione di DNA genomico di controllo dovrebbe produrre l'amplificato corrispondente al gene *Defhc1* (primers

3. RISULTATI

1-2) ma non amplificare una banda quando si usano le altre coppie di primers. Le PCR eseguite sul DNA genomico della linea *Defhc1* knockout putativa e su DNA genomico di controllo hanno chiaramente dimostrato che il pattern dei prodotti di PCR corrispondeva a quelli attesi sia per *Defhc1*^{KO} sia per il controllo, confermando così che in questa linea il gene *Defhc1* è stato eliminato per ricombinazione omologa.

Ulteriore conferma è stata ottenuta da esperimenti di RT-PCR su RNA totale di individui di controllo ed individui *Defhc1*^{ko} (Fig.13-e). Utilizzando primers per l'amplificazione del cDNA di *Defhc1* è stato possibile identificare il trascritto del gene *Defhc1* esclusivamente da RNA totale estratto da individui w¹¹¹⁸, dimostrando la mancanza dell'RNA corrispondente al gene *Defhc1* negli individui mutanti.

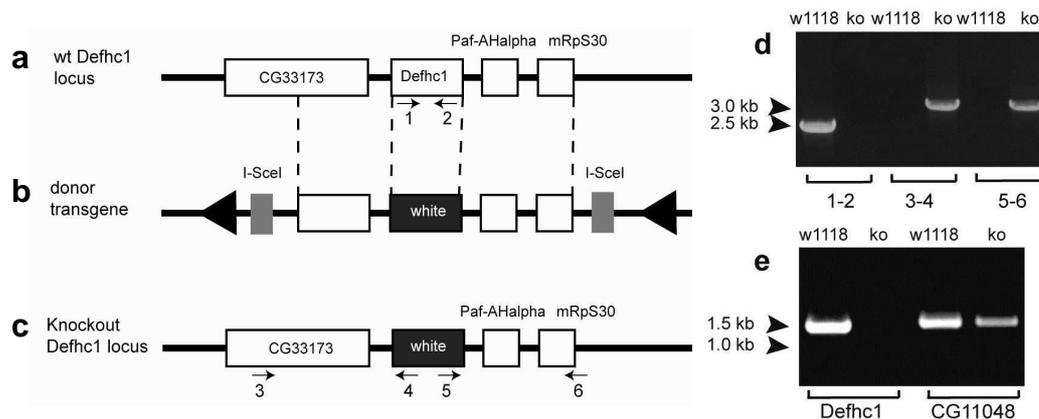


Figura 13. Generazione e caratterizzazione del mutante *Defhc1*^{ko}: (a) Locus del gene *Defhc1*; (b) Costrutto del transgene donor. In questo costrutto il gene marker mini-*white*⁺ è fiancheggiato da sequenze omologhe al locus del gene *Defhc1*, due siti di restrizione I-SceI e due siti FRT; (c) Locus *Defhc1*^{KO}, dove il gene *Defhc1* è stato rimpiazzato dal gene marker mini-*white*⁺; (d) PCR di controllo che dimostrano la presenza del locus *Defhc1* nel controllo w¹¹¹⁸, mentre è assente nel DNA degli adulti *Defhc1*^{KO} (primers 1-2). Diversamente le PCR amplificano il DNA di *Defhc1*^{KO} solo in presenza delle coppie di primers disegnate nel gene marker mini-*white*⁺ (primer 3-4 e 5-6); (e) RT-PCR su RNA totale di individui *Defhc1*^{KO} dimostra l'assenza del trascritto endogeno del gene *Defhc1*.

I moscerini *Defhc1*^{ko} così ottenuti sono stati analizzati per verificare eventuali alterazioni nella vitalità, che non si è rivelata diversa da quella dei controlli. I moscerini sono stati poi analizzati per valutare la potenziale presenza di altri fenotipi comportamentali avvalendosi di test sia meccanici che ambientali che mimano alcuni stimoli stressanti causa di crisi epilettiche. Da questi test è risultato che gli individui omozigoti *Defhc1*^{ko} non presentano alcun fenotipo evidente.

3.3 Caratterizzazione fenotipica del mutante loss of function del gene *Defhc1*

Per determinare eventuali difetti causati dalla mancanza del gene *Defhc1* a livello subcellulare, sono state condotte analisi immunohistochimiche su giunzioni neuromuscolari di larve al terzo stadio *Defhc1*^{ko} omozigoti. Per visualizzare la morfologia sinaptica, le giunzioni neuromuscolari sono state marcate con l'anticorpo specifico anti-Horseradish Peroxidase (HRP), marcatore delle membrane neuronali. L'osservazione preliminare ha indicato la presenza di un numero elevato di bottoni satellite nelle giunzioni *Defhc1*^{ko} rispetto alle giunzioni di controllo. I bottoni satellite, sono definiti, come sono piccole terminazioni sinaptiche che gemmano dal ramo principale della giunzione neuromuscolare o da altri bottoni più grandi (Fig.14 a-b). I bottoni satellite sono caratterizzati da dimensioni ridotte e solitamente sono localizzati direttamente a contatto, o attraverso piccole ramificazioni, al bottone principale (Dickman et al., 2006). Per quantificare questa osservazione sono stati contati i bottoni satellite delle giunzioni neuromuscolari che innervano il muscolo 4, poiché questo tipo di giunzione neuromuscolare è caratterizzata da una morfologia semplice e da un esiguo numero di ramificazioni e di bottoni sinaptici. I risultati ottenuti dalla conta hanno dimostrato che le giunzioni neuromuscolari di controllo presentano un esiguo numero di bottoni satellite, mentre le giunzioni neuromuscolari di larve *Defhc1*^{ko} omozigoti presentano un incremento pari a 3 volte del numero di bottoni satellite rispetto al controllo (controllo = 2.7 ± 0.35 , n = 27; *Defhc1*^{ko} 8.2 ± 0.46 , n

3. RISULTATI

= 29; $P = 3.02e^{-12}$) (Fig. 14-c). Diversamente il numero totale di bottoni sinaptici, esclusi i bottoni satellite, risulta inalterato.

Per verificare che il fenotipo osservato fosse diretta conseguenza della mancanza di *Defhc1*, sono stati fatti esperimenti di complementazione. Per fare ciò è stato allestito un incrocio tra individui *Defhc1^{ko}* ed individui di una linea di *Drosophila* che presenta la delezione del gene *Defhc1*, per ottenere larve nelle quali il 50% del gene fosse effettivamente eliminato in modo indipendente dal mutante da noi generato. Successivamente sono stati eseguiti esperimenti di immunostochimica per analizzare la morfologia delle giunzioni neuromuscolari delle larve di terzo stadio contenenti un cromosoma con la delezione *Df(1)ED7344*, che comprende l'intero locus del gene *Defhc1*, e una copia del cromosoma *Defhc1^{ko}*; anche in questo caso l'analisi e la successiva quantificazione hanno mostrato un aumento significativo del numero di bottoni satellite, comparabile con il valore riscontrato nelle larve omozigoti *Defhc1^{ko}* (9.0 ± 0.58 , $n = 22$) (Fig.14-c).

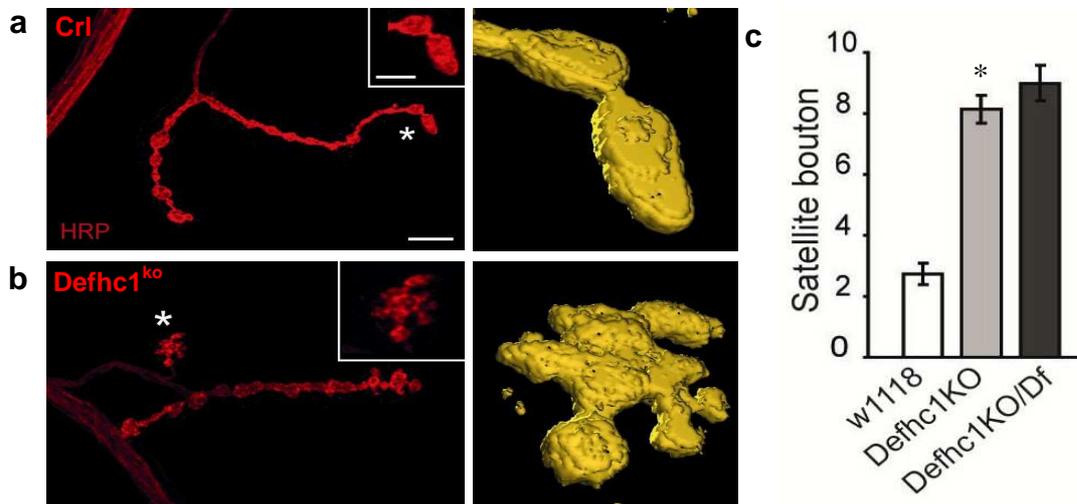


Figura 14. *Defhc1^{KO}* causa l'aumento del numero di bottoni satellite: Immagine al microscopio confocale di una NMJ di tipo 4 di larva al terzo stadio marcata con il marker neuronale HRP. (a) Controllo w¹¹¹⁸ con ricostruzione 3D di un bottone sinaptico; (b) Mutante *Defhc1^{KO}* con ricostruzione di un bottone sinaptico dove sono visibili i bottoni satellite; (c) Quantificazione del numero di bottoni satellite nei genotipi sotto indicati. . Scala: 10 μ M; ingrandimento scala: 5 μ M.

