



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE
INDIRIZZO: GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO
CICLO XX

Drosophila melanogaster
**COME MODELLO DI
MALATTIE MITOCONDRIALI UMANE:
ANALISI FUNZIONALE DEI GENI
dEthel e *dSurfl***

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore: Ch.mo Prof. Rodolfo Costa

Dottorando: Ester Spadaro

31 gennaio 2008

Drosophila melanogaster* COME MODELLO DI MALATTIE MITOCONDRIALI UMANE: ANALISI FUNZIONALE DEI GENI *dEthel1* e *dSurf1

La Encefalopatia Etilmalonica (EE) è una rara malattia mitocondriale causata da mutazioni nel gene umano *Ethel1*. Si ipotizza che la proteina ETHE1 sia una tioesterasi che agisce, a livello mitocondriale, su un substrato non ancora identificato. Le gravi conseguenze derivanti dal malfunzionamento della proteina ETHE1 indicano un ruolo importante di tale prodotto genico nel metabolismo energetico mitocondriale (Tiranti *et al.*, 2004).

Allo scopo di ottenere un modello di *D. melanogaster* nel quale l'espressione del gene CG30022 (*dEthel1*), omologo del gene umano *Ethel1*, risulti compromessa, sono stati adottati molteplici approcci, con il ricorso alle principali tecniche di genetica inversa attualmente disponibili.

Mediante la tecnica della “*double-strand RNA interference*”, è stato indotto un silenziamento post-trascrizionale del gene *dEthel1*, a partire da due differenti regioni target del gene di interesse. La sostanziale mancanza di effetti fenotipici rilevabili negli individui interferati potrebbe derivare da un insufficiente abbattimento del messaggero riconducibile ad una situazione di “eterozigosi”, peraltro asintomatica anche nell'uomo.

Alla luce di questi risultati, si è ritenuto opportuno valutare gli effetti di un abbattimento completo dell'espressione del gene *dEthel1*.

Considerate le piccole dimensioni del gene CG30022, si è fatto riferimento al sistema di “*two-step ends-in targeting*” che consente di ottenere, mediante eventi di ricombinazione omologa indotti in due “step” successivi, la delezione precisa di uno specifico gene di interesse (Xie e Golic, 2004).

In parallelo, mediante la tecnica del *Tilling* (Till *et al.*, 2003), sono state selezionate e caratterizzate sette linee mutanti di *D. melanogaster* che presentano, in regioni esoniche del gene *dEthel1*, singole mutazioni di tipo missense e frameshift. Sulla base del modello di struttura tridimensionale previsto per la proteina ETHE1 in *Drosophila melanogaster*, è stato possibile stimare, per ciascuna mutazione, le eventuali conseguenze sulla funzionalità proteica.

Inoltre, è stata ricercata una possibile alterazione nella espressione del gene *dEthel1* nelle linee mutanti 0017965 e 104009, caratterizzate dall'inserzione di un elemento trasponibile localizzato, rispettivamente, nella regione regolatrice e nel primo esone del gene di interesse.

La Sindrome di Leigh (LS) è una grave encefalopatia mitocondriale causata, prevalentemente, da mutazioni nel gene umano *Surf1*. La proteina SURF1, localizzata nella membrana interna dei mitocondri, è presumibilmente implicata nella biogenesi della citocromo c ossidasi (Tiranti *et al.*, 1999).

Recentemente, è stato caratterizzato un modello di *D. melanogaster* per lo studio della Sindrome di Leigh, nel quale è possibile indurre il silenziamento post-trascrizionale, via dsRNAi, del gene CG9943 (*dSurf1*), omologo del gene umano *Surf1* (Zordan *et al.*, 2006).

Gli individui *knockdown* mostrano, oltre ad un generale arresto nello sviluppo, alterazioni strutturali e funzionali nel sistema nervoso centrale riconducibili,

almeno in parte, ai sintomi clinici rilevabili nei pazienti affetti da Sindrome di Leigh,

Per dimostrare che le alterazioni fenotipiche indotte dall'RNAi sono dovute ad un silenziamento specifico del gene target, si è adottato un approccio di recente applicazione, denominato “*trans-complementation by a synthetic gene*” (Kumar *et al.*, 2006). In accordo con questo metodo, è stato progettato un gene sintetico (d*Surfl*-sinonimo) in grado di codificare la proteina dSURF1 mediante codoni sinonimo diversi da quelli del gene endogeno e di sfuggire così al macchinario dell'RNAi.

Sono state quindi generate linee transgeniche di *D. melanogaster* nelle quali è possibile, mediante il sistema UAS-GAL4, attivare simultaneamente l'espressione del gene sintetico ed il costrutto per l'RNAi. Tale attivazione, indotta mediante shock termico nelle prime fasi di sviluppo, determina la sopravvivenza di individui “*rescued*” anche se in una percentuale inferiore rispetto all'atteso.

La caratterizzazione comportamentale di tali individui ha evidenziato un recupero delle alterazioni fenotipiche rilevate negli individui *knockdown*.

BIBLIOGRAFIA

KUMAR D., GUSTAFSSON C., KLESSIG D. F. (2006) - Validation of RNAi silencing specificity using synthetic genes: salicylic acid-binding protein 2 is required for innate immunity in plants. *The Plant Journal*, 45: 863-868.

TILL B. J., COLBERT T., TOMPA R., ENNS L. C., CODOMO C. A., JOHNSON J. E., REYNOLDS S. H., HENIKOFF J. G., GREENE E. A., STEINE M. N., COMAI L., HENIKOFF S. (2003) - High-throughput TILLING for functional genomics. *Methods Mol. Biol.*, 236, 205-220.

TIRANTI V., D'ADAMO P., BRIEM E., FERRARI G., MINERI R., LAMANTEA E., MANDEL H., BALESTRI P., GARCIA-SILVA M.T., VOLLMER B., RINALDO P., HAHN S.H., LEONARD J., RAHMAN S., DIONISI-VICI C., GARAVAGLIA B., GASPARINI P., ZEVIANI M. (2004) - Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in *Ethel*, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 239-252.

TIRANTI V., JAKSCH M., HOFMANN S., GALIMBERTI C., HOERTNAGEL K., LULLI L., FREISINGER P., BINDOFF L., GERBITZ K. D., COMI G.-P., UZIEL G., ZEVIANI M., MEITINGER T. (1999) - Loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with Leigh syndrome with cytochrome c oxidase deficiency. *Ann. Neurol.*, 46: 161-166.

XIE H. B., GOLIC K. G. (2004) - Gene deletions by ends-in targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 168: 1477-1489.

ZORDAN M. A., CISOTTO P., BENNA C., AGOSTINO A., RIZZO G., PICCIN A., PEGORARO M., SANDRELLI F., PERINI G., TOGNON G., DE CARO R., PERON S., TE KRONNIE' T., MEGIGHIAN A., REGGIANI C., ZEVIANI M., COSTA R. (2006) - Post-transcriptional Silencing and Functional Characterization of the *Drosophila melanogaster* Homolog of Human *Surfl*. *Genetics*, 172: 229-241.

***Drosophila melanogaster* AS A MODEL TO STUDY MITOCHONDRIAL DISEASES: FUNCTIONAL ANALYSIS OF *dEthel1* and *dSurf1* genes**

Ethylmalonic Encephalopathy (EE) is a rare autosomal recessive metabolic disorder caused by mutations in *Ethel1*, a nuclear gene encoding a mitochondrial matrix thioesterase. Although the function of ETHE1 protein is still unknown, the severe consequences of its malfunctioning indicate an important role of the *Ethel1* gene product in mitochondrial homeostasis and energy metabolism (Tiranti *et al.*, 2004).

In order to understand the molecular pathogenesis underlying EE, it would be useful to establish a *Drosophila melanogaster* model in which the expression of CG30022 (*dEthel1*), the *Drosophila Ethel1* homolog, is disrupted or impaired.

I have thus set up transgenic *Drosophila melanogaster* lines in which it is possible to induce the post-transcriptional silencing of *dEthel1* by double-stranded RNA interference. I was unable to detect any functional differences between knockdown and control flies. This lack of effects can be due to incomplete knockdown of *dEthel1* mRNA, that mimicks a heterozygosity condition, asymptomatic in humans as well.

In order to produce a complete null allele of *dEthel1*, we applied a gene targeting strategy that provides a way to knock-out genes in *Drosophila* using the organism's endogenous machinery of DNA repair and recombination.

Since CG30022 is a small gene (1492 pb), we used the “two-step ends-in targeting” system (Xie & Golic, 2004) that allows precise deletions even in small target loci.

Moreover, in *Tilling*, traditional chemical mutagenesis is followed by high-throughput screening for mutations in a target gene (Till *et al.*, 2003). By this strategy, seven *Drosophila* lines carrying missense and frameshift mutations in *dEthel1* gene were identified and characterized. On the basis of a dETHE1 three dimensional model, it was possible to predict the functional consequences of the amino acid changes characterizing each mutant.

Moreover, we have characterized *dEthel1* expression, both at a transcriptional and translational level, in *Drosophila* lines 0017965 and 104009 carrying a transposable element in the regulatory region and in the first exon of the *dEthel1* gene, respectively.

Leigh Syndrome (LS) is a progressive mitochondrial encephalopathy. The single most prevalent cause of LS are mutations in the *Surf1* gene, which encodes a protein located in the inner membrane of mitochondria which is probably involved in cytochrome c oxidase assembly (Tiranti *et al.*, 1999).

Recently, a *Drosophila melanogaster* model for Leigh Syndrome has been characterized in which double-stranded RNA interference is used to induce the post-transcriptional silencing of CG9943 (*dSurf1*) gene, the *D. melanogaster Surf1* homolog (Zordan *et al.*, 2006).

The structural and functional abnormalities at level of nervous system, as well as the global developmental arrest, observed in *Drosophila* knockdown flies are largely concordant with the human Leigh syndrome phenotype.

Here, we have designed a method to assess if the phenotypic changes induced by double-stranded RNA interference are due to silencing of the targeted gene or to off-target effects.

This method uses trans-complementation by a synthetic gene (*dSurf1*-synonymous) that encodes the same protein as the native gene but uses a different nucleotide sequence to escape RNAi-induced silencing (Kumar *et al.*, 2006).

We have generated transgenic lines in which it is possible to induce, by the UAS-GAL4 system, the simultaneous activation of *dSurf1*-synonymous expression and dsRNAi silencing of the endogenous *Surf1* gene.

This activation, induced via heat shock during early development, produces “rescued” flies, even if in a proportion that is lower than expected.

The functional characterization of “rescued” flies shows a complete reversion of behavioral and electrophysiological abnormalities detectable in knockdown flies.

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1

ASPETTI GENERALI

LE MALATTIE MITOCONRIALI

Il termine “malattie mitocondriali” indica un ampio gruppo di patologie accomunate da una alterazione del metabolismo energetico mitocondriale riconducibile, in particolare, a difetti nella fosforilazione ossidativa (Di Mauro & Hirano, 2005).

Data la complessità genetica e biochimica della fosforilazione ossidativa, le malattie mitocondriali, che colpiscono circa 10-15 persone ogni 100.000, risultano estremamente eterogenee, da un punto di vista sia clinico che molecolare (Di Mauro & Schon, 2003).

ASPETTI CLINICI

Lo spettro di manifestazioni cliniche delle malattie mitocondriali è molto ampio, in quanto le lesioni possono coinvolgere singoli tessuti o molteplici organi ed apparati, fino a causare complesse sindromi multisistemiche (Zeviani & Di Donato, 2004).

In genere, le strutture più colpite sono quelle che richiedono un maggiore apporto di energia quali il sistema visivo ed uditivo, il sistema nervoso centrale e periferico, il cuore, i muscoli, il pancreas endocrino, il rene ed il fegato.

I pazienti adulti presentano, generalmente, segni di miopatia associata ad un coinvolgimento più o meno severo del sistema nervoso centrale, con un quadro clinico caratterizzato da atassia, perdita dell'udito, paralisi, neuropatia, retinopatia e, più raramente, disturbi del movimento (Zeviani & Di Donato, 2004).

Talora, i pazienti affetti da malattie mitocondriali mostrano solo debolezza muscolare e/o ridotta tolleranza allo sforzo fisico (Zeviani & Carelli, 2003).

Nei pazienti pediatrici, le manifestazioni cliniche più frequenti includono un grave ritardo nello sviluppo psicomotorio, ipotonia ed acidosi lattica; inoltre, essi spesso presentano disturbi cardiorespiratori (Zeviani & Di Donato, 2004).

La diagnosi della maggior parte delle malattie mitocondriali si basa sulla presenza di specifici segni morfologici e biochimici.

Tra i difetti morfologici, il più caratteristico è rappresentato dalla trasformazione delle fibre muscolari in “*ragged red fibres*” (RRF) in seguito all'accumulo, al di sotto della membrana sarcolemmatica, di mitocondri alterati per dimensione e struttura. Tale fenomeno è riconoscibile mediante caratterizzazione biochimica, per l'intensa reazione subsarcolemmatica ad enzimi specifici della catena respiratoria, quali, ad esempio, la succinato deidrogenasi (SDH).

I pazienti affetti da malattie mitocondriali sono inoltre caratterizzati da una ridotta attività della citocromo c ossidasi (COX) nelle fibre muscolari (Zeviani & Di Donato, 2004).

ASPETTI MOLECOLARI

Poiché la catena respiratoria è sotto il controllo di due sistemi genetici separati, il genoma nucleare (nDNA) ed il genoma mitocondriale (mtDNA), le malattie mitocondriali possono essere causate da mutazioni in geni del DNA mitocondriale

o da mutazioni in geni nucleari codificanti proteine coinvolte nei processi di fosforilazione ossidativa.

Le conseguenti alterazioni nella catena respiratoria possono essere di due tipi:

- primarie: causate da mutazioni nel DNA mitocondriale e nei geni nucleari che codificano per le subunità dei complessi della catena respiratoria e per l'ATP sintetasi;
- secondarie: causate da mutazioni in geni nucleari che codificano per proteine mitocondriali capaci di compromettere l'attività della catena respiratoria.

Mutazioni del mtDNA

Considerata la genetica peculiare del mtDNA, le patologie mitocondriali causate da difetti in tale genoma mostrano una eredità materna e possono essere caratterizzate da una condizione di eteroplasmia, nella quale copie mutate del genoma coesistono, nella stessa cellula, con copie selvatiche. Inoltre, a causa della poliploidia e della segregazione mitotica del DNA mitocondriale, l'espressione fenotipica di tali patologie può mostrare un caratteristico "effetto soglia" (Jenuth *et al.*, 1997).

Secondo una recente classificazione clinico-genetica (Zeviani & Di Donato, 2004), le mutazioni del mtDNA possono essere così suddivise:

- Riarrangiamenti su larga scala, causati da delezioni e duplicazioni parziali. Si tratta di mutazioni eteroplasmiche, per lo più sporadiche. Le principali malattie mitocondriali associate a questo tipo di mutazioni sono la sindrome di Kearns-Sayre (*Kearns-Sayre syndrome*, KSS), la oftalmoplegia esterna sporadica progressiva (*progressive external ophthalmoplegia*, PEO) e la sindrome di Pearson (*Pearson's syndrome*).
- Mutazioni puntiformi. Tali mutazioni sono in genere trasmesse per via materna e possono essere sia eteroplasmiche (ad esempio: *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*, MELAS e *Myoclonus Epilepsy with ragged Red Fibres*, MERRF) che omoplasmiche (ad esempio *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*, LHON); queste ultime determinano, in genere, una manifestazione clinica principalmente limitata ad un singolo tessuto.

Mutazioni del nDNA

Secondo quanto descritto da Zeviani & Carelli (2007), le mutazioni nel DNA nucleare possono interessare:

- Geni coinvolti nella stabilità del DNA mitocondriale. Le patologie mitocondriali dovute a questo tipo di mutazioni possono essere caratterizzate sia dall'accumulo, nel mtDNA, di delezioni multiple (come, ad esempio, nella *autosomal dominant progressive external*

ophthalmoplegia, adPEO) sia dalla deplezione del mtDNA nei tessuti affetti (come, ad esempio, nella *mitochondrial DNA depletion syndrome*, MDS).

- Geni codificanti per componenti strutturali o fattori di assemblaggio dei complessi della catena respiratoria.

Esempio caratteristico di patologia causata da questo tipo di mutazioni è la sindrome di Leigh (*Leigh syndrome*, LS); tale patologia, estremamente eterogenea da un punto di vista molecolare, può essere infatti causata da mutazioni nel gene SURF1, codificante per un fattore di assemblaggio di COX (Munaro *et al.*, 1997).

- Geni codificanti per componenti non proteiche della catena respiratoria.
Mutazioni in geni codificanti per il coenzima Q10 e la aciltransferasi tafazzina causano, rispettivamente, la deficienza da CoQ10 (*CoQ10 deficiency*) e la sindrome di Barth (*Barth syndrome*, BTHS).

- Geni coinvolti indirettamente nella fosforilazione ossidativa.

Tra le proteine mitocondriali coinvolte indirettamente nella fosforilazione ossidativa, vi sono la paraplegina, associata ad una paraplegia spastica autosomica recessiva (Casari *et al.*, 1998) e la frataxina, proteina mitocondriale associata alla atassia di Friedreich (*Friedreich's ataxia*, FA).

Attualmente, lo studio delle malattie mitocondriali segue due linee di ricerca, finalizzate rispettivamente alla comprensione dell'eziologia e della fisiopatologia di tali disturbi.

La comprensione della eziologia delle malattie mitocondriali risulta di notevole importanza alla luce del fatto che, per circa il 50% dei pazienti adulti, la diagnosi si basa sull'analisi del quadro clinico, supportato da evidenze istologiche e biochimiche, senza, peraltro, una conferma molecolare. Inoltre, per circa l'80-90% dei casi pediatrici non è possibile una caratterizzazione di tipo molecolare (Zeviani & di Donato, 2004).

Uno degli aspetti più caratteristici delle malattie mitocondriali è rappresentato dalla estrema variabilità delle manifestazioni cliniche; tale variabilità riflette l'esistenza di molteplici meccanismi patogenetici coinvolti nell'insorgenza delle patologie in questione.

Studi recenti confermano che, nelle malattie mitocondriali, le alterazioni nella catena respiratoria, con i conseguenti difetti energetici, potrebbero essere strettamente correlati ad altri meccanismi patogenetici, quali, ad esempio, la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), il rilascio di segnali apoptotici, ed alterazioni nella omeostasi del calcio (Zeviani & Di Donato, 2007).

La complessità delle malattie mitocondriali rende necessario il ricorso a modelli animali che riproducano *in vivo* i meccanismi patogenetici coinvolti; la definizione e la caratterizzazione di tali organismi modello rappresentano un promettente campo di ricerca, considerate anche le possibili ricadute in ambito terapeutico.

***Drosophila melanogaster* COME MODELLO PER LO STUDIO DELLE MALATTIE MITOCONDRIALI UMANE**

Drosophila melanogaster rappresenta, oggi, un ottimo modello per lo studio di malattie mitocondriali dovute a mutazioni nel DNA sia mitocondriale che nucleare.

Drosophila, infatti, presenta numerosi geni ortologhi a geni malattia umani; inoltre, in tale organismo modello, l'intero apparato mitocondriale, con i relativi complessi enzimatici coinvolti nella fosforilazione ossidativa, risulta altamente conservato (Sánchez-Martínez *et al.*, 2006).

Tra i diversi modelli, il mutante *technical knockout (tko)*, portatore di una mutazione puntiforme nella proteina mitoribosomale S12, presenta un quadro fenotipico riconducibile, in parte, alle manifestazioni cliniche tipiche delle malattie mitocondriali umane (Toivonen *et al.*, 2001). La caratterizzazione fenotipica del mutante *tko* ha evidenziato, in particolare, ritardo nello sviluppo larvale, difetti nel corteggiamento da parte dei maschi, iporeattività e danni al sistema visivo ed uditivo. Inoltre, tale mutante è caratterizzato da “*bang sensitivity*”, in quanto mostra paralisi temporanea in seguito a shock meccanico. Questo aspetto fenotipico, causato da difetti nella trasmissione del segnale a carico dei meccanorecettori neuronali, rende il mutante *tko* un buon modello per lo studio della sordità neurosensoriale umana. Tale patologia è infatti causata da una alterazione della trasmissione sinaptica a livello dei meccanorecettori dell'orecchio interno (Jacobs *et al.*, 2004).

Similmente, il mutante *stress sensitive (sesB)* mostra una paralisi temporanea in seguito a shock termico, con perdita della trasmissione sinaptica nel sistema visivo. Anche in questo caso, la condizione di “*bang sensitivity*” è associata a difetti in una componente chiave dell'apparato della fosforilazione ossidativa; il mutante *sesB* presenta, infatti, mutazioni nel gene codificante per il traslocatore mitocondriale dell'adenina (*mitochondrial adenine nucleotide translocase*, ANT) (Rikhy *et al.*, 2003).

I mutanti di *Drosophila* per geni coinvolti nella funzione mitocondriale mostrano spesso fenotipi caratterizzati da danni al sistema nervoso. Esemplicativi, in questo senso, sono i mutanti *tamas* e *sluggish-A* che presentano, rispettivamente, mutazioni nel gene *tamas*, codificante per la subunità catalitica della DNA polimerasi mitocondriale (*DNApol-125*) e nel gene *sluggish-A*, codificante per la prolina ossidasi, enzima mitocondriale necessario per la sintesi del glutammato.

I mutanti *tamas* muoiono all'inizio dello stadio pupale e manifestano profonde alterazioni del sistema visivo e locomotorio (Iyengar *et al.*, 1999); similmente, i mutanti *sluggish-A* presentano deficit locomotorio e fototattico (Hayward *et al.*, 1993).

Il mutante di *Drosophila* per il gene *lopo power (lopo)*, che codifica per una proteina di legame al mtDNA a singolo filamento (*mitochondrial single-stranded DNA-binding protein*, mtSSB), muore prima della metamorfosi, in seguito ad una ridotta proliferazione cellulare; anche in questo caso, come nei mutanti *tamas* e *sluggish-A*, si osservano gravi alterazioni a livello del sistema visivo. Indagini molecolari, istochimiche e fisiologiche hanno rilevato una deplezione nel

contenuto di mtDNA, associata ad una diminuzione nelle capacità di respirazione mitocondriale (Maier *et al.*, 2001).

La letalità pupale e la perdita di mtDNA e di massa mitocondriale, sono manifestazioni fenotipiche che si ritrovano nel mutante di *Drosophila* per il gene *pol- $\gamma\beta$* , codificante per la subunità accessoria β della polimerasi- γ mitocondriale (Iyengar *et al.*, 2002). Tale mutante, per le sue caratteristiche fenotipiche, può essere utile per la comprensione delle risposte molecolari e metaboliche causate dalla deplezione del mtDNA; tale condizione patologica si ritrova in diverse malattie mitocondriali umane quali, ad esempio, la sindrome da deplezione del mtDNA (*mtDNA depletion syndrome*, MDS) e la encefalomiopatia mitocondriale neurogastrointestinale (*Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy*, MNGIE) (Sánchez-Martínez *et al.*, 2006) (Filosto & Mancuso, 2007).

Il mutante *ATP6^l*, caratterizzato da una mutazione nell'omologo del gene mitocondriale umano *ATP6*, rappresenta un modello che riassume, in *Drosophila*, molti aspetti peculiari delle malattie mitocondriali umane. Il gene *ATP6*, che risulta associato a diverse patologie mitocondriali umane (*neuropathy ataxis retinitis pigmentosa*, NARP; *maternally inherited Leigh syndrome*, MILS; *familial bilateral striatal necrosis*, FBSN), codifica per una componente del complesso V della catena respiratoria. I mutanti di *Drosophila ATP6^l* sviluppano miodegenerazione e disfunzione neuromuscolare progressiva, con esordio allo stadio adulto. In particolare, sono stati rilevati difetti nella struttura della membrana mitocondriale interna, nonché disfunzione neurologica e riduzione nella attività della ATP-sintasi mitocondriale (Celotto *et al.*, 2006).

Drosophila melanogaster si è rivelata, inoltre, un buon modello per lo studio della sindrome di Barth (*Barth syndrome*, BTHS), miopatia mitocondriale causata da mutazioni nel gene codificante per la tafazzina, una aciltransferasi presumibilmente coinvolta nel metabolismo della cardiolipina. La mancata produzione di tafazzina causa, in *Drosophila* come nell'uomo, un fenotipo caratterizzato da una alterata produzione e composizione della cardiolipina, con difetti nelle cristae mitocondriali e debolezza muscolare. Sulla base di tali analogie, è stata ipotizzata una relazione causale tra le caratteristiche patologiche citate (Xu *et al.*, 2006).

Recentemente, lo studio di modelli di *Drosophila* per le forme familiari giovanili del morbo di Parkinson (*Parkinson disease*, PD), associate a mutazioni nei geni *Park1*, *Pink1* e *Dj-1*, ha fornito un importante contributo alla comprensione della patogenesi di tale malattia neurodegenerativa evidenziando, nel contempo, il ruolo centrale della funzionalità mitocondriale (Moore *et al.*, 2006). In particolare, i mutanti di *Drosophila* nulli per l'omologo del gene *Park1* (Greene *et al.*, 2003) e per l'omologo del gene *Pink1* (Clark *et al.*, 2006) mostrano un fenotipo simile, caratterizzato da ridotta vitalità, infertilità maschile con difetti nella individualizzazione degli spermatozoi, apoptosi muscolare ed alterazioni nella struttura mitocondriale. Inoltre, il *knockdown* funzionale di *Drosophila* per l'omologo del gene umano gene *Dj-1*, sviluppa la neurodegenerazione tipica del morbo di Parkinson, peraltro assente nei modelli murini finora caratterizzati (Yang *et al.*, 2005).

Infine, mediante silenziamento post-trascrizionale via *double-stranded RNA interference*, sono stati generati modelli di *Drosophila melanogaster* utili per lo studio dell'ataxia di Friedreich (*Friedreich's ataxia*, FA) (Anderson *et al.*, 2005) e della sindrome di Leigh (*Leigh's syndrome*, LS) (Zordan *et al.*, 2006).

Nel complesso, i mutanti di *Drosophila* per geni associati a malattie mitocondriali umane, mostrano spesso letalità allo stadio larvale; tale condizione è una caratteristica fenotipica che si ritrova, ad esempio, nei mutanti per la subunità α della ATP-sintasi mitocondriale (Talamillo *et al.*, 1998) e per la subunità 9 della ubiquinolo-citocromo c reduttasi mitocondriale (Frolov *et al.*, 2000).

Inoltre, la letalità larvale risulta frequentemente associata a difetti neuromuscolari e fotocomportamentali; infatti, tali aspetti risultano, in *Drosophila*, particolarmente sensibili alle carenze energetiche correlate alla fosforilazione ossidativa mitocondriale.

CAPITOLO 2
LA ENCEFALOPATIA ETILMALONICA

ENCEFALOPATIA ETILMALONICA

L'Encefalopatia Etilmalonica (EE, OMIM #602473) è una rara malattia mitocondriale, descritta per la prima volta da Burlina *et al.* nel 1991.

Tale patologia presenta un pattern di trasmissione di tipo autosomico recessivo; in genere, i pazienti affetti da EE appartengono a gruppi etnici o culturali caratterizzati da significativi livelli di consanguineità. La EE è diffusa prevalentemente nel bacino del Mediterraneo e nel Medio Oriente; alcuni casi sono stati registrati anche in Nord Europa, Canada e Corea (Ozand *et al.*, 1994; Garcia-Silva *et al.*, 1997; Nowaczyk *et al.*, 1998a; Yoon *et al.*, 2001; Grosso *et al.*, 2002; McGowan *et al.*, 2004; Tiranti *et al.*, 2004).

Ad oggi, sono stati descritti circa 35 casi di EE; tuttavia, l'incidenza della malattia è probabilmente sottostimata in quanto il fenotipo biochimico che le caratterizza potrebbe essere stato attribuito ad altri disturbi metabolici (Tiranti *et al.*, 2004).

ASPETTI CLINICI

La Encefalopatia Etilmalonica si manifesta nella prima infanzia, con sintomi multisistemici, di entità variabile e decorso progressivo. Il decesso sopraggiunge, generalmente, entro la prima decade di vita.

Il quadro clinico si caratterizza secondo quanto di seguito riportato:

Sintomi a carico del sistema nervoso. La EE si manifesta inizialmente con un grave ritardo nello sviluppo neuromuscolare ed una ipotonia generalizzata; in seguito, i pazienti mostrano un progressivo deterioramento del sistema nervoso, associato a vari segni piramidali ed extrapiramidali, quali tetraparesi spastica, atassia e distonia (Grosso *et al.*, 2002).

Sintomi a carico del sistema vascolare. I pazienti affetti da EE presentano lesioni emorragiche nei piccoli vasi sanguigni di retina, cervello e cute. In particolare, le lesioni vascolari cutanee provocano manifestazioni cliniche caratteristiche quali acrocianosi ortostatica, ecchimosi e petecchie (Ozand *et al.*, 1994).

Sintomi a carico del sistema enterico. La EE è caratterizzata da diarrea cronica, che si manifesta, generalmente, dopo lo svezzamento (Plecko, 2007).

Il principale segno neuropatologico, rilevabile mediante risonanza magnetica, è rappresentato da uno specifico pattern di lesioni necrotiche simmetriche nella struttura della materia grigia profonda; tali lesioni potrebbero derivare da episodi infartuali correlati all'accumulo di metaboliti tossici o dalle alterazioni vascolari tipiche della Encefalopatia Etilmalonica (Grosso *et al.*, 2002).

La EE presenta, inoltre, uno specifico quadro biochimico, caratterizzato da:

- riduzione dell'attività della citocromo c ossidasi nel muscolo scheletrico, ma non nei fibroblasti;
- acidemia lattica persistente;
- elevate concentrazioni plasmatiche di acilcarnitine (C-4 e C-5);
- escrezione di acido etilmalonico (EMA) ed acido metilsuccinico (MSA) nelle urine (Tiranti *et al.*, 2004).

L'accumulo di EMA nei liquidi organici non è una caratteristica biochimica peculiare della EE in quanto tale metabolita è presente anche nelle urine dei pazienti affetti da aciduria glutarica di tipo secondo (*glutaric acidemia type II*, GA II) (Gregersen *et al.*, 1998), da deficit di acil-CoA deidrogenasi a catena corta (*deficiency of short chain acyl-CoA dehydrogenase*, SCAD) e da altre patologie caratterizzate da encefalopatia, sintomatologia muscolare ed acidemia lattica (Barschak *et al.*, 2006).

L'acido etilmalonico può derivare o dalla carbossilazione del butirril-CoA, come conseguenza di disturbi nella β -ossidazione degli acidi grassi a catena corta, o dalla semialdeide-2-etilmalonica, prodotto finale del *pathway* R del catabolismo dell'isoleucina (Baretz *et al.*, 1979) (figura 2.1).



Figura 2.1: Rappresentazione semplificata della via metaboliche degli acidi grassi e dell'isoleucina (*pathway* S ed R). Immagine modificata da Baretz *et al.*, 1979.

Attualmente, la specifica fonte biochimica di EMA nella Encefalopatia Etilmalonica non è nota.

Secondo quanto ipotizzato da Nowaczyk *et al.* (1998b), l'acido etilmalonico deriverebbe, nei pazienti affetti da EE, da una alterazione nel metabolismo dell'isoleucina. Studi più recenti indicano che il precursore di EMA nella EE sia la metionina (McGowan *et al.*, 2004). La via metabolica della metionina prevede, infatti, la formazione di omoserina; tale metabolita viene in seguito convertito in acido 2-ossibutirrico che costituisce una possibile fonte di acido etilmalonico (figura 2.2).



Figura 2.2: Rappresentazione semplificata della via metabolica della metionina. (McGowan *et al.*, 2004).

In particolare, nel lavoro di McGowan *et al.* (2004), è stato osservato che la somministrazione di metionina a pazienti affetti da EE determina un aumento di escrezione di EMA; inoltre, l'escrezione di acido etilmalonico diminuisce in seguito ad un ridotto apporto di metionina con la dieta.

Tali osservazioni vanno a sostegno di una possibile relazione tra l'aciduria etilmalonica ed il metabolismo degli aminoacidi contenenti zolfo, come precedentemente ipotizzato da Duran *et al.* (1997).

Peraltro, una elevata concentrazione di tiosolfati, prodotti secondari del metabolismo della metionina (figura 2.2), è stata rilevata in alcuni pazienti affetti da EE (Duran *et al.*, 1997).

Per quanto riguarda le possibili conseguenze patologiche dell'accumulo di acido etilmalonico, studi *in vitro*, condotti su muscoli scheletrici umani, dimostrano che l'EMA è in grado di inibire l'attività della catena respiratoria (complessi I, II e III) e della creatin chinasi (CK), enzima cruciale per la produzione di ATP, con conseguenti alterazioni nel metabolismo energetico mitocondriale e comparsa di miopatia; tale segno clinico è infatti caratteristico delle patologie con accumulo di EMA (Barschak *et al.*, 2006).

ASPETTI MOLECOLARI

Recentemente, mediante mappaggio per omozigosi, integrazione di dati genomici, fisici e funzionali e screening mutazionale, è stato dimostrato che la Encefalopatia Etilmalonica è causata da mutazioni nel gene umano *Ethel* (Tiranti *et al.*, 2004).

In particolare, partendo da quattro famiglie consanguinee e da due famiglie non consanguinee, è stata identificata, mediante analisi di linkage, la regione cromosomica 19q13, contenente circa 130 geni. Considerate le caratteristiche cliniche e biochimiche della EE, i geni candidati sono stati selezionati sulla base di una possibile funzione mitocondriale, assegnando a ciascuno di essi un "neighborhood index"; tale valore riflette, per il profilo di espressione di RNA di un dato gene, il grado di similarità rispetto ai profili di espressione di geni mitocondriali noti. Lo screening mutazionale dei geni candidati così selezionati, ha permesso di dimostrare che mutazioni nel gene umano *Ethel* sono responsabili dell'insorgenza della Encefalopatia Etilmalonica.

Ad oggi, sono state descritte, in pazienti affetti da EE, 22 mutazioni nel gene *Ethel*, che determinano l'insorgenza della malattia solo quando entrambi gli alleli sono mutati (Tiranti *et al.*, 2006).

Tali mutazioni, riportate in figura 2.3, causano, nella maggior parte dei casi, perdita di funzione, in seguito alla introduzione di codoni di stop prematuri, cambiamenti nel frame di lettura, splicing aberranti o delezioni. Inoltre, sono state descritte mutazioni missense determinanti cambiamenti aminoacidici in porzioni del gene altamente conservate.