Per confermare ulteriormente che il fenotipo osservato fosse conseguenza della mancanza di *Defhc1* dal sistema nervoso di *Drosophila*, sono stati condotti degli esperimenti di rescue del fenotipo. Per fare questo sono stati allestiti degli incroci per esprimere il gene *Defhc1* (UAS-*Defhc1*-GFP or UAS-*Defhc1*-HA) nel background del mutante *Defhc1*^{ko} sotto il controllo del promotore specifico per il sistema nervoso elav-GAL4.

In seguito all'espressione del gene *Defhc1* nel tessuto nervoso del moscerino mutante è stato osservato il totale recupero del fenotipo sinaptico. Infatti il numero di bottoni satellite nelle giunzioni neuromuscolari di questi individui risulta comparabile con un normale animale di controllo (3.3 ± 0.38 , n = 31) (Fig. 15).

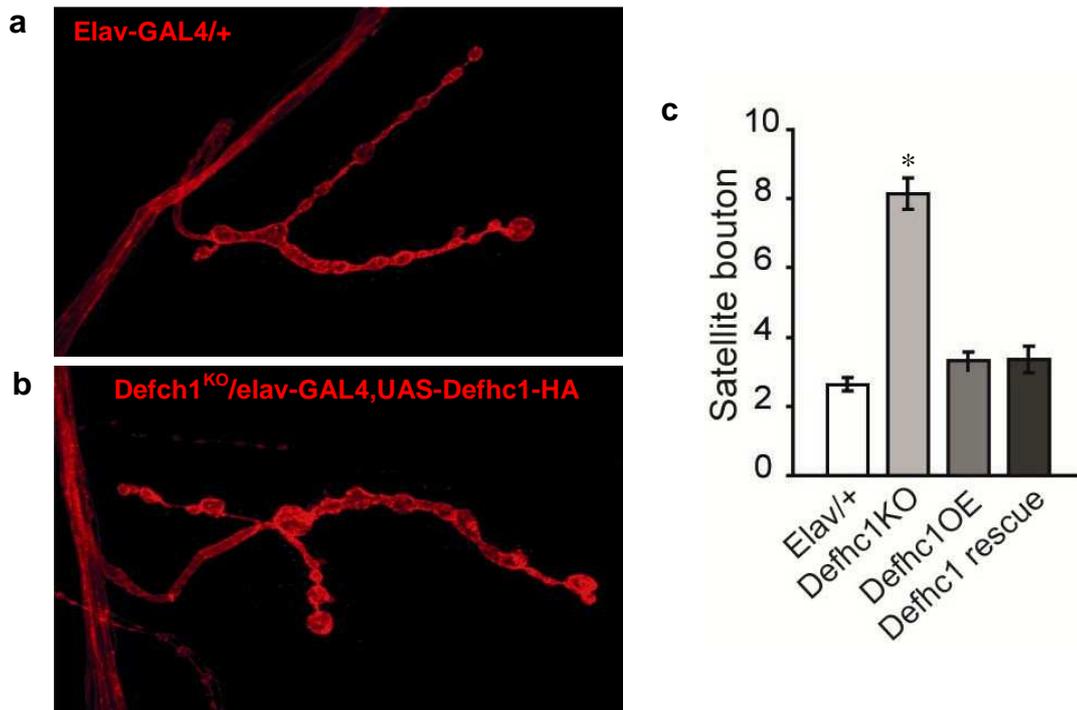


Figura 15. Rescue del fenotipo generato dal mutante *Defhc1*^{KO} : Immagine al microscopio confocale di una NMJ di tipo 4 di larva al terzo stadio marcata con il marker neuronale HRP. (a) Elav-GAL4/+; (b) *Defhc1*^{KO}/elav-GAL4,UAS-*Defhc1*-HA espressione del costrutto UAS-*Defhc1*-HA nel background del mutante *Defhc1*^{KO} sotto il controllo della linea driver elav-GAL4; (c) Quantificazione del numero di bottoni satellite nei genotipi sotto indicati. Scala: 10 μ M.

3. RISULTATI

I risultati ottenuti indicano che l'aumento del numero di bottoni satellite osservato nelle giunzioni neuromuscolari di moscerini *Defhc1*^{ko} è una diretta conseguenza della mancanza di *Defhc1* nel sistema nervoso. E' possibile dunque che il gene *Defhc1* abbia un ruolo a livello presinaptico nella regolazione negativa della formazione di nuovi bottoni sinaptici.

Per verificare se i bottoni satellite delle giunzioni neuromuscolari degli individui *Defhc1*^{ko} fossero terminazioni sinaptiche funzionali sono stati eseguiti degli esperimenti di immunohistochimica con marcatori specifici per alcune proteine pre- e post-sinaptiche, che sono indice del corretto funzionamento delle terminazioni sinaptiche. Esperimenti simili realizzati per altri mutanti che presentano un aumento del numero di bottoni satellite hanno mostrato che queste strutture sono normali per struttura e funzionalità (Dickman et al., 2006; O'Connor-Giles et al., 2008). Giunzioni neuromuscolari di tipo 4 di larve al terzo stadio *Defhc1*^{ko} omozigoti e di controllo, sono state marcate con gli anticorpi anti-CSP, specifico per la proteina pre-sinaptica Cysteine String Protein fondamentale per l'esocitosi, e l'anticorpo anti-BRP/nc82, specifico per la proteina BRP localizzata nelle zone attive dei bottoni sinaptici (Fig.16). Sono stati utilizzati, inoltre, gli anticorpi anti-discs large (DLG), proteina presente nel compartimento post-sinaptico e l'anticorpo anti-glutamate receptor subunits II e III, specifico per i recettori del Glutammato. Tutti i marcatori analizzati presentano una corretta localizzazione e distribuzione nei bottoni satellite, indicando che queste strutture sinaptiche presentano una normale organizzazione e funzionalità (Fig.17)

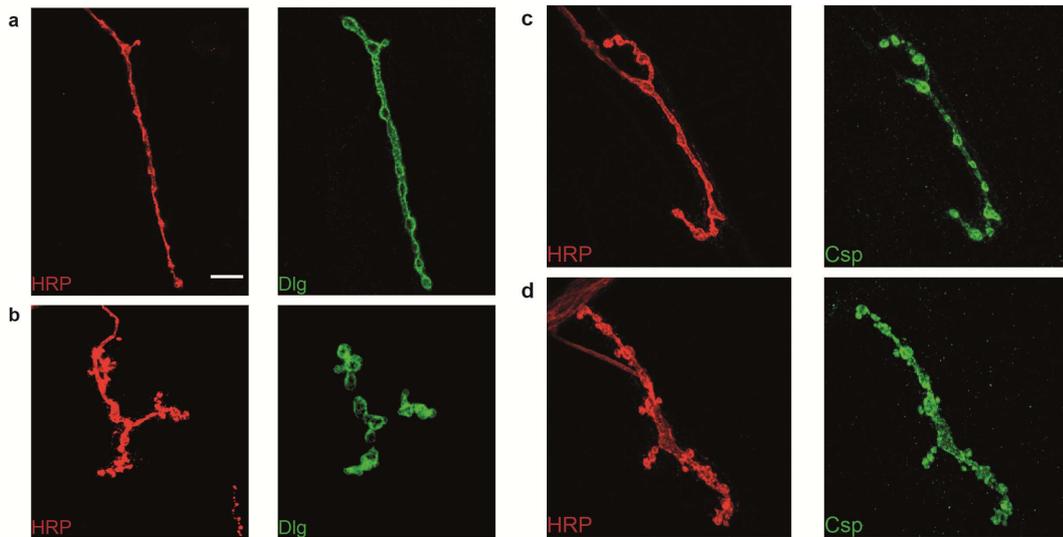


Figura 16. Marcatori pre-sianptici: Immagine al microscopio confocale di una giunzione neuromuscolare di tipo 4 di una larva al terzo stadio, marcata con HRP (marker delle membrana neuronale) , Dlg (marker post-sinaptico), Csp (marker pre-sinaptico). (a, c) controllo w^{1118} ; (b, d) $Defhc1^{KO}$; Scala: 12 μ M.