MUTAZIONI <i>Ethel</i>	
SEQUENZA NUCLEOTIDICA	SEQUENZA PROTEICA
1 [g.-83delCGCCC]	NON TRADOTTA
2 [c.376+1G→T]	NON TRADOTTA
3 [g.del ex 4]	NON TRADOTTA
4 [c.3G→T]	[p.M11]
5 [c.448G→A]	[p.R163Q]
6 [c.187C→T]	[p.Q63X]
7 [c.482G→A]	[p.C161Y]
8 [c.230de1A]	[p.N77fsx144]
9 [c.406A→G]	[p.T136A]
10 [c.34 C→T]	[p.Q12X]
11 [c.375+5G→A]	SPLICING ESONE-INTRONE 3
12 [c.487C→T]	[p.R163W]
13 [c.604_605insG]	[p.V202fsX220]
14 [c.222_223insA]	[p.Y74fsX97]
15 [c.440_450de1L]	[p.H147fsX176]
16 [g.del ex 1-7]	NON TRADOTTA
17 [c.505 +1G→T]	SPLICING ESONE-INTRONE 4
18 [c.131_132de1AG]	[p.E44fsX102]
19 [c.592_593insC]	[p.H198fsX220]
20 [c.113A→G]	[p.Y38C]
21 [c.554T→G]	[p.L158R]
22 [c.505 +1G→A]	SPLICING ESONE-INTRONE 4

Figura 2.3: Mutazioni del gene umano *Ethel*: alterazioni rilevate a livello della sequenza nucleotidica e conseguenti alterazioni a livello proteico. Immagine modificata da Tiranti *et al.*, 2006.

Nonostante la EE sia stata descritta principalmente in famiglie di origine mediterranea ed arabica, non è stata ottenuta, nei pazienti finora caratterizzati, alcuna evidenza dell'esistenza di un aplotipo ancestrale comune. Sulla base di tale osservazione, si è ipotizzato un possibile vantaggio selettivo per i soggetti portatori di mutazioni eterozigoti nel gene *Ethel* (Tiranti *et al.*, 2006).

IL GENE UMANO *Ethel1*

Il gene umano *Ethel1* (19q13.32) (GenBank D83198), indicato anche con l'acronimo *HSCO* (*Hepatoma subtracted clone one*), venne inizialmente identificato come gene sovraespresso nei carcinomi epatocellulari. Studi preliminari indicarono un possibile ruolo della nuova proteina nella inibizione dell'apoptosi dipendente da p-53, data la sua capacità di interazione con il fattore di trascrizione RELA/NFKB3 (Higashitsuji *et al.*, 2002).

Alla luce della sua relazione con l'Encefalopatia Etilmalonica, il gene *HSCO* venne successivamente rinominato *Ethel1* (Tiranti *et al.*, 2004).

Il gene *Ethel1* umano si estende per 20525 paia di basi, consta di 7 esoni e codifica per un trascritto di circa 1 Kilobase ed espresso in maniera ubiquitaria (figura 2.4).

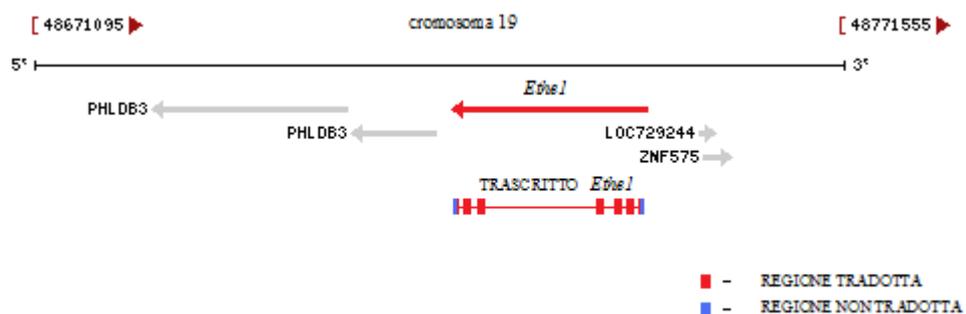


Figura 2.4: Il gene umano *Ethel1*. Il gene umano *Ethel1*, indicato in rosso, mappa in posizione 19q13.32, presenta 7 esoni e codifica per un unico trascritto. In blu sono indicate le regioni non tradotte. Figura tratta e modificata da <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Il trascritto di *Ethel1* viene tradotto in un precursore inattivo di circa 30 KDa che viene importato, con un processo che richiede energia, nella matrice mitocondriale; qui viene convertito in una forma attiva di 28 KDa, in seguito a taglio del peptide segnale per i mitocondri, presumibilmente per azione della peptidasi di processamento mitocondriale MPP (*mitochondrial processing peptidase*) (Tiranti *et al.*, 2004).

LA PROTEINA ETHE1: STRUTTURA E POSSIBILE FUNZIONE

ETHE1 è una proteina filogeneticamente conservata in quanto proteine “ETHE1-like” si ritrovano in tutti i metazoi, nelle piante, come *Arabidopsis thaliana*, e nei funghi, come *Saccharomyces cerevisiae*.

Le proteine ETHE1 sono state classificate all'interno della super-famiglia delle metallo β -lattamasi poiché presentano il tipico dominio β -lattamico, caratterizzato dalla sequenza consenso HXHXD(X)H. In particolare, la sequenza primaria delle proteine ETHE1 presenta un'elevata omologia con le proteine Gliossalasi II appartenenti, con le Gliossalasi I, al sistema delle gliossalasi. Tale sistema svolge un importante ruolo nei processi di detossificazione chimica in quanto è deputato alla conversione, in presenza di glutatione, delle α -cheto aldeidi tossiche nei corrispondenti idrossiacidi (Thornalley, 1990).

Malgrado tali similarità di sequenza, ETHE1 non mostra attività gliossalasica (Tiranti *et al.*, 2004).

La recente risoluzione cristallografica della proteina ETHE1 di *Arabidopsis thaliana* (AtETHE1) ha permesso di evidenziare un *folding* simile a quello caratteristico delle gliossalasi II, fatta eccezione per tre regioni. In AtETHE1 mancano infatti due regioni ad elica, presenti nelle gliossalasi II, localizzate nella porzione centrale della catena aminoacidica; inoltre, AtETHE1 possiede una regione C-terminale che si estende in prossimità dell'apertura del sito attivo, limitando fortemente la dimensione dei possibili substrati (McCoy *et al.*, 2006).

La struttura cristallina di AtETHE1 rivela inoltre una organizzazione dimerica, in accordo con quanto precedentemente dimostrato mediante cromatografia per filtrazione (Tiranti *et al.*, 2004). La regione di interfaccia per la formazione dell'omodimero si localizza nella parte centrale della catena aminoacidica, in corrispondenza delle due regioni ad elica delle gliossalasi II in cui peraltro è assente una organizzazione dimerica.

I residui aminoacidici responsabili, nelle gliossalasi II, del legame a cofattori metallici risultano conservati nelle proteine ETHE1. Nelle gliossalasi II, cinque istidine e due residui di aspartato interagiscono direttamente con due ioni zinco (Cameron *et al.*, 1999); la conservazione di tali residui nella proteina ETHE1 suggerisce che anche ETHE1 possa legare due ioni metallici.

In particolare, nella sequenza di ETHE1 umana (hETHE1), i residui H79, H81, H153 sono implicati nel legame con il primo ione metallico, mentre D83, H84 e H195 sono coinvolti nel legame con il secondo ione metallico; D154 è il residuo di coordinazione tra i due ioni (Tiranti *et al.*, 2006).

Le proteine ETHE1 presentano inoltre uno specifico residuo di tirosina (Y38 in hETHE1) altamente conservato e presente anche nelle gliossalasi II; tale aminoacido potrebbe essere coinvolto nell'interazione con un gruppo tioestere (Ridderström, 2000).

Sulla base di tali evidenze, si ipotizza che la proteina ETHE1 sia, come la GlyO-II, una tioesterasi che agisce, a livello mitocondriale, su un substrato non ancora identificato.

Le gravi conseguenze del malfunzionamento della proteina ETHE1 indicano un ruolo importante di tale prodotto genico nell'omeostasi mitocondriale e nel metabolismo energetico.



Figura 2.5: Allineamento, ottenuto mediante il programma CLUSTALW, tra la sequenza della proteina umana ETHE1 e proteine ad essa altamente omologhe in topo, *X. laevis*, *C. elegans*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Synechocystis*, *S. cerevisiae* e uomo. Sono evidenziate le regioni maggiormente conservate, corrispondenti alla sequenza consenso HXHXD(X)H (residui 35-196 in hETHE1) ed al residuo Y (posizione 38 in hETHE1).

L'OMOLOGO DEL GENE UMANO *Ethe1* IN *Drosophila melanogaster*

L'omologo, in *Drosophila melanogaster*, del gene umano *Ethe1* è il gene CG30022 (*dEthe1*). Tale gene (1462 bp) mappa sul cromosoma 2R nella regione 47F8, in corrispondenza della sequenza intronica del gene *sprt* (CG30023). La regione codificante è suddivisa in 4 esoni e dà origine ad un unico trascritto di 1254 nucleotidi che codifica per una proteina di 279 aminoacidi (Drysedale *et al.*, 2005); i primi 50 residui costituiscono la sequenza segnale per l'importazione nel mitocondrio (figura 2.6).

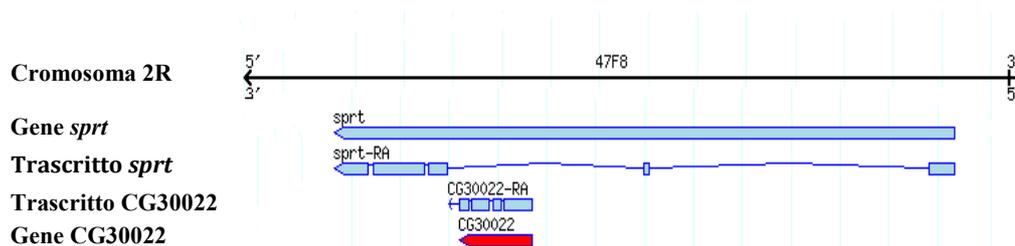


Figura 1.1: il gene CG30022, indicato in rosso, mappa nella regione intronica del gene *sprt*, presenta 4.esoni e codifica per un unico trascritto (CG30022-RA). Figura tratta e modificata da <http://Flybase.bio.indiana.edu>.

L'allineamento delle sequenze di ETHE1 umano e di *Drosophila melanogaster* conferma che la proteina è altamente conservata: 58% di identità e 72% di similarità. Infatti, anche in *Drosophila*, è presente un dominio- β -lattamico dall'aminoacido 59 al 219. Al suo interno sono conservati i residui aminoacidici responsabili del legame con lo Zn (II), in particolare le Istidine 104, 106 e 159, responsabili del legame con il primo atomo di Zinco, l'Aspartato 108 e le Istidine 109 e 219, responsabili del legame con il secondo atomo di zinco ed infine l'Aspartato 179, implicato nel legame con entrambi gli atomi. Essi corrispondono rispettivamente ai residui H79, H81, H135, D83, H84, H195 e D154 della proteina umana (Tiranti *et al.*, 2006).

CAPITOLO 3

LA SINDROME DI LEIGH

LA SINDROME DI LEIGH

Descritta per la prima volta nel 1951, la sindrome di Leigh (LS, OMIM #256000), nota anche come encefalopatia necrotizzante subacuta infantile (SNE), è una encefalopatia mitocondriale progressiva caratterizzata da lesioni focali simmetriche a carico di una o più aree del sistema nervoso centrale.

La causa principale alla base della sindrome di Leigh è una fosforilazione ossidativa deficitaria, dovuta ad alterazioni nei complessi della catena respiratoria mitocondriale (Dahl *et al.*, 1998).

ASPETTI CLINICI

La sindrome di Leigh esordisce nell'infanzia e, più raramente, nell'età adulta, con sintomi clinici che variano a seconda dalle aree del sistema nervoso centrale colpite dalle lesioni.

La forma infantile si manifesta tipicamente nei primi due anni di vita in pazienti che mostrano, inizialmente, ritardo nello sviluppo psicomotorio ed ipotonia muscolare. Successivamente, tali pazienti sviluppano gravi sintomi neurologici, con segni sia piramidali (disturbi motori, paralisi) che extrapiramidali (atassia).

Inoltre, si osservano danni a livello del tronco celebrale (disturbi respiratori e difficoltà nella deglutizione) e del nervo ottico (oftalmoplegia, atrofia ottica e nistagmo).

La forma adulta esordisce in genere con segni extrapiramidali, quali distonia e rigidità, che evolvono in maniera progressiva (Kalimo *et al.*, 1979).

I pazienti affetti da sindrome di Leigh possono presentare anche sintomi non neurologici quali vomito persistente, dismorfismo facciale ed irsutismo. Occasionalmente, la sindrome di Leigh si presenta come malattia multisistemica, con danni a carico di cuore (cardiomiopatia ipertrofica, Rutledge *et al.*, 1981). e fegato (assenza di piruvato carbossilasi, Hommes *et al.*, 1968).

Il quadro biochimico dei pazienti affetti da sindrome di Leigh è caratterizzato da un elevato livello di lattato e piruvato nel sangue e nel fluido cerebrospinale.

Il principale segno neuropatologico, rilevabile mediante risonanza magnetica, è rappresentato da lesioni focali simmetriche localizzate a livello di cervello, talamo, gangli basali, cervelletto e corda spinale. Tali lesioni possono essere associate a processi di demielinizzazione, gliosi, necrosi, spongiosi o ipertrofia venosa.

In genere il decesso sopraggiunge entro la prima decade di vita, anche se talora il quadro clinico rimane invariato per anni (Huntsman *et al.*, 2005).

ASPETTI MOLECOLARI

Da un punto di vista molecolare, la sindrome di Leigh è caratterizzata da una notevole eterogeneità genetica in quanto può essere causata da mutazioni in molteplici geni, sia nucleari che mitocondriali, coinvolti nel metabolismo

energetico. I geni coinvolti nell'insorgenza della sindrome di Leigh possono essere classificati secondo quanto di seguito riportato:

Geni codificanti per i componenti del complesso I della catena respiratoria.

Tali geni possono appartenere al genoma:

- nucleare, come i geni *Ndufv1* (Schuelke *et al.*, 1999), *Ndufs1* (Martin *et al.*, 2005) *Ndufs3* (Benit *et al.* 2004), *Ndufs4* (Petruzzella *et al.*, 2001), *Ndufs7* (Smeitink & van den Heuvel, 1999; Lebon *et al.*, 2004) e *Ndufs8* (Loeffen *et al.*, 1998).
- mitocondriale, come i geni *Mtnd3* (McFarland *et al.*, 2002) *Mtnd5* (Sudo *et al.*, 2004) e *Mtnd6* (Ugalde *et al.*, 2003).

Geni codificanti per i componenti del complesso II della catena respiratoria.

Sono state descritte, in pazienti affetti da sindrome di Leigh, mutazioni nel gene *Sdha*, codificante la flavoproteina della subunità A del complesso II (Bourgeron *et al.*, 1995).

Geni codificanti per i componenti del complesso III della catena respiratoria.

Mutazioni nel gene *Bcs1l*, codificante per una proteina coinvolta nell'assemblamento del complesso III, possono causare la sindrome di Leigh (De Lonlay *et al.*, 2001).

Geni codificanti per i componenti del complesso IV della catena respiratoria.

Appartengono a questa categoria il gene mitocondriale *Mtco3* (Tiranti *et al.*, 2000) ed i geni nucleari *Cox10* (Antonicka *et al.*, 2003; Coenen *et al.*, 2004), *Cox15* (Oquendo *et al.*, 2004), *Sco2* (Jaksch *et al.*, 2001) e *Surf1* (Zhu *et al.*, 1998; Tiranti *et al.*, 1998; Tiranti *et al.*, 1999; Teraoka *et al.*, 1999; Poyau *et al.*, 2000; Moslemi *et al.*, 2003; Salviati *et al.*, 2004; Bohm *et al.*, 2006).

Geni codificanti per i componenti del complesso V della catena respiratoria.

La sindrome di Leigh associata ad una deficienza del complesso V della catena respiratoria è causata da mutazioni nel gene mitocondriale *MtAtp6* (Tatuch *et al.*, 1992; Shoffner *et al.*, 1992; De Vries *et al.*, 1993).

Geni codificanti per i tRNA mitocondriali.

Sono state descritte, in pazienti affetti da sindrome di Leigh, mutazioni nei geni *Mttv* (McFarland *et al.*, 2002), *Mttk* (Rahman *et al.*, 1996), *Mttw* (Santorelli *et al.* 1997; Tulinius *et al.*, 2003) e *Mttl1* (Sue *et al.*, 1999).

Geni codificanti per i componenti del complesso della piruvato deidrogenasi

Rientrano in questa categoria i geni *Dld* (Grafakou *et al.*, 2003) e *Pdhal* (Matthews *et al.*, 1993); in particolare, il gene *Pdhal* (Xp22.2-p22.1) è responsabile di una forma di LS caratterizzata da una trasmissione legata all'X.

La sindrome di Leigh può dunque presentare tre diverse modalità di trasmissione:

- legata all'X;
- mitocondriale;
- autosomica recessiva.

La maggior parte dei pazienti risulta, tuttavia, caratterizzata da una deficienza sistemica di citocromo c ossidasi (COX); tale forma di sindrome di Leigh associata a deficienza di COX (LS^{COX}), viene trasmessa secondo una modalità di tipo autosomico recessivo (Zeviani *et al.*, 1999). I pazienti affetti da LS^{COX} appartengono prevalentemente, ad un unico gruppo di complementazione e presentano, nella maggior parte dei casi, mutazioni nel gene *Surf1* (Munaro *et al.*, 1997).

II GENE *Surf1* UMANO

Il gene umano *Surf1* (9q34.2) (GenBank BC071685) fa parte del locus *surfeit*, cluster altamente conservato di sei geni "housekeeping" (*Surf1-6*), strutturalmente non correlati tra loro (Colombo *et al.*, 1992).

Il locus *surfeit* presenta una organizzazione peculiare nel genoma di molti vertebrati quali uomo (Duhig *et al.*, 1998), pollo (Lennard *et al.*, 1994) e topo (Colombo *et al.* 1992). In particolare, i sei geni *Surf* sono disposti secondo una organizzazione estremamente compatta, in cui la direzione di trascrizione di ciascun gene è opposta rispetto a quella del gene adiacente (Garson *et al.*, 1995). Inoltre, le estremità 5' dei geni *Surf* sono associate a regioni ricche in GC (Huxley & Fried, 1990). In aggiunta, il locus *surfeit* presenta un promotore bidirezionale, coinvolto nella regolazione dei geni *Surf1* e *Surf2*.

Ad oggi, non vi è alcuna indicazione che i prodotti genici del locus *surfeit* siano funzionalmente correlati tra loro e, ad eccezione del gene *Surf3*, che codifica per la proteina ribosomale Rpl7a, la funzione degli altri geni *Surf* è relativamente poco nota.

Il gene umano *Surf1* si estende per 4696 paia di basi, con una regione codificante (1029 pb) organizzata in nove esoni (figura 3.1).

Surf1 è espresso in maniera ubiquitaria, soprattutto nei tessuti ad elevata richiesta energetica quali cuore, muscolo scheletrico e fegato (Yao & Shoubridge, 1999).

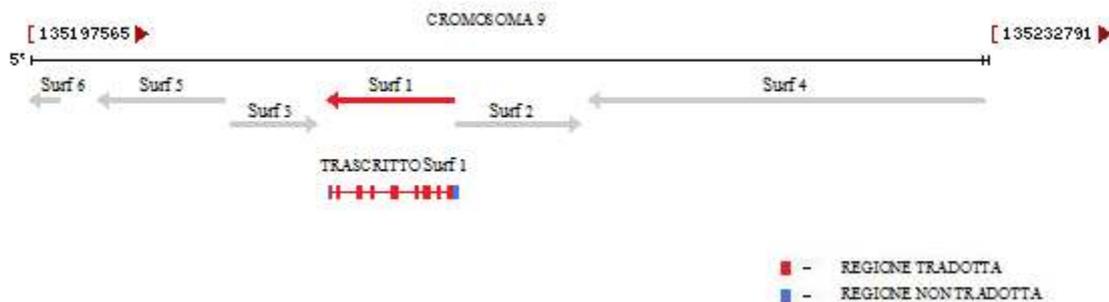


Figura 3.1: il gene umano *Surf1*, indicato in rosso, fa parte del locus *Surfeit*, costituito da altri cinque geni *Surf* (*Surf2-6*), indicati in grigio. *Surf1* presenta 9 esoni e codifica per un unico trascritto di 1037 paia di basi, le cui regioni non tradotte sono indicate in blu. Immagine tratta e modificata da <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

LA PROTEINA SURF1: STRUTTURA E POSSIBILE FUNZIONE

Il gene *Surf1* codifica per un precursore inattivo di 35 kDa; tale precursore, importato nel mitocondrio, viene processato in una forma matura di 30 kDa, in seguito a taglio del peptide leader di circa 40 aa in posizione N-terminale (Tiranti *et al.*, 1999).

SURF1 è una proteina idrofobica strettamente associata alla membrana interna dei mitocondri; sono infatti riconoscibili due domini transmembrana, localizzati rispettivamente alla estremità N-terminale (aa 60–80) e C-terminale (aa 271–291) (Tiranti *et al.*, 1999).

Benchè il preciso ruolo di SURF1 non sia ancora noto, studi condotti sulla proteina omologa di lievito SHY suggeriscono un possibile coinvolgimento nella biogenesi del complesso della citocromo c ossidasi (Nijtmans *et al.*, 2001).

In particolare, in cellule umane *Surf1*^{-/-}, SURF1 risulta essenziale per l'incorporazione della subunità II nell'intermedio in formazione (Tiranti *et al.*, 1999).

Inoltre, è stata ipotizzata una ridondanza nella funzione di SURF1, dato che bassi livelli del complesso di COX vengono comunque rilevati sia in cellule umane *Surf1*^{-/-}, che in topi knockout *Surf1*^{-/-} (Tiranti *et al.*, 1999) (Agostino *et al.*, 2003).

L'OMOLOGO DEL GENE UMANO *Surf1* IN *Drosophila melanogaster*

L'omologo, in *Drosophila melanogaster*, del gene umano *Surf1* (CG9943-PA; *dSurf1*), mappa in posizione 3L65D4 e non presenta l'organizzazione in cluster tipica del genoma dei vertebrati.

Il gene *dSurf1* si estende per 1200 bp e la sequenza codificante (900 pb) è organizzata in 4 esoni (figura 3.2).

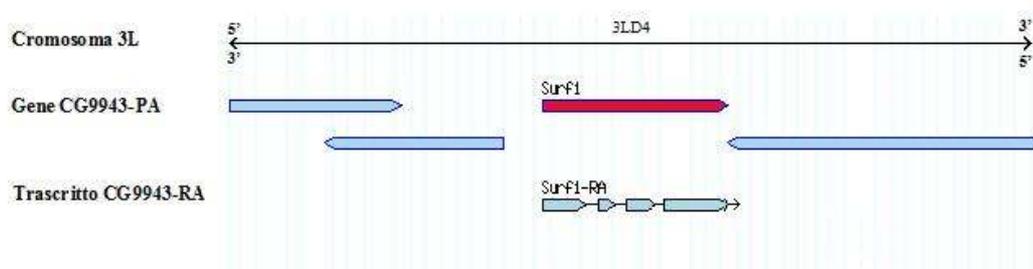


Figura 3.2: il gene CG9943, indicato in rosso, presenta 4 esoni e codifica per un unico trascritto (CG9943-RA). Figura tratta e modificata da <http://Flybase.bio.indiana.edu>.

Il gene CG9943-PA codifica per un unico trascritto, espresso in maniera ubiquitaria, che viene tradotto in una proteina di 300 aminoacidi. Similmente alla proteina umana, dSURF1 presenta, nella regione N-terminale, una sequenza target (41 aminoacidi) per i mitocondri e due domini transmembrana localizzati, rispettivamente, tra gli aa 62-80 e 296-300.

MODELLI ANIMALI PER LO STUDIO DELLA SINDROME DI LEIGH

MODELLI MURINI PER LA SINDROME DI LEIGH

Allo scopo di comprendere il ruolo della proteina SURF1 ed il meccanismo fisiopatologico alla base della LS^{COX}, sono stati creati due modelli murini nei quali l'espressione del gene *Surf1* risulta compromessa.

Il primo modello è stato ottenuto sostituendo gli esoni 5-7 del gene *Surf1* con il gene di resistenza alla neomicina (Neo^r) (Agostino *et al.*, 2003).

In questo caso, i topi knockout (*Surf1*^{NEO}-/-) mostrano, in circa il 90% dei casi, letalità allo stadio embrionale.

La caratterizzazione degli individui *Surf1*^{NEO}-/- a letalità post-natale, ha permesso di evidenziare aspetti fenotipici riconducibili, in parte, alla sindrome di Leigh.

In particolare, è stata osservata una mortalità precoce in quanto il 30% degli individui *Surf1*^{NEO}-/- a letalità post-natale risulta morire entro il primo mese di vita, mentre il 15% entro i primi sei mesi di vita.

Inoltre, tali individui mostrano debolezza muscolare e ridotte capacità motorie. L'analisi del muscolo scheletrico rivela una grave riduzione dell'attività di COX ed una proliferazione mitocondriale nella regione sub-sarcolemmatica.

Tuttavia, a differenza di quanto accade nei pazienti affetti da sindrome di Leigh, il sistema nervoso non presenta alcuna alterazione strutturale ed i topi *Surf1*^{NEO}-/- non sviluppano alcun sintomo neurologico. Tale aspetto è imputabile ad una differente sensibilità al deficit di fosforilazione ossidativa nei due organismi, come già osservato anche in altri modelli murini studiati per malattie mitocondriali umane (Agostino *et al.*, 2003).

Poiché gli individui *Surf1*^{NEO}-/- non riproducono le caratteristiche neuropatologiche della LS^{COX}, è stato in seguito creato un secondo modello murino knockout per il gene *Surf1*. Tale modello (*Surf1*^{loxP}-/-) è stato ottenuto mediante inserzione della sequenza *loxP* nell'esone 7 del gene *Surf1*, con conseguente formazione di una proteina SURF1 tronca, altamente instabile (Dell'Agnello *et al.*, 2007).

Gli individui *Surf1*^{loxP}-/- non mostrano la elevata letalità embrionale che caratterizza il modello *Surf1*^{NEO}-/-, indicando un possibile effetto spurio della cassetta di neomicina sull'espressione degli altri geni del locus *surfeit*.

Similmente a quanto osservato nei topi *Surf1*^{NEO}-/-, anche in questo caso si riscontra una diminuzione sistemica dell'attività della citocromo c ossidasi; tuttavia, non vengono rilevate le lesioni al sistema nervoso centrale caratteristiche della LS^{COX}.

L'assenza di un fenotipo clinico nel modello *Surf1*^{loxP}-/- suggerisce che la funzione della proteina SURF1 nell'assemblamento di COX potrebbe essere ancillaria o ridonante, benchè tale proteina sia altamente conservata ed espressa in modo ubiquitario (Dell'Agnello *et al.*, 2007).

I topi *Surf1*^{loxP}-/- mostrano, inaspettatamente, una longevità significativamente maggiore rispetto ai controlli; essi, inoltre, sono caratterizzati da una completa resistenza alla neurotossicità indotta dall'agonista glutamatergico acido cainico.

Poiché la neurodegenerazione indotta dall'acido cainico è largamente dipendente dall'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} , sono state valutate le variazioni dei flussi cellulari di Ca^{2+} indotte dal glutammato.

In colture neuronali primarie *Surfl*^{loxP} -/-, si osserva una riduzione dell'aumento di Ca^{2+} indotto dal glutammato, a livello sia citosolico che mitocondriale. In particolare, la riduzione dell'*uptake* mitocondriale di Ca^{2+} risulta secondario all'assenza di SURF1, mentre il potenziale mitocondriale di membrana rimane inalterato rispetto ai neuroni di controllo.

Sulla base di tali osservazioni, è stato ipotizzato che SURF1 possa svolgere un ruolo nella omeostasi del Ca^{2+} mitocondriale, con possibili effetti sulla longevità; tale ruolo potrebbe essere parzialmente o totalmente indipendente dalla sua funzione nell'assemblamento di COX (Dell'Agnello *et al.*, 2007).

MODELLO DI *Drosophila melanogaster* PER LA SINDROME DI LEIGH

Recentemente, sono state create e caratterizzate tre linee transgeniche indipendenti di *Drosophila melanogaster* nelle quali è stato indotto, mediante *double-stranded RNA interference*, un silenziamento post-trascrizionale del gene CG9943-PA (Zordan *et al.*, 2006).

Utilizzando il sistema binario UAS-GAL4 (Brand & Perrimon, 1993), è stato possibile porre l'attivazione dell'RNA interference sotto il controllo alternativo di due diversi promotori, appartenenti ai seguenti geni:

- *Actin5C*: gene “*housekeeping*” ad espressione precoce;
- *elav*: gene neuronale ad espressione precoce.

Quando viene utilizzato il driver *Actin5C-GAL4*, che permette di indurre un abbattimento precoce ed ubiquitario del gene *dSurfl*, nessun individuo raggiunge lo stadio adulto e, nella maggior parte dei casi, si osserva letalità allo stadio larvale.

In tutte e tre le linee, le larve *knockdown* (KD) appaiono rallentate nei movimenti e più piccole rispetto ai controlli; inoltre, il sistema nervoso centrale risulta fortemente sottosviluppato, soprattutto a livello dei lobi ottici (figura 3.3).

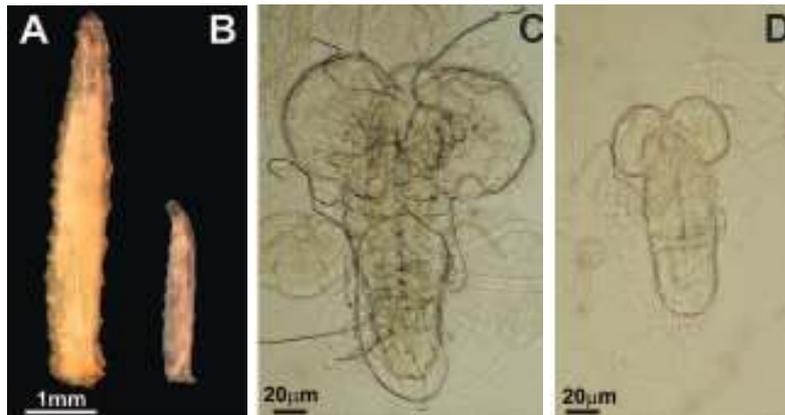


Figura 3.3: Le larve *Actin5C-GAL4 dSurf1* KD di 7 giorni (B) appaiono molto più piccole rispetto alle corrispondenti larve di controllo (A). Inoltre, le larve *Actin5C-GAL4 dSurf1* KD presentano lobi ottici di dimensione ridotta (D) rispetto al controllo (C). Immagini tratte da Zordan *et al.*, 2006.

Talora, alcuni individui *Actin5C-GAL4 dSurf1* KD raggiungono lo stadio pupale, ma non progrediscono ulteriormente nello sviluppo, in quanto muoiono nelle prime fasi di imago, subito dopo l'eversione delle strutture cuticolari dell'adulto (figura 3.4).

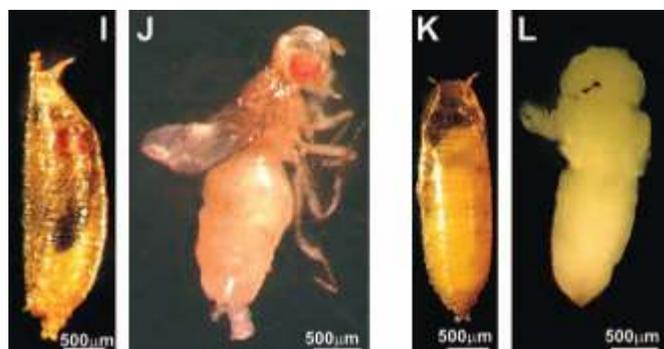


Figura 3.4: Alcuni individui *Actin5C-GAL4 Surf1* KD raggiungono lo stadio pupale, ma muoiono nelle prime fasi di imago. Le immagini K e L si riferiscono a pupe *Actin5C-GAL4 Surf1* KD con e senza pupario, mentre I e J rappresentano i corrispondenti individui di controllo.

Le larve *Actin5C-GAL4 dSurf1* KD mostrano una riduzione significativa nella velocità locomotoria ed una risposta alla luce profondamente alterata. Questa alterazione nel movimento non è tuttavia imputabile a difetti nel sistema motorio. Infatti, le fibre muscolari larvali risultano normali per struttura ed organizzazione, benché siano, rispetto agli individui utilizzati come controllo, più piccole in dimensione (figura 3.5); inoltre, non sono state rilevate alterazioni né a carico dell'apparato contrattile né a livello delle giunzioni neuromuscolari.

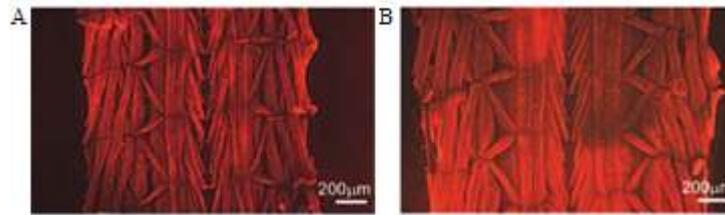


Figura 3.5: Fibre muscolari di larve *Actin5C-GAL4 Surf1* KD (A) e controllo (B).

Tuttavia, le fibre muscolari delle larve *Actin5C-GAL4 dSurf1* KD presentano mitocondri alterati per struttura e dimensione; essi inoltre non mostrano la tipica organizzazione in cluster tra gli spazi miofibrillari.

Sulla base di queste osservazioni, è stato ipotizzato che i difetti motori delle larve KD siano causate da difetti nel metabolismo energetico mitocondriale.

La carenza energetica potrebbe determinare anche il ritardo nello sviluppo e la letalità larvale che caratterizzano gli individui *Actin5C-GAL4 dSurf1* KD; infatti, la fase finale dello sviluppo larvale e la metamorfosi larva-pupa sono processi critici, per i quali è richiesto un notevole dispendio energetico (Singh & Singh, 1999).

Tali osservazioni sono in accordo con i fenotipi descritti in diversi mutanti di *Drosophila* per geni correlati a funzioni mitocondriali (Iyengar *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2001; Szuplewski & Terracol, 2001; Frolov *et al.*, 2000).

Tali mutanti mostrano frequentemente letalità larvale associata a difetti neuromotori e/o fotocomportamentali, suggerendo che tali funzioni siano particolarmente sensibili alle riduzioni di energia fornita dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale.