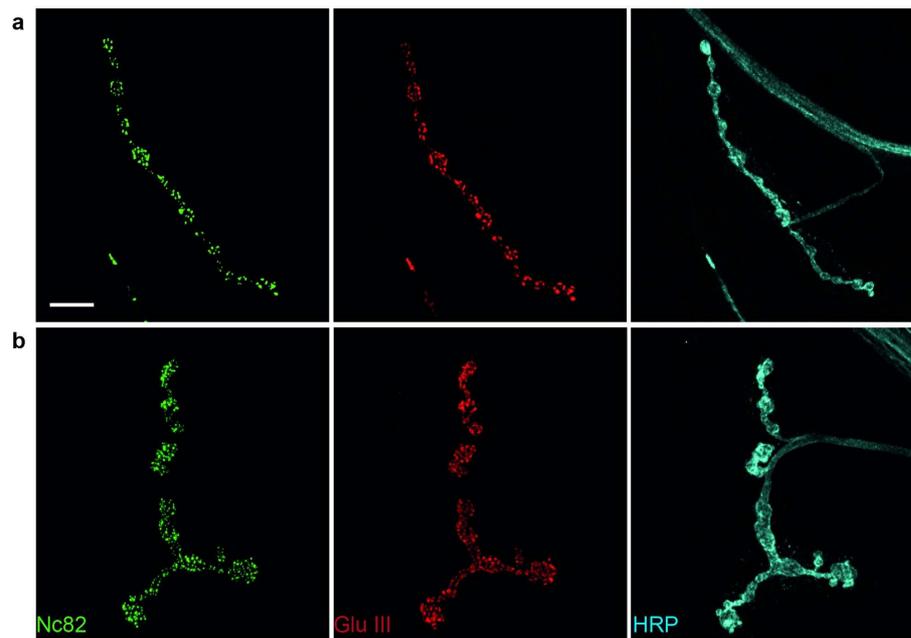


Figura 17. Marcatori post-sianptici: Immagine al microscopio confocale di una giunzione neuromuscolare di tipo 4 di una larva al terzo stadio, marcata con NC82 (marker per le zone attive), GluIII (recettore del glutammato) e HRP (marker delle membrane neuronali). (a) Controllo w^{1118} ; (b) $Defhc1^{KO}$; Scala: 12 μ M.

3.4 Espressione ectopica del gene *Defhc1*

Per determinare la localizzazione endogena di *Defhc1* sono stati generati due anticorpi contro la proteina, che sono stati utilizzati in esperimenti di immunistochemica su embrioni e tessuti larvali di *Drosophila*. Le analisi eseguite su questi tessuti utilizzando tecniche di microscopia confocale non hanno evidenziato alcun pattern specifico per la proteina.

Sono state quindi disegnate sonde specifiche per determinare l'espressione dell'mRNA tramite ibridazione *in situ*. Anche in questo caso l'analisi non ha permesso di identificare un pattern di espressione per *Defhc1*.

I risultati ottenuti si spiegano con l'osservazione che le EST corrispondenti al gene *Defhc1* riportate sono molto scarse. Inoltre tali EST sono state individuate quasi esclusivamente da tissue-specific libraries create per identificare trascritti rari. Questi dati suggeriscono che il gene *Defhc1* sia espresso a livelli molto bassi, tanto da impedire la visualizzazione della normale distribuzione endogena attraverso le tradizionali tecniche di immunistochemica e ibridazione *in situ*.

Data la mancanza di dati sull'espressione endogena della proteina *Defhc1*, per definire la distribuzione subcellulare della proteina sono state generate linee transgeniche di *Drosophila* per l'espressione ectopica del gene. Sono state generate le linee transgeniche UAS-*Defhc1*-GFP e UAS-*Defhc1*-HA che, espresse mediante il sistema binario UAS-GAL4, (Brand and Perrimon, 1993), permettono di determinare la distribuzione della proteina attraverso esperimenti di immunocitochemica. Queste linee sono state utilizzate per esprimere la proteina *Defhc1* nel sistema nervoso centrale di *Drosophila* utilizzando la linea driver *elav*-GAL4, che guida l'espressione del gene in modo specifico nel tessuto nervoso, e la linea driver *D42*-GAL4, che guida l'espressione nei motoneuroni. Dall'analisi immunistochemica di larve al terzo stadio è stato osservato che la proteina *Defhc1*-GFP, quando espressa sotto la guida di driver per il sistema nervoso centrale, risulta visibile nel ganglio ventrale larvale, nei prolungamenti degli assoni che da esso dipartono, nelle giunzioni neuromuscolari ed in tutti i tipi di bottoni sinaptici (Fig.18 a-b). Inoltre è stato osservato che la sovraespressione della proteina *Defhc1* nel sistema nervoso centrale, diversamente dalla sua

eliminazione, non causa alcun cambiamento morfologico a carico delle giunzioni neuromuscolari.

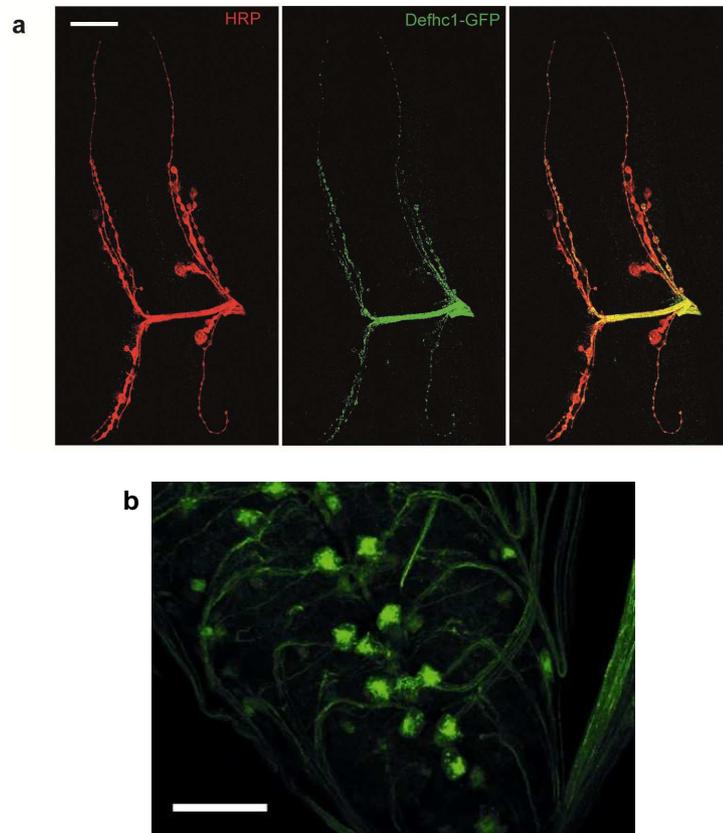


Figura 18. Localizzazione ectopica della proteina Defhc1-GFP: (a) Immagine al microscopio confocale di una NMJ di tipo 12/13 di larva al terzo stadio, dove la proteina Defhc1-GFP è espressa sotto il controllo della linea driver per il sistema nervoso elav-GAL4, visualizzata con l'anticorpo HRP (rosso). L'immagine mostra come la proteina Defhc1-GFP sia distribuita in tutti i tipi di bottoni sinaptici. Scala: 20 μ M. (b) immagine al confocale di un ganglio ventrale di una larva al terzo stadio Defhc1-GFP; elav-GAL4 dove il segnale della GFP è visibile nel citoplasma dei corpi cellulari e negli assoni che da esso dipartono. Scala: 40 μ M.

In base alle osservazioni effettuate in seguito alla sovraespressione della proteina umana che in colture cellulari causa un cambiamento morfologico di queste cellule, generando neuriti più corti e meno ramificati, è stato deciso di osservare se anche Defhc1 fosse in grado di generare fenotipi evidenti anche a livello dei dendriti. Gli esperimenti immunostochimici effettuati hanno evidenziato che l'espressione di Defhc1-GFP nel sistema nervoso periferico sotto il controllo della linea driver ppk-GAL4, promotore specifico per i dendriti di tipo

3. RISULTATI

IV, distribuisce la proteina nei corpi cellulari e nei prolungamenti delle arborizzazioni dendritiche (Fig.19).

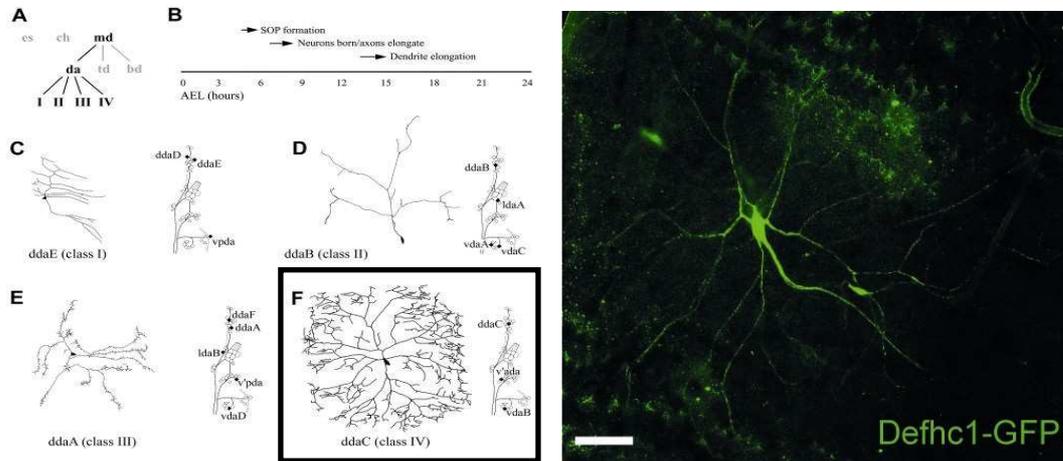


Figura 19. Localizzazione ectopica della proteina Defhc1-GFP: La proteina Defhc1-GFP espressa sotto il controllo della linea driver ppk-Gal4 è localizzata nelle arborizzazioni dendritiche dei dendriti di tipo IV. Scala: 60 µM.

3.5 Analisi elettrofisiologica del mutante loss of function del gene *Defhc1*

La localizzazione presinaptica della proteina Defhc1 ed i fenotipi osservati in assenza di Defhc1, caratterizzati dall'alterazione morfologica della giunzione neuromuscolare che presenta un incremento del numero dei bottoni satellite, suggeriscono un ruolo di *Defhc1* nella regolazione della morfologia della giunzione. Per verificare se all'alterazione morfologica corrispondesse anche un'alterazione funzionale, sono state eseguite analisi elettrofisiologiche per stabilire se l'assenza di *Defhc1* desse luogo a difetti della neurotrasmissione. Gli esperimenti sono stati realizzati dal Dottor Kumar presso l'istituto di Science and Reserch (Bhopal, India). Le registrazioni effettuate si sono concentrate inizialmente sulla rilevazione dei tracciati di potenziali evocati (EJP) raccolti da giunzioni neuromuscolari eccitatorie di larve al terzo stadio. L'analisi dei tracciati rilevati da giunzioni neuromuscolari di larve mutanti Defhc1^{ko} hanno evidenziato

che i potenziali evocati di questi individui sono paragonabili ai tracciati rilevati negli individui di controllo (Fig.20). Successivamente sono stati analizzati i tracciati corrispondenti ai potenziali spontanei (EJPs), che rappresentano gli eventi di rilascio spontaneo di neurotrasmettitore nella sinapsi. Le giunzioni neuromuscolari di larve Defhc1^{ko} presentano tracciati con un significativo aumento nella frequenza dei potenziali spontanei rispetto ai tracciati di larve di controllo (Fig.20). Questi risultati sono coerenti con i dati riscontrati in altri mutanti che generano un aumento delle dimensioni dei bottoni sinaptici (Huntwork et al., 2007; Koh et al., 2004; Rikhy et al. 2002) e potrebbero derivare dall'incremento del numero delle zone attive nelle sinapsi di Defhc1^{ko} dovuta alla presenza di bottoni satellite in sovrannumero.

Sono stati condotti anche esperimenti nei quali la proteina è stata sovraespressa. Sono stati analizzati i tracciati di giunzioni neuromuscolari di larve al terzo stadio nelle quali la proteina Defhc1 è stata espressa nel sistema nervoso sotto il controllo del driver specifico elav-GAL4. L'analisi di questi tracciati ha dimostrato che, in seguito a sovraespressione della proteina, la trasmissione sinaptica è normale, con un lieve ma non statisticamente significativo, aumento della frequenza dei potenziali spontanei (mEJP) rispetto ai tracciati di controllo (0,75 ± 0,04 mV in elav-GAL4/+ rispetto a 0,9 ± 0,07 mV in Defhc1^{ko}, P = 0.055) (Fig. 20).

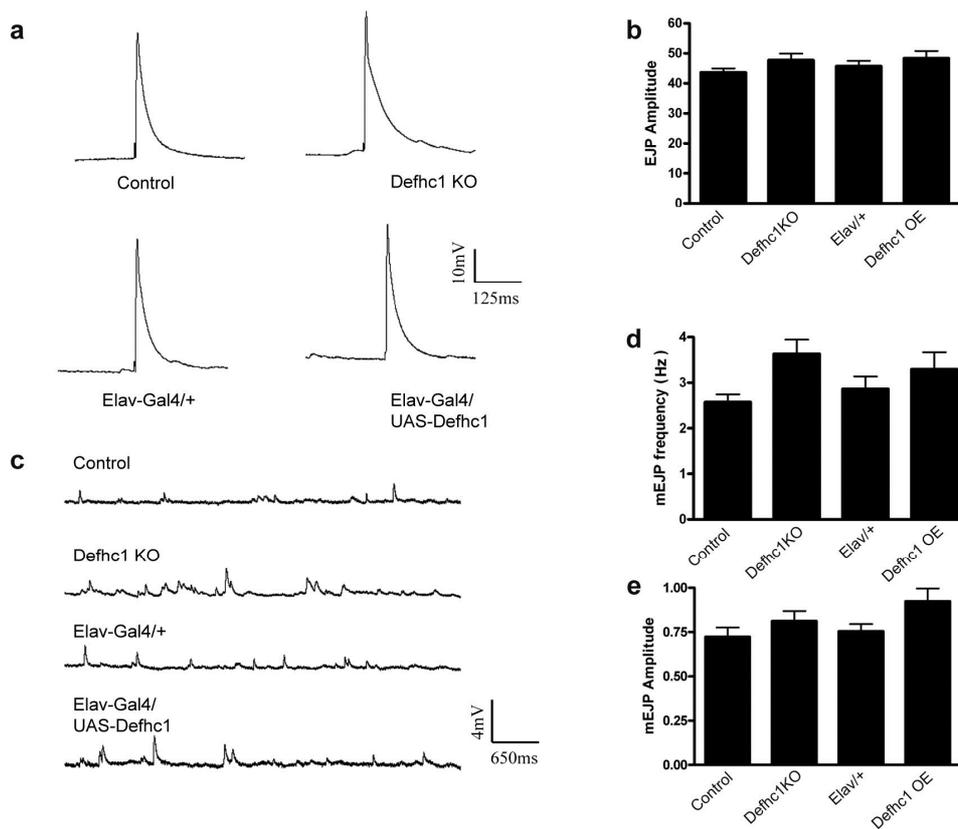


Figura 20. Analisi elettrofisiologica del mutante $Defhc1^{KO}$ e della sovraespressione della proteina $Defhc1$: (a, c) Tracciati rappresentativi di (a) potenziali evocati e (c) potenziali sinaptici spontanei (mEJP) di animali controllo, mutanti $Defhc1^{KO}$, $elav-GAL4/UAS-Defhc1$. (b, d, e) Quantificazione di (b) ampiezza delle EJP, (d) frequenza delle mEJP e (e) ampiezza delle mEJP dei genotipi sotto indicati. Per la quantificazione sono stati utilizzati i tracciati di 7 animali per ogni genotipo.

3.6 Interazione di *Defhc1* con i microtubuli *in vitro* ed *in vivo*

La regolazione dell'organizzazione e della dinamicità dei microtubuli è un evento molto importante e cruciale per la corretta formazione ed il corretto mantenimento degli assoni (Medina M.T. et al., 2008). Inoltre, studi che hanno utilizzato il sistema nervoso centrale di *Drosophila* come modello, hanno dimostrato chiaramente il coinvolgimento dei microtubuli nel controllo della dinamicità del citoscheletro, nella modulazione della crescita della sinapsi e nello sviluppo dei bottoni. Quindi, lo studio si è concentrato sull'analisi di una possibile correlazione tra un'alterata dinamicità e organizzazione dei microtubuli con il fenotipo osservato nel mutante $Defhc1^{KO}$.

Recentemente è stato osservato che la proteina umana EFHC1 è localizzata nei centrosomi del fuso mitotico ed è in grado di legarsi ai microtubuli (de Nijs et al., 2009). Abbiamo quindi determinato se la proteina omologa di *Drosophila Defhc1* avesse la stessa localizzazione subcellulare e la stessa capacità di interagire con i microtubuli. Sono stati quindi generati dei costrutti per l'espressione in cellule di mammifero in cui il gene *Defhc1* è stato fuso con l'epitopo Myc. Cellule Cos7 sono state trasfettate con il plasmide e sono stati condotti esperimenti di immunocitochimica. Le cellule sono state marcate con gli anticorpi specifici anti-Tubulina, per evidenziare i filamenti di microtubuli delle cellule, e anti-Myc che permette di visualizzare l'epitopo fuso con la proteina. L'analisi delle cellule al microscopio confocale ha evidenziato che la proteina Defhc1-Myc, a livello subcellulare, è distribuita principalmente nel citoplasma (Fig.21-a). In alcuni casi il segnale è presente anche a livello nucleare, rimanendo comunque assente nei nucleoli. Inoltre è stato osservato che in cellule in divisione la proteina è localizzata in modo specifico nei centrosomi del fuso mitotico, analogamente alla proteina umana EFHC1 (de Nijs et al., 2006) (Fig.21-b).