Quando viene utilizzato il driver *elav-GAL4*, che permette di attivare l'RNAi nel sistema nervoso centrale, gli individui KD sopravvivono fino allo stadio adulto.

La caratterizzazione di tali individui ha evidenziato ridotte capacità locomotorie e fotocomportamentali, imputabili ad una alterazione della trasmissione sinaptica del segnale visivo.

L'effetto diretto del silenziamento di *Surf1* sulla respirazione mitocondriale è dimostrato da una significativa riduzione nella reazione istochimica alla COX, osservata nei lobi ottici degli adulti *elav-GAL4 dSurf1* KD; il sistema nervoso centrale non presenta tuttavia alcun segno neurodegenerativo.

Infine, gli individui *elav-GAL4 dSurf1* KD mostrano una longevità significativamente maggiore rispetto ai controlli, similmente a quanto osservato nel modello murino *Surf1^{loxP}-/-* (Dell'Agnello *et al.*, 2007).

Tale incremento di longevità rimane un dato di difficile interpretazione, soprattutto alla luce della mortalità precoce che caratterizza i pazienti affetti da LS^{COX}. Secondo una recente ipotesi, l'effetto sulla longevità è imputabile ad un coinvolgimento di SURF1 nella regolazione della omeostasi del Ca²⁺; tale effetto potrebbe essere evidente solo negli organismi in cui la deplezione di SURF1 determina una alterazione limitata della fosforilazione ossidativa mitocondriale (Dell'Agnello *et al.*, 2007).

CAPITOLO 4
TECNICHE DI GENETICA INVERSA IN
Drosophila melanogaster

RNA INTERFERENCE

Il fenomeno dell'RNA interference (RNAi), ovvero il silenziamento sequenza-specifico di un gene in risposta alla presenza di RNA a doppio filamento (dsRNA) di sequenza omologa, è stato inizialmente caratterizzato nel nematode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). Simili meccanismi erano tuttavia già stati osservati in *Petunia*, con il silenziamento di loci endogeni in seguito all'introduzione di transgeni. In questo caso il fenomeno era stato denominato "co-soppressione" (Napoli *et al.*, 1990), mentre quando un simile evento era stato osservato in presenza di RNA di origine virale era stato descritto come "*virus-induced gene silencing*" (VIGS). Inoltre, un fenomeno di silenziamento in risposta all'introduzione di geni esogeni, denominato "*quelling*", era stato precedentemente descritto anche in *Neurospora crassa* (Cogoni *et al.*, 1997).

I successivi studi genetici e biochimici hanno confermato che l'RNAi, la co-soppressione ed il *quelling* sono riconducibili ad un unico meccanismo, altamente conservato, la cui presenza è stata dimostrata in una grande varietà di organismi eucarioti: protozoi, funghi, insetti e mammiferi. E' stato ipotizzato che tale meccanismo di silenziamento genico potrebbe essersi evoluto come risposta difensiva nei confronti di attacchi virali, trasposoni o mRNA aberranti, tanto che è stato definito come "sistema immunitario del genoma" (Plasterk *et al.*, 2002).

IL MACCHINARIO DELL'RNA INTERFERENCE IN *Drosophila melanogaster*

Il meccanismo generale dell'RNAi e dei fenomeni di silenziamento ad esso strettamente correlati, consiste nel riconoscimento della molecola di dsRNA ad opera di specifiche ribonucleasi; l'azione di tali enzimi converte il segnale iniziale in frammenti di 21-23 nucleotidi denominati "*small interfering RNA*" (siRNA). In seguito, gli siRNA, descritti in tutte le vie di silenziamento genico, diventano parte del complesso effettore RISC (*RNA-induced silencing complex*) e lo guidano verso substrati ad essi complementari.

Studi condotti su estratti di embrioni di *Drosophila* hanno dimostrato che le ribonucleasi in grado di iniziare il processo dell'RNAi appartengono alla famiglia evolutivamente conservata delle RNasi di tipo III (Hannon *et al.*, 2002). Tali enzimi, denominati anche Dicer, possiedono un dominio RNA elicastico aminoterminale, un dominio PAZ, due domini RNasiIII ed un "*dsRNA binding domain*" (DRBD) in posizione carbossi-terminale; essi, inoltre, presentano un dominio di funzione non ancora nota, denominato DUF283 (Saunders & Barber, 2003).

In *Drosophila* sono stati identificati due geni della famiglia Dicer: *dicer-1* (*dcr-1*) e *dicer-2* (*dcr-2*) che codificano per prodotti proteici differenti per dimensione e struttura. In particolare, DCR-1 è privo di un dominio elicastico funzionale e DCR-2 non presenta il dominio PAZ. Tali differenze suggeriscono che i due enzimi possano svolgere attività diverse o tra loro complementari.

Si è infatti osservato che solamente DCR-2 è in grado di processare il dsRNA in frammenti di circa 22 nucleotidi, mentre DCR-1 sembra essere implicato nella

biogenesi dei pre-miRNA (RNA a doppio filamento implicati in fenomeni di regolazione genica pre-traduzionale) (Lee *et al.*, 2004).

Le molecole di siRNA, generate in seguito alla azione di DCR-2, sono costituite da un filamento senso stabile e da un filamento antisense instabile, per la presenza di due nucleotidi sporgenti alla estremità 3'-OH. Grazie alla asimmetria termodinamica che le caratterizza, tali molecole vengono riconosciute e legate dal complesso eterodimerico che DCR-2 forma con la proteina R2D2.

In particolare, R2D2, legandosi alla estremità 5' del filamento senso, lo contrassegna per la degradazione, mentre il filamento antisense diviene parte integrante del complesso RISC, dove può fungere da stampo per il riconoscimento dell' mRNA target (figura 4.1) (Kavi *et al.*, 2005).

Il complesso costituito da siRNA, R2D2 e DCR-2 viene in seguito convertito, con un processo ATP-dipendente, nel complesso RISC attivo, la cui formazione passa attraverso l'intermedio RLC (*RISC Loading Complex* o complesso A).

RISC è un complesso ribonucleoproteico di grandi dimensioni (80S); le componenti proteiche che lo costituiscono vengono descritte di seguito:

- AGO2 (*Argonaute 2*): AGO2 fa parte della famiglia *Argonaute*, costituita da proteine altamente conservate coinvolte nei processi di RNAi.

Le proteine della famiglia *Argonaute* presentano dei domini caratteristici, denominati PIWI e PAZ. Il primo, in posizione C-terminale, interagisce con il dominio ribonucleasico di Dicer; il dominio PAZ consente, invece, l'interazione con altre proteine (Kavi *et al.*, 2005).

AGO2 è direttamente coinvolta nel taglio della molecola mRNA target e rappresenta il vero e proprio "motore catalitico" di RISC, come recentemente dimostrato in linee cellulari umane (Liu *et al.*, 2004).

- dFXR (*Drosophila human fragile X mental retardation*): dFXR è l'omologo, in *Drosophila*, della proteina umana coinvolta nella insorgenza della sindrome dell'X fragile; tale proteina contiene tre domini di legame all'RNA (Caudy *et al.*, 2002).

- TUDOR-SN (*Tudor Staphylococcus nuclease*): si tratta di una proteina ad attività nucleasica, caratterizzata da un dominio TUDOR e da cinque domini omologhi al dominio nucleasico di *Staphylococcus* (Caudy *et al.*, 2003).

- VIG (*Vasa intronic gene*): la proteina VIG, codificata da un introne all'interno del gene *Vasa*, presenta un motivo di legame all'RNA; la precisa funzione svolta da tale proteina evolutivamente conservata non è nota (Caudy *et al.*, 2002).

La molecola-guida di siRNA, che interagisce con il dominio PAZ della proteina AGO-2 (Collins & Cheng, 2005), consente il riconoscimento delle molecole di mRNA target con un meccanismo basato sulla complementarità tra coppie di basi (Hannon *et al.*, 2002).

Il complesso RISC esplica la propria attività tagliando la molecola target al centro della sequenza guida, in una reazione Mg^{2+} -dipendente; si ritiene che la degradazione degli mRNA target avvenga nel citoplasma (Kavi *et al.*, 2005).

I frammenti generati dalla azione di RISC vengono infine degradati ad opera delle endonucleasi (Cerutti, 2003).

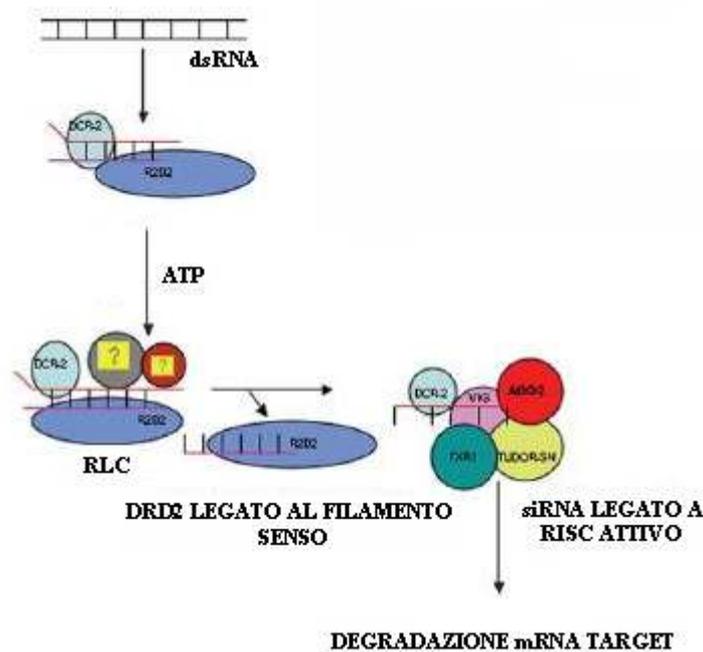


Figura 4.1: RNAi: assemblamento del complesso RISC attivo. Le proteine DCR-2 e R2D2 formano un complesso eterodimerico che si lega alla molecola termodinamicamente asimmetrica di siRNA, prodotta dalla degradazione del dsRNA ad opera di DCR-2. Il complesso costituito da siRNA, R2D2 e DCR-2 viene in seguito convertito, con un processo ATP-dipendente, nel complesso RISC attivo. La formazione del complesso RISC attivo prevede la formazione dell'intermedio RLC, le cui componenti proteiche non sono state ancora completamente caratterizzate. Il complesso RISC attivo, costituito dal filamento termodinamicamente instabile dello siRNA, e da un insieme di proteine (AGO2, R2D2, TSN e dFXR1), diviene quindi competente per il taglio endonucleolitico delle molecole di mRNA target. Immagine modificata da Kavi *et al.*, 2005.

Studi recenti suggeriscono che il macchinario dell'RNA interference potrebbe controllare l'espressione genica ad un livello non esclusivamente post-trascrizionale, inducendo, ad esempio, cambiamenti a livello del genoma quali rimodellamento nella struttura della cromatina e metilazione del DNA (Pal-Bhadra *et al.*, 2002)

Inoltre, in seguito alla caratterizzazione di mutanti per proteine coinvolte nell'RNAi in *Drosophila* (Kataoka *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 1998), *Arabidopsis* (Bohmert *et al.*, 1998) e *C. elegans* (Ketting *et al.*, 2001; Knight *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001), è stato ipotizzato un possibile ruolo del macchinario dell'RNAi nella regolazione dell'espressione genica endogena.

RNA INTERFERENCE STABILE ED EREDITABILE IN *Drosophila*

L'RNA interference può essere indotta in *Drosophila* mediante iniezione di molecole di dsRNA in embrioni allo stadio preblastodermico, generando tuttavia un effetto transiente e limitato ai soli stadi embrionali (Misquitta & Paterson, 1999). Tale problema venne in seguito superato mediante l'utilizzo di un elemento P trasformante di *Drosophila*, in cui l'espressione di un costrutto, corrispondente alla sequenza senso ed antisense del gene target, era inducibile mediante shock termico, in quanto posta sotto il controllo del promotore del gene *hsp70* (*heat shock protein 70*) (Lam & Thummel, 2000). Con questo sistema non era tuttavia possibile modulare l'attivazione dell'RNAi in maniera tessuto-specifica.

Attualmente, il metodo più usato per l'induzione mirata di geni ectopici in *Drosophila* si basa sul sistema binario di lievito UAS-GAL4, secondo quanto sviluppato da Brand & Perrimon nel 1993; questo metodo consente, infatti, di indurre un RNAi stabile, ereditabile e modulabile a livello sia spaziale che temporale.

Il sistema UAS-GAL4 è presente naturalmente nel lievito *Saccharomyces cerevisiae*, dove regola l'espressione di alcuni geni coinvolti nel metabolismo del galattosio. In particolare, l'attivatore trascrizionale GAL4 (881 aa) si lega ad una sequenza bersaglio, detta UAS (*Upstream Activating Sequence*), costituita da quattro sequenze di 17 paia di basi, localizzate a monte dei loci controllati dal sistema UAS-GAL4. La proteina GAL4 presenta un sito di legame al DNA, localizzato nei primi 74 aa della porzione N-terminale, mentre i due domini di attivazione della trascrizione sono localizzati nella regione C-terminale (regioni 148-196 e 768-881).

L'induzione, in *Drosophila*, dell'RNAi basato sul sistema UAS-GAL4 prevede la generazione di due linee transgeniche separate. Nella prima linea, la sequenza di interesse viene posta sotto il controllo dell'elemento UAS, mantenendola così in uno stato trascrizionalmente inattivo. L'espressione della sequenza ectopica può essere attivata solo nella progenie dell'incrocio con una seconda linea transgenica, nella quale l'attivatore GAL4 viene trascritto sotto il controllo di promotori diversi a seconda delle esigenze sperimentali (Duffy, 2002).

Recentemente, è stato sviluppato in *Drosophila* un metodo di RNA interference, basato sul sistema UAS-GAL4, che utilizza la fonte più potente di dsRNA, ovvero una sequenza ripetuta ed invertita in grado di formare, dopo la trascrizione, una struttura a forcina (Tavernarakis *et al.*, 2000).

In particolare, una regione del gene di interesse viene clonata in modo da ottenere due ripetizioni invertite, separate da una porzione del gene codificante per la GFP (*green fluorescent protein*). La presenza di tale spaziatore facilita la formazione, in seguito alla trascrizione del gene, di una struttura a forcina nel dsRNA (Piccin *et al.*, 2001). Tale costrutto viene posto sotto il controllo della sequenza di attivazione UAS utilizzando il vettore pUAST; in questo modo è possibile ottenere linee transgeniche in cui l'attivazione dell'RNA interference è modulabile mediante incroci con opportune linee GAL4 (figura 4.2).

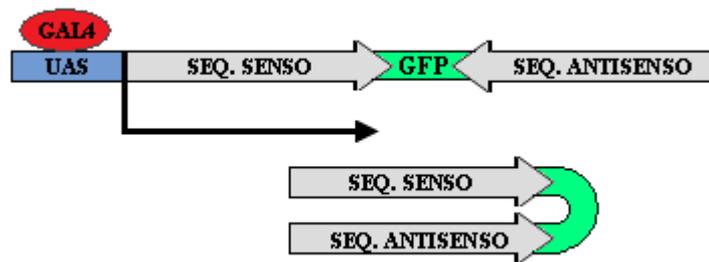


Figura 4.2: rappresentazione schematica del costrutto per l'RNA interference e della struttura a forcina del dsRNA.

OFF-TARGET EFFECTS

Con il termine “*off-target effects*” (OTE) si indicano i possibili cambiamenti aspecifici nell'espressione genica, conseguenti ad interazioni inattese tra gli siRNA e le diverse componenti cellulari (Echeverri & Perrimon, 2006).

Gli OTE possono derivare dall'attivazione di meccanismi indipendenti dall'RNAi o ad esso direttamente associati (Birmingham *et al.*, 2007).

Tra i meccanismi indipendenti dall'RNAi, sono stati descritti fenomeni di tossicità cellulare e, nei mammiferi, è stata osservata l'attivazione di una risposta immunitaria innata, attraverso il *pathway* dell'interferone (Reynolds *et al.*, 2006).

Più frequentemente, gli OTE derivano da un silenziamento di geni omologhi al gene target e/o di altri geni che mostrano parziale complementarità di sequenza con gli siRNA (Jackson *et al.*, 2003).

Un'altra possibile causa di OTE è la generazione di siRNA secondari. In tale processo, definito “*transitive RNAi*”, gli siRNA, accoppiandosi a trascritti complementari, generano nuovi dsRNA, grazie all'azione di una RNA polimerasi RNA-dipendente. Questi dsRNA vengono in seguito processati in siRNA che possono a loro volta silenziare mRNA complementari, diversi dall'mRNA target. Il fenomeno dell'RNAi transitivo è stato documentato in *C. elegans* ma potrebbe anche verificarsi in altri organismi (Alder *et al.*, 2003).

Infine, gli siRNA potrebbero talora funzionare come microRNA, inducendo quindi una inibizione della traduzione senza alterare i livelli di trascrizione (Saxena *et al.*, 2003; Scacheri *et al.*, 2004).

E' stato ipotizzato che, in organismi modello quali *Drosophila melanogaster* e *C. elegans*, il fenomeno degli OTE potrebbe essere limitato dall'elevato numero di molecole di siRNA che si generano in seguito al processamento del dsRNA ad opera di Dicer. In tale condizione, la possibilità che si formino molecole in grado di attivare una risposta aspecifica sarebbe estremamente ridotta (Echeverri & Perrimon, 2006). Questa ipotesi, benché priva di precise prove sperimentali, è stata messa in discussione solo recentemente, in seguito a quanto emerso in screening di RNAi condotti *in silico* (Ma *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006). In particolare si è dimostrato che molecole di dsRNA contenenti triplette ripetute e contigue del tipo CA[AGCT] o CAN (Ma *et al.*, 2006), o sequenze di almeno 19 nucleotidi in grado di appaiarsi con trascritti aspecifici (Kulkarni *et al.*, 2006), possono produrre “*off-target-effects*”.

Ne deriva che, quando vengono utilizzate, per indurre RNAi, molecole di dsRNA con le citate caratteristiche, è necessario escludere eventuali effetti aspecifici (Echeverri & Perrimon, 2006).

Secondo quanto prospettato, a tale proposito, da Birmingham *et al.* (2007), la questione degli OTE dovrebbe essere affrontata sia migliorando gli strumenti bioinformatici per la progettazione dei dsRNA, sia mettendo in atto strategie sperimentali in grado di confermare la specificità del fenotipo osservato.

Per quanto riguarda l'ottimizzazione del disegno dei dsRNA, è attualmente disponibile un programma bioinformatico in grado di prevedere, sulla base di opportuni algoritmi, efficienza e specificità degli siRNA (Arziman *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda la conferma della specificità dell'RNAi, è possibile seguire due approcci, tra loro complementari, basati sulla ridondanza degli dsRNA e sulla complementazione del fenotipo osservato.

In particolare, può essere utile testare molteplici dsRNA, indipendenti tra loro, ma diretti verso lo stesso gene target.

La complementazione (o “*rescue*”) consiste, invece, nel verificare che il fenotipo indotto dall'RNAi reverta in seguito alla sovrappressione di una copia del gene target, reso in qualche modo immune all'abbattimento mediato dall'RNAi.

Una promettente strategia di *rescue* è stata recentemente utilizzata da Kittler *et al.*, (2005). Lavorando in colture di cellule umane, è stata dimostrata la specificità del fenotipo indotto dall'RNAi mediante un sistema basato sulla transgenesi di BAC (*bacterial artificial chromosome*). Tali costrutti, originati dal genoma di una specie diversa, consentono di esprimere il gene target in una forma sufficientemente divergente per sfuggire al macchinario dell'RNAi, mantenendone tuttavia inalterato il pattern di espressione.

Infine, è stato messo a punto, in piante di tabacco, un sistema di *rescue* che consiste nella trans-complementazione attraverso un gene sintetico in grado di codificare per la stessa proteina del gene nativo, utilizzando tuttavia una differente sequenza nucleotidica (Kumar *et al.*, 2006).

GENE TARGETING

Il “*gene targeting*” è il metodo attualmente più utilizzato per ottenere knockout in *Drosophila melanogaster*. Tale metodo, applicato per la prima volta in *Drosophila* da Rong e Golic nel 2000, si basa sui sistemi endogeni di ricombinazione omologa.

Il *gene targeting* prevede la formazione di una molecola di DNA di natura ricombinogena che viene generata grazie all’azione concertata di tre componenti principali, di seguito riportate:

- 1) **Transgene** che codifica per la ricombinasi sito-specifica di lievito FLIPPASI (FLP). Tale enzima catalizza l’excisione della porzione di DNA compresa tra due siti di riconoscimento FRT, lunghi 34 paia di basi e dotati di direzionalità. Tale transgene viene posto sotto il controllo di un promotore inducibile mediante shock termico.
- 2) **Transgene** che codifica per la endonucleasi sito specifica di lievito I-SceI. Tale enzima produce un taglio a doppio filamento in corrispondenza di uno specifico sito di riconoscimento di 18 paia di basi, assente nel genoma di *Drosophila*. Anche questo transgene viene posto sotto il controllo di un promotore inducibile mediante shock termico.
- 3) **Costrutto donatore** contenente i seguenti elementi:
 - siti di riconoscimento specifici per la ricombinasi FLP e per la endonucleasi I-SceI;
 - DNA omologo al locus target;
 - un opportuno gene marker (figura 4.3).

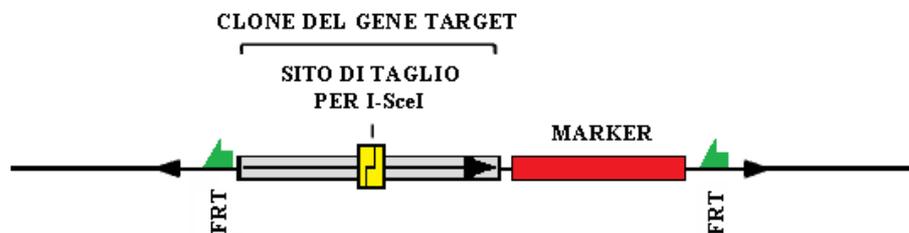


Figura 4.3: costrutto donatore. Immagine modificata da Rong *et al.*, 2002.

La molecola ricombinogena viene generata *in vivo*, in una linea transgenica in grado di esprimere ciascuna delle tre componenti fondamentali.

Una volta ottenuti, mediante opportuni incroci, moscerini contenenti il costrutto donatore ed i transgeni per FLP ed I-SceI, si induce, nelle cellule germinali degli

embrioni nelle prime fasi dello sviluppo, la generazione di una molecola ricombinogena che sarà in grado di appaiarsi e ricombinare con il locus target (Rong & Golic, 2000).

Il meccanismo generale è il seguente:

1. Induzione della sintesi di FLP e I-SceI mediante shock termico.
2. Azione degli enzimi a livello dei rispettivi siti di taglio; in particolare, la flippasi excide il costrutto donatore formando una molecola circolare extracromosomica che viene linearizzata da I-SceI.
3. Generazione della molecola donatrice ricombinogena. La ricombinogenicità della molecola donatrice è data dalla presenza del taglio a doppio filamento prodotto da I-SceI. Infatti, la presenza di tagli a doppio filamento stimola meccanismi di riparo endogeni alla cellula. La molecola utilizzata come guida dai sistemi di riparo endogeni può essere localizzata sul cromatidio fratello, su un cromosoma omologo oppure, come in questo caso, può essere di origine ectopica.
4. Appaiamento della molecola donatrice con il locus target.
5. Integrazione della molecola donatrice nel locus target in seguito a ricombinazione omologa.

Il costrutto donatore può essere disegnato per una ricombinazione di tipo “*ends-in*” o “*ends-out*” (figura 4.4). La differenza sostanziale è che nel metodo “*ends-in*” viene generato un taglio a doppio filamento all’interno di una sequenza di DNA omologa al locus target, con conseguente duplicazione della regione target; nel metodo “*ends-out*”, invece, un taglio a doppio filamento viene generato ad entrambe le estremità del segmento omologo e ciò determina la sostituzione del locus target con la sequenza omologa presente nel costrutto donatore (Gong & Golic, 2003).

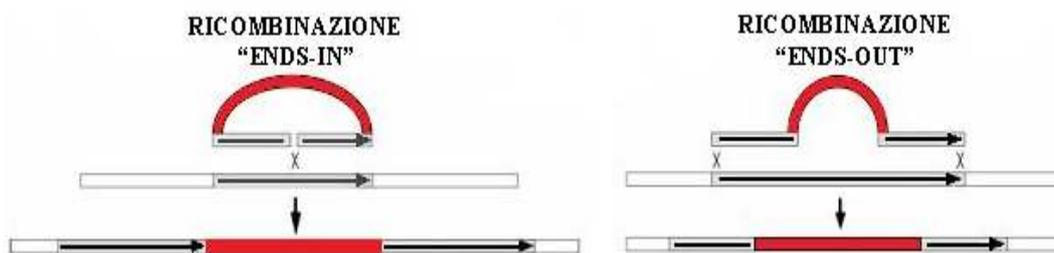


Figura 4.4: ricombinazione “*ends-in*” ed “*ends out*”. Immagine modificata da Gong & Golic, 2003.

ENDS-IN TARGETING

Il metodo “*ends-in targeting*” (o “*insertional gene targeting*”) è stato utilizzato per la prima volta in *Drosophila melanogaster* da Rong e Golic (2000), allo scopo di ottenere rescue per il gene *yellow*¹, caratterizzato da una mutazione puntiforme in grado di determinare un corpo di colore chiaro.

Nel lavoro citato, si dimostra che, utilizzando un costrutto donatore contenente DNA omologo all'intero gene target ed opportuni siti di riconoscimento per gli enzimi FLP e I-SceI, è possibile indurre eventi di ricombinazione omologa tra il costrutto donatore ed il locus target.

Tali eventi di targeting possono essere classificati, sulla base delle loro caratteristiche molecolari, come riportato di seguito:

- classe I: eventi di sostituzione allelica, riconducibili a conversione genica o a doppio crossing-over tra gene target e molecola donatrice;
- classe II: eventi di duplicazione del gene target, causati da integrazione della molecola donatrice in seguito a ricombinazione omologa;
- classe III: eventi di duplicazione del gene target con inserzioni o delezioni nella copia selvatica e mutata, probabilmente causati da difetti nella reazione di ricombinazione;
- classe IV: eventi di integrazione della molecola donatrice dimerizzata, con conseguente integrazione di due copie aggiuntive del gene target.

In seguito a tale analisi molecolare, Rong e Golic hanno progettato una molecola donatrice contenente DNA omologo ad una porzione interna al gene target. Con questa strategia è possibile ottenere, in seguito ad un evento di targeting di classe II, due copie non funzionali del gene target, ciascuna priva di una differente porzione codificante (figura 4.5).

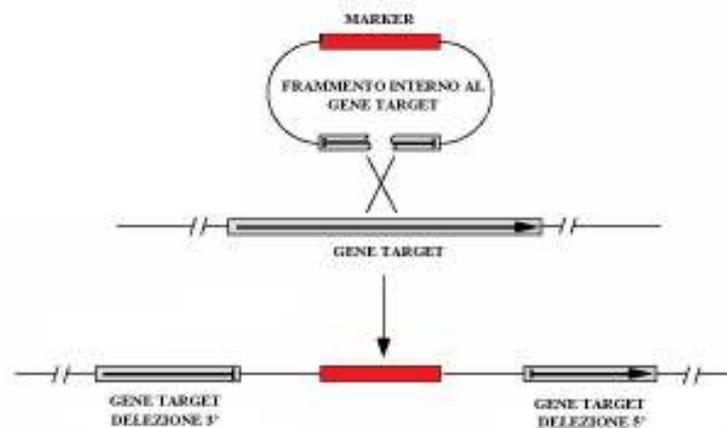


Figura 4.5: metodo di *ends-in targeting* messo a punto da Rong e Golic (2000). Immagine modificata da Rong e Golic, 2000.

Tale metodo è stato in seguito utilizzato per ottenere knockout del gene *pugilist* (Rong & Golic, 2001), dimostrando così che l’“*ends-in targeting*” è applicabile anche quando il gene target non è localizzato vicino al telomero (come *yellow*). Infatti, secondo l’ipotesi avanzata da Engels (2000), la ricombinazione osservata per *yellow*, sarebbe dovuta ad un meccanismo di riparo dei tagli a doppio filamento osservabile solo in loci vicini ai telomeri.

Successivamente, sono stati messi a punto due ulteriori metodi di *ends-in targeting* (Rong *et al.*, 2002).

Il primo sistema sperimentale prevede l’utilizzo di una molecola donatrice che presenta una mutazione puntiforme deleteria ad entrambi i lati del sito di taglio per I-SceI; in questo modo, in seguito a ricombinazione omologa, è possibile ottenere due copie del gene target, ciascuna con una mutazione in grado di impedirne l’espressione (figura 4.6).

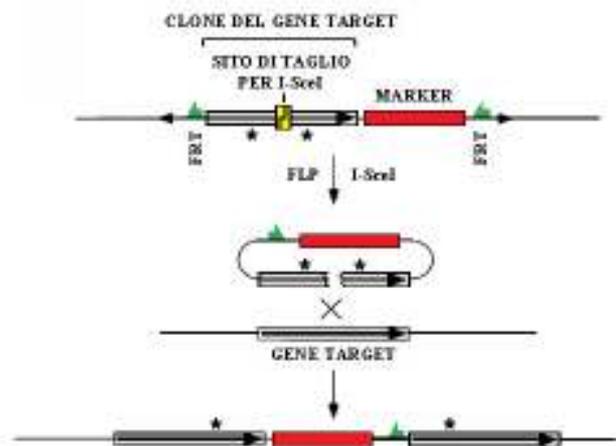


Figura 4.6: strategia di *ends-in targeting* messa a punto da Rong *et al.*, 2002. Immagine modificata da Rong *et al.*, 2002.

E’ possibile che, in seguito all’azione di esonucleasi endogene, il taglio a doppio filamento prodotto da I-SceI, venga ingrandito fino a formare un “*gap*”, successivamente riparato sulla base dello stampo fornito dal filamento cromosomico complementare. Ne deriva che, una certa proporzione di geni target saranno privi della mutazione introdotta perché eliminata dalla attività esonucleasica precedente alla ricombinazione omologa. Quindi, per introdurre mutazioni con successo, è necessario che queste distino dal sito I-SceI più di 400 paia di basi; tale metodo risulta dunque difficilmente applicabile a geni di piccole dimensioni.

Con questa strategia sono state introdotte mutazioni nei geni *pug*, *Nlaz*, *GC*, *p53*, *CG11305* (Rong *et al.*, 2002), *Nap1* (Lankenau *et al.*, 2003) ed *Or43b* (Elmore *et al.*, 2003).

Il secondo metodo consiste in un sistema a due passaggi che permette di ottenere una sola copia mutata del gene target. Nel primo passaggio viene introdotta, mediante *ends-in targeting*, una singola mutazione puntiforme nel gene target. Nel

secondo passaggio, il gene target viene ridotto ad una singola copia (figura 4.7). Tale metodo prevede l'utilizzo di un costrutto donatore contenente, a valle del gene marker, il sito di riconoscimento per la endonucleasi I-CreI. Il transgene che codifica per tale enzima viene espresso in seguito a shock termico; il taglio a doppio filamento che ne deriva facilita la ricombinazione omologa tra i due geni, con conseguente riduzione del gene target ad una singola copia.

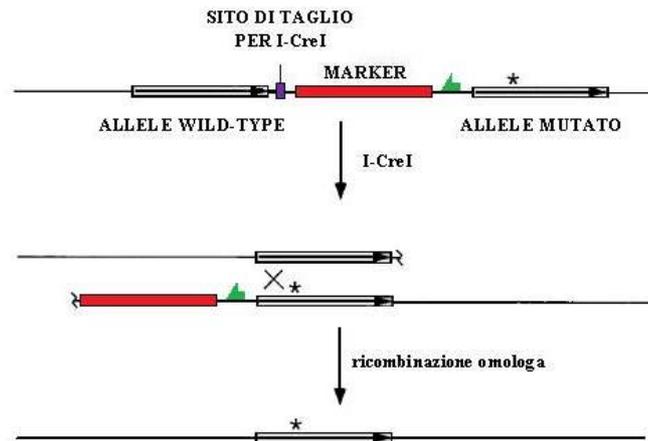


Figura 4.7: riduzione del gene target a singola copia mediante l'utilizzo della endonucleasi I-CreI. Immagine modificata da Rong *et al.*, 2002.

Questo metodo, che è stato applicato per ottenere knockout dei geni *pug*, *p53*, *CG11305* (Rong e Golic, 2002) ed *ADGF* (Dolezal *et al.*, 2003), offre i seguenti vantaggi:

- La mutazione può essere localizzata in qualsiasi posizione della sequenza.
- A livello del locus target non rimane alcun frammento esogeno (tranne la mutazione introdotta).

Nel 2004, Xie e Golic hanno messo a punto un ulteriore sistema di *ends-in targeting* che consente di ottenere delezioni geniche in specifici geni target (*Sir2*, *Sirt2* e *p53*).

In questo caso, il costrutto donatore (figura 4.8) è caratterizzato da:

- Regioni di DNA che fiancheggiano, a monte (C) e a valle (A), il gene da sottoporre a delezione (B).
- Sito di riconoscimento per I-SceI nella regione A.
- Il gene marker *white^{hs}* (*w^{hs}*) che consente di individuare i possibili eventi di targeting sulla base del colore degli occhi.
- Sequenze FRT esterne.
- Sito per I-CreI, a monte del gene *white^{hs}*.

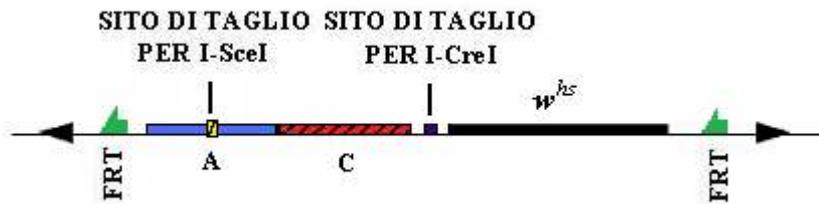


Figura 4.8: costruito donatore. Immagine modificata da Xie & Golic, 2004.

Dopo l'induzione dell'espressione di FLP e di I-SceI, la molecola donatrice viene excisa ed il taglio a doppio filamento stimola la ricombinazione omologa a livello della regione A.

Ne deriva la formazione di un allele target in cui il gene marker è fiancheggiato, a monte, da A e C ed, a valle, dalle regioni A, B e C (figura 4.9).