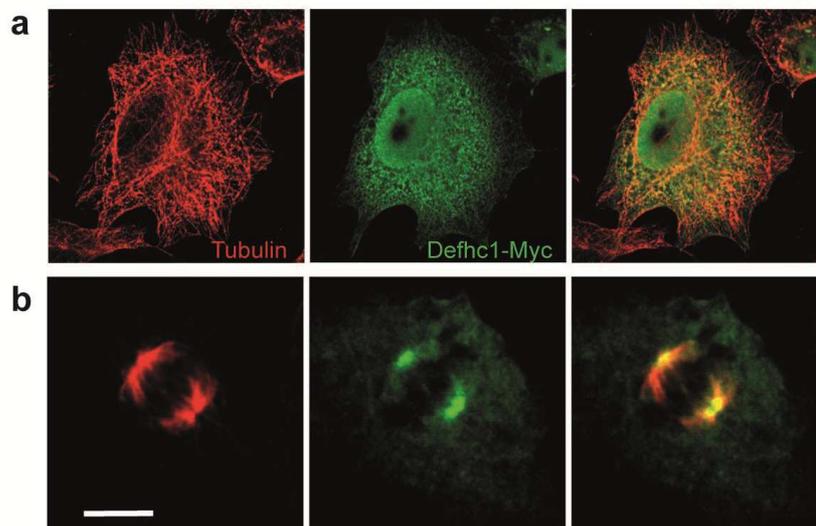


Figura 21. Interazione dei Defhc1 con i microtubuli: Cellule Cos7 trasfettate con il costrutto Defhc1-Myc sono state marcate utilizzando l'anticorpo anti-Tubulina (rosso) e anti-Myc (verde). (a) Cellule in fase G. (b) Cellule in divisione mitotica. Scala 4 μ M.

3. RISULTATI

Per testare la diretta interazione tra la proteina Defhc1 ed i microtubuli, è stato eseguito un saggio per il binding dei microtubuli. In questo saggio *in vitro* il lisato di cellule Cos7 trasfettate con il costrutto Defhc1-Myc, è stato fatto co-sedimentare con microtubuli stabilizzati dal Tassolo. Parallelamente è stato condotto lo stesso saggio di binding utilizzando lisato cellulare di cellule Cos7 trasfettate solamente con la proteina GFP, che non è in grado di co-sedimentare con i microtubuli. I campioni ottenuti dal saggio sono stati analizzati mediante Western Blot usando gli anticorpi anti-Myc, specifico per l'epitopo fuso con la proteina Defhc1, anti-Tubulina, marcatore dei microtubuli, ed anti-GFP, specifico per la proteina GFP che funge da controllo negativo. La presenza nel pellet della proteina Defhc1 dimostra che questa è in grado di co-sedimentare con i microtubuli (Fig.22), analogamente alla proteina umana EFHC1.

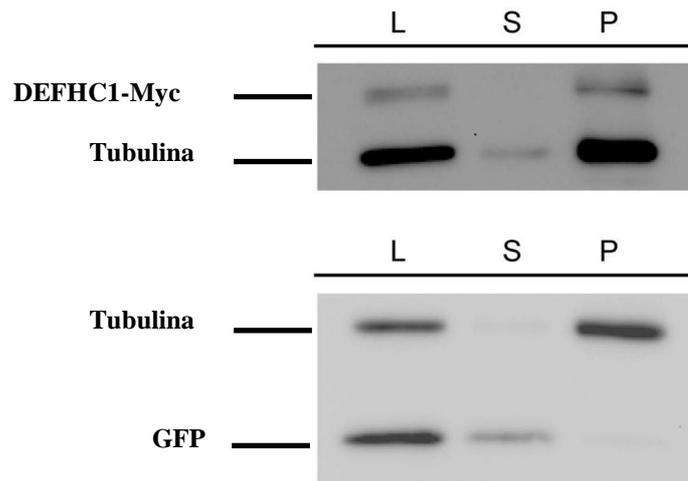


Figura 22. Defhc1-Myc co-sedimenta con i microtubuli. Cellule Cos7 trasfettate con il costrutto Defhc1-Myc o GFP, lisate e pellettate con microtubuli stabilizzati. L'analisi mediante Western Blot dimostra che Defhc1-Myc co-sedimenta con i microtubuli (alto) mentre la GFP rimane nel surnatante (basso). L, lisato; S, surnatante; P, pellet.

Per visualizzare anche *in vivo* l'interazione della proteina Defhc1 con i microtubuli, sono stati effettuati esperimenti di immunistochemica su giunzioni neuromuscolari di larve al terzo stadio, nelle quali la proteina Defhc1-GFP è stata espressa in modo specifico sotto il controllo del driver neuronale elav-GAL4. Per visualizzare i microtubuli, le giunzioni neuromuscolari sono state marcate con un anticorpo che riconosce Futsch, una proteina associata ai microtubuli necessaria

per la crescita dendritica ed assonale (Hummel et al., 2000). L'analisi degli assoni e delle giunzioni neuromuscolari di queste larve mostra che il segnale della fluorescenza della proteina Defhc1-GFP si sovrappone al segnale dell'anticorpo anti-Futsch, dimostrando che la proteina Defhc1 in *Drosophila* colocalizza con i microtubuli e in particolare con la proteina Futsch *in vivo* (Fig.23).

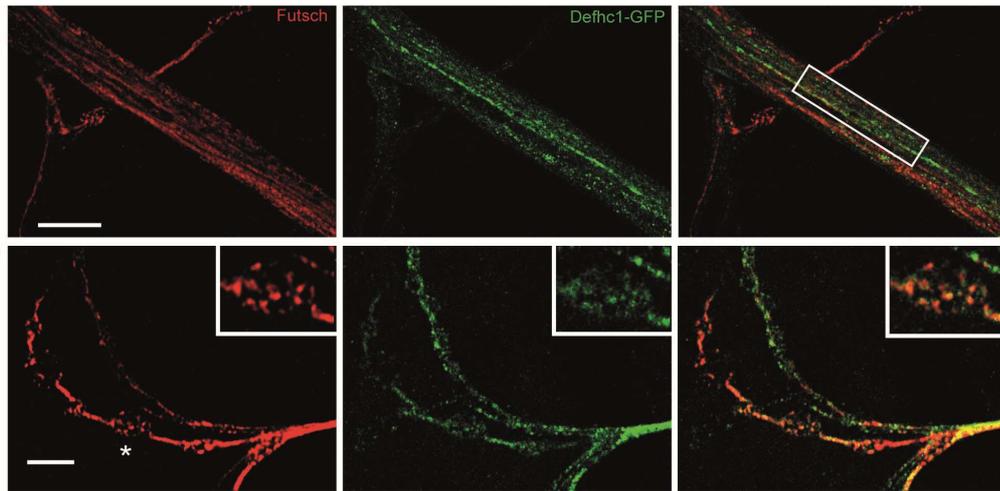


Figura 23. Interazione di Defhc1 con i microtubuli: (a) Segmento di un motoneurone, di una larva che sovraesprime la proteina Defhc1-GFP (verde) nel sistema nervoso, marcato con l'anticorpo anti-Futsch (rosso) per visualizzare i fasci di microtubuli. La sovrapposizione dei due pannelli mostra come il segnale della GFP sia sovrapposta al segnale dell'anticorpo anti-Futsch. (b) Immagine di una giunzione neuromuscolare 12/13 marcata in rosso con l'anticorpo anti-Futsch ed in verde il segnale della GFP fusa con la proteina Defhc1. I due segnali colocalizzano anche nei bottoni sinaptici. Scala: 5 μ M.

3.7 Interazione di *Defhc1* ed i microtubuli del citoscheletro

Il principale fenotipo osservato in seguito alla mancanza della proteina *Defhc1* è stato il vistoso aumento del numero di bottoni satellite. E' noto in letteratura che questi bottoni rappresentano i precursori di potenziali nuovi bottoni sinaptici durante lo sviluppo delle giunzioni neuromuscolari (Franco et al.2004). La sinaptogenesi, in *Drosophila*, è un processo regolato da molteplici fattori, ma richiede soprattutto una corretta attività della proteina Futsch. Durante lo sviluppo della giunzione neuromuscolare in *Drosophila*, la proteina Futsch è associata con i microtubuli in strutture a forma di "loop" nei bottoni definiti stabili, ovvero bottoni che non andranno più incontro a divisione. Diversamente, nei bottoni in

3. RISULTATI

divisione la proteina Futsch assume una distribuzione diffusa e frammentata (Ross et al., 2000). La distribuzione della proteina Futsch all'interno dei bottoni può quindi essere utilizzata come parametro per determinare la dinamicità dei microtubuli e dei bottoni sinaptici. Giunzioni neuromuscolari di larve al terzo stadio *Defhc1^{ko}* e di larve di controllo, sono state marcate con l'anticorpo anti-HRP, per visualizzare le membrane neuronali, e con l'anticorpo specifico contro la proteina Futsch per determinare il numero di loops presenti nella giunzione. La quantificazione del numero di loops eseguita su giunzioni neuromuscolari di tipo 4, ha dimostrato una diminuzione del numero di loops nel mutante *Defhc1^{ko}* rispetto alle giunzioni di controllo (1.1 ± 0.16 per *Defhc1^{-/-}*; 1.9 ± 0.19 per controlli; $p = 0.01$, $n = 30$) (Fig.24). In particolare è stato osservato che nei bottoni sinaptici normali, ovvero quelli non satellite, del mutante *Defhc1^{ko}* la proteina Futsch ha una distribuzione sia frammentata che sotto forma di loops, similmente alla distribuzione osservata in larve di controllo. Diversamente, nei bottoni satellite la proteina Futsch presenta sempre una distribuzione frammentata.