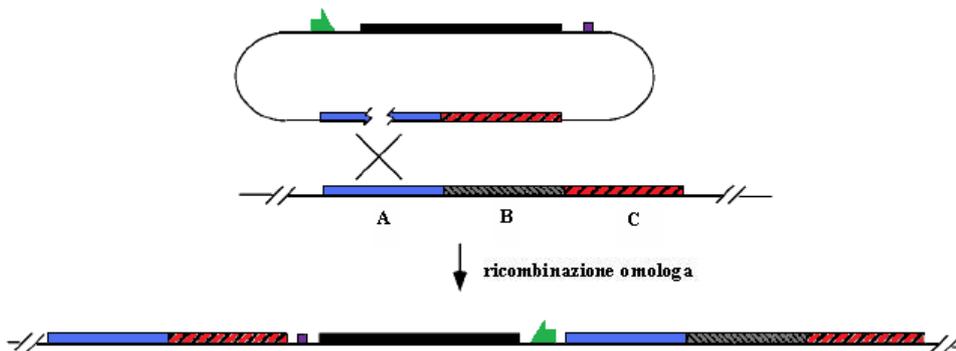


Figura 4.9: schema del targeting. Immagine modificata da Xie e Golic, 2004.

In un secondo passaggio viene generato un taglio a doppio filamento in seguito alla espressione di I-Cre I. A questo punto, possono verificarsi due eventi di ricombinazione omologa, entrambi riconoscibili per la perdita del gene marker:

1. Se la ricombinazione avviene nella regione A, viene ricostituito un allele wild-type, come mostrato in figura 4.10.

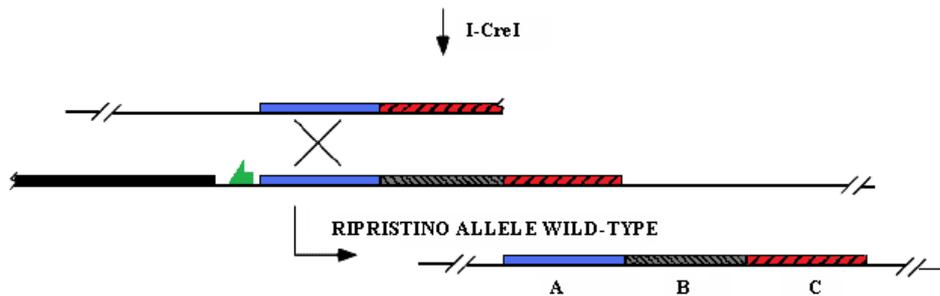


Figura 4.10: schema del targeting. Immagine tratta da Xie e Golic, 2004.

2. Se la ricombinazione avviene nella regione C, il gene target B viene deletato (figura 4.11).



Figura 4.11: schema del targeting. Immagine tratta da Xie e Golic, 2004.

L'introduzione di tale metodo ha aumentato la versatilità del *targeting* di tipo “*ends-in*” in quanto:

- consente una delezione precisa del locus target;
- è applicabile anche quando il locus target è di piccole dimensioni; infatti, nel 2003, è stato utilizzato da Liu *et al.* per ottenere il knockout del gene *Sp*, che si estende solo per 200 paia di basi.

ENDS-OUT TARGETING

Il sistema di “*ends-out targeting*” (o “*replacement gene targeting*”) consente di generare, in un singolo passaggio, un allele nullo del gene target. Il costrutto donatore viene progettato in modo tale da includere porzioni di DNA omologhe alle regioni che fiancheggiano il locus target; inoltre, i siti di riconoscimento per l'enzima FLP vengono posti ad entrambe le estremità del segmento omologo. In questo modo, in seguito a ricombinazione omologa, il gene target viene sostituito dal gene marker presente nel costrutto donatore (Bi e Rong, 2003).

L'applicabilità dell'*ends-out targeting* in *Drosophila melanogaster* è stata per la prima volta dimostrata da Gong & Golic (2003); tale strategia venne utilizzata per

indurre targeting a livello del *locus yellow*, con una efficienza comparabile a quella precedentemente ottenuta, per lo stesso locus, mediante *ends-in targeting* (Rong e Golic, 2000).

Il sistema di *ens-out targeting* venne successivamente utilizzato per indurre specifiche delezioni nei sei geni *Hsp70* in *Drosophila* (Gong & Golic, 2004).

Si fa presente che, utilizzando la strategia di *ends-out targeting*, alcune sequenze esogene permangono nel locus target, anche dopo la rimozione del gene marker; quest'ultimo può essere rimosso solo se progettato in modo tale da includere siti di riconoscimento per la endonucleasi Cre-I.

Ne deriva che, se risulta necessaria una delezione precisa del locus target, è preferibile utilizzare il metodo di tipo "*ends-in*" (Gong & Golic, 2004).

EFFICIENZA DEL TARGETING

Negli studi finora condotti, il *gene targeting* si verifica, in *Drosophila melanogaster*, con una efficienza che varia da un evento ogni 500 gameti, fino ad un evento ogni 30.000 gameti (Rong *et al.*, 2002).

Diversi parametri possono incidere sulla efficienza del targeting.

Un aspetto cruciale sembra essere il grado di omologia tra costrutto donatore e locus target. Benché non siano stati ancora condotti studi sistematici sulla relazione tra efficienza di targeting ed estensione della regione di omologia, si ritiene che la regione di omologia si debba estendere per almeno 6 Kilobasi (Rong *et al.*, 2002).

Inoltre, l'efficienza del targeting può variare a seconda del locus target; a tale proposito, è stata ipotizzata una relazione tra grado di trascrizione e frequenza di ricombinazione in una certa regione (Gong & Golic, 2004).

Infine, il targeting è risultato molto più efficiente nelle cellule germinali femminili. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che i maschi di *Drosophila melanogaster* non subiscono ricombinazione meiotica. Sulla base di questa osservazione, la ricerca degli eventi di targeting viene effettuata unicamente nelle femmine.

TILLING

Il *Tilling* (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) è una tecnica di genetica inversa che consiste in una tradizionale mutagenesi chimica, seguita da uno screening su larga scala, allo scopo di individuare mutazioni puntiformi.

Il *Tilling* venne inizialmente messo a punto in *Arabidopsis* da McCallum *et al.* (2000). Viste le promettenti prospettive di questa tecnica, venne in seguito fondato il progetto ATP (*Arabidopsis Tilling project*, Till *et al.*, 2003), oggi esteso anche ad altri organismi (*Seattle Tilling project*, STP), quali, ad esempio, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Zebrafish* e topo (Gilchrist *et al.*, 2006; Bentley *et al.*, 2000; Wienholds *et al.*, 2003; Smits *et al.*, 2004).

Inoltre, il *Tilling* trova attualmente ampia applicazione in numerose piante da coltura, date le possibili ricadute in ambito agroindustriale.

In particolare, per *Drosophila melanogaster*, è stato attivato, a partire dal 2003, il servizio “*Fly-TILL*” (<http://tilling.fhcrc.org:9366>) che consente di screenare, per una specifica regione di interesse, 5600 (cromosoma 2) e 6000 (cromosoma 3) linee mutagenizzate.

Il protocollo di *Tilling* attualmente utilizzato in *Drosophila melanogaster* si articola come di seguito riportato (Till *et al.*, 2003):

1. Mutagenizzazione di linee di *Drosophila melanogaster* mediante l’etilmetansulfonato (EMS), mutagene chimico a bassa specificità di target, in grado di generare un’alta densità di mutazioni puntiformi. L’EMS agisce producendo O-6-etilguanina che, accoppiandosi con T, ma non con C, porta alla sostituzione della coppia G/C con la coppia A/T; per questo si osserva una forte prevalenza di mutazioni da G/C ad A/T.
2. Creazione di una libreria di linee mutate, isogenizzate per il cromosoma 2 o 3, che vengono mantenute come stock bilanciati.
3. Screening della libreria, per una specifica regione target, mediante la strategia “nested-PCR/Cel-I” (Wienholds *et al.*, 2003) (figura 4.12). Tale sistema, adottato per la sua applicabilità su larga scala, consiste nella generazione, mediante nested-PCR, di ampliconi marcati con fluorofori differenti alle due estremità. Tali prodotti, denaturati e rinaturati in modo da generare eteroduplex, vengono in seguito sottoposti a taglio enzimatico dei *mismatch*, ad opera della endonucleasi CelI. I frammenti così ottenuti vengono separati mediante elettroforesi denaturante su gel di poliacrilammide. Durante la corsa elettroforetica, i fluorofori utilizzati per marcare le molecole di DNA (IRDye700 e IRDye800) vengono eccitati e l’emissione nell’infrarosso viene rilevata con un apparato ad elevata sensibilità (LI-COR, Lincoln, NE; Middendorf *et al.*, 1992). La scansione dei gel sottoposti a corsa elettroforetica permette di ricostruire immagini altamente precise nelle quali è possibile riconoscere, sulla base della dimensione dei frammenti ottenuti, la presenza di eventuali mutazioni.
4. Sequenziamento delle mutazioni ed individuazione dei ceppi di *Drosophila* corrispondenti.

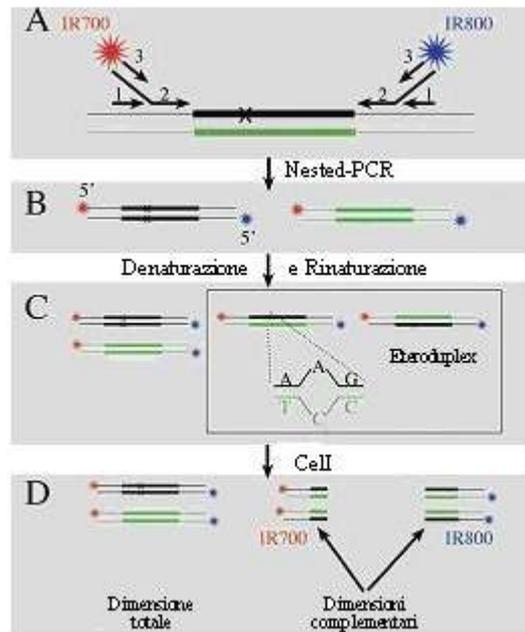


Figura 4.12 Tilling: screening delle librerie mutagenizzate mediante strategia “nested-PCR/Cel-I”. A) Nested-PCR a tre passaggi (1, 2, 3): il primo passaggio prevede l’utilizzo di primer specifici per il gene target (1); il prodotto della prima reazione serve da template per amplificazioni mediante primer interni all’amplicone (2) o legati ai fluorofori IRDye700 e IRDye800 (3). B) In questo modo l’amplicone presenta le due estremità marcate in maniera differente. C) Il prodotto di PCR marcato viene denaturato e rinaturato in modo da generare eteroduplex. D) Digestione enzimatica dei *mismatch*; la presenza di una mutazione determina la formazione di due frammenti marcati aventi dimensioni complementari la cui somma corrisponde a quella dell’amplicone target. Immagine modificata da Winkler *et al.*, 2005.

E’ stato stimato che, con il protocollo descritto, si induce una sostituzione da G/C ad A/T ogni 300 Kilobasi circa. Inoltre, per un tipico gene di interesse, e per una libreria costituita da 3000 linee mutagenizzate, la probabilità di trovare almeno una mutazione deleteria è pari al 98% (Winkler *et al.*, 2005).

Tra le mutazioni a localizzazione esonica, solo una piccola percentuale (circa il 5%) è in grado di determinare la formazione di una proteina tronca; le mutazioni indotte sono, invece, per la maggior parte, mutazioni missense che possono generare alleli nulli, alleli condizionali o alterare specifici domini proteici. Le serie alleliche generate in questo modo possono essere utili per comprendere la funzione del gene di interesse.

CAPITOLO 5

SCOPO DELLA TESI

SCOPO DELLA TESI

La complessità delle malattie mitocondriali, sotto il profilo sia clinico che molecolare, rende necessario, per lo studio di tale patologie, il ricorso a modelli animali che ne riproducano *in vivo* i meccanismi patogenetici.

La Encefalopatia Etilmalonica è una rara malattia mitocondriale autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene umano *Ethel*.

La proteina ETHE1 è, presumibilmente, un enzima ad attività tioesterasica che agisce, nella matrice mitocondriale, su un substrato non ancora identificato. Le gravi conseguenze dovute al malfunzionamento della proteina ETHE1 indicano un importante ruolo di tale prodotto genico nel metabolismo energetico mitocondriale (Tiranti *et al.*, 2004).

Lo scopo del presente lavoro di tesi consiste nella definizione di un modello, in *Drosophila melanogaster*, nel quale la funzionalità della proteina dETHE1 risulti compromessa, rendendo così possibile lo studio dei meccanismi fisiologici alla base dell'insorgenza della Encefalopatia Etilmalonica. Sono state adottate le seguenti strategie, basate sulle principali tecniche di genetica inversa attualmente disponibili:

- *double-stranded RNA interference* che consente di valutare gli eventuali effetti fenotipici indotti dal silenziamento post-trascrizionale del gene CG30022 (d*Ethel*), omologo, in *Drosophila melanogaster*, del gene umano *Ethel*;
- *gene targeting* che, sfruttando i meccanismi endogeni della ricombinazione omologa, permette di ottenere il knockout di uno specifico gene di interesse (Xie & Golic, 2004);
- *tilling*, per studiare eventuali effetti deleteri sulla funzionalità proteica causati da singole mutazioni nel gene d*Ethel*.

Infine, attingendo alla banca dati disponibile in *Flybase*, è stato possibile selezionare linee di *Drosophila melanogaster* caratterizzate dalla presenza di un elemento trasponibile nel gene d*Ethel*, in grado di comprometterne l'espressione a livello trascrizionale e/o traduzionale.

La sindrome di Leigh è una grave encefalopatia mitocondriale causata, in prevalenza, da mutazioni nel gene umano *Surf1*.

Si ipotizza che la proteina SURF1, localizzata nella membrana interna dei mitocondri, sia implicata nella biogenesi della citocromo c ossidasi (Tiranti *et al.*, 1999).

Recentemente, è stato caratterizzato un modello di *D. melanogaster* per lo studio della sindrome di Leigh, nel quale è possibile indurre il silenziamento post-trascrizionale, via dsRNAi, del gene CG9943 (d*Surf1*), omologo del gene umano *Surf1* (Zordan *et al.*, 2006).

Allo scopo di dimostrare che le alterazioni fenotipiche indotte dall'RNAi sono dovute ad un silenziamento specifico del gene target, si è adottato il metodo denominato "*trans-complementation by a synthetic gene*" (Kumar *et al.*, 2006).

Tale strategia prevede la progettazione di un gene sintetico che sia in grado di codificare la proteina espressa dal gene silenziato via dsRNAi, utilizzando codoni sinonimo differenti.

Sono state quindi prodotte e caratterizzate linee transgeniche di *D. melanogaster* nelle quali è possibile indurre, mediante il sistema UAS-GAL4, l'abbattimento post-trascrizionale di *dSurf1* e la simultanea espressione di un gene sintetico, denominato *dSurf1*-sinonimo, in grado di codificare per la proteina dSURF1.

In questo modo, il gene sintetico, sfuggendo al macchinario dell'RNAi, dovrebbe determinare complementazione del fenotipo *knockdown*, se quest'ultimo non è causato da effetti "off-target".

PARTE I

dEthe1

CAPITOLO 6
MATERIALI e METODI

CLONAGGIO DIREZIONATO

PROTOCOLLI GENERALI

CEPPI, SOLUZIONI E MATERIALI UTILIZZATI

CELLULE DI *E. coli* XLI-BLUE-MRA:

$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR mrr)$ 173
endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac-
F'[*proAB+lacI^q lacZDM15 Tn10(Tet^R)*]

IPTG

Isopropil β -D-1-tiogalactopiranoside
0.16 mM

CELLULE DI *E. coli* TOP10F':

F' {*lacIq Tn10 (TetR)*} *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-$
*mcrBC) $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1$
araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL
(StrR) *endA1 nupG**

X-Gal

5-Bromo-4-cloro-3-indolil β -D
galatopiranoside
80 mg/l

CELLULE *Epicurian coli*[®] SURE[®]

e14' (*McrA*) $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171
endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB
recJ sbcC umuC: Tn5 (Kan^r) uvrC [F' *proAB*
lacI^q\Delta(M15 Tn10 (Tet^r)]

AMPICILLINA

50 mg/l

KANAMICINA

50 mg/l

CLORAMFENICOLO

50 mg/ml

LB

1% Bactotripton
0.5% Estratto di lievito
1% NaCl

TE

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
1 mM EDTA

LB SOLIDO

LB
2% Agar

LOADING BLUE 6X

Tris-HCl 10 mM
Blu di bromofenolo 0.03%
EDTA 60 mM

SOLUZIONE A

50 mM Tris-HCl pH 8.0
4% TritonX-100
2.5 M LiCl
62.5 mM EDTA

Sol 1

50 mM glucosio
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA pH
Glicerolo 60%

TAE (Tris-Acetato-EDTA)

40 mM Tris-acetato
10 mM EDTA

Sol 2

0.2 N NaOH
1% SDS

STE

0.1 M NaCl
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA pH 8

Sol 3

4 M Kac
10 M HAc

PREPARAZIONE DELLE MOLECOLE DI DNA MEDIANTE RESTRIZIONE ENZIMATICA

Mediante il processo noto come clonaggio direzionato è possibile inserire in un dato vettore di clonazione un frammento di DNA esogeno secondo la direzione desiderata; in particolare, vettore e frammento vengono sottoposti a digestione enzimatica con gli stessi enzimi di restrizione, in modo tale che ciascuna molecola presenti estremità coesive differenti. Per allestire una reazione di restrizione enzimatica sono richiesti i seguenti reagenti:

- DNA in quantità compresa tra 0.5 e 3 µg;
- enzima di restrizione, ad una concentrazione finale di 10 U/µl;
- buffer 10x specifico per l'enzima;
- BSA 100 µg/ml, quando previsto;
- H₂O bidistillata Milli-Q fino a volume di 50 µl.

Per impedire la ricircularizzazione di un vettore linearizzato, può essere effettuato un trattamento con l'enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, USB®); tale enzima rimuove il gruppo 5' fosfato del plasmide digerito, essenziale per la sua ricircularizzazione.

Di seguito viene riportata la composizione della miscela di reazione:

- | | |
|---|--------|
| - DNA: | 5-3 µl |
| - SAP (1 U/µl): | 1 µl |
| - Buffer 10x specifico per la SAP: | 5 µl |
| - H ₂ O bidistillata Milli-Q fino a volume di: | 50 µl |

La reazione di defosforilazione viene fatta avvenire a 37°C per circa 30 minuti.

SEPARAZIONE DELLE MOLECOLE DI DNA MEDIANTE ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO

La separazione dei prodotti di digestione viene effettuata mediante elettroforesi su gel di agarosio; il gel viene preparato aggiungendo all'agarosio, sciolto in un volume appropriato di TAE 1x, una quantità di bromuro di etidio pari a 0.5 µg/ml. I campioni, mescolati con Loading Blue 1x, vengono caricati nei pozzetti del gel di agarosio insieme ad marcatore di peso molecolare, in un volume pari a 200 ng. In seguito, si effettua una migrazione elettroforetica in un apposito apparato riempito con una soluzione tampone TAE 1x. A corsa ultimata, il gel viene osservato ai raggi UV di un transilluminatore, così da poter visualizzare il DNA in bande rosso-arancio.

ESTRAZIONE DEL DNA DA GEL DI AGAROSIO

L'estrazione del DNA da gel di agarosio è stata effettuata con il kit "QIAGEN-Gel Extraction Kit (Qiagen®)", secondo il protocollo di seguito riportato.

1. Le bande di interesse vengono tagliate dal gel d'agarosio e sciolte a 50°C in un volume di Buffer QG pari e tre volte il loro peso.

2. Si aggiunge un isovolume di isopropanolo e si mescola per inversione.
3. La soluzione viene caricata nella colonnina in dotazione e centrifugata per un minuto a 13000 rpm.
4. Allo scopo di eliminare eventuali tracce di agarosio, si aggiungono 500 μ l di buffer QG e si centrifuga per un minuto.
5. Si effettua un lavaggio con 750 μ l di buffer PE e si centrifuga per un minuto.
6. Si aggiungono 50 μ l di buffer EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8.5) o H₂O e si eluisce il DNA centrifugando per un minuto a 13000 rpm.

REAZIONE DI LIGAZIONE

Per una reazione di ligazione sono richiesti i seguenti reagenti:

- DNA inserto:	50-500 μ g
- DNA vettore:	50-500 μ g
- Enzima T4 DNA Ligasi (PROMEGA [®]) (3 U/ μ l):	1.5 μ l
- Buffer 10x (PROMEGA [®]) specifico per la T4 Ligasi:	1.5 μ l
- H ₂ O milliQ fino a volume di:	15 μ l

La reazione di ligazione (4°C, over-night) viene precipitata a -80°C per 15 minuti dopo l'aggiunta di NaCl 0.1 M, 1 μ l di tRNA 25 ng/ μ l e 2-3 volumi di etanolo 100%. In seguito, si centrifuga per 15 minuti e si lava con etanolo 80%. Il pellet viene risospeso in 10 μ l di H₂O milliQ.

PREPARAZIONE DELLE CELLULE PER ELETTROPORAZIONE

Le cellule di *E.coli* possono essere rese competenti alla trasformazione per elettroporazione in seguito ad uno specifico trattamento che permette sia di concentrarle in una densa sospensione, sia di eliminare gran parte degli elettroliti presenti in coltura.

1 ml di una coltura di *E.coli* in fase stazionaria viene inoculato in 1 lt di LB liquido, in presenza degli opportuni antibiotici. Le cellule vengono lasciate crescere in agitazione, a 37°C, fino alla fase logaritmica, che corrisponde ad un valore di densità ottica compreso tra 0.4 e 0.5, determinato mediante lettura allo spettrofotometro ($\lambda=600$ nm). La coltura viene sottoposta a centrifugazione (2500 g; 4°C; 15 min); il pellet ottenuto viene risospeso in 1 lt di H₂O deionizzata sterile (pre-raffreddata) e quindi nuovamente centrifugato. Segue un ulteriore ciclo di risospensione, in 0.5 lt di H₂O deionizzata sterile, e centrifugazione. Successivamente, i batteri, risospesi in 20 ml di glicerolo 10% (pre-raffreddato), vengono centrifugati; le cellule ottenute, risospese in 2 ml di glicerolo 10%, possono essere aliquotate, con un volume pari a circa 40 μ l, in provette eppendorf. I campioni vengono congelati per immersione in azoto liquido e conservati a -80°C.

TRASFORMAZIONE BATTERICA PER ELETTROPORAZIONE

L'elettroporazione permette di formare pori nella parete batterica consentendo l'entrata del DNA esogeno, mediante l'applicazione di un campo elettrico ad alto

voltaggio (1.8 KV/cm) e per breve tempo (circa 5 millisecondi). La procedura prevede l'aggiunta di 5 µl di DNA plasmidico ad un'aliquota di 40 µl di batteri *E. coli* del ceppo XL1-Blue. In seguito, i batteri, trasferiti in apposite cuvette, vengono sottoposti ad elettroporazione mediante l'elettroporatore *E. coli Pulser Transformation Apparatus* (BioRad®). Dopo l'aggiunta di 1 ml di LB privo di antibiotico, i batteri vengono incubati per circa un'ora, in agitazione, a 37°C, così da permettere l'espressione della resistenza. In seguito, un'aliquota di soluzione viene piastrata, a diluizioni crescenti, in LB solido contenente l'opportuno antibiotico; le piastre vengono incubate a 37°C per una notte.

TRASFORMAZIONE BATTERICA MEDIANTE HEAT-SHOCK

La trasformazione batterica mediante *heat-shock* è stata utilizzata nel caso di clonaggio diretto di un prodotto di amplificazione, effettuato mediante il "TOPO TA Cloning®" kit (INVITROGEN®). La procedura di utilizzo prevede l'aggiunta di un'aliquota della miscela di ligazione ad opportune cellule competenti (*E. coli* TOP10F'). Le cellule, incubate in ghiaccio per 5-30 minuti, vengono sottoposte ad uno shock termico di 30 secondi, a 42°C e trasferite immediatamente in ghiaccio. Dopo l'aggiunta di 250 µl di LB, i batteri vengono incubati, in agitazione, a 37°C per circa un'ora, così da permettere l'espressione della resistenza. Un'aliquota di soluzione batterica viene prelevata e piastrata su terreno LB solido contenente l'opportuno antibiotico; infine, le piastre vengono incubate a 37°C per una notte.

MINIPREP DI DNA PLASMIDICO (SPEEDPREP)

Mediante la tecnica delle "*speedprep*" è possibile estrarre DNA plasmidico molto velocemente e con un grado di purezza sufficiente per realizzare delle mappe di restrizione. Colonie indipendenti cresciute in terreno selettivo vengono fatte crescere in circa 4 ml di terreno liquido selettivo a 37°C, in agitazione per circa 16 ore. Le colture batteriche vengono quindi raccolte in aliquote di circa 1.5 ml e centrifugate a 14000 rpm per 2 minuti; il pellet viene poi risospeso in 100 µl di Soluzione A che permette la lisi della parete batterica. Dopo l'aggiunta di 100 µl di fenolo-cloroformio (1:1), la soluzione viene centrifugata a 13000 rpm per 7 minuti. In questo modo il DNA viene separato dalle proteine e dalla carcasse dei batteri: gli acidi nucleici restano nella fase acquosa superiore, mentre le proteine vengono raccolte in quella inferiore, al di sotto delle pareti batteriche lisate. La fase superiore viene prelevata, precipitata in etanolo e risospesa in 10 µl di H₂O. Nel caso di procedimenti preparativi, il DNA plasmidico è stato estratto mediante l'utilizzo del kit GENELUTE™ PLASMID MINIPREP (SIGMA®). Le tappe fondamentali di questo protocollo comprendono: (i) lisi alcalina delle pareti batteriche; (ii) trasferimento del lisato in una colonnina contenente una resina che adsorbe il DNA plasmidico; (iii) eluizione del DNA con H₂O.

MAXIPREP DI DNA PLASMIDICO

La tecnica delle "*maxiprep*" (Felicciello & Chinali, 1993) è un metodo rapido ed efficiente per la preparazione su larga scala di DNA plasmidico. La procedura prevede i seguenti passaggi:

- il pellet, ottenuto dalla centrifugazione (15 minuti; 5000 rpm; 4°C) di 200 ml di coltura batterica, viene risospeso in 20 ml di STE.
- Ripetuta la centrifugazione, il pellet viene risospeso in 4 ml di Sol1 e lasciato in ghiaccio.
- Si aggiungono 8 ml di Sol2 per far avvenire la lisi alcalina, lasciata procedere per 3 minuti. Si aggiungono 12 ml di Sol3 e la soluzione viene lasciata in ghiaccio per 5 minuti.
- Il surnatante, ottenuto in seguito a centrifugazione (30 minuti; 13.000 rpm; 4°C) viene filtrato, a 4°C, attraverso un filtro di carta umido.
- Dopo l'aggiunta di isopropanolo fino ad un volume di 40 ml, si effettua una ulteriore centrifugazione (30 minuti; 10.000 rpm) ed il pellet viene risospeso in 250 µl di TE.
- Dopo l'aggiunta di 600 µl di isopropanolo 88%-0.2 M KAc e successiva centrifugazione, si effettua un lavaggio con etanolo 80%; infine, il pellet viene risospeso in 300 µl di TE.

In alternativa, è stato utilizzato il GenElute™ Plasmid Midiprep kit (SIGMA®), secondo il protocollo previsto dalla casa produttrice.

SCREENING DEI CLONI MEDIANTE RESTRIZIONE ENZIMATICA

Il DNA plasmidico ottenuto viene sottoposto a restrizioni di controllo con opportuni enzimi di restrizione, per verificare la presenza dell'inserto e valutarne l'orientamento. Di seguito viene riportata la miscela di reazione utilizzata:

- | | |
|--|----------|
| - DNA: | 0.5-2 µg |
| - Buffer 10x: | 2 µl |
| - enzima di restrizione (10 U/µl): | 2 µl |
| - RNasi H (10 U/µl): | 2 µl |
| - H ₂ O mQ fino ad un volume finale di: | 20µl |

La reazione viene incubata a temperatura e per tempi variabili a seconda dell'enzima utilizzato; tali parametri sono infatti specifici per ogni endonucleasi e sono riportati nella scheda tecnica di ciascun enzima.

SEQUENZIAMENTO

La reazione di sequenziamento viene allestita aliquotando in una provetta eppendorf da 0.2 ml una adeguata quantità di DNA e 0.64 µl di primer 10 µM Forward o Reverse. I campioni, essiccati a 70°C fino a completa evaporazione, vengono inviati al C.R.I.B.I. (Centro di Ricerche Interdipartimentali sulle Biotecnologie Innovative dell'Università di Padova), dove viene utilizzato il *Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* in un sequenziatore automatico ABI 3700 (*Applied Biosystem*). La lettura e l'analisi delle sequenze sono state effettuate tramite il programma *Seqman II*.

VETTORI UTILIZZATI

pBC[®] SK e pBS[®] SK

pBC[®]SK e pBS[®]SK sono plasmidi fagemidici che differiscono per la dimensione (pBC[®]SK: 3399 bp; pBS[®]SK: 2961 bp), per il gene che conferisce la resistenza all'antibiotico (pBC[®]SK: cloramfenicolo; pBS[®]SK: ampicillina) e per l'origine di replicazione (pBC[®]SK: origine fl (+) ed fl (-); pBS[®]SK: origine fl (+)).

In particolare, tali vettori sono caratterizzati da:

- origine fl (+): origine di replicazione del fago filamentoso fl che permette il ritrovamento del filamento “senso” del gene *LacZ*;
- origine fl (-): origine di replicazione del fago filamentoso fl, che permette il ritrovamento del filamento “antisenso” del gene *LacZ*;
- origine ColE1: origine di replicazione plasmidica, usata in assenza del fago helper;
- gene *LacZ* (promotore *lac*): questa porzione del gene *LacZ* permette l' α -complementazione per la selezione bianco-blu dei fagemidi ricombinanti;
- un sito polylinker fiancheggiato dai promotori per le RNA polimerasi T3 e T7 e posto all'interno del gene *LacZ*.

pCR[®] II-TOPO

Il vettore pCR[®] II-TOPO (3973 nucleotidi) è caratterizzato dalle seguenti sequenze:

- origine fl (+);
- un sito polylinker fiancheggiato dai promotori per le RNA polimerasi Sp6 e T7, posto all'interno del gene *LacZ*;
- gene *LacZ* (promotore *lac*) che permette l' α -complementazione per la selezione bianco-blu;
- siti di annealing per i primer M13 reverse e forward, all'interno del gene *LacZ*;
- l'origine di replicazione pUC;
- i geni per la resistenza all'ampicillina ed alla kanamicina.

pP[UAST]

Il vettore pP[UAST] (9050 bp) appartiene alla famiglia dei plasmidi pUC e gli elementi principali che lo caratterizzano sono:

- l'allele selvatico del gene *white* (w^+) che funge da marcatore negli individui trasformati, i cui occhi risultano rossi; questo gene, denominato anche “mini *white*” è stato ridotto nelle dimensioni mediante rimozione del V introne (2.7 Kb);
- le sequenze degli elementi P di *Drosophila melanogaster* che fungono da veicolo per il trasferimento di geni all'interno del genoma ricevente;
- l'origine di replicazione di *Escherichia coli* (ori);
- un gene per la resistenza all'ampicillina;
- il TATA box di *Escherichia coli*, sotto il controllo del promotore *hsp70*;
- la sequenza di lievito UAS (*upstream activation sequence*) che fornisce il sito di legame con GAL4 ed induce la trascrizione del costrutto;

- la sequenza SV40, che dà il segnale di terminazione della trascrizione;
- un sito di policlonaggio, posto tra il TATA box ed il sito di terminazione.

pTV2

Il vettore pTV2 (10800 bp) è un plasmide di recente creazione, prodotto da Xie & Golic (2004) a partire dal progenitore pP{FRT(w^{hs})}.

pTV2 è stato progettato in modo tale da contenere le componenti necessarie per la generazione della molecola ricombinogena, quali:

- gene marker w^{hs} ;
- sito di riconoscimento per la endonucleasi I-CreI a monte del gene w^{hs} ;
- 2 sequenze FRT lunghe 34 pb e dotate di direzionalità;
- siti di restrizione unici per NotI e KpnI, necessari per l'inserzione del costrutto donatore;
- il gene per la resistenza all'ampicillina.

ALLESTIMENTO DEL COSTRUTTO pP[UAST] 5'-dEthe1-3'/GFP/3'-dEthe1-5'

Nel vettore pP[UAST] è stata inserita una porzione della sequenza codificante il gene *dEthe1*, clonata in modo da ottenere due ripetizioni invertite e separate da uno spaziatore. Il linker spaziatore è costituito da un frammento di circa 300 bp della proteina *Green Fluorescent Protein* (GFP), assente nel genoma di *Drosophila*. Tale organizzazione si è rivelata indispensabile perché i plasmidi che contengono due ripetizioni invertite adiacenti sono letali per i batteri usati nei clonaggi (Hagan & Warren, 1983).

La strategia utilizzata per assemblare il costrutto pP[UAST] 5'-*dEthe1*-3'/GFP/3'-*dEthe1*-5' può essere riassunta come di seguito riportato:

1. amplificazione di un frammento del gene di interesse a partire da cDNA del ceppo selvatico Oregon-R di *Drosophila*;
2. clonaggio nel vettore pCR[®] II-TOPO[®];
3. trasferimento dei frammenti clonati in pCR[®] II-TOPO[®] nel vettore pBC[®] SK;
4. unione del linker (GFP) e dei frammenti, orientati in direzione opposta;
5. clonaggio della sequenza 5'-*dEthe1*-3'/GFP/3'-*dEthe1*-5' nel vettore pP[UAST].

Tale strategia è stata utilizzata per allestire due differenti costrutti pP[UAST] 5'-*dEthe1*-3'/GFP/3'-*dEthe1*-5' che differiscono per la presenza (UAS-*dEthe1*+introne-IR) o meno (UAS-*dEthe1*-IR) dell'introne I nella regione clonata. Di seguito vengono illustrati per esteso i vari passaggi, schematizzati in figura 6.1.

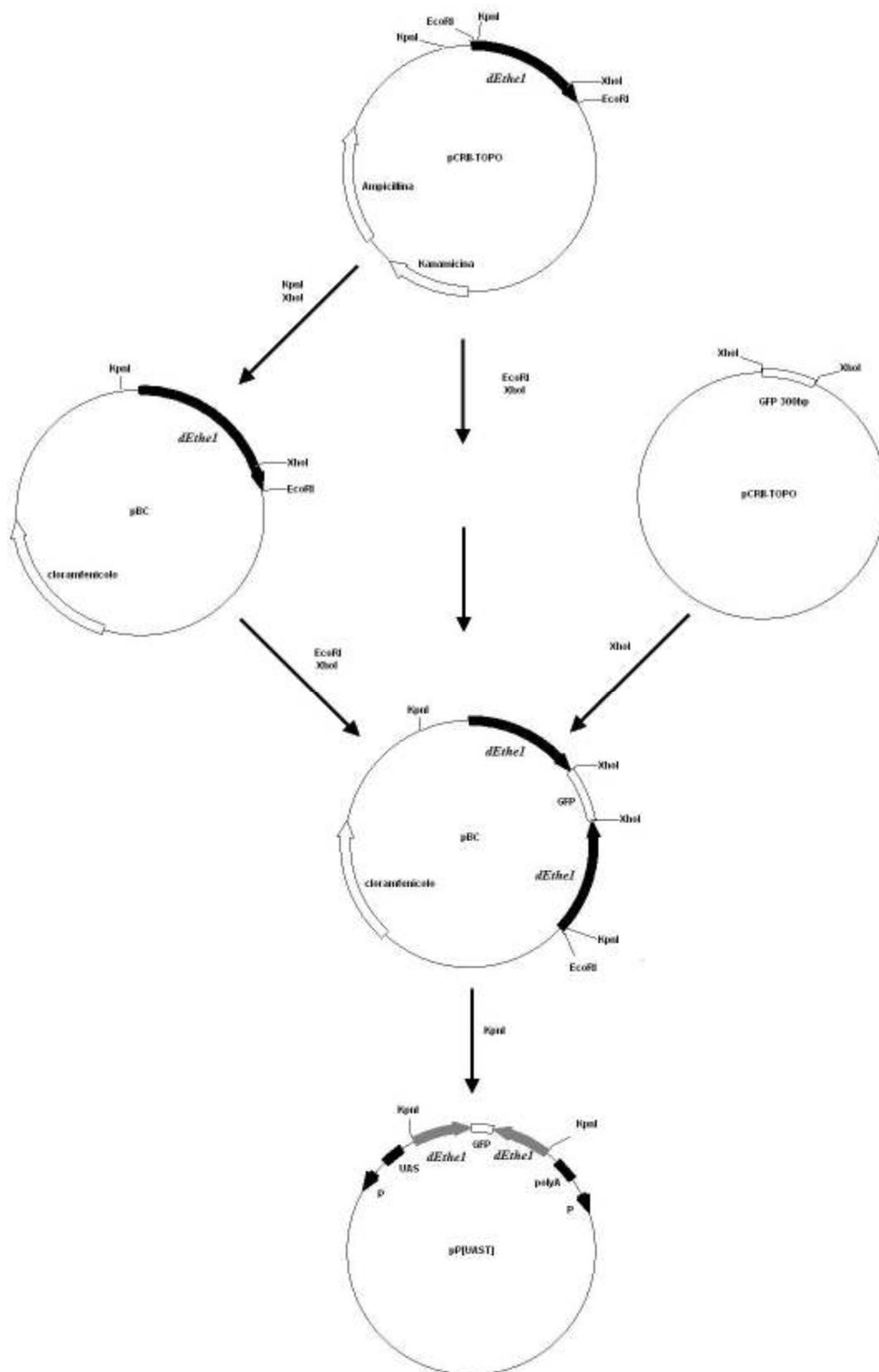


Figura 6.1: Schema dei clonaggi necessari per ottenere il costrutto pP[UAST] 5'-*dEthel1*-3'/GFP/3'-*dEthel1*-5'.

AMPLIFICAZIONE E CLONAGGIO DELLA SEQUENZA

La sequenza stampo del gene *dEthel1*, utilizzata per sintetizzare il costrutto pP[UAST] 5'-*dEthel1-3'*/GFP/3'- *dEthel1-5'*, è stata amplificata a partire da cDNA del ceppo selvatico Oregon-R di *Drosophila*, con l'uso della seguente coppia di primer, disegnati sulla base della sequenza nucleotidica depositata:

dEthel1-5': 5'-GGAATTCAACCCCCCACCTTGGTCAGTAACATCCG-3'
dEthel1-3': 5'-CCGCTCGAGCTCTTCAATATCCTTAGTCAGTCTGGGG-3'

La miscela di reazione ed il programma di amplificazione utilizzati sono di seguito riportati:

Miscela di reazione:

- cDNA (20 ng/μl):	1.0 μl
- Buffer 10×:	2.0 μl
- MgCl ₂ (50 mM):	2.0 μl
- dNTPs (10 mM):	0.5 μl
- Primer Forward (10 μM):	1.0 μl
- Primer Reverse (10 μM):	1.0 μl
- Taq (2 U/μl):	0.4 μl
- H ₂ O:	11.9 μl

Programma di amplificazione:

- Denaturazione iniziale:	5 min a 94°C	} 30 cicli
- Denaturazione:	30 sec a 94°C	
- Annealing:	30 sec a 65°C	
- Allungamento:	1 min a 72°C	
- Allungamento finale:	10 min a 72°C	

Il prodotto di questa amplificazione è stato inserito nel vettore pCR[®] II-TOPO[®], ingegnerizzato per ottimizzare il clonaggio dei frammenti ottenuti con PCR, seguendo il protocollo fornito dalla casa di produzione (Invitrogen[®]). Il frammento clonato è stato sottoposto a sequenziamento.

TRASFERIMENTO DEL FRAMMENTO 5'-*dEthel1-3'* NEL VETTORE PBC[®] SK

Il frammento 5'-*dEthel1-3'*, che costituisce la prima ripetizione, è stato estratto dal vettore pCR[®] II-TOPO[®] 5'-*dEthel1-3'* mediante digestione enzimatica con gli enzimi XhoI e KpnI.

Il vettore pBC[®] SK è stato linearizzato con gli enzimi XhoI e KpnI ed in seguito defosforilato mediante trattamento con Fosfatasi alcalina.

Vettore ed inserto sono stati purificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e recuperati dal gel utilizzando il kit "QIAEX II Agarose Gel Extraction (QIAGEN[®])".

In seguito, sono stati sottoposti ad una reazione di ligazione, condotta over-night a 4°C, in 15 μl finali:

- Frammento (5 ng/μl):	6 μl
- Plasmide (100 ng/μl):	3 μl
- Buffer 5×:	3 μl
- T4 DNA ligasi (1U/μl):	1 μl
- H ₂ O:	8 μl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare batteri competenti. Il plasmide pBC[®] SK 5'-d*Ethel*-3' è stato purificato mediante il "Plasmid Midi Kit" (QIAGEN[®]).

UNIONE DEI SEGMENTI RIPETUTI CON IL LINKER SPAZIATORE

Il vettore pBC[®] SK 5'-d*Ethel*-3' è stato linearizzato con gli enzimi XhoI ed EcoRI che tagliano, rispettivamente, nella porzione 3' del frammento d*Ethel* e nel polylinker, a valle rispetto al sito di riconoscimento per XhoI.

Dopo le digestioni enzimatiche, il DNA è stato defosforilato con Fosfatasi alcalina e sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio, allo scopo di rimuovere i frammenti terminali generati dalla digestione e le molecole di vettore non linearizzato. Il DNA è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

Il frammento 3'-d*Ethel*-5' è stato estratto dal vettore pCR[®] II-TOPO[®] 5'-d*Ethel*-3' mediante gli enzimi XhoI ed EcoRI. Dopo le digestioni, il DNA è stato sottoposto a corsa elettroforetica su gel di agarosio, allo scopo di separare il frammento dal vettore. Il frammento d*Ethel* è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

Il frammento del gene della GFP, precedentemente preparato ad una concentrazione di 5 ng/μl, contiene, ad entrambe le estremità, un sito di riconoscimento per l'enzima XhoI, aggiunto mediante l'utilizzo di specifici primer (GFPX5: 5'-GTGTCGCCCTCGAGCTTCAC-3'; GFPX3: 5'-CATCCTGCTCGAGCTGGACG-3').

Le due ripetizioni invertite sono state unite al linker di GFP con una reazione di ligazione condotta in 15 μl finali (16°C over-night). La miscela di reazione viene indicata in seguito:

- pBC 5'- d <i>Ethel</i> -3' (50 ng/μl):	2 μl
- 3'- d <i>Ethel</i> -5' XhoI-EcoRI (30 ng/μl):	2.5 μl
- Spaziatore (5 ng/μl):	5 μl
- Buffer 10×:	1.5 μl
- T4 DNA ligasi (1 U/μl):	1 μl
- H ₂ O:	3 μl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare batteri competenti del ceppo *Epicurian coli*[®] SURE[®] (STRATAGENE[®]) che è ottimizzato per aumentare la stabilità del DNA contenente ripetizioni invertite, favorendo il clonaggio di tali sequenze.

Il plasmide pBC[®] SK 5'-d*Ethel*-3'/GFP/3'- d*Ethel*-5' è stato purificato mediante l'utilizzo del kit GENELUTE[™] PLASMID MINIPREP (Sigma[®]).

TRASFERIMENTO DI 5'-dEthe1-3'/GFP/3'- dEthe1-5' NEL VETTORE DI INIEZIONE pP[UAST]

L'inserto 5'-dEthe1-3'/GFP/3'- dEthe1-5' è stato subclonato nel vettore pP[UAST], a livello del sito KpnI.

Il plasmide pP[UAST] è stato linearizzato con KpnI e sottoposto a defosforilazione con Fosfatasi alcalina. In seguito, il plasmide è stato purificato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio ed estratto da gel mediante il kit "Qiaex II" (QIAGEN®).

L'inserto 5'-dEthe1-3'/GFP/3'- dEthe1-5' è stato estratto dal vettore pBC® SK mediante l'utilizzo della endonucleasi di restrizione KpnI; inoltre, per evitare contaminazioni del vettore pBC® SK, il plasmide è stato tagliato in due frammenti, di circa 3000 e 1400 pb, mediante digestione con l'enzima ScaI. Il DNA, sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio; è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN®). Il frammento 5'-dEthe1-3'/GFP/3'- dEthe1-5' è stato inserito nel plasmide con la seguente reazione di ligazione, condotta in 15 µl finali (4°C, over-night):

- Frammento (40 ng/µl):	4 µl
- Plasmide (200 ng/µl):	1 µl
- Buffer 10×:	1.5 µl
- T4 DNA ligasi (1 U/µl):	1 µl
- H ₂ O:	7.5 µl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata usata per trasformare batteri competenti ceppo *Epicurian coli*® SURE® (STRATAGENE®). Il plasmide con il costrutto finale è stato purificato utilizzando il GenElute™ Plasmid Midiprep kit (Sigma®).

ALLESTIMENTO DEL COSTRUTTO RICOMBINOGENO pTV2(A+C)

Allo scopo di allestire il costrutto donatore ricombinogeno, sono state introdotte nel vettore pTV2 le regioni di DNA che fiancheggiano, a monte (A) e a valle (C), il gene CG30022.

La regione A e la regione C si estendono, rispettivamente, per circa 7.2 Kb e 4.2 Kb a monte e a valle rispetto al gene da sottoporre a delezione.

Le regioni A e C scelte per l'allestimento del costrutto donatore sono state suddivise in frammenti più piccoli (A₁: 1700 bp; A₂: 1600 bp; A₃: 2400 bp; A₄: 2400 bp; C₁: 2100 bp; C₂: 2100 bp), in modo tale da facilitarne l'amplificazione ed il successivo clonaggio.

La strategia utilizzata per assemblare il costrutto può essere riassunta nei seguenti punti:

- amplificazione dei frammenti (A₁, A₂, A₃, A₄, C₁, C₂) e clonaggio nel vettore pCR® II-TOPO®;
- subclonaggio, in pBS® SK, dei frammenti A₁+A₂;
- unione, in pCR® II-TOPO®, dei frammenti A₃+A₄;
- unione, in pCR® II-TOPO®, dei frammenti C₁+C₂;

- subclonaggio dei frammenti A₁+A₂ ed A₃+A₄ nel vettore pBS[®] SK;
- subclonaggio dei frammenti A₁+A₂+A₃+A₄ nel vettore pBC[®] SK;
- clonaggio dei frammenti C₁+C₂ nel vettore pBC[®] SK A₁+A₂+A₃+A₄;
- trasferimento di A₁+A₂+A₃+A₄+C₁+C₂ dal vettore pBC[®] SK al vettore pTV2.

Di seguito vengono illustrati per esteso i vari passaggi, schematizzati in figura 6.2.

AMPLIFICAZIONE E CLONAGGIO DEI FRAMMENTI A₁, A₂, A₃, A₄, C₁ e C₂

I singoli frammenti A₁, A₂, A₃, A₄, C₁ e C₂ sono stati amplificati, a partire da DNA genomico estratto da moscerini adulti OregonR, mediante una polimerasi ad alta fedeltà, EXPAND[™] HIGH FIDELITY PCR SYSTEM (ROCHE[®]) che utilizza una miscela di Taq DNA polimerasi e Pwo DNA polimerasi. Le attività 5'-3' polimerasica della Taq e 3'-5' "proofreading" della Pwo garantiscono una elevata efficienza di polimerizzazione ed un' alta fedeltà di replicazione. L'amplificazione è stata condotta seguendo le istruzioni della ditta fornitrice:

- DNA genomico (50 ng/μl):	1 μl
- Buffer 10×:	5 μl
- dNTPs (10 mM):	1 μl
- Primer Forward (10 μM):	1.5 μl
- Primer Reverse (10 μM):	1.5 μl
- Taq (2 U/μl)	0.75 μl
- H ₂ O	39.75 μl

I primer utilizzati vengono di seguito riportati:

A₁ Forward: 5'-AAGCGGCCGCTATGCCCCGAGACTAATTGCCAGTG-3'
 A₂ Reverse: 5'-GACGTCGACATTACCCTGTTATCCCTACTCCAGCATCTGTT
 TGACATGTA-3'
 A₃ Forward: 5'-ACGGTTCGACATATGGGCCCCAAACAGAGGAAGCTG-3'
 A₃ Reverse: 5'-GATATCGATTTTCGTTTCGCTCTGCC-3'
 A₄ Forward: 5'-GGCAGAGCGAAACGAAATCGATATC-3'
 A₄ Reverse: 5'-CCCTCGAGTTTGGACTCGTATTTCTATCTGATTGAGGTT-3'
 C₁ Forward: 5'-GGCTCGAGATGCCTCGCTGCCCGCCAATCGAGAG-3'
 C₁ Reverse: 5'-CGTTCGATATCCGCACAGGGGTGC-3'
 C₂ Forward: 5'-GCACCCCTGTGCGGATATCGAACG-3'
 C₂ Reverse: 5'-GATATCGATTTTCGTTTCGCTCTGCC-3'

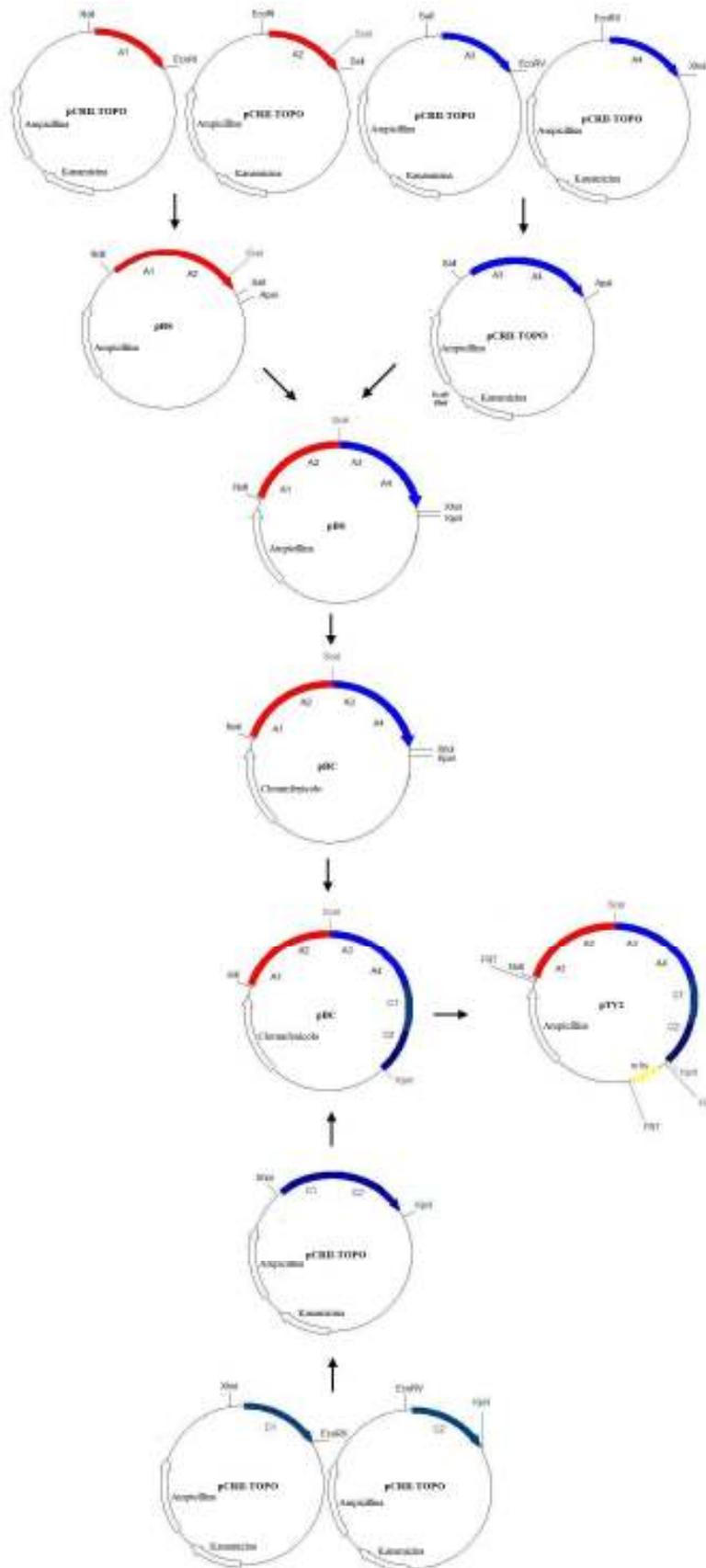


Figura 6.2: Schema dei clonaggi necessari per ottenere il costrutto ricombinogeno pTV2 (A+C).

In accordo con quanto previsto dal modello di costrutto donatore progettato da Xie e Golic (2004), è stato introdotto il sito di riconoscimento per la endonucleasi di lievito I-SceI, (5'-TAGGGATAACAGGGTAAT-3') tra il frammento A₂ ed A₃ mediante opportuna ingegnerizzazione del primer A₂ Reverse, nel quale è stato aggiunta la sequenza di interesse.

Il programma di amplificazione utilizzato per i singoli frammenti viene di seguito riportato:

A₁

- denaturazione iniziale:	94°C	2 min	} 33 cicli
- denaturazione:	90°C	1 min	
- annealing:	65°C	1 min	
- allungamento:	72°C	1min e 30 sec	
- allungamento finale:	72°C	10 min	

A₂

- denaturazione iniziale:	94°C	2 min	} 33 cicli
- denaturazione :	90°C	30 sec	
- annealing:	68°C	30 sec	
- allungamento:	72°C	2 min e 20 sec	
- allungamento finale:	72°C	10 min	

A₃, A₄

- denaturazione iniziale:	94°C	2 min	} 33 cicli
- denaturazione:	90°C	30 sec	
- annealing:	66°C	30 sec	
- allungamento:	72°C	2 min e 30 sec	
- allungamento finale:	72°C	10 min	

C₁

- denaturazione iniziale:	94°C	2 min	} 40 cicli
- denaturazione :	90°C	30 sec	
- annealing:	68°C	30 sec	
- allungamento:	72°C	2 min e 20 sec	
- allungamento finale:	72°C	10 min	

C₂

- denaturazione iniziale:	94°C	2 min	} 33 cicli
- denaturazione :	90°C	1 min	
- annealing:	68°C	1 min	
- allungamento:	72°C	2 min	
- allungamento finale:	72°C	10 min	

I prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore pCR[®]II-TOPO[®] seguendo il protocollo fornito dalla casa di produzione (Invitrogen[®]). I prodotti clonati sono stati sottoposti a sequenziamento per determinare la direzione di inserzione in pCR[®]II-TOPO[®].

UNIONE DEI FRAMMENTI A₁ ed A₂ NEL VETTORE pBC[®] SK

Il frammento A₁ è stato estratto dal plasmide pCR[®]II-TOPO[®] mediante digestione enzimatica con le endonucleasi di restrizione NotI ed EcoRI. I siti di restrizione per gli enzimi NotI ed EcoRI sono presenti alle estremità 5' e 3' del frammento A₁ in quanto precedentemente aggiunti mediante amplificazione con i primer A₁ Forward ed A₁ Reverse, opportunamente ingegnerizzati.

Il frammento A₂ è stato estratto dal plasmide pCR[®]II-TOPO[®] mediante digestione con le endonucleasi di restrizione Sall ed EcoRI. I siti di restrizione per gli enzimi Sall ed EcoRI sono presenti alle estremità 5' e 3' del frammento A₂ in quanto precedentemente aggiunti mediante amplificazione con i primer A₂ Forward ed A₂ Reverse, opportunamente ingegnerizzati.

Il vettore pBC[®] SK è stato linearizzato mediante le endonucleasi di restrizione Sall e NotI. Il vettore pBC[®] SK e gli inserti A₁ ed A₂ sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio e purificati da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]). In seguito, è stata effettuata la reazione di ligazione, condotta in 15 µl finali, per quattro ore, a temperatura ambiente:

- Frammento A ₁ (50 ng/µl):	3.2 µl
- Frammento A ₂ (60 ng/µl):	2.7 µl
- Plasmide (50 ng/µl):	2 µl
- Buffer 10×:	3 µl
- T4 DNA ligasi (1 U/µl):	1 µl
- H ₂ O:	4.6 µl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare i batteri competenti. Il plasmide con il frammento genico A₁+A₂ è stato purificato mediante il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]).

UNIONE DEI FRAMMENTI A₃ ED A₄ NEL VETTORE pCR[®]II-TOPO[®]

Il frammento A₄ è stato estratto dal plasmide pCR[®]II-TOPO[®] mediante digestione con le endonucleasi di restrizione EcoRV e XhoI. I siti di restrizione per gli enzimi EcoRV e XhoI sono presenti, rispettivamente, alle estremità 5' e 3' del frammento A₄ in quanto precedentemente aggiunti mediante amplificazione con i primer A₄ Forward ed A₄ Reverse. L'inserto è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio ed il DNA è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

Il vettore pCR[®]II-TOPO[®] (A₃) è stato linearizzato con gli enzimi EcoRV e XhoI. Il plasmide è stato quindi sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio allo scopo di rimuovere i frammenti terminali generati dalla digestione e le molecole di vettore non linearizzato. Il DNA è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

La reazione di ligazione è stata condotta in 15 µl finali, 16°C, over-night:

- Frammento (25 ng/μl):	2 μl
- Plasmide (40 ng/μl):	2 μl
- Buffer 10×:	1.5 μl
- T4 DNA ligasi (1 U/μl):	1 μl
- H ₂ O:	8.5 μl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare i batteri competenti. Il plasmide con il frammento genico è stato purificato con il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]).

UNIONE DEI FRAMMENTI C₁ e C₂ NEL VETTORE pCR[®]II-TOPO[®]

Il frammento C₁ è stato estratto dal plasmide pCR[®]II-TOPO[®] mediante digestione con le endonucleasi di restrizione EcoRV e XhoI. I siti di restrizione per gli enzimi EcoRV e XhoI sono stati precedentemente aggiunti alle estremità 5' e 3', rispettivamente, mediante amplificazione con i primer C₁ Forward ed C₁ Reverse. L'inserto è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio ed il DNA è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

Il vettore pCR[®]II-TOPO[®] (C₂) è stato linearizzato con gli enzimi EcoRV e XhoI. Il plasmide è stato quindi sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio allo scopo di rimuovere i frammenti terminali generati dalla digestione e le molecole di vettore non linearizzato. Il DNA è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

La reazione di ligazione è stata condotta in 15 μl finali, 16°C, over-night:

- Frammento (50 ng/μl):	2 μl
- Plasmide (60 ng/μl):	1.5 μl
- Buffer 10×:	1.5 μl
- T4 DNA ligasi (1 U/μl):	1 μl
- H ₂ O:	9 μl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare i batteri competenti. Il plasmide con il frammento genico è stato purificato con il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]).

SUBCLONAGGIO DEI FRAMMENTI A₃+A₄ NEL VETTORE pBS[®] SK A₁+A₂

Il frammento A₃+A₄ è stato estratto dal plasmide pCR[®]II-TOPO[®] mediante digestione con le endonucleasi di restrizione Sall ed ApaI. Inoltre, mediante digestione enzimatica con ScaI, il vettore pCR[®]II-TOPO[®] è stato tagliato in due frammenti, di circa 3000 e 1400 pb, evitando così eventuali contaminazioni plasmidiche. L'inserto è stato sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio ed il DNA è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

Il vettore PBS[®] SK A₁+A₂ è stato linearizzato con gli enzimi Sall ed ApaII e successivamente sottoposto a defosforilazione con Fosfatasi alcalina allo scopo di impedirne la ricircularizzazione. Il plasmide è stato quindi purificato mediante

elettroforesi su gel di agarosio; il DNA è stato recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

La reazione di ligazione è stata condotta in 15 µl finali, 16°C, over-night:

- Frammento A₃+A₄ (25 ng/µl): 5 µl
- Plasmide (50 ng/µl): 2 µl
- Buffer 10×: 1.5 µl
- T4 DNA ligasi (1 U/µl): 1 µl
- H₂O: 5.5 µl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare i batteri competenti. Il plasmide con il frammento genico è stato purificato usando il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]).

SUBCLONAGGIO DEI FRAMMENTI A₁+A₂+A₃+A₄ NEL VETTORE pBC[®] SK

Il frammento A₁+A₂+A₃+A₄ è stato estratto dal vettore pBS[®] SK mediante digestione con gli enzimi NotI e KpnI. Il DNA è stato quindi sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio ed in seguito recuperato con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]). Il plasmide pBC[®] SK è stato linearizzato con gli enzimi NotI e KpnI, purificato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

La reazione di ligazione (16°C, over-night) viene di seguito riportata:

- Frammento (25 ng/l): 5 µl
- Plasmide (50 ng/µl): 2 µl
- Buffer 10×: 1.5 µl
- T4 DNA ligasi (1 U/µl): 1 µl
- H₂O: 5.5µl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare i batteri competenti. Il plasmide pBC[®] SK A₁+A₂+A₃+A₄ è stato purificato mediante il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]).

SUBCLONAGGIO DEI FRAMMENTI C₁+C₂ NEL VETTORE pBC[®] SK A₁+A₂+A₃+A₄

Il frammento C₁+C₂ è stato estratto dal vettore pCR[®]II-TOPO[®] mediante gli enzimi di restrizione XhoI e KpnI. Inoltre, il vettore pCR[®]II-TOPO[®] è stato digerito con l'enzima NcoI. Tale enzima non presenta siti di riconoscimento nella sequenza di C₁+C₂ ma è in grado di digerire il vettore in due frammenti di 1900 bp e 2100 bp. In questo modo, vettore ed inserto, che altrimenti presenterebbero dimensioni simili, risultano facilmente separabili mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Il vettore pBC[®] SK A₁+A₂+A₃+A₄ è stato linearizzato mediante restrizione enzimatica con gli enzimi KpnI e XhoI.

Al termine della restrizioni enzimatiche, il vettore pBC[®] SK ed il frammento C₁+C₂ sono stati purificati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e recuperati da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

La reazione di ligazione (4°C, over-night) è stata allestita come di seguito riportato:

- DNA pBC[®] SK (80 ng/μl): 1.5 μl
- DNA C₁-C₂ (100 ng/μl): 1.5 μl
- Ligasi (3 U/μl): 1 μl
- Buffer 10x: 1.5 μl
- H₂O: 9.5 μl

I prodotti di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di batteri elettrocompetenti; il plasmide pBC[®] SK A+C è stato purificato mediante il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]).

SUBCLONAGGIO DEL FRAMMENTO A+C IN pTV2

Il frammento A+C è stato estratto dal vettore pBC[®] SK mediante digestione con gli enzimi di restrizione NotI e KpnI. Al termine della restrizioni enzimatiche, il DNA è stato purificato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e recuperato da gel con l'uso del kit "Qiaex II" (QIAGEN[®]).

Il vettore pTV2 è stato linearizzato mediante restrizione enzimatica con gli enzimi NotI e KpnI; inoltre, il vettore pTV2 è stato sottoposto a defosforilazione, mediante trattamento con Fosfatasi alcalina. Il DNA ottenuto dalla digestione enzimatica del vettore pTV2 è stato utilizzato direttamente per allestire la reazione di ligazione. La reazione di ligazione (over-night, 4°C) è stata allestita secondo quanto di seguito riportato:

- pTV2 (150 ng/μl): 1 μl
- A+C (100 ng/μl): 5 μl
- Ligasi (3 U/μl): 1 μl
- Buffer 10x: 1.5 μl
- H₂O: 6.5 μl

I prodotti di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di batteri elettrocompetenti. Il plasmide con il costrutto finale è stato purificato mediante il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]) ed utilizzato per la microiniezione in embrioni di *Drosophila*.

MICROINIEZIONE

Il costrutto pTV2 (A+C) ed il costrutto UAS-*dEthel*-IR, costruito a partire dal clone di *dEthel* privo dell'introne I, sono stati microiniettati dal servizio di microiniezione fornito dalla ditta "Bestgene" (<http://www.bestgene.com>).

Per quanto riguarda il costrutto pTV2 (A+C) ed il costrutto UAS-*dEthel*+introne-IR, allestito utilizzando il clone di *dEthel* contenente l'introne I, sono state utilizzati i protocolli di microiniezione di seguito illustrati.

PREPARAZIONE DEL DNA PER LA MICROINIEZIONE

Il DNA del costrutto UAS-*dEthel*+introne-IR e del costrutto pTV2 (A+C) sono stati precipitati in etanolo insieme al plasmide "helper", necessario per l'integrazione nel genoma ospite del plasmide di interesse.

Il costrutto da microiniettare ed plasmide "helper" sono stati risospesi in un tampone di microiniezione (Rubin & Spradling, 1982) ad una concentrazione finale di circa 600 ng/μl e 300 ng/μl, rispettivamente.

LINEE DI *Drosophila melanogaster* UTILIZZATE NEGLI ESPERIMENTI DI MICROINIEZIONE

Linea *w*¹¹¹⁸

Per la microiniezione sono stati utilizzati embrioni appartenenti al ceppo *w*¹¹¹⁸. Tale ceppo è caratterizzato da:

- *white* (*w*, 1-1.5): allele recessivo per la presenza di una ampia delezione del locus *white*, che determina il fenotipo "occhio bianco"; il gene è coinvolto nella produzione e distribuzione dei pigmenti ommocromo (marrone) e pteridina (rosso) presenti negli occhi composti e negli ocelli dell'insetto adulto.

Linea *w*; *CyO/Sco*; *MKRS/TM6B* o doppio bilanciatore

Per bilanciare le linee transgeniche e per determinare in quale cromosoma si fosse verificata l'inserzione, è stato usato il ceppo *w*; *CyO/Sco*; *MKRS/TM6B*.

Tale ceppo è caratterizzato da:

- *w*: vedi sopra
- *CyO* (*Curly of Oster*): cromosoma con inversioni multiple sovrapposte che funge da soppressore della ricombinazione nel cromosoma II. È un efficace soppressore della ricombinazione per la maggior parte del cromosoma II, in quanto solo i telomeri non sono bilanciati. È letale in omozigosi per la presenza di *Curly* (*Cy*, 2-6.1), allele dominante responsabile in eterozigosi del fenotipo "ali arricciate" che risulta letale in omozigosi.
- *Scutoid* (*Sco*, 2-51.0): allele dominante, letale in omozigosi, che provoca l'assenza di setole nello scutello.
- *TM6B*: cromosoma con inversioni multiple che funge da soppressore della ricombinazione nel cromosoma III. *TM6B* presenta i marcatori dominanti *Ultrabithorax* (*Ubx*) e *Tubby* (*Tb*) che lo rendono letale in omozigosi. In particolare, *Ubx* (3-58.8) è un allele dominante che provoca una mutazione omeotica. Nell'adulto eterozigote i bilanciatori hanno volume doppio rispetto al tipo selvatico e presentano setole solo nella parte anteriore. In presenza del marcatore *Tb* (3-90.6), l'eterozigote

appare più corto e tozzo rispetto al selvatico; tale morfologia è maggiormente evidente a livello di larva e di pupa.

- MKRS: cromosoma con inversioni multiple pericentromeriche che fungono da inibitori della ricombinazione nella porzione pericentromerica del cromosoma III. Tale cromosoma è letale in omozigosi per la presenza di *Stubble* (*Sb*, 3-58.22). *Sb* è un allele dominante che, in eterozigosi, determina setole più corte e spesse rispetto al fenotipo selvatico, mentre in omozigosi è letale.

MEDIUM NUTRITIVO PER IL MANTENIMENTO DELLE LINEE DI *Drosophila melanogaster*

Le linee di *Drosophila* sono state mantenute all'interno di fiale da coltura di polistirolo (cristallo atossico) di 3.5 cm di diametro e 8.5 cm di altezza, chiuse da un tappo di gommapiuma e contenenti sul fondo uno strato di medium nutritivo composto da:

- saccarosio:	44 g
- lievito di birra:	44 g
- nipagina (metile-4-idrossibenzoato)	2 g
- agar:	12 g
- H ₂ O:	1000 ml

MEDIUM PER LA STIMOLAZIONE DELLA DEPOSIZIONE DELLE UOVA

Il medium per la stimolazione della deposizione delle uova è stato preparato sciogliendo, in 1 l di acqua deionizzata, 30 g di Agar. La soluzione è stata portata ad ebollizione e fatta bollire per 15 min. In un altro recipiente sono stati mescolati 300 ml di succo di frutta, 33 g di zucchero e 2 g di nipagina, lasciati in ebollizione per circa 30 min. Le due soluzioni, raffreddate fino a circa 60 °C, sono state mescolate e versate in capsule Petri.