Questi dati indicano che la crescita eccessiva di bottoni satellite causata dalla mancanza del gene *Defhc1* sia dovuta all'alterazione della dinamicità dei microtubuli all'interno della giunzione neuromuscolare.

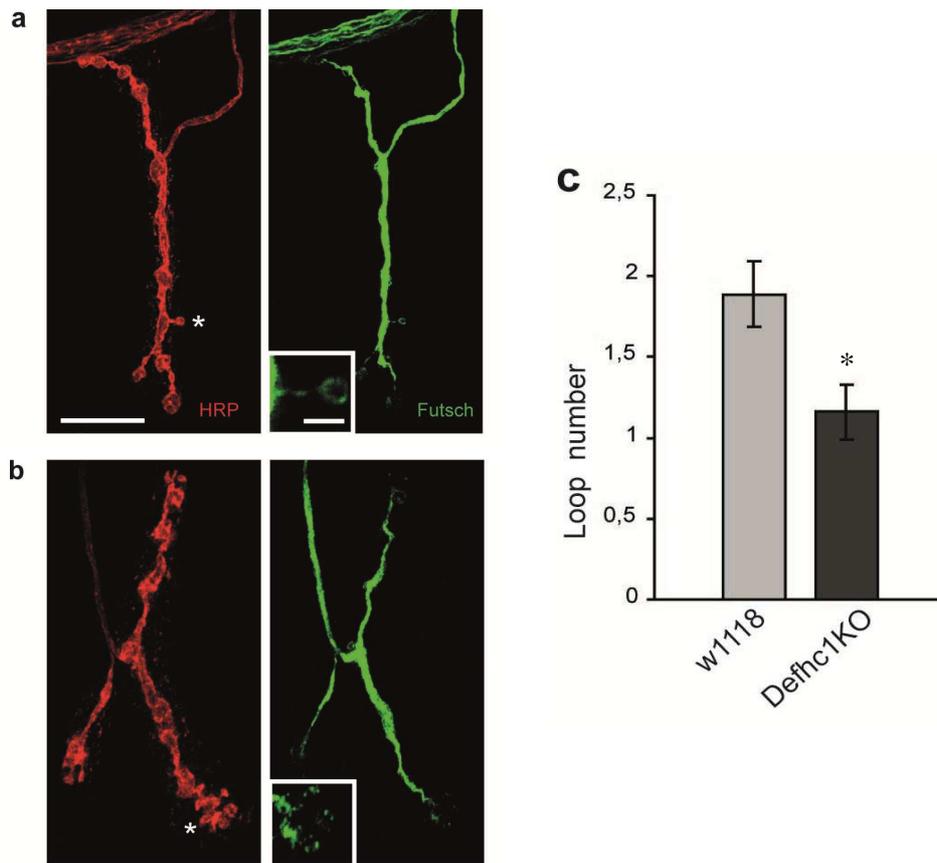


Figura 24. Interazione di Defhc1 con i microtubuli del citoscheletro: Immagine al microscopio confocale di una giunzione neuromuscolare di tipo 4 di larve al terzo stadio di animali (a) controllo e (b) *Defhc1*^{KO}. Le giunzioni neuromuscolari sono state marcate in rosso con l'anticorpo HRP ed in verde con l'anticorpo anti-Futsch per visualizzare i loops formati dai microtubuli. nell'ingrandimento è possibile notare che nei bottoni satellite sono positivi alla marcatura con l'anticorpo anti-Futsch. Scala 10 μ M; ingrandimento scala: 2.5 μ M. (c) Quantificazione del numero di loops presenti nelle giunzioni neuromuscolari dei genotipi sotto indicati.

Per verificare che l'aumento del numero di bottoni satellite causato dall'assenza di *Defhc1* è il risultato di una maggior dinamicità dei microtubuli, è stato messo a punto un esperimento di rescue del fenotipo generato dal mutante *Defhc1*^{KO} utilizzando un soppressore farmacologico della dinamica dei microtubuli. È stato scelto di utilizzare Vinblastina, un alcaloide naturale che a dosi molto basse impedisce la corretta polimerizzazione dei microtubuli destabilizzandoli, sia *in vivo* che *in vitro*. (Tanaka et al., 1995; Tanaka et al., 1991). L'impiego di questo farmaco in *Drosophila* ha dimostrato il recupero di difetti a carico dei microtubuli causati dalla mancanza della proteina regolatrice della stabilità dei microtubuli *spastina* (Orso et al., 2005). Individui *Defhc1*^{KO}

3. RISULTATI

sono stati trattati con Vinblastina ad una concentrazione di 0.05 mM somministrata attraverso il medium nutritivo. Raggiunto il terzo stadio larvale, le larve sono state dissezionate e analizzate per immunostochimica con l'utilizzo dell'anticorpo anti-HRP per visualizzare le membrane neuronali. Le giunzioni neuromuscolari di tipo 4 delle larve *Defhc1*^{KO} in seguito al trattamento con Vinblastina appaiono simili a giunzioni di controllo, senza alterazioni evidenti nel numero di bottoni satellite o altre alterazioni morfologiche a livello delle terminazioni sinaptiche. La quantificazione del numero di bottoni satellite ha confermato il totale recupero in presenza di Vinblastina del fenotipo generato dalla mancanza di *Defhc1* (controllo con vinblastina = 3.44 ± 0.18 , n = 20; *Defhc1*^{ko} con vinblastina 3.38 ± 0.16 , n = 30; P = $6.37e^{-12}$; controllo senza vinblastina = 2.7 ± 0.35 , n = 27; *Defhc1*^{ko} senza vinblastina 8.2 ± 0.46 , n = 29; P = $3.02e^{-12}$) (Fig.25).

Questi risultati dimostrano che il fenotipo dovuto alla mancanza di *Defhc1* può essere recuperato mediante l'inibizione farmacologica della dinamicità dei microtubuli.

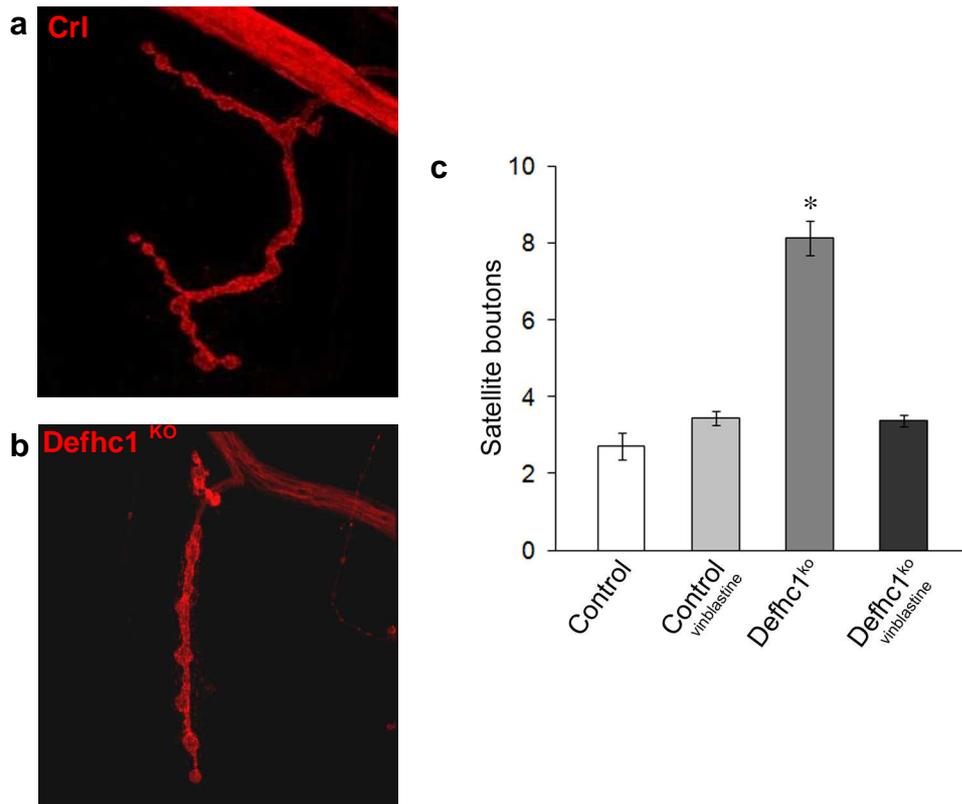


Figura 25. Rescue del fenotipo *Defhc1*^{KO} con Vinblastina: Immagine al confocale di giunzioni neuromuscolari di tipo 4 di animali (a) controllo e (b) *Defhc1*^{KO}. Dall'immagine è possibile vedere un totale recupero del fenotipo in seguito a trattamento con Vinblastina. (c) Quantificazione del numero dei bottoni per i genotipi sotto indicati.