COMPONENTI PRINCIPALI DEL MICROINIETTORE E LORO FUNZIONAMENTO

Gli esperimenti di microiniezione necessitano dei seguenti strumenti:

- un microscopio rovesciato, modello "CK2" della "Olympus".
- Un microiniettore, modello "IM300 Micoinjector" (NARISCHIGE). Tale strumento è costituito da una pompa computerizzata che riceve, da una bombola esterna, una pressione di gas inerte (Azoto) di circa 35 psi e la immette nel microago, ad ogni impulso di microiniezione (modalità INJ), ad una pressione ridotta (circa 20 psi), e per un tempo prestabilito (circa 30 ms). In caso di ostruzione, il microago può essere liberato impostando la modalità "clear" (CLR) che sfrutta tutta la pressione in entrata nello strumento (35 psi), per un tempo generalmente fissato a circa 10 ms. Tutti i parametri citati sono suscettibili di lievi modifiche

necessarie per ottimizzare la microiniezione in base alle caratteristiche di ogni singolo microago.

- Un micromanipolatore “Leica” dotato di una serie di regolazioni di posizione ed inclinazione atte ad orientare opportunamente il braccio che sostiene il microago. Il movimento di quest’ultimo durante l’iniezione viene effettuato mediante un “joystick”, parte integrante del manipolatore.
- Microaghi prodotti a partire da capillari di vetro borosilicato (GC 100TF-15, Reading, England) utilizzando un “Micropipette puller” (Modello P-80/PC, Sutter Instrument Company) che permette, impostando opportuni parametri d’azione, di produrre aghi con punta di lunghezza e diametro diversi. I parametri utilizzati sono: Heat = 365, Pull = 215, Vel = 95, Time = 120, Pressure = 500. Da ogni capillare si ottengono due microaghi, originariamente chiusi, che vengono aperti spezzando manualmente la punta al momento dell’utilizzo.
- Uno strumento per ricavare microaghi da microcapillari.
- Un sostegno per microaghi.

DEPOSIZIONE DELLE UOVA

La raccolta degli embrioni avviene ponendo un adeguato numero di individui adulti in età fertile (2-3 giorni dallo sfarfallamento) in cilindri di polistirolo cristallizzato (diametro 6 cm, altezza 18 cm). Tali cilindri, sulla cui sommità sono stati operati dei forellini per consentire la respirazione, vengono chiusi con una capsula Petri (diametro 6 cm) contenente medium per la stimolazione della deposizione ed una pasta di estratto di lievito ed acqua.

DECORIONAZIONE MANUALE DEGLI EMBRIONI

L’embrione di *Drosophila* è protetto da due membrane di rivestimento: la membrana vitellina ed il corion. Quest’ultimo, più esterno, conferisce all’embrione impermeabilizzazione e resistenza proteggendolo da danni meccanici e dal disseccamento. Tale strato deve essere rimosso in quanto non è forabile dal microago; inoltre, l’embrione deve subire una lieve disidratazione in quanto il turgore interno dell’embrione non consentirebbe la permanenza del DNA esogeno.

La separazione del corion dalla membrana vitellina viene effettuata manualmente, mediante aghi da dissezione, facendo rotolare ciascun embrione su una striscia di nastro biadesivo atossico posta su un vetrino portaoggetto. Una volta privati del corion, gli embrioni sono stati allineati su un lato del nastro biadesivo, con il polo vegetativo sporgente. A questo livello, infatti, deve essere iniettato il DNA poiché, nelle fasi successive di sviluppo, in questa regione si formeranno le cellule da cui avrà origine la linea germinale.

Tra la decorionazione e la microiniezione degli embrioni deve intercorrere un breve intervallo di tempo (circa 10-15 min), variabile con le condizioni esterne di temperatura e di umidità. Ciò è necessario affinché gli embrioni si disidratino parzialmente. Dopo la disidratazione, gli embrioni sono stati ricoperti con un olio (halocarbonoil Voltalef Pctfe 10S-Atochem) che permette gli scambi gassosi impedendo un’ulteriore disidratazione.

STADI EMBRIONALI OTTIMALI PER LA MICROINIEZIONE

Dopo la fecondazione, il nucleo dello zigote subisce una serie di rapide divisioni, senza formazione di membrane cellulari. Dopo nove divisioni, la maggior parte dei nuclei migra verso la periferia, a formare il blastoderma sinciziale. A questo stadio, dopo circa mezz'ora dalla fecondazione, si possono distinguere, nel plasma polare, 3-4 nuclei che costituiscono i precursori della linea germinale. I restanti nuclei si dividono alla superficie dell'uovo prima di essere circondati dalle membrane cellulari, dando luogo alle circa 6000 cellule che compongono il blastoderma cellulare. Questo stadio è completo dopo circa tre ore dalla fecondazione; successivamente inizia il processo di gastrulazione (Ashburner, 1989). Gli stadi ottimali per la microiniezione sono quelli che precedono la formazione delle cellule polari, come mostrato in figura 6.3. Gli embrioni che hanno già raggiunto stadi avanzati dello sviluppo vengono eliminati.

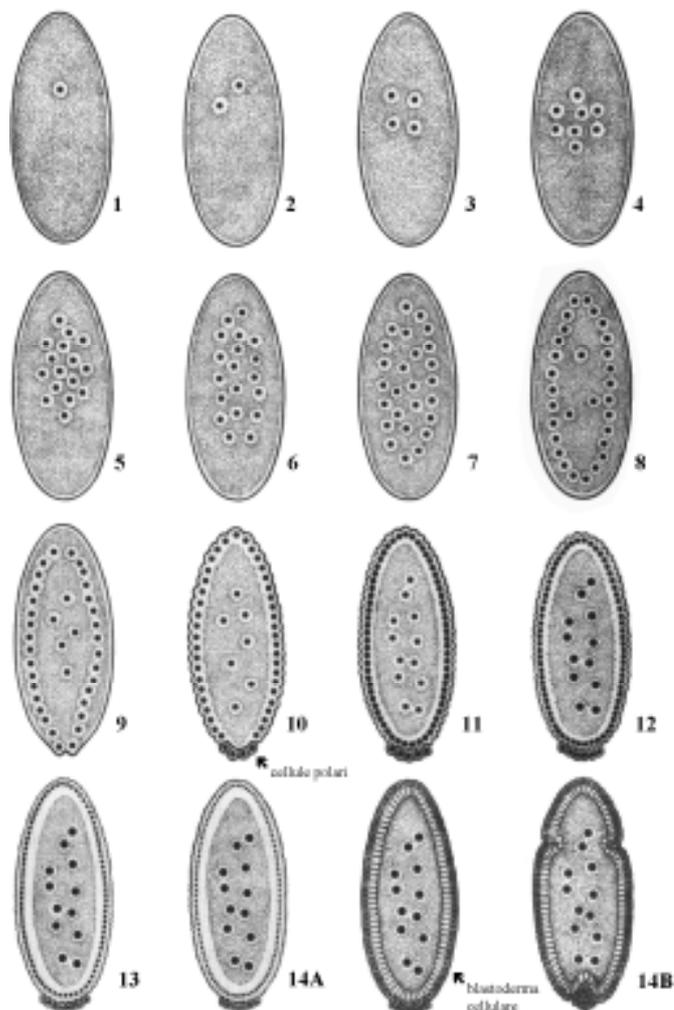


Figura 6.3: Stadi iniziali dell'embriogenesi di *Drosophila melanogaster*. Gli stadi ottimali per la microiniezione sono quelli precedenti il numero 10, stadio nel quale cominciano a formarsi le cellule polari (Ashburner, 1989).

MICROINIEZIONE

Affinché l'integrazione del DNA plasmidico nei nuclei precursori della linea germinale possa avvenire con successo, gli embrioni devono essere microiniettati al polo posteriore entro un'ora e mezza dalla fecondazione. I volumi di DNA impiegati nella microiniezione di ogni singolo uovo corrispondono a circa 2-3 nl. I vetrini coprioggetto con gli embrioni iniettati, ricoperti da un ulteriore strato protettivo di olio, sono stati trasferiti in capsule Petri contenenti terreno nutritivo e successivamente riposte in ambiente termostato a 23°C. Dopo qualche giorno, le larve sviluppatesi dagli embrioni sopravvissuti alla microiniezione sono state raccolte e trasferite singolarmente in fiale, contenenti terreno nutritivo, fino al completamento dello sviluppo ed allo farfallamento dell'individuo adulto.

ALLESTIMENTO DI INCROCI PER L'IDENTIFICAZIONE DI INDIVIDUI TRASFORMATI

Gli adulti sviluppati dagli embrioni microiniettati sono stati incrociati per tutta la durata della loro vita con individui appartenenti al ceppo w^{1118} ed è stata osservata la pigmentazione degli occhi della progenie F1 nata da tale incrocio.

Gli individui con occhi bianchi (w) sono stati scartati, poiché la colorazione bianca dell'occhio era indice di mancata inserzione del costrutto all'interno del loro genoma.

Gli individui con occhio pigmentato w^+ (individui transgenici: la colorazione rossa dell'occhio è indice di inserzione di una o più copie del costrutto) sono stati raccolti e incrociati singolarmente con individui w^{1118} iniziando così le procedure di incrocio per ottenere linee stabili di transgenici.

CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE TRASFORMATE

ALLESTIMENTO DEGLI INCROCI PER LA LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA E PER IL BILANCIAMENTO DELL'INSERTO

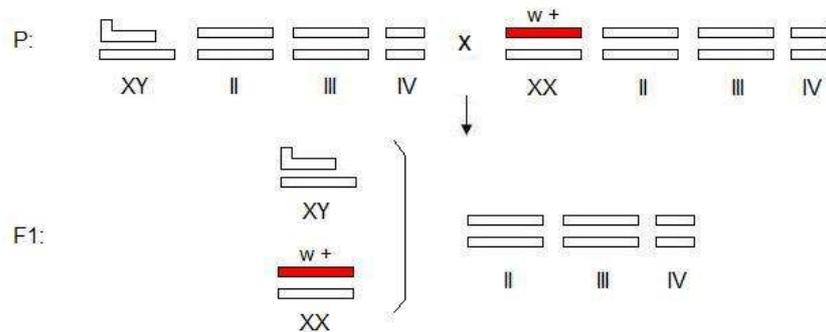
Il corredo cromosomico di *Drosophila melanogaster* è costituito da quattro paia di cromosomi, con una coppia eteromorfa nei maschi (XX o XY, II, III, IV). Dal momento che il cromosoma IV è molto piccolo rispetto agli altri, e perciò la probabilità che il costrutto vi si integri è molto bassa, sono stati allestiti degli incroci che hanno consentito di evidenziare geneticamente l'eventuale inserzione del costrutto nei cromosomi sessuali o negli autosomi II e III.

INSERZIONE NEI CROMOSOMI SESSUALI

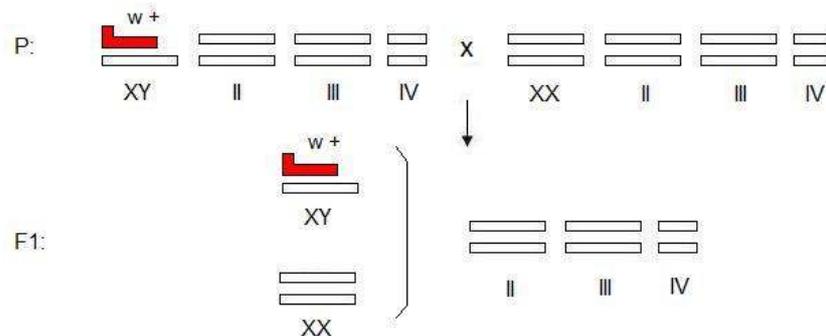
Quando viene allestito il seguente incrocio parentale (P):

P: ♂ transgenico (w^+) X ♀ w^{1118}

- Se l'inserto è localizzato sul cromosoma X, l'intera progenie F1 sarà costituita da femmine con occhio rosso e da maschi con occhio bianco:



- Se l'inserto è localizzato sul cromosoma Y, l'intera F1 sarà costituita da maschi con occhio rosso e da femmine con occhio bianco:



INSERZIONE NEGLI AUTOSOMI

Quando viene allestito il seguente incrocio parentale (P):

$$P: \quad \text{♂ transgenico} \quad \times \quad \text{♀ } w^{118}$$

se l'inserto è localizzato in un cromosoma autosomico, nella generazione F₁ saranno visibili individui, sia maschi che femmine, con fenotipo w⁺.

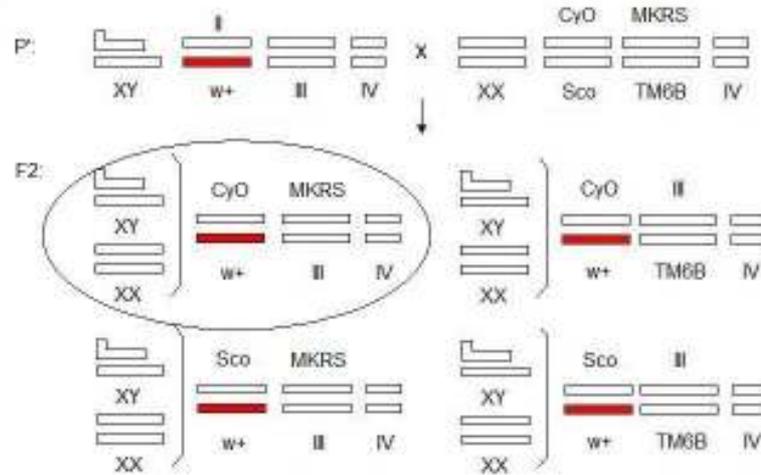
Inserzione nel II cromosoma

Gli individui con fenotipo w⁺, selezionati nella generazione F₁, sono stati incrociati con moscerini appartenenti al ceppo w; CyO/Sco; MKRS/TM6B.

Dopo aver eliminato gli individui con larva "Tubby", si selezionano gli individui con:

- occhi rossi (w⁺) per la presenza dell'inserto;
- ali arricciate per la presenza di CyO;

- setole corte e spesse per la presenza del marcatore morfologico *Stubble*.

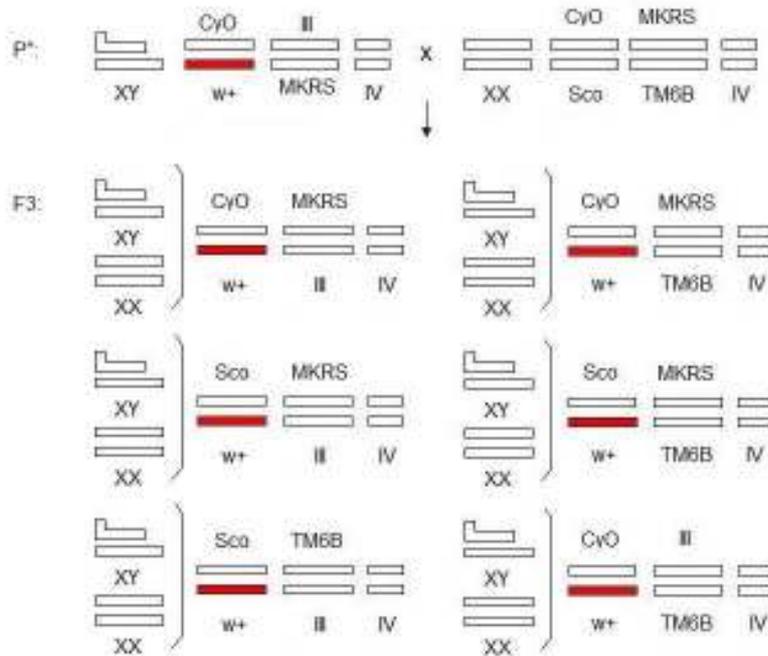


Tali individui sono stati incrociati nuovamente con moscerini appartenenti al ceppo *w*; *CyO/Sco*; *MKRS/TM6B*.

Nella F₃, tra tutti i fenotipi possibili, sono stati cercati individui con:

- occhio rosso (*w*⁺) per la presenza dell'inserto;
- ali arricciate, determinate da *CyO*;
- setole corte e spesse per la presenza del marcatore *Stubble*;
- scutello selvatico.
- aspetto corto e tozzo per la presenza di *Tubby*.

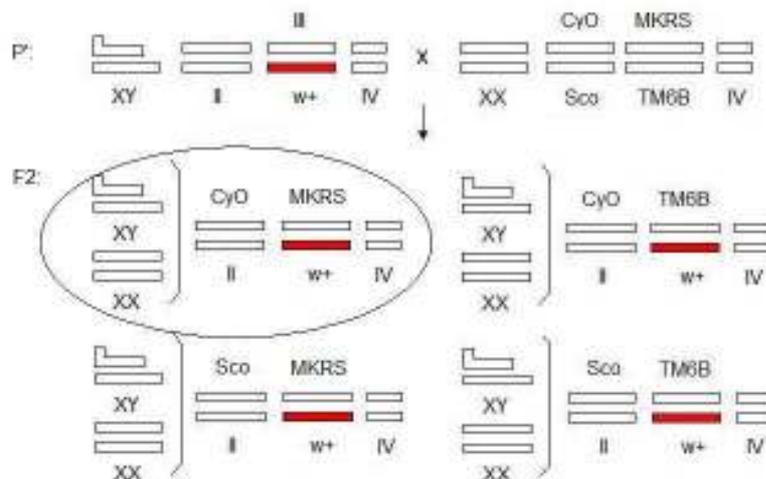
L'individuo selezionato indica la presenza del costrutto nel II cromosoma.



Inserzione nel III cromosoma

Gli individui con fenotipo w^+ , selezionati nella generazione F_1 , sono stati incrociati con moscerini appartenenti alla linea w ; CyO/Sco ; $MKRS/TM6B$. Dopo aver eliminato gli individui con larva “*Tubby*”, si selezionano gli individui con:

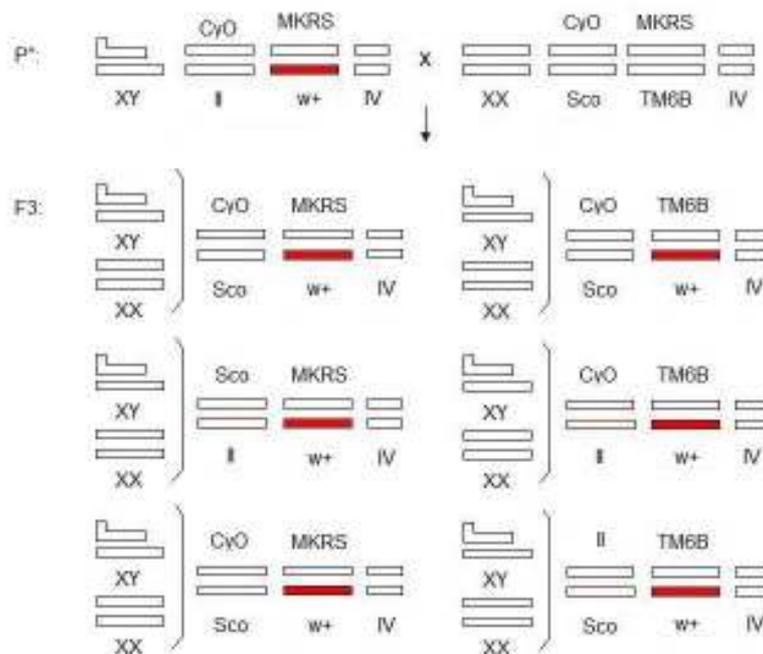
- occhi rossi (w^+) per la presenza dell'inserto;
- ali arricciate per la presenza del marcatore morfologico CyO ;
- setole corte e spesse per la presenza del marcatore morfologico *Stubble*.



Tali individui sono stati nuovamente incrociati con moscerini del ceppo bilanciante. Nella F₃, tra tutti i fenotipi possibili, vengono cercati individui con:

- occhio rosso (w^+) per la presenza dell'inserto;
- ali arricciate per la presenza del marcatore morfologico *CyO*;
- setole corte e spesse per la presenza del marcatore *Stubble*;
- scutello privo di setole per la presenza di *Sco*.

L'individuo selezionato indica un'inserzione del costrutto nel III cromosoma:



Per ottenere linee transgeniche stabili ed omozigoti gli individui con occhio rosso, ali arricciate e setole corte, ottenuti nella progenie F₁, sono stati incrociati fra loro selezionando nella progenie individui caratterizzati da:

- occhi rossi (w^+);
- setole lunghe;
- scutello selvatico;
- ali non arricciate.

CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE TRANSGENICHE MEDIANTE IBRIDAZIONE IN SITU

Per identificare il numero delle inserzioni e mappare a livello cromosomico la posizione dell'inserto, è stato impiegato un metodo di ibridazione *in situ*, in combinazione con tecniche di immunocitochimica.

SOLUZIONI E MATERIALI UTILIZZATI

TAMPONE MALEICO

Acido maleico 100 mM
NaCl 150 mM, pH 7.5

TAMPONE DI BLOCCAGGIO ("BLOCKING BUFFER")

Il "Blocking Reagent" (siero di latte; Boehringer Mannheim) viene disciolto all'1% in tampone maleico.

Tris HCl

Tris HCl 100 mM
NaCl 100 mM
MgCl₂ 50 mM, pH 9.5

SSC 20X

NaCl 3 M
Citrato di sodio 300 mM pH 7.0

PBS

Na₂HPO₄ 10mM
NaH₂PO₄ 10mM
NaCl 140 mM pH 7.4

SOLUZIONE "ANTIFADE"

100 mg di p-fenilendiamino-diedrocloruro (Sigma P-1519) vengono diluiti in 10 ml di PBS. Il pH viene portato a 8.0 con una soluzione 0.5 M di carbonato-bicarbonato, pH 9.0. Infine vengono aggiunti 90 ml di glicerolo. La soluzione viene conservata a -20°C e al riparo dalla luce

SOLUZIONE COLORANTE

45 µl di soluzione di NBT (nitroblutetrazolio 10% in dimetilformammide; Boehringer Mannheim) e 35 µl di soluzione BCIP (bromo-cloro-indolofosfato 10% in dimetilformammide; Boehringer Mannheim) disciolti in 10 ml di Tris HCl.

TRATTAMENTO DEI VETRINI COPRIOGGETTO

I vetrini coprioggetto sono stati trattati con una soluzione a base di silani (SIGMACOTE, Sigma-Aldrich). I vetrini puliti (passati in etanolo 95% ed asciugati all'aria) sono stati immersi per due volte nella soluzione di silicone. Successivamente sono stati riposti in un contenitore al riparo dalla polvere. Questo trattamento è essenziale per evitare l'adesione del materiale citologico ai vetrini coprioggetto.

TRATTAMENTO DEI VETRINI PORTAOGGETTO

I vetrini portaoggetto sono stati lavati accuratamente con un detergente e sciacquati abbondantemente con acqua distillata. Successivamente sono stati immersi in una soluzione di gelatina (0.1%) e cromoallume (0.01%) ed infine lasciati asciugare per una notte al riparo dalla polvere. La gelatinizzazione dei vetrini portaoggetto è essenziale poiché permette l'adesione del materiale citologico sui vetrini stessi.

PREPARAZIONE DI CROMOSOMI POLITENICI DI *Drosophila melanogaster*

Per allestire i preparati da analizzare sono state utilizzate cellule provenienti da ghiandole salivari larvali di individui trasformati. In esse, infatti, durante lo sviluppo larvale, i cromosomi omologhi si appaiano ed entrano in una serie di cicli replicativi senza che avvenga né mitosi né citodieresi, formando cromosomi con un elevato grado di politenizzazione. Nella preparazione dei cromosomi politenici sono state utilizzate larve corrispondenti al tardo III stadio, in cui i cromosomi politenici raggiungono il massimo delle loro dimensioni.

Gli individui vengono dissezionati in acido acetico 45% trattenendone delicatamente il corpo con delle pinzette e puntando un ago da siringa appena al di sotto degli uncini buccali: tirando in direzioni opposte si ottiene la separazione della porzione apicale della larva dal resto del corpo. In prossimità dell'apparato boccale sono chiaramente distinguibili le ghiandole salivari cui è associato del tessuto adiposo di forma caratteristica. Isolate e ripulite, le ghiandole salivari vengono poste in una goccia di acido acetico 45% su un vetrino coprioggetto siliconizzato che viene fatto aderire ad un vetrino portaoggetti gelatinizzato. La rottura delle cellule, la separazione dei singoli nuclei e la distensione dei bracci dei cromosomi viene eseguita picchiettando con una gomma dura a matita dapprima lungo i lati del portaoggetto e poi radialmente, dal centro verso la periferia del coprioggetto, opportunamente protetto con carta assorbente. In seguito, viene esercitata una pressione verticale sul coprioggetto in modo da appiattare i cromosomi. Il preparato viene quindi congelato in azoto liquido per favorire il distacco del coprioggetto dal portaoggetto che si esegue facendo leva con una lametta. Il vetrino viene successivamente immerso per 5 minuti in etanolo 95% al fine di disidratare il materiale citologico. I preparati così ottenuti vengono conservati a - 20°C.

PREPARAZIONE DEL DNA UTILIZZATO COME SONDA NEGLI ESPERIMENTI DI IBRIDAZIONE IN SITU

La sonda utilizzata per la caratterizzazione delle linee transgeniche corrisponde a un frammento di circa 2 Kb di cDNA del gene "*miniwhite*" contenuto nel vettore di trasformazione. L'allele w^+ funge da marcatore negli individui trasformanti e per questo è stato utilizzato come marcatore negli esperimenti di ibridazione *in situ*.

MARCATURA DELLA SONDA

La sonda è stata marcata con digossigenina, uno steroide estratto da *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata*, uniche fonti naturali note di tale composto. Di conseguenza, non vi può essere legame con un anticorpo anti-digossigenina in nessun altro materiale biologico noto. La digossigenina si trova legata covalentemente a nucleotidi uridina incorporati nel DNA della sonda per via enzimatica, attraverso la tecnica di marcatura "random priming". Avvenuta l'ibridazione *in situ*, la sonda marcata con digossigenina viene rivelata con tecniche di immunocitochimica impiegando anticorpi anti-digossigenina coniugati a sistemi di visualizzazione (fosfatasi alcalina o fluoresceina).

Per la marcatura della sonda si è proceduto secondo il metodo di Shmidt (1988), utilizzando il DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche) secondo il protocollo seguente:

- 1 µg di DNA disciolto in 10 µl di acqua milliQ è stato denaturato per 5 minuti a 95°C.
- 2 µl di miscela di esanucleotidi (0.5 M Tris-HCl; 0.1 M MgCl₂; Ditiotreitolo (DTT) 1 mM; 2 mg/ml di BSA; 62.5 A₂₆₀ U/ml di esanucleotidi).
- 2 µl di DIG-DNA labeling mixture (1 mM dATP; 1 mM dCTP; 1 mM dGTP; 0.65 mM dTTP; 0.35 mM DIG-dUTP).
- 1 µl di enzima Klenow.
- H₂O milli Q fino ad 1 volume finale di 20 µl.

Dopo breve centrifugazione la miscela di reazione è stata incubata a 37°C per tutta la notte. La reazione è stata interrotta operando una nuova denaturazione a 95°C per 10 minuti; sono stati aggiunti H₂O, SSC 20x e SDS 10% fino ad una concentrazione finale di 5x e 0.1% rispettivamente.

VERIFICA DELLA MARCATURA DELLA SONDA MEDIANTE DOT-BLOT

Mediante dot-blot è stata verificata l'efficienza della marcatura della sonda ed è stata stimata la sua concentrazione per confronto con un DNA marcato di controllo, a concentrazione nota (5 ng/µl). Il DNA-sonda è stato denaturato per 10 min a 90°C. Successivamente, aliquote di 1 µl di diluizioni progressive della sonda e del DNA di controllo sono state poste su una membrana di nylon, lasciata asciugare per 30 min a 50°C. In seguito, la membrana è stata bagnata in tampone maleico, quindi incubata prima in tampone di bloccaggio per 30 minuti e poi per altri 30 minuti in anticorpo antidigossigenina coniugato con fosfatasi alcalina (1:5000 in tampone di bloccaggio; Roche). Dopo due lavaggi di 10 minuti in tampone maleico, la membrana è stata equilibrata con tampone Tris-HCl ed infine incubata al buio, per 30 minuti, con la soluzione di substrato colorante. La fosfatasi alcalina metabolizza i substrati NBT e BCIP, contenuti nella soluzione colorante, producendo un precipitato blu violetto facilmente visibile. L'intensità della colorazione è proporzionale alla quantità di enzima presente.

IBRIDAZIONE IN SITU

L'ibridazione *in situ* consente di determinare la localizzazione di specifiche sequenze di DNA grazie ad apposite sonde ad esse complementari. Si è proceduto secondo tre fasi principali:

Denaturazione dei cromosomi

- Disidratazione dei cromosomi politenici mediante immersione in etanolo 95% per 5 minuti.
- Incubazione in SSC 2x a 75% per 30 minuti.
- Ulteriore disidratazione in etanolo 70% prima e 95% poi, per 5 minuti ciascuno.

- Denaturazione in NaOH 0.07 N (pH 12.5) per 3 minuti.
- Disidratazione in etanolo 70% e 95% per 5 minuti ciascuno.

Ibridazione

- La sonda è stata denaturata a 90°C per 5 minuti.
- Su ogni campione sono stati aggiunti 10 µl di sonda denaturata.
- I campioni sono stati poi sigillati con colla (UHU-extra).
- Incubazione in camera umida a 68°C per almeno 4 ore e 30 minuti.

Immunosaggio

Per evidenziare il segnale di ibridazione è stata utilizzata una tecnica immunocitochimica basata sull'impiego della reazione specifica antigene-anticorpo.

- I campioni sono stati immersi in tampone maleico per circa 1 minuto e, successivamente, in tampone di bloccaggio per 30 minuti.
- Incubazione per 30 minuti a 37°C con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fluoresceina (20 µg/µl diluito in tampone di bloccaggio; Roche) al riparo dalla luce.
- Due lavaggi in tampone maleico (15 minuti ciascuno).
- Colorazione con bromuro di etidio alla concentrazione di 0.5 mg/ml in "antifade". Tale mezzo di inclusione colora i cromosomi e limita il decadimento della fluorescenza.

I preparati sono stati analizzati con un microscopio Nikon Eclipse E600, corredato di apparato laser per confocale BIORAD Radiance 2000. Le immagini sono state acquisite mediante software BIORAD Lasersharp 2000.

MAPPATURA DEGLI INSERTI

Per localizzare i segnali di ibridazione corrispondenti agli inserti, i preparati sono stati confrontati con le mappe citologiche standard dei cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*, messe a punto da Bridges (1935) e con le fotografie ottenute da Lefevre (1976). I cromosomi politenici sono uniti a livello dei centromeri in una struttura eterocromatica detta cromocentro, da cui si dipartono cinque bracci maggiori di lunghezza molto simile (il cromosoma X e i bracci sinistro e destro dei cromosomi II e III) e un sesto braccio molto piccolo (il cromosoma IV).

In figura 6.4 sono state riportate le mappe citologiche dei cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*.

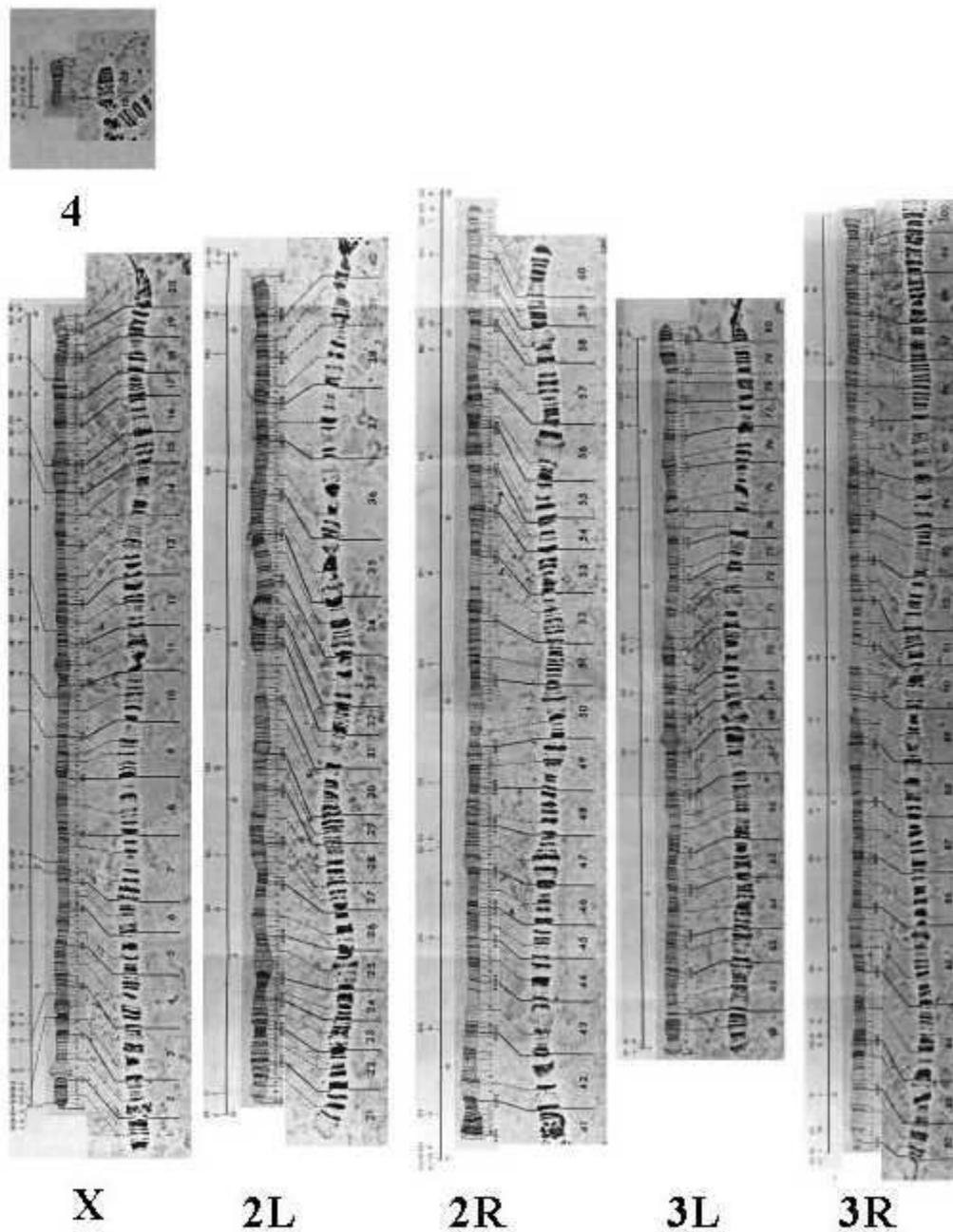


Figura 6.4: Mappe citologiche dei cromosomi politenici di *Drosophila* (Bridges, 1935)

Ciascun braccio dei cromosomi X, II e III è stato suddiviso in 20 regioni, il cromosoma IV in 2 soltanto. Le regioni vengono numerate come segue:

- Da 1 a 20 per il cromosoma X.
- Da 21 a 40 per il 2L.
- Da 41 a 60 per il 2R.
- Da 61 a 80 per il 3L.
- Da 81 a 100 per il 3R.
- 101 e 102 per il cromosoma IV.

Ogni regione viene a sua volta suddivisa in 6 sottoregioni indicate con una lettera (da A a F) e, all'interno di queste, vengono numerate le bande. La posizione dell'inserto viene determinata dal numero del cromosoma, dal braccio dalla regione e dalla sottoregione in cui viene individuato. Su ogni braccio dei diversi cromosomi si trovano punti di riconoscimento peculiari, dovuti alla presenza di "puff" (tratti rigonfi corrispondenti a zone di attiva trascrizione) o di altre caratteristiche morfologiche, spesso definite da una nomenclatura particolare (Bridges, 1935; Lefevre, 1976). Questi punti di riferimento sono molto utili nell'appattatura dell'inserto.

ALLESTIMENTO DEGLI INCROCI

LINEE DI *Drosophila melanogaster* UTILIZZATE

Linea *yw*; *Act5C-GAL4/TM6B*

La linea *yw*; *Act5C-GAL4/TM6B* è stata utilizzata per indurre una attivazione precoce ed ubiquitaria del costrutto *UAS-Ethe1-IR* e risulta caratterizzata da:

- *white* (*w*, 1-1.5): allele recessivo che determina il fenotipo "occhio bianco";
- *yellow* (*y*, 1-0.0): questo gene controlla il pattern di pigmentazione della cuticola degli adulti e la pigmentazione della bocca della cuticola larvale; i mutanti per questo locus sono di colore giallo-marrone.
- *TM6B*: cromosoma che funge da soppressore della ricombinazione nel cromosoma III. *TM6B* presenta i marcatori dominanti *Ultrabithorax* (*Ubx*) e *Tubby* (*Tb*) che lo rendono letale in omozigosi.
- *Act5C-GAL4*: la sequenza *GAL4* è controllata dal promotore prossimale del gene che codifica la proteina ubiquitaria Actina; in questo modo la sequenza viene trascritta durante lo sviluppo e permette l'espressione generalizzata del costrutto in esame.

Linea *yw*; *P{70FLP}11 P{70I-SceI}2B noc^{ScO}/CyO S²*

La linea *yw*; *P{70FLP}11 P{70I-SceI}2B noc^{ScO}/CyO* è stata utilizzata per indurre excisione e ricombinazione omologa del costrutto pTV2 (A+C).

Le caratteristiche peculiari di tale linea sono di seguito riportate:

- *white* (*w*, 1-1.5): vedi sopra.
- *yellow* (*y*, 1-0.0): vedi sopra.
- *P{70FLP}11*: si tratta di un costrutto nel quale il gene codificante per l'enzima FLIPPASI è posto sotto il controllo di un promotore inducibile mediante shock termico; tale promotore appartiene al gene *heat-shock hsp70*. Nella linea considerata, il costrutto *P{70FLP}* è localizzato sul cromosoma II.
- *P{70I-SceI}2B*: si tratta di un costrutto nel quale il gene codificante per l'endonucleasi *I-SceI* è posto sotto il controllo di un promotore inducibile

mediante shock termico; tale promotore appartiene al gene *heat-shock hsp70*. Nella linea considerata, il costrutto $P\{70I-SceI\}$ è localizzato sul cromosoma II.

- CyO: cromosoma bilanciante letale in omozigosi per la presenza di *Curly* (*Cy*, 2-6.1), allele dominante responsabile del fenotipo “ali arricciate”.

Linea *yw*; $P\{70FLP\}23$ $P\{70I-SceI\}4A/TM6$

La linea *yw*; $P\{70FLP\}23$ $P\{70I-SceI\}4A/TM6$ è stata utilizzata per indurre excisione e ricombinazione omologa del costrutto pTV2 (A+C).

Tale linea è caratterizzata da:

- *white* (*w*, 1-1.5): vedi sopra.
- *yellow* (*y*, 1-0.0): vedi sopra.
- $P\{70FLP\}23$: si tratta di un costrutto nel quale il gene codificante per l'enzima FLIPPASI è posto sotto il controllo di un promotore inducibile mediante shock termico; tale promotore appartiene al gene *heat-shock hsp70*. Nella linea considerata, il costrutto $P\{70FLP\}23$ è localizzato sul cromosoma III.
- $P\{70I-SceI\}4A$: si tratta di un costrutto nel quale il gene codificante per l'endonucleasi *I-SceI* è posto sotto il controllo di un promotore inducibile mediante shock termico; tale promotore appartiene al gene *heat-shock hsp70*. Nella linea considerata, il costrutto $P\{70I-SceI\}4A$ è localizzato sul cromosoma III.
- TM6: cromosoma che funge da soppressore della ricombinazione nel cromosoma III. Tale cromosoma presenta i marcatori dominanti *Ultrabithorax* (*Ubx*) e *Tubby* (*Tb*) che lo rendono letale in omozigosi.

Linea w^{1118} ; $P\{70FLP\}10$

Tale linea è caratterizzata da:

- *white* (*w*, 1-1.5): vedi sopra.
- $P\{70FLP\}10$: in questo caso il costrutto $P\{70FLP\}$ è stato modificato in modo tale da indurre una espressione costitutiva dell'enzima FLIPPASI.

Linee identificate mediante Tilling

Le linee di *Drosophila melanogaster* identificate dallo screening effettuato dal servizio di “Fly-TILL” sono mantenute come stock bilanciati e presentano le seguenti caratteristiche:

- presenza di una singola mutazione nel gene *dEthel1*;
- cromosoma bilanciante CyO;
- presenza degli alleli recessivi *cinnabar* (*cn*, 2-57.5) e *brown* (*bw*, 2-104.5): nel cromosoma II mutagenizzato; la presenza contemporanea dei due alleli, in omozigosi, determina occhi di colore bianco.

Linea w^{1118} ; Df(2R)ED2219, P{3\'.RS5+3.3\'}ED2219/SM6a
(Bloomington stock center: # 8910)

La linea 8910 presenta le seguenti caratteristiche:

- delezione di circa 467 Kb nel cromosoma 2R (47D6...48B6) (2R:7084917...7552896);
- SM6a: cromosoma bilanciatore che funge da inibitore della ricombinazione di tutto il cromosoma II. Presenta l'allele *cn* (*cn*, 2-57.5), coinvolto nella biosintesi del pigmento ommocromo.

Linea Df(2R)en-A/CyO
(Bloomington stock center: # 190)

La linea 190 presenta le seguenti caratteristiche:

- delezione che si estende per circa 600 Kb nel cromosoma 2R (47D3-47F8);
- cromosoma bilanciatore CyO.

Linea w^{1118} ; Df(2R)ED2155, P{3\'.RS5+3.3\'}ED2155/SM6a
(Bloomington stock center: # 9344)

La linea 9344 presenta le seguenti caratteristiche:

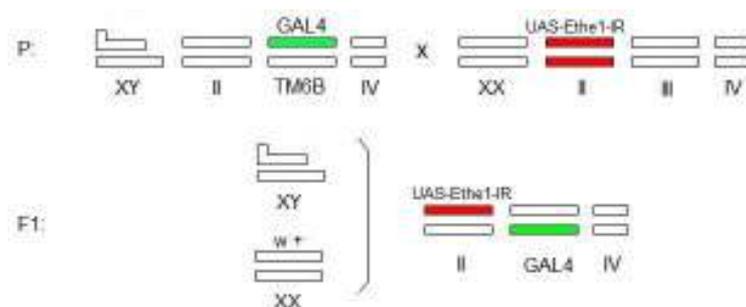
- delezione di circa 500 Kb nel cromosoma 2R (47C5...47F8) (2R:6781601...7284947);
- cromosoma bilanciatore SM6a.

dsRNA INTERFERENCE

INCROCIO PER L'ESPRESSIONE DEL COSTRUTTO pP[UAST] 5'-d*Ethe1*-3'/GFP/3'-d*Ethe1*-5'

Femmine vergini adulte transgeniche, omozigoti per il costrutto in analisi, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *yw*; *Act5C*-GAL4/TM6B.

Nella progenie ottenuta, sono stati selezionati gli individui che presentano le sequenze sia UAS che GAL4; tali individui sono riconoscibili in quanto privi del marcatore *Tb*. Nello schema seguente viene rappresentato, a titolo di esempio, il caso in cui il costrutto in analisi sia localizzato sul cromosoma II.



GENE TARGETING

ALLESTIMENTO DI INCROCI PER GENERARE INDIVIDUI CONTENENTI IL COSTRUTTO RICOMBINOGENO ED I TRANSGENI FLP ED I-SceI

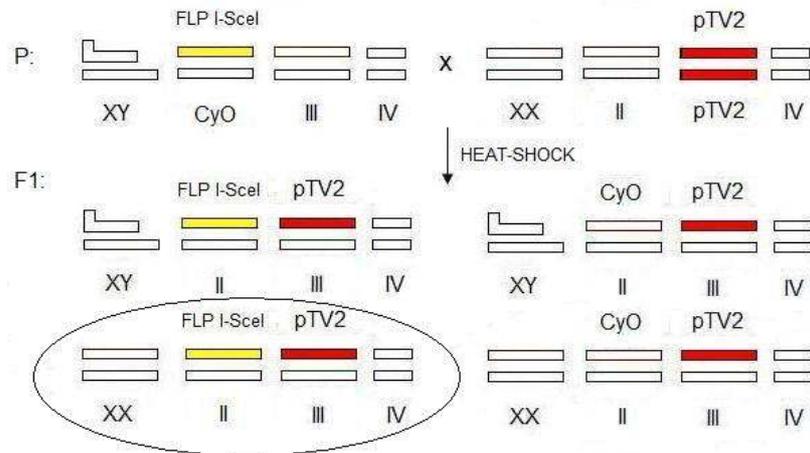
Nel caso di inserzione del costrutto ricombinogeno nel cromosoma III, femmine vergini adulte transgeniche, omozigoti per il costrutto pTV2 (A+C), sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *yw; P{70FLP}11 P{70I-SceI}2B noc^{Sco}/CyO S²*.

La progenie di tale incrocio è stata sottoposta ad heat-shock nelle prime fasi di sviluppo (48 ore dopo la deposizione) allo scopo di indurre excisione e ricombinazione del costrutto ricombinogeno.

In seguito, nella progenie della generazione F1 sono state selezionate femmine vergini contenenti:

- il costrutto ricombinogeno;
- il gene FLP;
- il gene *I-SceI*.

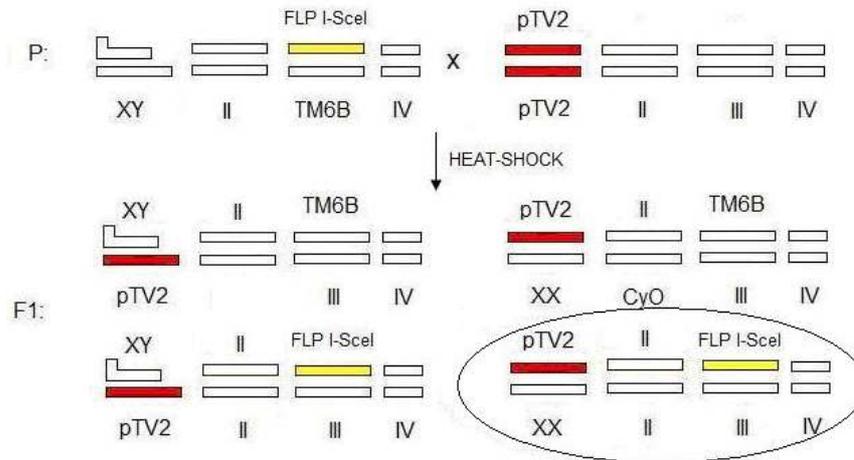
Tali individui sono riconoscibili per la presenza di ali non arricciate, Nello schema seguente viene rappresentato l'allestimento di tali incroci.



Nel caso di inserzione di pTV2(A+C) a livello del cromosoma X, le femmine omozigoti per il costrutto ricombinogeno sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *yw; P{70FLP}23 P{70I-SceI}4A/TM6*.

In seguito, sono state selezionate femmine vergini, contenenti il costrutto ricombinogeno, il gene FLP ed il gene *I-SceI*, riconoscibili per l'assenza dei marcatori genetici caratteristici del cromosoma bilanciatore TM6.

Nello schema seguente viene rappresentato l'allestimento di tali incroci.



Si fa presente che le femmine selezionate nella progenie della generazione F1 possono presentare:

- occhi bianchi, qualora il costrutto ricombinogeno, una volta subita excisione somatica, non venga reintegrato nel genoma. Questa condizione si verifica nella maggior parte dei casi.
- occhi rossi, se il costrutto ricombinogeno non ha subito excisione o, alternativamente, si è verificata ricombinazione omologa.
- occhi mosaico, qualora il costrutto ricombinogeno, una volta subita excisione somatica, non venga reintegrato nel genoma solo in alcune cellule dell'occhio.

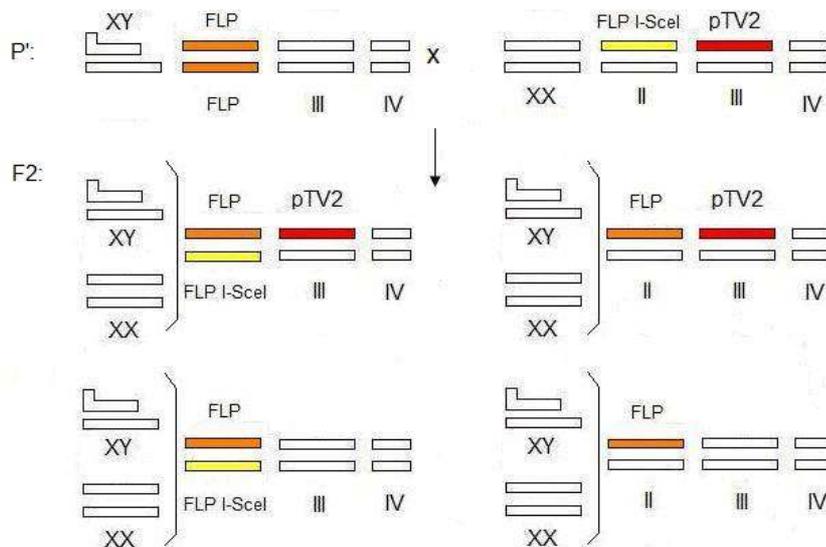
Poiché gli individui selezionati nella generazione F1 sono, per quanto riguarda gli eventi di ricombinazione omologa, dei mosaici, il colore degli occhi non rappresenta un criterio affidabile per distinguere gli individui per i quali si sia verificato un evento di targeting a livello della linea germinale.

ALLESTIMENTO DI INCROCI PER RICERCARE POSSIBILI EVENTI DI TARGETING

Allo scopo di ricercare possibili eventi di ricombinazione omologa nella linea germinale, le femmine vergini selezionate nella generazione F1 sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸; P{70FLP}10*, caratterizzata da una espressione costitutiva della FLIPPASI.

Poiché il costrutto ricombinogeno, subendo excisione e ricombinazione omologa, perde una sequenza FRT e, conseguentemente, non è più suscettibile alla azione della FLIPPASI, nella progenie ottenuta vengono ricercati individui con occhi rossi, che sono dunque indicativi della presenza di un potenziale evento di targeting.

Nello schema seguente viene rappresentata la progenie ottenuta da tali incroci assumendo, a titolo esemplificativo, che il costrutto ricombinogeno sia localizzato nel cromosoma III.



Allo scopo di determinare la posizione del costrutto ricombinogeno nella progenie con occhio rosso ottenuta dall'incrocio con la linea $w^{1118}; P\{70FLP\}10$, sono stati allestiti degli incroci con moscerini appartenenti al ceppo $w; CyO/Sco; MKRS/TM6B$. La progenie è stata analizzata secondo quanto descritto nel paragrafo "Allestimento degli incroci per la localizzazione cromosomica e per il bilanciamento dell'inserto" del presente capitolo.

TILLING

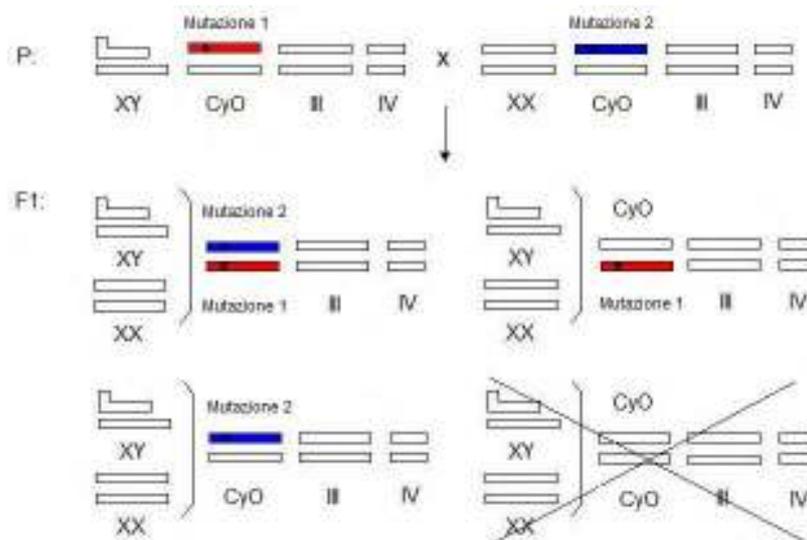
ALLESTIMENTO DEGLI INCROCI DI COMPLEMENTAZIONE

Individui appartenenti alle linee ottenute dal *Tilling* del gene *dEthel1*, nelle quali gli individui omozigoti non sono vitali, sono stati incrociati tra loro allo scopo di verificare l'eventuale esistenza di complementazione tra le mutazioni considerate. Nel caso di complementazione, la progenie attesa risulta costituita da:

- $\frac{1}{4}$ di individui "doppi eterozigoti", portatori, in eterozigosi, di entrambe le mutazioni analizzate. Tali individui risultano caratterizzati da:
 - ali non arricciate;

- occhi bianchi, per la presenza degli alleli *cn* e *bw* in omozigosi;
- ½ di individui eterozigoti, caratterizzati da:
 - ali arricciate, per la presenza di CyO;
 - occhi rossi;
- ¼ della progenie muore per la presenza di CyO in omozigosi.

Nello schema seguente viene riportata la progenie attesa:



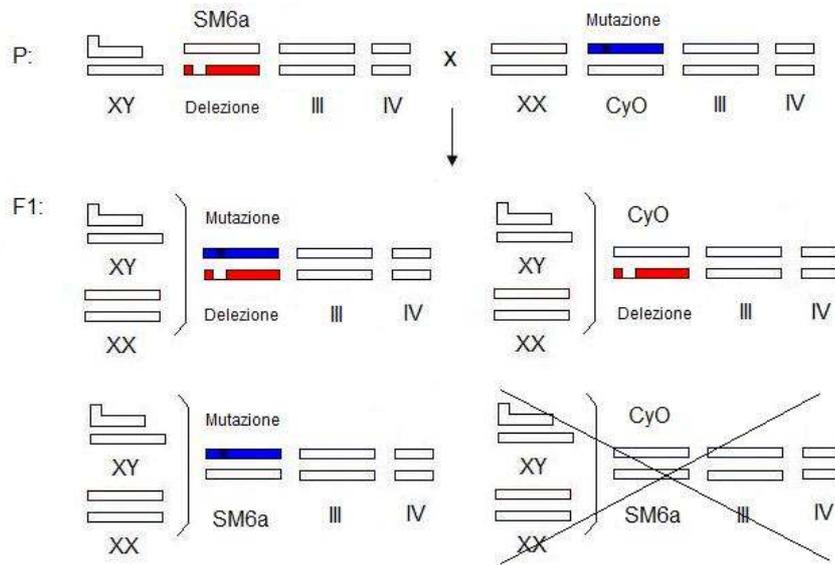
ALLESTIMENTO DEGLI INCROCI CON LINEE PORTATRICI DI DELEZIONE

Individui appartenenti alle linee ottenute mediante *Tilling* del gene *dEthel*, nelle quali gli individui non sono vitali, sono stati incrociati con individui appartenenti a linee caratterizzate da delezioni cromosomiche associate a perdita del gene *dEthel*. Nel caso in cui la delezione sia bilanciata con SM6 (linee 8910 e 9344), la progenie attesa è costituita da:

- ¼ di individui eterozigoti per la delezione, caratterizzati da:
 - occhi rossi;
 - ali arricciate, per la presenza di CyO.
- ¼ di individui eterozigoti per la mutazione del gene *dEthel*, caratterizzati da:
 - ali arricciate, per la presenza di SM6;
 - occhi bianchi, per la presenza di *cn* in omozigosi. Tale allele è infatti presente sia nel cromosoma II mutagenizzato che nel cromosoma bilanciante SM6.
- ¼ di individui emizigoti, portatori sia della mutazione che della delezione del gene *dEthel*. Tali individui sono caratterizzati da:
 - occhi rossi;
 - ali non arricciate.

- $\frac{1}{4}$ di individui che muore per la presenza di CyO in omozigosi.

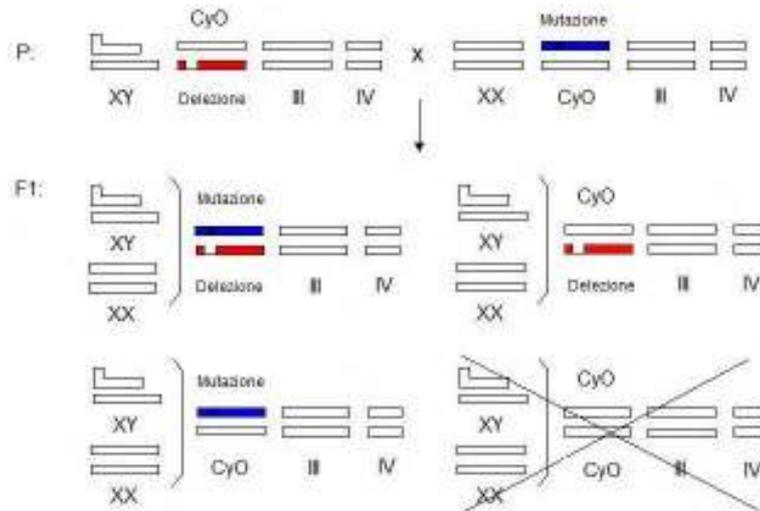
Nello schema seguente viene riportata la progenie attesa:



Nel caso in cui la delezione sia bilanciata con CyO (linea 190), la progenie attesa è costituita da:

- $\frac{1}{2}$ di individui eterozigoti per la delezione o per la mutazione del gene *dEthel*, entrambi caratterizzati da:
 - occhi rossi;
 - ali arricciate, per la presenza di CyO.
- $\frac{1}{4}$ di individui emizigoti, portatori sia della mutazione che della delezione del gene *dEthel*, caratterizzati da:
 - occhi rossi;
 - ali non arricciate.
- $\frac{1}{4}$ di individui che muore per la presenza di CyO in omozigosi.

Nello schema seguente viene riportata la progenie attesa:



REAL TIME PCR

La REAL TIME PCR è una tecnica che consente la quantificazione di un trascritto attraverso il monitoraggio dell'amplificazione del suo cDNA.

In questo caso, si tratta di quantificazioni di carattere relativo rispetto ad un campione definito, a priori, come controllo. Le iniziali differenze quantitative tra i campioni vengono normalizzate grazie all'analisi comparata del gene di interesse ("target") e di un gene *housekeeping* ("reference"), il cui livello di espressione è costante nei diversi campioni. Il gene *housekeeping* utilizzato nel presente lavoro è *rp49*, codificante una proteina ribosomale. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando come fluoroforo il "Syber Green" (Applied Biosystem). Tale molecola è un intercalante che, a contatto con il DNA, subisce un cambiamento conformazionale che ne aumenta la fluorescenza. L'amplificazione è stata condotta con il Rotor Gene 3000, un termociclatore dotato di fluorimetro, che registra la fluorescenza dei campioni al variare del numero di cicli. I dati così ottenuti sono stati analizzati secondo il metodo di Pfaffl (2001).

ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il reagente Trizol (Invitrogen[®]), secondo il seguente protocollo:

- Omogeneizzazione del campione in 1 ml di Trizol ed incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Aggiunta di 0.2 ml di cloroformio, agitazione e incubazione per 2 min a temperatura ambiente.
- Centrifugazione per 15 min a 13000 rpm, 4°C.
- Trasferimento della fase acquosa in 0,5 ml di isopropanolo.
- Incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti e centrifugazione alle medesime condizioni dello step precedente.
- Lavaggio del pellet in etanolo 70% DEPC (DiEtilPiroCarbonato, inibitore delle RNasi) e risospensione in 15-20 µl di acqua DEPC.

QUANTIFICAZIONE DELL'RNA ESTRATTO

L'RNA estratto è stato analizzato allo spettrofotometro per determinarne la concentrazione ed evidenziarne eventuali contaminazioni da fenolo o proteine. Per il calcolo della quantità di RNA, si suppone che una soluzione acquosa di RNA, a pH 7-7.5 e ad una concentrazione di 40 ng/μl, abbia un'assorbanza pari a circa 1, se si utilizza per la misura una cuvetta con un cammino ottico di 1 cm:

$$1 \text{ U } A_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Il rapporto ideale A_{260}/A_{280} è compreso fra 1.8-2.0 e tale rapporto è influenzato dal pH della soluzione di RNA. Un basso valore di tale rapporto indica la presenza di proteine, mentre un alto valore indica la presenza di contaminazione da DNA.

La concentrazione di RNA è stata in seguito ricavata con la formula:

$$[\text{RNA}] \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} \text{ *fattore di diluizione}$$

RETROTRASCRIZIONE

La retrotrascrizione è stata allestita utilizzando:

- l'enzima SuperScriptII Reverse Transcriptase (Invitrogen[®]), una trascrittasi inversa di MMLV (Virus della Leucemia Murina di Moloney);
- RNaseOUT (Invitrogen[®]), un inibitore delle RNasi di pancreas bovino;
- Oligo dT di 17 basi come primer.

La mix di reazione per ciascun campione è stata preparata secondo il seguente schema:

- | | |
|--|------|
| - RNA totale portato a volume 10 μl in H2O-DEPC: | 1 μg |
| - dNTPs (10 mM): | 1 μl |
| - Oligo dT (10 μM): | 1 μl |

Per rompere le strutture secondarie dell'RNA in soluzione, i campioni sono stati incubati a 70°C per 4 minuti e trasferiti rapidamente in ghiaccio.

In seguito, a ciascun campione, sono stati aggiunti i seguenti reagenti, incubati per un'ora a 42°C:

- | | |
|-----------------------------|------|
| - Buffer di reazione 5x: | 4 μl |
| - DTT 0.1 M: | 2 μl |
| - RNaseOUT (40 U/μl): | 1 μl |
| - SuperScriptII (100 U/μl): | 1 μl |

REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE

La reazione di amplificazione è stata così allestita:

- | | |
|------------------------------|--------|
| - Sybr Green master mix 10x: | 2.5 μl |
| - dNTPs (10 mM): | 0.4 μl |

- MgCl₂ (2 mM): 2 µl
- primer Forward (10 µM): 0.75 µl
- primer Reverse (10 µM): 0.75 µl
- Ampli Taq Gold (5 U/µl): 0.125 µl
- H₂O: 0.5 µl
- cDNA opportunamente diluito: 18 µl

Ogni ciclo prevede:

- denaturazione a 95°C per 30 secondi;
 - annealing a 60°C per 30 secondi;
 - estensione a 72°C per 45 secondi.
- } 45 cicli

Di seguito vengono riportati i primer utilizzati :

<i>CG30022</i> 5'	5'-AAAGCAGTGTGTGGGAGGAG-3'
<i>CG30022</i> 3'	5'-CATCCCCACCTATTTTCTTGGG-3'
<i>rp49</i> 5' (169-188)	5'-ATCGGTTACGGATCGAACAA-3'
<i>rp49</i> 3' (314-333)	5'-GACAATCTCCTTGCGCTTCT-3'

METODI MATEMATICI PER LA QUANTIFICAZIONE RELATIVA DEI DATI

Nel presente lavoro di tesi, è stato utilizzato, per la quantificazione relativa dei dati, il metodo matematico di Pfaffl (Pfaffl *et al.*, 2001). Secondo tale metodo, la quantificazione relativa del campione viene espressa come rapporto (R) tra le efficienze di amplificazione (E) del gene “*target*” e del gene “*housekeeping*” (reference), rispettivamente elevati a un fattore Δct che tiene conto delle differenze tra cicli threshold calcolati per il campione di riferimento (*control*) ed il campione di interesse (*sample*).

$$R = (E \text{ target})^{\Delta ct \text{ target (control-sample)}} / (E \text{ reference})^{\Delta ct \text{ reference (control-sample)}}$$

L'efficienza di amplificazione (E) viene calcolata come potenza di base 10 del reciproco della pendenza della retta di regressione (m), con segno negativo.

$$E = 10^{-1/m}$$

Allo scopo di effettuare un'analisi di regressione lineare, per ogni campione vengono effettuate tre diluizioni (contenenti all'incirca 54000 pg/µl, 18000 pg/µl e 6000 pg/µl), ognuna delle quali presente in due repliche; per ciascuna diluizione viene “plottata” la fluorescenza emessa contro i cicli di amplificazione. In seguito, viene individuata una soglia che esclude il background di fluorescenza e per ogni campione viene individuato il numero di cicli necessari affinché la fluorescenza emessa superi tale soglia (ct = “ciclo threshold”). Nella fase di amplificazione esponenziale esiste una relazione lineare tra il logaritmo della concentrazione dei prodotti di amplificazione ed il numero dei cicli threshold. Dall'interpolazione dei

punti ottenuti riportando in grafico il logaritmo delle concentrazioni (alle varie diluizioni) ed il numero dei cicli threshold si ottiene una retta che fornisce il valore della pendenza per calcolare l'efficienza di amplificazione.

WESTERN BLOT

SOLUZIONI E MATERIALI UTILIZZATI

BUFFER DI LISI

HEPES 20 mM, pH 7.5
KCl 100 mM
Glicerolo 5%
EDTA 10 mM
Triton X-100 0.1%
DTT 1 mM
Aprotinina 0.02 mg/ml
Leupeptina 0.01 mg/ml
Pepstatina A 0.05 mg/ml
PMSF (Fluoruro di FenilMetilSulfonile) 0.5 mM

TAMPONE DI CARICAMENTO LDS 4x

Tris-Cl 106 mM
Tris base 141 mM
LDS 2%
DTT 50 mM
Glicerolo 10%
EDTA 0.51 mM
SERVA Blue G250 0.22 mM
Phenol Red 0.175 mM

TBST 1x

TBS 20x
Tween 20 0.05%

TBS 20x

NaCl 0.14 M
Tris-Cl 0.01 M pH 7.5

RUNNING BUFFER

MOPS 20x
H₂O mQ

NUPAGE® ANTIOXIDANT

viene aggiunto nella camera interna per prevenire la riduzione delle proteine dalla riossidazione durante la corsa

MOPS 20x

MOPS 50 mM
Tris base 50 mM
SDS 0.1%
EDTA 1 mM

BLOCKING BUFFER

TBST 1x
Latte in polvere senza grassi (Carnation NonFat Dry Milk, 5 g per 50 ml totali)

TRANSFER BUFFER

Transfer bis tris 20x
Metanolo 20x
H₂O mQ

SOLUZIONE DI SVILUPPO

Tris-Cl 0.1M, pH 8.5
Luminolo 2.25 mM
Acido p-Coumarico 0.2 mM
H₂O₂ 0.01%
H₂O mQ

ESTRAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE PROTEINE

A ciascun campione, costituito da dieci individui adulti, sono stati aggiunti 250 µl di Buffer di Lisi. Ogni campione è stato omogenato con un pestello motorizzato; successivamente, le provette sono state sottoposte a centrifugazione per 10 min a 4°C ed il surnatante recuperato è stato centrifugato ulteriormente per 3 min a 4 °C. La concentrazione proteica dei campioni è stata determinata con un metodo basato su variazioni colorimetriche del colorante "Comassie brilliant blue G-250" (Bio-Rad Protein Assay). 1µl di ciascun campione è stato aggiunto ad una soluzione

colorante al 20%. Dopo 5 minuti di reazione, per ogni campione è stata determinata l'assorbanza a 595 nm allo spettrofotometro (Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS Spectrophotometer).

ELETTROFORESI IN GEL DI POLIACRILAMMIDE

I campioni, dopo l'aggiunta del tampone di caricamento LDS NuPAGE, sono stati denaturati per 10 minuti a 70°C, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al momento della corsa elettroforetica.

Una quantità di proteine equivalente per ciascun campione è stata caricata nel gel di poliacrilammide, assieme al marcatore di peso molecolare ("Precision Plus Protein™ All Blue Standards" BIO-RAD). Per la corsa elettroforetica, avvenuta a 4°C per circa 4 ore a 80 Volt, sono stati utilizzati gel pre-cast NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels 10% (Invitrogen®).

TRASFERIMENTO SU MEMBRANA DI NITROCELLULOSA

Al termine della corsa elettroforetica, le proteine sono state elettrotrasferite su membrana di nitrocellulosa Trans-Blot Transfer Medium (BIO-RAD), nell'apparato di trasferimento "XCell II Blot Module (Invitrogen®), in una soluzione di Transfer Buffer per 1 ora a 30 Volt e 400 mA. La membrana è stata colorata con il colorante Ponceau (SIGMA®) allo scopo di valutare la bontà della corsa e del trasferimento e successivamente decolorata in TBST 1x per qualche minuto. Infine, la membrana è stata incubata per 1 ora in Blocking Buffer (BB) 10% in modo da bloccare i siti aspecifici.

IMMUNOSAGGIO

Dopo il bloccaggio, la membrana è stata posta ad incubare per tutta la notte a 4°C con anticorpo primario diluito in 5 % BB. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- anti-CG30022: anticorpo prodotto in coniglio (Neosystem®), diretto contro il peptide corrispondente agli amminoacidi 335-349 (RKGQEYQNAMARVPA) 1:500, diluito in BB 5%.
- anti-HSP70: anticorpo monoclonale (SIGMA®), diretto contro la proteina "*Heat Shock Protein 70*"; diluizione 1:5000.

Dopo 2 lavaggi con TBST 1x, la membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario IgG-HRP (*Horse Radish Peroxidase* SIGMA). L'anticorpo secondario contro immunoglobuline di coniglio è stato utilizzato alla diluizione 1:10000, mentre quello contro le immunoglobuline di topo a diluizione 1:5000. Successivamente, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi con TBST, ciascuno di 10 minuti, a temperatura ambiente.