4. DISCUSSIONE

L'Epilessia Mioclonica Giovanile interessa una popolazione molto ampia a livello mondiale, rappresentando circa il 10-12% di tutti i casi di epilessia riportati. La maggioranza di queste epilessie è di origine genetica, quindi stabilire le cause genetiche di queste patologie é di grande importanza non solo scientifica ma anche sociale. Il primo passo in questa direzione viene compiuto con l'identificazione dei geni la cui mutazione provoca l'epilessia. Successivamente diventa fondamentale comprendere la normale funzione di questi geni malattia allo scopo di svelare come difetti di questa normale funzione possano condurre ad alterazioni patologiche. Solamente i 3 geni BDR2, GABRA1 ed EFHC1 finora sono stati associati con certezza all'insorgere di forme diverse di Epilessia Mioclonica Giovanile, ma in nessun caso è stato possibile identificarne il normale ruolo biologico e di conseguenza nemmeno i difetti patofisiologici responsabili della malattia.

Il gene che più recentemente è stato associato all'Epilessia Mioclonica Giovanile è *EFHC1* che produce una proteina chiamata mioclonina 1 o, appunto, EFHC1. Questa proteina presenta nella sua struttura quaternaria 3 domini DM10, a funzione tuttora sconosciuta, un motivo EF-hand tipico dei modulatori del Ca²⁺. Recentemente è stato identificato anche un dominio di binding per i microtubuli nella regione N-terminale.

Nonostante siano stati eseguiti alcuni studi di carattere funzionale non è ancora noto quale ruolo *EFHC1* svolga all'interno della cellula. E' stato comunque dimostrato che la proteina EFHC1 è espressa in modo pressoché ubiquitario ed è particolarmente abbondante nel sistema nervoso dove a livello subcellulare è localizzata prevalentemente nelle arborizzazioni dendritiche neuronali. Inoltre studi su neocorteccia di ratto hanno proposto il coinvolgimento della proteina EFHC1 nella regolazione della divisione cellulare e della migrazione neuronale durante lo sviluppo corticale (de Nijs et al., 2009), nonostante non siano stati riscontrati evidenti difetti anatomici nei cervelli di topi mutanti per il gene *EFHC1* (Suzuki et al., 2009). Non è ancora evidente, quindi,

un legame diretto tra i difetti generati dalla mancanza della proteina EFHC1 e l'insorgenza della malattia.

L'identificazione in *Drosophila* da parte del nostro gruppo di ricerca di due proteine, Defhc1 e Defhc2, omologhe a EFHC1 di mammifero, ha rappresentato il naturale punto di partenza del progetto per cercare di comprendere la funzione di questa famiglia di geni. In accordo con gli studi condotti sui topi knockout, che dimostrano che la mancanza del gene *EFHC1* non genera fenotipi macroscopici evidenti e permette una normale vitalità degli individui, anche il mutante del gene *Defhc1* in *Drosophila* non presenta alterazioni fenotipiche evidenti, è in grado di volare, attività locomotoria inalterata e ha una longevità normale. Tuttavia, un'analisi più dettagliata del mutante knockout (*Defhc1*^{ko}) ha permesso di identificare alcuni difetti neuronali potenzialmente importanti dal punto di vista dell'insorgenza della patologia. Infatti, l'assenza della proteina Defhc1 nel sistema nervoso causa uno sviluppo sinaptico anormale, caratterizzato dalla formazione di un elevato numero di bottoni satellite. Inoltre, dal punto di vista elettrofisiologico è stato riscontrato un aumento della frequenza di rilascio spontaneo di neurotrasmettitori. Questo fenotipo, in particolare, può essere correlato all'insorgenza della malattia in quanto un'aumentata neurotrasmissione può favorire l'insorgenza di episodi convulsivi, caratteristici delle crisi epilettiche.

Recenti studi condotti sulla proteina umana hanno dimostrato la sua capacità di legarsi ed interagire con i microtubuli. Allo stesso modo, la proteina omologa di *Drosophila* ha dimostrato, *in vitro*, di essere in grado di co-sedimentare con i microtubuli stabilizzati dal Tassolo e, *in vivo*, di colocalizzare con i microtubuli assonali. Questi risultati indicano che i fenotipi osservati a livello neuronale potrebbero essere il risultato di un'alterazione della dinamicità e dell'organizzazione dei microtubuli del citoscheletro che si manifestano come conseguenza della modulazione dell'espressione del gene *Defhc1*.

L'organizzazione dell'architettura sinaptica è un processo molto studiato e ben documentato e la sua dipendenza dalla dinamicità dei microtubuli è risaputa. La giunzione neuromuscolare di *Drosophila* si è rivelata un valido modello per lo studio di questi fenomeni, in quanto è noto che la dinamicità dei microtubuli

regola strettamente la complessità e le dimensioni delle terminazioni sinaptiche (Hummel et al., 2000; Pennetta et al., 2002; Roos et al., 2000; Ruiz-Canada et al., 2004; Orso et al., 2005; Trotta et al., 2004; Sherwood et al., 2004; Trotta et al., 2004; Sherwood et al., 2004; Schulte et al.). *Defhc1* codifica per una proteina associata ai microtubuli e la mancanza del gene genera un vistoso aumento del numero di bottoni satellite nelle giunzioni neuromuscolari suggerendo che questa crescita eccessiva di bottoni potrebbe essere una stretta conseguenza della mancata attività regolatoria del gene *Defhc1* sui microtubuli.

Solitamente alterazioni nell'architettura dei loops formati dai microtubuli all'interno delle terminazioni sinaptiche delle giunzioni neuromuscolari di *Drosophila* sono indice del processo di divisione dei bottoni sinaptici. In letteratura è riportato che la distribuzione dei microtubuli sotto forma di loops è associata a bottoni sinaptici così detti stabili, ovvero che non sono in fase di divisione; viceversa la distribuzione frammentata dei microtubuli è indice di bottoni che sono in fase di divisione (Ross et al., 2000). Queste dinamiche ricordano il comportamento dei microtubuli assonali che, quando la migrazione si arresta, presentano una distribuzione statica sottoforma di loops all'interno di coni di crescita inattivi, mentre perdono questa conformazione quando riprende l'elongazione assonale e il cono di crescita è nuovamente attivo. Ciò dimostra che la presenza di loops stabili di microtubuli all'interno dei coni di crescita e dei bottoni sinaptici è correlata con la stabilità o la dinamicità di questi loops che risulta, a sua volta, dipendente dalla motilità e dalla plasticità della struttura in cui si trovano. Recenti studi hanno dimostrato che mutanti in grado di generare un aumento del numero dei bottoni satellite nelle giunzioni neuromuscolari possono presentare sia un aumento (Franco et al., 2004) sia una diminuzione (Schulte et al.) del numero di loops formati dai microtubuli. In entrambi i casi alterazioni della dinamicità dei microtubuli potrebbero essere alla base dei cambiamenti osservati nei bottoni sinaptici. Pertanto l'alterazione della dinamicità dei microtubuli è un evento che deve essere strettamente regolato per un corretto sviluppo sinaptico. Nel nostro studio abbiamo riscontrato che il numero di loops formati dai microtubuli nei bottoni di larve *Defhc1*^{ko}, identificati mediante marcatura con l'anticorpo specifico per la proteina Futsch, è significativamente

4. DISCUSSIONE

ridotto, suggerendo che Defhc1 potrebbe agire influenzando la normale dinamicità dei microtubuli all'interno dei bottoni sinaptici. Poiché l'ipotesi predominante sostiene che le proteine che destabilizzano i microtubuli promuovano la crescita, mentre le proteine che li stabilizzano inibirebbero la crescita sinaptica, in questo studio proponiamo che il gene *Defhc1* sia in grado di favorire la stabilizzazione dei microtubuli, diminuendo così la loro instabilità dinamica e limitando la formazione di nuovi bottoni. Un'importante conferma a questa ipotesi deriva dall'osservazione che l'inibizione della dinamicità dei microtubuli mediante il trattamento farmacologico con Vinblastina di moscerini *Defhc1*^{ko} sopprime completamente il fenotipo caratterizzato dall'aumento del numero di bottoni satellite osservato nel mutante *Defhc1*^{ko}.

Nei mammiferi la dinamicità e la plasticità dei microtubuli nei coni di crescita sono fondamentali nella formazione di nuovi segmenti assonali. Per questo la diminuzione della dinamicità dei microtubuli è un evento cruciale, poiché li rende stabili impedendo l'allungamento assonale (Tanaka, et al., 2005). Un comportamento analogo è stato osservato nei microtubuli delle sinapsi delle giunzioni neuromuscolari di *Drosophila*, suggerendo un'analogia tra le dinamiche di crescita dei bottoni sinaptici e la motilità dei coni di crescita assonali (Ross et al., 2000). Esperimenti su cellule di mammifero hanno dimostrato che l'assenza di EFHC1 provoca *bundling* dei microtubuli. Questo indica che un aumento del *bundling* dei microtubuli potrebbe essere il meccanismo alla base dell'eccessiva crescita di bottoni sinaptici riscontrata nelle giunzioni neuromuscolari di mutanti *Defhc1*^{ko}.

La mancanza del gene *Defhc1* comporta una maggiore di dinamicità ed instabilità dei microtubuli, osservazione confermata anche dalla diminuzione del numero di loops nei mutanti *Defhc1*^{ko}. In questo modo è favorito il *bundling* dei microtubuli, uno step fondamentale per la divisione e formazione di nuovi bottoni e la crescita sinaptica. Secondo questa ipotesi, la funzione del gene *Defhc1* sarebbe quella di rallentare l'eccessiva crescita sinaptica, arginando l'instabilità dinamica dei microtubuli.

I dati ottenuti dagli esperimenti elettrofisiologici, insieme con i risultati *in vivo*, hanno permesso di ipotizzare che l'alterata morfologia delle giunzioni

neuromuscolari presentata dai mutanti *Defhc1*^{ko} possa essere correlata con un eccessivo rilascio spontaneo di neurotrasmettitori, un difetto che risulterebbe in accordo con la fisiopatologia della malattia in esame. Quindi, per la prima volta una proteina che controlla la morfologia e la fisiologia sinaptiche esercitando un controllo sulla dinamicità dei microtubuli viene implicata nell'insorgenza dell'epilessia. Inoltre, l'osservazione che l'assenza di *Defhc1* conduce ad un aumento di rilascio spontaneo propone un nuovo modello secondo il quale il livello di attività neurale basale può contribuire alla manifestazione di crisi epilettiche. Questo evento può essere giustificato dall'aumento di eventi di fusione spontanea di vescicole sinaptiche a causa dell'aumento della crescita sinaptica e conseguentemente del numero di zone attive all'interno della giunzione neuromuscolare.

La lieve entità dei fenotipi a carico dei microtubuli del citoscheletro riscontrati in mancanza del gene *Defhc1*, coerentemente con l'assenza di fenotipi nei topi *EFHC1* knockout (Suzuki et al., 2009) può essere correlata facilmente all'assenza di sintomi e manifestazioni epilettiche nei pazienti affetti da JME (Suzuki et al., 2004), in quanto questi, solitamente, manifestano un fenotipo neurologico normale.

Un obiettivo imminente di questo progetto di ricerca è l'analisi dei fenotipi causati dalla mancanza dell'altro omologo del gene *EFHC1*, il gene *Defhc2*, per comprendere se la sua mancanza sia in grado di potenziare i fenotipi già osservati nel mutante *Defhc1*^{ko}.

In conclusione, i risultati ottenuti da questo studio suggeriscono che il gene *EFHC1* sia coinvolto nell'epilettogenesi attraverso una sottile regolazione della fusione spontanea di vescicole sinaptiche, ottenuta mediante una fine regolazione dei microtubuli del citoscheletro. Composti in grado di interferire con la dinamicità dei microtubuli potrebbero essere importanti punti di partenza per lo studio di nuove strategie farmacologiche contro questa malattia.

5. BIBLIOGRAFIA

Annesi F, Gambardella A, Michelucci R, Bianchi A, Marini C, et al. (2007) Mutational analysis of EFHC1 gene in Italian families with juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia* 48: 1686-1690.

Brand A.H. and Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* Jun;118(2):401-15.

Cauchi R.J. and van den Heuvel M. (2006). The Fly as a Model for Neurodegenerative Diseases: Is It Worth the Jump? *Neurodegenerative Dis.* 3:338–356

Collins CA, DiAntonio A. (2007). Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol.* 17(1):35-42.

Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci.* 10: 319-332.

Cossette P, Liu L, Brisebois K, Dong H, Lortie A, et al. (2002) Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 31: 184-189.

Delgado-Escueta AV, Medina MT, Serratos JM, Castroviejo IP, Gee MN, et al. (1999) Mapping and positional cloning of common idiopathic generalized epilepsies: juvenile myoclonus epilepsy and childhood absence epilepsy. *Adv Neurol.* 79: 351-374.

Delgado-Escueta AV (2007) Advances in genetics of juvenile myoclonic epilepsies. *Epilepsy Curr.* 7: 61-67.

de Nijs L, Lakaye B, Coumans B, Leon C, Ikeda T, et al. (2006) EFHC1, a protein mutated in juvenile myoclonic epilepsy, associates with the mitotic spindle through its N-terminus. *Exp Cell Res.* 312: 2872-2879.

de Nijs L, Leon C, Nguyen L, Loturco JJ, Delgado-Escueta AV, et al. (2009) EFHC1 interacts with microtubules to regulate cell division and cortical development. *Nat Neurosci.* 12: 1266-1274.

Dickman DK, Lu Z, Meinertzhagen IA, Schwarz TL (2006) Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. *Curr Biol.* 16: 591-598.

5. BIBLIOGRAFIA

Duffy J.B. (2002). GAL4 System in *Drosophila*: a fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*. 34: 1-15.

Franco B, Bogdanik L, Bobinnec Y, Debec A, Bockaert J, et al. (2004) Shaggy, the homolog of glycogen synthase kinase 3, controls neuromuscular junction growth in *Drosophila*. *J Neurosci*. 24: 6573-6577.

Gong WJ, Golic KG (2003) Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 2556-2561.

Hummel T, Krukkert K, Roos J, Davis G, Klambt C (2000) *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26: 357-370.

Huntwork S, Littleton JT (2007) A complexin fusion clamp regulates spontaneous neurotransmitter release and synaptic growth. *Nat Neurosci*. 10: 1235-1237.

Koh TW, Verstreken P, Bellen HJ (2004) Dap160/intersectin acts as a stabilizing scaffold required for synaptic development and vesicle endocytosis. *Neuron* 43: 193-205.

Martinez-Juarez IE, Alonso ME, Medina MT, Duron RM, Bailey JN, et al. (2006) Juvenile myoclonic epilepsy subsyndromes: family studies and long-term follow-up. *Brain* 129: 1269-1280.

Medina MT, Suzuki T, Alonso ME, Duron RM, Martinez-Juarez IE, et al. (2008) Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 70: 2137-2144.

Muquit M.K. and Feany M.B. (2002). Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nature Reviews* 3: 237-243.

O'Connor-Giles KM, Ho LL, Ganetzky B (2008) Nervous wreck interacts with thickveins and the endocytic machinery to attenuate retrograde BMP signaling during synaptic growth. *Neuron* 58: 507-518.

Orso G, Martinuzzi A, Rossetto MG, Sartori E, Feany M, et al. (2005) Disease-related phenotypes in a *Drosophila* model of hereditary spastic paraplegia are ameliorated by treatment with vinblastine. *J Clin Invest*. 115: 3026-3034.

Pennetta G, Hiesinger PR, Fabian-Fine R, Meinertzhagen IA, Bellen HJ (2002) *Drosophila* VAP-33A directs bouton formation at neuromuscular junctions in a dosage-dependent manner. *Neuron* 35: 291-306.

Rikhy R, Kumar V, Mittal R, Krishnan KS (2002) Endophilin is critically required for synapse formation and function in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*. 22: 7478-7484.

Roos J, Hummel T, Ng N, Klambt C, Davis GW (2000) Drosophila Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron* 26: 371-382.

Renganathan R., Delanty N.(2003).Juvenile myoclonic epilepsy: under-appreciated and under-diagnosed. *Juvenile myoclonic epileps*, 79:78–80.

Ruiz-Canada C, Ashley J, Moeckel-Cole S, Drier E, Yin J, et al. (2004) New synaptic bouton formation is disrupted by misregulation of microtubule stability in aPKC mutants. *Neuron* 42: 567-580.

Schulte J, Sepp KJ, Jorquera RA, Wu C, Song Y, et al. DMob4/Phocein regulates synapse formation, axonal transport, and microtubule organization. *J Neurosci.* 30: 5189-5203.

Sherwood NT, Sun Q, Xue M, Zhang B, Zinn K (2004) Drosophila spastin regulates synaptic microtubule networks and is required for normal motor function. *PLoS Biol.* 2: e429.

Stogmann E, Lichtner P, Baumgartner C, Bonelli S, Assem-Hilger E, et al. (2006) Idiopathic generalized epilepsy phenotypes associated with different EFHC1 mutations. *Neurology* 67: 2029-2031.

Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, et al. (2004) Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet.* 36: 842-849.

Suzuki T, Miyamoto H, Nakahari T, Inoue I, Suemoto T, et al. (2009) Efhc1 deficiency causes spontaneous myoclonus and increased seizure susceptibility. *Hum Mol Genet.* 18: 1099-1109.

Tanaka EM, Kirschner MW (1991) Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J Cell Biol.*115: 345-363.

Tanaka E, Ho T, Kirschner MW (1995) The role of microtubule dynamics in growth cone motility and axonal growth. *J Cell Biol.* 128: 139-155.

Trotta N, Orso G, Rossetto MG, Daga A, Broadie K (2004) The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr Biol.* 14: 1135-1147.

Zifkin B., Andermann E. and Andermann F. (2005). Mechanisms, genetics, and pathogenesis of juvenile myoclonic epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, 18:147–153.

5. BIBLIOGRAFIA