RIVELAZIONE DEI SEGNALI DI IMMUNOLOCALIZZAZIONE

Per eseguire la rivelazione dei segnali di immunolocalizzazione, la membrana è stata messa a contatto per 1 minuto con la Soluzione di Rivelazione, applicando il metodo della chemiluminescenza intensificata (ECL, Enhanced ChemiLuminescence). In presenza di perossido di idrogeno e del substrato chemiluminescente luminolo, la perossidasi di rafano ossida il luminolo con la concomitante produzione di luce. Dopo aver allontanato l'eccesso di soluzione, la membrana è stata messa a contatto con una lastra autoradiografica (BioMax light film, KODAK) che si impressiona grazie ai fotoni emessi dalla reazione tra perossidasi e luminolo. La lastra è stata poi sviluppata e fissata con soluzioni Agfa.

IMMUNOSAGGIO E RIVELAZIONE DELLA PROTEINA DI CONTROLLO “HEAT SHOCK PROTEIN-70” (HSP70)

La membrana è stata incubata a 4°C con un anticorpo anti HSP70, prodotto in topo (SIGMA®; 1:10000, in BB 1%). Dopo 3 lavaggi con TBST 1x a temperatura ambiente, la membrana è stata incubata per 1 ora con un anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato con HRP (Horse Radish Peroxidase SIGMA®; 1:1000 in BB 1%). Dopo l'incubazione, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi in TBST 1x. La rivelazione è stata effettuata come descritto nel paragrafo precedente.

VALUTAZIONE SEMIQUANTITATIVA DEI SEGNALI DI IMMUNOLOCALIZZAZIONE

I segnali di immunolocalizzazione sono stati quantificati impiegando un analizzatore di immagini ed il programma Quantity One 4.2.0 Software (Bio-Rad). Per ogni segnale di immunolocalizzazione è stata valutata la densità ottica definita come intensità di segnale/unità di superficie. La quantità relativa di ETHE1 è stata calcolata come il rapporto tra le densità ottiche dei segnali di immunolocalizzazione di ETHE1 e di HSP70 (ETHE1/HSP70) e normalizzata sul segnale di intensità massima per ogni esperimento.

VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO E DELLA VITALITÀ

VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ DI *Drosophila melanogaster*

Gli esperimenti volti all'acquisizione di dati sulla vitalità sono stati condotti registrando il numero di embrioni, larve ed adulti di *Drosophila melanogaster*, ottenuti dagli incroci per indurre l'attività del costrutto e calcolando la percentuale di sopravvivenza tra uno stadio ed il successivo.

Su piastre Petri contenenti il medium per il mantenimento di *Drosophila* sono stati posti individui, di età compresa tra 3 e 7 giorni, di cui si vuole analizzare la progenie, racchiusi in cilindri di plastica trasparente (diametro 5 cm, altezza 8 cm). Sulle estremità dei cilindri, che non sono a contatto con il medium nutritivo,

sono stati praticati alcuni fori, in modo da permettere l'areazione dell'ambiente. In questo modo le femmine depongono embrioni sul medium contenuto nella piastra Petri. Ogni 24 ore per tre giorni la piastra è stata cambiata e gli embrioni alloggiati sulla superficie sono stati contati. In seguito sono state contate le larve e trasferite in un tubino che consente lo sviluppo delle pupe e degli adulti.

La vitalità ai vari stadi di sviluppo è stata valutata su individui interferati UAS-*dEthel+introne-IR Act5C-GAL4* e UAS-*dEthel-IR Act5C-GAL*. In questo caso sono stati utilizzati come controllo sia gli individui UAS-*dEthel+introne-IR TM6B* e UAS-*dEthel-IR TM6B* (fenotipo *Tubby*) originati dal medesimo incrocio di attivazione, che gli individui ottenuti incrociando le rispettive linee parentali con la linea d'origine *w¹¹¹⁸* in modo che in tutti gli individui il costrutto fosse presente in eterozigosi ed in background *w¹¹¹⁸*.

VITALITÀ DEGLI INDIVIDUI ADULTI

Gli individui adulti interferati UAS-*dEthel+introne-IR Act5C-GAL4* sono stati posti in tubi di coltura e ne è stato valutato il tempo di sopravvivenza contando gli individui vivi ogni cinque giorni. In occasione di ogni conteggio, i moscerini sono stati trasferiti in tubi di coltura nuovi in modo che il depauperamento del medium nutritivo e lo sviluppo delle larve non inficiassero la bontà dell'esperimento. I dati raccolti, elaborati tramite un foglio di calcolo Excel, sono stati riportati in grafico ed espressi come percentuale rispetto al numero iniziale di adulti. Il confronto dei dati è stato attuato mediante Test t per dati appaiati.

ANALISI DELLA MOTILITÀ

VELOCITÀ DI LOCOMOZIONE LARVALE

La velocità di locomozione di larve III stadio è stata analizzata in piastre Petri (140 x 15 mm) contenenti una base di agar (1%) avente una altezza di 0.5 cm; inoltre, è stata utilizzata una lampada a fibra ottica (100 W) con una intensità luminosa di 60 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$. Ciascuna larva è stata posta in un solco lineare prodotto sulla superficie dello strato di agar con l'aiuto di un capillare di vetro (diametro: 1mm) e lasciata acclimatare per 60 secondi. Il test è stato condotto registrando il tempo impiegato dalla larva per percorrere la distanza di 1 cm; la velocità di locomozione larvale è stata espressa in cm/sec.

Per ciascun genotipo sono state testate almeno 10 larve.

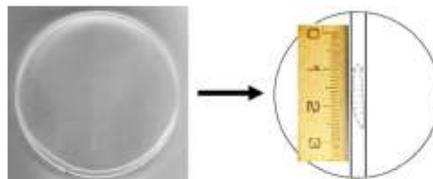


Figura 6.5: Determinazione della velocità di locomozione larvale. Una larva III stadio viene posta in un solco lineare prodotto sulla superficie di uno strato di agar (1%) in una piastra Petri. Viene registrato il tempo necessario affinché la larva percorra la distanza di 1 cm e la velocità di locomozione larvale è espressa in cm/sec.

CONTRAZIONI PERISTALTICHE DELLA LARVA III STADIO

Il numero delle contrazioni peristaltiche è stato registrato appoggiando una larva III stadio sulla superficie di una piastra Petri 100x15 mm contenente uno strato di circa 3 mm di agar 1% e, dopo aver atteso che spontaneamente assumesse andatura regolare, sono state contate le contrazioni peristaltiche compiute in 30 secondi.

TEST “ROLL-OVER”

Quando una larva viene appoggiata sul dorso su una superficie piatta tende a ribaltarsi per ritornare alla consueta posizione ventrale. Il test misura il tempo impiegato dalla larva per ribaltarsi (Ball *et al.*, 1985).

Larve III stadio sono state poste delicatamente in posizione dorsale su una superficie di agar 1% ed è stato misurato il tempo impiegato dall'animale per ribaltarsi.

TILLING

SCELTA DELLA REGIONE DA SOTTOPORRE A TILLING

La regione genomica sottoposta a *Tilling* si estende per 1458 paia di basi e comprende l'intero gene *dEthel*.

Di seguito vengono riportati i primer utilizzati nello screening della libreria di linee di *Drosophila melanogaster* mutagenizzate:

dEthel TILLING Forward
dEthel TILLING Reverse

5'-CGAGGCAAATAATTACAC-3'
5'-GGTACTGGCAGTCTCCTG-3'

Lo screening della libreria e l'identificazione delle mutazioni del gene *dEthel* sono state realizzate dal servizio “*Fly-TILL*” (<http://tilling.fhrc.org:9366>), secondo le modalità descritte da Till *et al.* (2003).

ANALISI BIOINFORMATICA

Mediante analisi bioinformatica, realizzata grazie al contributo del Prof. S. Tosatto (Dipartimento di Biologia, Università degli studi di Padova), è stata caratterizzata la sequenza primaria della proteina dETHE1, identificandone specifiche regioni segnale e peculiari motivi funzionali. La predizione della struttura secondaria e terziaria della proteina dETHE1 ha permesso di identificare la localizzazione delle mutazioni ottenute mediante *Tilling* e di valutarne i possibili effetti sulla funzionalità della proteina in questione.

Sono di seguito riportati i programmi bioinformatici utilizzati per l'analisi *in silico*.

ANALISI DELLA STRUTTURA PRIMARIA

Numerosi database e metodi predittivi sono oggi disponibili per identificare alcune proprietà funzionali delle sequenze aminoacidiche primarie.

Banche dati come EMBL, TREMBL e SWISSPROT ospitano l'insieme delle sequenze aminoacidiche attualmente conosciute. SWISSPROT comprende una parte delle sequenze presenti nella banca dati di TREMBL, risultato della traduzione automatica in aminoacidi di tutte le sequenze della banca dati EMBL, annotate come sequenze codificanti proteine.

Il server PSI-BLAST applica una procedura iterativa che consente di identificare proteine appartenenti alla medesima famiglia ma con sequenze poco simili.

Il server ClustalW crea allineamenti multipli progressivi a partire da allineamenti di sequenze a coppie. Questi allineamenti permettono l'identificazione rapida di sequenze o motivi omologhi ad elevato grado di conservazione.

Il server PSORT II permette di predire la localizzazione di una proteina in quanto è grado di rilevare potenziali segnali per la ritenzione nei diversi compartimenti cellulari.

I programmi SignalP e TargetP sono utili per riconoscere, in una sequenza aminoacidica, la presenza di siti di taglio post-traduzionale caratteristici di peptidi segnale.

Il programma RADAR (*Rapid Automatic Detection and Alignment of Repeats*) permette di evidenziare eventuali sequenze ripetute all'interno della sequenza di interesse.

ANALISI DELLA STRUTTURA SECONDARIA E TERZIARIA

Analisi della struttura secondaria

La struttura secondaria di dETHE1 è stata analizzata mediante l'uso di SPRITZ. Questo server permette di predire la struttura secondaria della sequenza di interesse e fornisce un'indicazione sulle regioni intrinsecamente disordinate (non strutturate) rispetto a quelle ordinate (strutturate) della proteina, mediante l'uso di classificatori binari implementati ad analisi probabilistiche.

Analisi della struttura terziaria

La predizione del ripiegamento tridimensionale della sequenza aminoacidica è stata svolta mediante il programma HOMER (*Homology Modelling Server*).

Questo programma consente di costruire la struttura tridimensionale di una sequenza aminoacidica target sulla base di una sequenza template, utilizzata come riferimento. Poiché le strutture target e template non sono perfettamente sovrapponibili, il modello di struttura tridimensionale prodotto mediante HOMER presenta delle regioni discontinue. La ricostruzione di tali regioni è stata effettuata manualmente utilizzando il server LOBO.

Il modello tridimensionale della proteina dETHE1 è stato analizzato mediante il server ConSurf che, costruendo un allineamento multiplo di proteine tramite ClustalW, consente di evidenziare le regioni maggiormente conservate.

CAPITOLO 7
RISULTATI
dsRNA INTERFERENCE

PREPARAZIONE DEI COSTRUTTI pP[UAST] 5'-d*Ethe1*-3'/GFP/3'-d*Ethe1*-5'

Allo scopo di indurre silenziamento post-trascrizionale del gene *dEthe1* via *double-stranded RNA interference*, sono stati allestiti due differenti costrutti, entrambi contenenti una porzione della sequenza codificante il gene di interesse, clonata in modo da ottenere due ripetizioni invertite e separate da uno spaziatore. Tali sequenze sono localizzate a valle dell'attivatore trascrizionale di lievito UAS che permette di indurre l'espressione del transgene in maniera mirata. Le porzioni del gene *dEthe1*, sono state clonate, invertite e separate dallo spaziatore, nel vettore pP[UAST], plasmide ingegnerizzato per ottenere un'elevata efficienza di trasformazione in *Drosophila*.

I due costrutti pP[UAST] 5'-*dEthe1*-3'/GFP/3'-*dEthe1*-5' differiscono a livello della sequenza codificante una porzione del gene *dEthe1*.

In particolare:

- il costrutto UAS-*dEthe1*+introne-IR contiene un clone di cDNA nel quale è ritenuto l'introne I.
- il costrutto UAS-*dEthe1*-IR contiene un clone di cDNA privo dell'introne I.

Tali cloni di cDNA, la cui sequenza è riportata in figura 7.1, potrebbero rappresentare due isoforme del gene *dEthe1*.

In figura 7.2 viene schematizzata la struttura dei costrutti UAS-*dEthe1*+introne-IR e UAS-*dEthe1*-IR, allestiti mediante la medesima strategia di clonaggio, come riportato nella sezione "materiali e metodi" (capitolo 6).

dETHE1 seq. proteica	V S N I R Y L S S F G T M S L P E R Q P F S P D	23
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>GTCAGTAACATCCGGTACCTGAGCTCGTTGGAAACCATGAGCCTGCCGAGCGCCAGCCCTTTTCTCCAG</u>	69
dETHE1 seq. proteica	F F F R	47
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>ACTTCTCTCCGTC</u> CAAGTACGTAATCGGATGGACTATGTTGAAATATTCTAGTGACACTATTACAAGCA	139
dETHE1 seq. proteica	Q L F D G E S S T Y S Y L L A D L K N G Q A	51
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>TTCATTGACGCTTTTGTATGGAGAAAGCAGCACCTATAGCTACCTTCTGGCCGATCTAAAGAATGGTCAGGC</u>	210
dETHE1 seq. proteica	V I I D P V L E Q A K R D A Q L V K D L G F E	73
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>CGTAATCATGTATCTGTTTTGGAGCAGGCGAAACAGAGATGCCAGCTGGTCAAGGATCTGGGCTTCGAG</u>	281
dETHE1 seq. proteica	L K Y A I	96
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>TTGAAAGTATGCCAGTAAGTTAGAGAGAGATCTCTATCTATGTATGGATAGATCATTGGATGATAATTCAT</u>	351
dETHE1 seq. proteica	N T H M H A D H I T G S	101
<i>dEthe1</i> seq. genomica	CATGACACTACAATATTTCCCATTCGCCCAAGTCAACACACACATGCATGCCGATCACATAACGGGCAG	422
dETHE1 seq. proteica	G W L R K L T G C Q S V I A A A S G A K A D R	113
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>TGGCTGGTTGAGGAAGTTAACTGGGTGTCAATCTGTGATGCTGCGCCAGTGAGCCAAAGGCGGATCGT</u>	492
dETHE1 seq. proteica	H L N E G D R I D F G T H V I D A L A T P G H T	136
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>CACCTGAATGAAGGGATCGCATAGATTTCCGCACCCATGTGATGATGCTCTGGCCACTCCGGGACACA</u>	562
dETHE1 seq. proteica	N G C M T Y V I K D Q G C V F T G D T L L I R	160
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>CAAATGGCTGCATGACCTATGTGATCAAGGATCAGGGTTGTCTTTACCGGAGATACTCTCCTGATACG</u>	632
dETHE1 seq. proteica	G C G R T D F Q E G C P R N L Y E N V H S K I	183
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>AGGCTGTGGACGCACCGATTTCCAGGAAAGCTGCCACGTAATCTCTACGAGAAATGTGCAAGTAAGATC</u>	702
dETHE1 seq. proteica	F T L P E N F R I Y P A H D Y K	206
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>TTACACTCCCGGAAAACCTTTCCGATATATCCGGCGCACGACTATAAGTGAGTGGGATCTGGAATGCTAT</u>	842
dETHE1 seq. proteica	G Q M E S S V W E E K R Y	222
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>GTGATATCAATCTAATGGCGGTCATTTCCAGAGGTCAAATGGAAAGCAGTGTGTGGGAGGAGAAAGGGT</u>	911
dETHE1 seq. proteica	N P R L T K D I E E F V K I M E N L N L P Y P	235
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>ATAACCCAGACTGACTAAGGATATTGAAGAGTTTGTCAAATCATGGAAAACCTAAATTTACCATATCC</u>	981
dETHE1 seq. proteica	K K I G G D V N I L L Y A S F T K F N I F STOP	279
<i>dEthe1</i> seq. genomica	<u>CAAGAAAATAGGTGGGATGTGAACATATTACTATATGCGTCTTTTACTAAGTTAATATCTTTTAG</u>	1048

SEQUENZA INCLUSA IN UAS-dEthe1+introne-IR —
SEQUENZA INCLUSA IN UAS-dEthe1-IR —

Figura 7.1: sequenza del gene *dEthe1* utilizzata per allestire i costrutti UAS-*dEthe1*+introne-IR (sottolineata in rosso) e UAS-*dEthe1*-IR (sottolineata in blu).

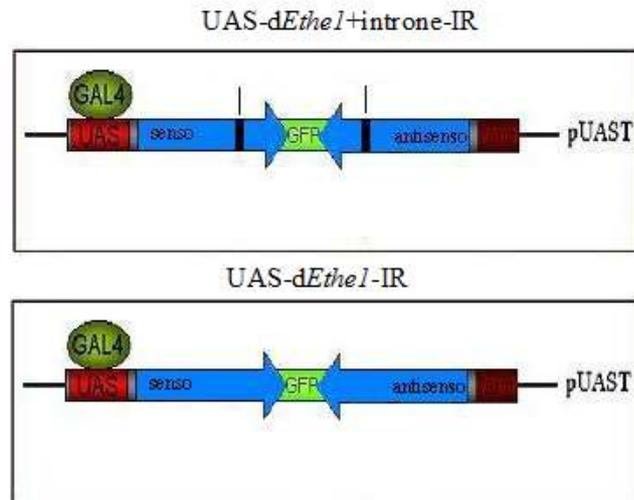


Figura 7.2: Struttura schematizzata dei costrutti UAS-*dEthe1*+introne-IR e UAS-*dEthe1*-IR.

TRASFORMAZIONE DI EMBRIONI *w*¹¹¹⁸ MEDIANTE MICROINIEZIONE DEI COSTRUTTI UAS- *dEthe1*+introne-IR E UAS-*dEthe1*-IR

I dati relativi all'efficienza della trasformazione ottenuta negli esperimenti di microiniezione del costrutto UAS-*dEthe1*+introne-IR sono riportati in tabella 7.1.

COSTRUTTO UAS <i>Ethe1</i> +introne-IR	EMBRIONI INIETTATI	LARVE OTTENUTE	ADULTI OTTENUTI	ADULTI FERTILI	INCROCI CON PROGENIE TRASFORMATA
TOTALE	4937	250	105	87	7
VALORE PERCENTUALE		5	2.1 (42)	1.8 (82.)	0.1 (8.05)

Tabella 7.1: Quadro riassuntivo dei dati riguardanti l'efficienza di trasformazione degli embrioni microiniettati con il costrutto UAS-*dEthe1*+introne-IR. I valori di percentuale sono calcolati in funzione del numero totale di embrioni microiniettati; i valori di percentuale indicati in corsivo, tra parentesi, sono calcolati in riferimento al valore della colonna precedente.

Gli adulti sviluppati dagli embrioni sopravvissuti alla microiniezione (87, vedi tabella 7.1), sono stati numerati progressivamente ed incrociati con individui

appartenenti allo stesso ceppo di partenza w^{1118} ; da sette di questi incroci sono nati individui transgenici. Per ciascun evento di inserzione è stata fondata una sola linea transgenica stabile. Infatti, gli individui trasformati nati dallo stesso incrocio, sono derivati, con elevata probabilità, da un clone di gameti originato, per divisioni successive, dalla medesima cellula progenitrice e, pertanto, presentano l'inserito nella stessa posizione cromosomica. Ciascuna linea ottenuta è stata denominata con il nome del costrutto microinieettato (UAS-d*Ethel*+*introne*-IR) e con due numeri di cui il primo identifica l'individuo che ha subito la microiniezione e ha originato la progenie transgenica, mentre il secondo identifica l'individuo trasformato (F1) da cui è stata originata la linea.

Sono state ottenute le linee transgeniche: 27.2, 46.1, 53.6, 56.1, 85.2, 89.4 e 103.1 UAS-d*Ethel*+*introne*-IR.

Il costrutto UAS-d*Ethel*-IR è stato microinieettato in embrioni del ceppo w^{1118} dal servizio di microiniezione fornito dalla ditta "Bestgene".

In questo modo, sono state ottenute 6 linee transgeniche per il costrutto UAS-d*Ethel*-IR, numerate da 1 a 6, secondo l'ordine di produzione della ditta fornitrice.

CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE TRASFORMATE E BILANCIAMENTO DEGLI INSERTI

Per stabilire su quale cromosoma si fosse inserito l'inserito, sono stati allestiti, per ogni linea transgenica, degli incroci inizialmente con il ceppo w^{1118} e, dopo aver escluso la presenza dell'inserito nel cromosoma X, con il ceppo doppio bilanciante per il II e per il III cromosoma (vedi sezione "materiali e metodi", capitolo 6).

Per la linea 46.1, l'incrocio con femmine vergini della linea w^{1118} ha dato origine ad una progenie F1 costituita da maschi con occhio bianco e femmine con occhio rosso, indicando l'avvenuta inserzione nel cromosoma X. Mediante l'incrocio di maschi emizigoti per l'inserito con femmine omozigoti, selezionate in base al colore più intenso dell'occhio, è stata ottenuta la linea omozigote stabile.

Per tutte le altre linee, è stata esclusa la possibilità di un evento di inserzione nel cromosoma X; si è quindi proceduto con gli incroci con il ceppo w ;CyO/*Sco*;MKRS/TM6B. Per la linea 53.6, l'analisi della progenie del secondo incrocio con il doppio bilanciante (F2) ha permesso di evidenziare la presenza di almeno un inserito nel II cromosoma; inoltre, la valutazione dell'intensità della pigmentazione dell'occhio, in relazione all'associazione con gli aplotipi CyO, *Sco*, MKRS e TM6B, suggerisce la possibile presenza di uno o più inserti anche sul cromosoma III.

La tabella 7.2 indica, per ogni linea, il cromosoma nel quale è avvenuto l'evento di inserzione.

COSTRUTTO	LINEA TRANSGENICA	CROMOSOMA DI INSERZIONE
UAS-d<i>Ethe1</i>+introne-IR	27.2	III
	46.1	X
	53.6	II +III
	56.1	III
	85.2	III
	89.4	III
	103.1	III
UAS-d<i>Ethe1</i>-IR	1	II
	2	III
	3	II
	4	II
	5	III
	6	II

Tabella 7.2: Linee transgeniche ottenute per i costrutti UAS-d*Ethe1*+introne-IR e UAS-d*Ethe1*-IR con indicazione del cromosoma che ha subito inserzione.

Dalla progenie ottenuta dal primo incrocio con il ceppo bilanciatore, sono stati selezionati individui transgenici caratterizzati dalla presenza dei marcatori CyO e MKRS. Tali individui sono stati incrociati tra loro allo scopo di ottenere ceppi stabili in omozigosi. Poiché nella linea 5 UAS-d*Ethe1*-IR gli omozigoti non sono vitali, questa viene mantenuta come ceppo eterozigote bilanciato.

Nel presente lavoro di tesi, sono state caratterizzate le linee 46.1 56.1 e 85.2 UAS-d*Ethe1*+introne-IR e le linee 1, 2 e 3 UAS-d*Ethe1*-IR.

MAPPATURA DELL'INSERTO MEDIANTE IBRIDAZIONE *IN SITU*

Il numero esatto e la posizione degli inserti all'interno del genoma degli individui transgenici ottenuti sono stati determinati mediante l'impiego della tecnica dell'ibridazione *in situ* su cromosomi politenici larvali.

La sonda è stata ottenuta impiegando come DNA stampo il cDNA del gene "*miniwhite*", contenuto nel vettore di trasformazione; l'allele w^+ funge da marcatore negli individui trasformanti e, per questo, è stato utilizzato come marcatore negli esperimenti di ibridazione *in situ*.

L'efficienza della marcatura e la concentrazione della sonda sono state stimate tramite il test Dot-Blot, per confronto con un DNA di controllo marcato (5 ng/μl) e non marcato (100 ng/μl). In figura 7.3 è riportato il risultato relativo al Dot-Blot: dallo sviluppo della reazione colorimetrica si può confermare l'avvenuta marcatura della sonda, la cui concentrazione è stimata pari a 1,25 ng/μl. Per l'ibridazione dei cromosomi, la sonda è stata diluita ad una concentrazione finale di 0,078 ng/μl.

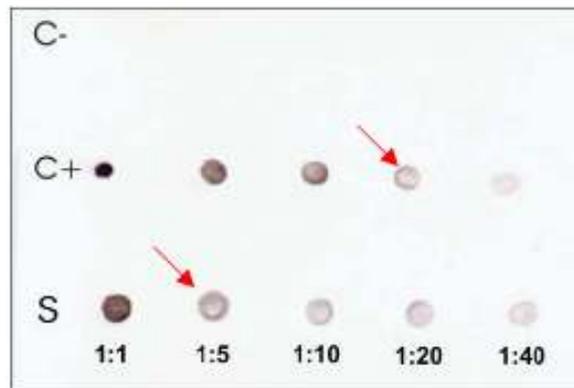


Figura 7.3: Pattern relativo al test Dot-Blot effettuato sul DNA sonda del gene *white* derivato dal costrutto UAS-*dEthel1+introne-IR*. Nella prima riga, in corrispondenza della posizione 1:1, è stata deposta una goccia di DNA non marcato (C-); nella seconda riga, sono visibili i segnali relativi alle diluizioni del DNA di controllo marcato (C+); nell'ultima riga quelli relativi al DNA sonda (S). Le frecce indicano i campioni che presentano una intensità di segnale simile.

Nelle figure 7.4 A, B e C sono riportate le fotografie dei cromosomi politenici appartenenti rispettivamente a larve delle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2. Risulta evidente, nelle linee analizzate, un singolo segnale di ibridazione giallo-verde sui cromosomi rosso-arancione, colorati con bromuro di etidio. In figura 7.4 A e B il segnale di marcatura in posizione X 3C corrisponde al gene *white* che, benché parzialmente deletato nella linea w^{1118} , viene riconosciuto dalla sonda. I risultati relativi alla mappatura del costrutto UAS *dEthel1+introne-IR* sono riportati in tabella 7.3.

LINEA TRANSGENICA	NUMERO DI INSERTI	POSIZIONE DEGLI INSERTI
46.1	1	X2A
56.1	1	R3 90F-91A
85.2	1	R3 90-94

Tabella 7.3: Quadro riassuntivo della mappatura degli inserti. Nella prima colonna sono indicate le linee transgeniche; nella seconda colonna il numero degli inserti all'interno di ciascuna linea analizzata; nella terza la posizione dei transgeni nei diversi bracci cromosomici. X: cromosoma X; 3R: terzo cromosoma, braccio destro.

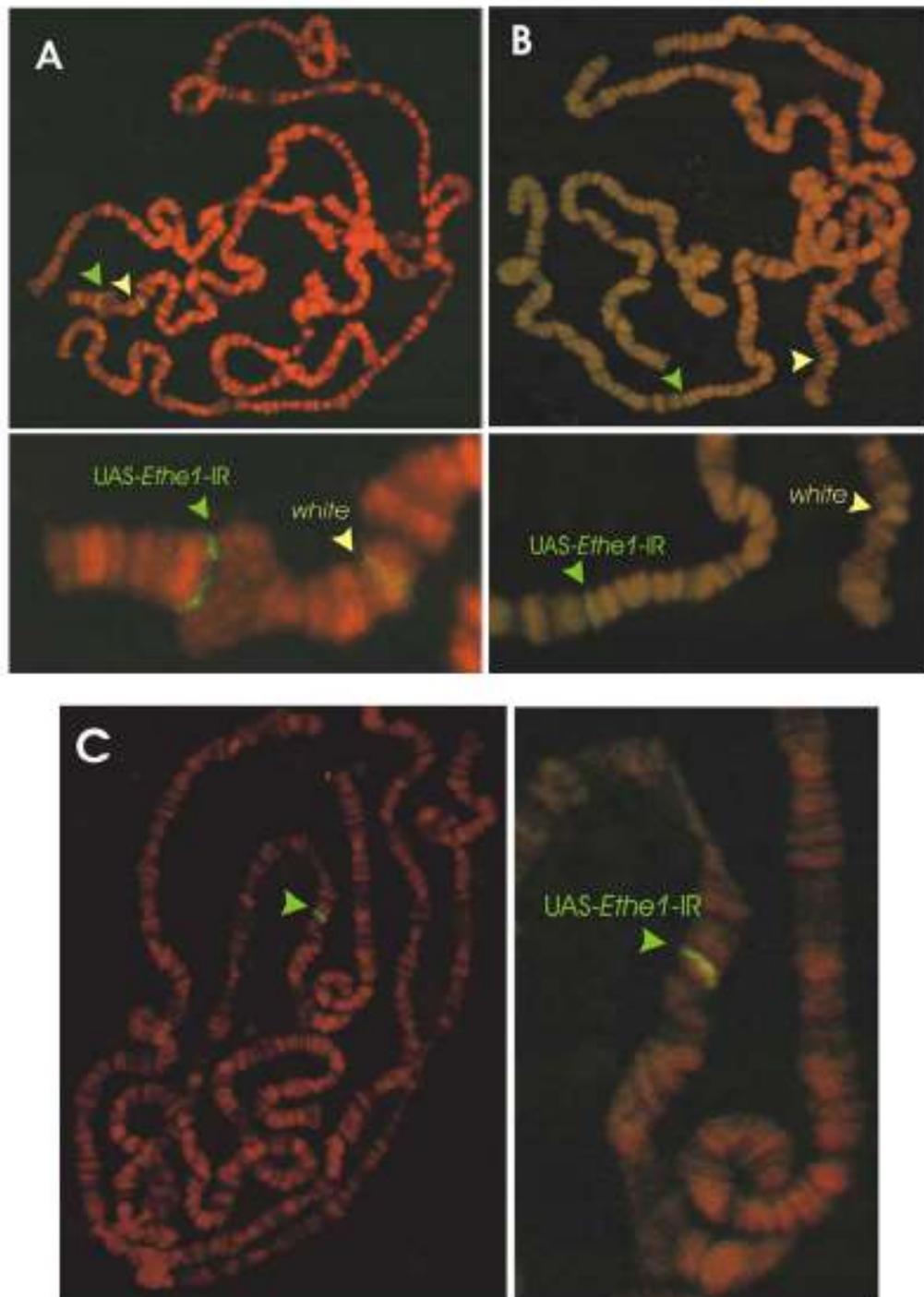


Figura 7.4: Nuclei politenici appartenenti alle linee 46.1 (A), 56.1 (B) e 85.2 (C) UAS *dEthel1+introne1*-IR. È possibile distinguere i segnali di ibridazione in corrispondenza del punto di inserzione del transgene (freccia verde) e del gene *white* endogeno (freccia gialla).

VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO E DELLA VITALITÀ

SVILUPPO DA UOVO AD ADULTO

In tabella 7.4 sono riportati i dati relativi allo sviluppo degli individui nati dai seguenti incroci:

- incrocio di individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* e 1, 2 e 3 UAS-*dEthel1-IR* con individui appartenenti alla linea *y,w; Act5C-GAL4/TM6B*.
- incrocio di individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* e 1, 2 e 3 UAS-*dEthel1-IR* con individui appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸*.

Per ciascuna linea transgenica analizzata, sono riportati i dati relativi agli individui interferati (UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* e UAS-*dEthel1-IR Act5C-GAL4*) ed agli individui utilizzati come controllo (UAS-*dEthel1+introne-IR TM6B*, UAS-*dEthel1-IR TM6B*, UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸* e UAS-*dEthel1-IR* × *w¹¹¹⁸*). In figura 7.5 i valori ottenuti sono espressi come percentuale, rispetto al totale di embrioni deposti per ogni incrocio.

COSTRUTTO UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i>						
INCROCIO	STADIO DI SVILUPPO	INDIVIDUI	INCROCIO	STADIO DI SVILUPPO	INDIVIDUI	
					UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> TM6B	UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> Act5C-GAL4
46.1 UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> x <i>w¹¹¹⁸</i>	embrioni	286	46.1 UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> x <i>y,w;Act5C-GAL4/TM6B</i>	embrioni	362	
	larve	279		larve	205	192
	pupe	256		pupe	198	178
	adulti	242		adulti	163	157
56.1 UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> x <i>w¹¹¹⁸</i>	embrioni	256	56.1 UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> x <i>y,w;Act5C-GAL4/TM6B</i>	embrioni	334	
	larve	245		larve	84	102
	pupe	241		pupe	83	94
	adulti	221		adulti	73	88
85.2 UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> x <i>w¹¹¹⁸</i>	embrioni	445	85.2 UAS- <i>dEthel1+introne-IR</i> x <i>y,w;Act5C-GAL4/TM6B</i>	embrioni	463	
	larve	315		larve	179	184
	pupe	292		pupe	153	167
	adulti	247		adulti	145	140
COSTRUTTO UAS- <i>dEthel1-IR</i>						
INCROCIO	STADIO DI SVILUPPO	INDIVIDUI	INCROCIO	STADIO DI SVILUPPO	INDIVIDUI	
					UAS- <i>dEthel1-IR</i> TM6B	UAS- <i>dEthel1-IR</i> Act5C-GAL4
1 UAS- <i>dEthel1-IR</i> x <i>w¹¹¹⁸</i>	embrioni	312	1 UAS- <i>dEthel1-IR</i> x <i>y,w;Act5C-GAL4/TM6B</i>	embrioni	337	
	larve	269		larve	150	160
	pupe	247		pupe	127	142
	adulti	220		adulti	123	138
2 UAS- <i>dEthel1-IR</i> x <i>w¹¹¹⁸</i>	embrioni	290	2 UAS- <i>dEthel1-IR</i> x <i>y,w;Act5C-GAL4/TM6B</i>	embrioni	310	
	larve	277		larve	138	150
	pupe	250		pupe	120	135
	adulti	247		adulti	115	127
3 UAS- <i>dEthel1-IR</i> x <i>w¹¹¹⁸</i>	embrioni	298	3 UAS- <i>dEthel1-IR</i> x <i>y,w;Act5C-GAL4/TM6B</i>	embrioni	326	
	larve	270		larve	154	169
	pupe	258		pupe	132	149
	adulti	249		adulti	116	135

Tabella 7.4: Quadro riassuntivo dei dati relativi allo sviluppo di individui nati dagli incroci di individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* e 1, 2 e 3 UAS-*dEthel1-IR* con individui appartenenti alle linee *y,w;Act5C-GAL4/TM6B* e *w¹¹¹⁸*. Per ciascun incrocio, è riportato il numero di embrioni, larve, pupe ed adulti ottenuti.

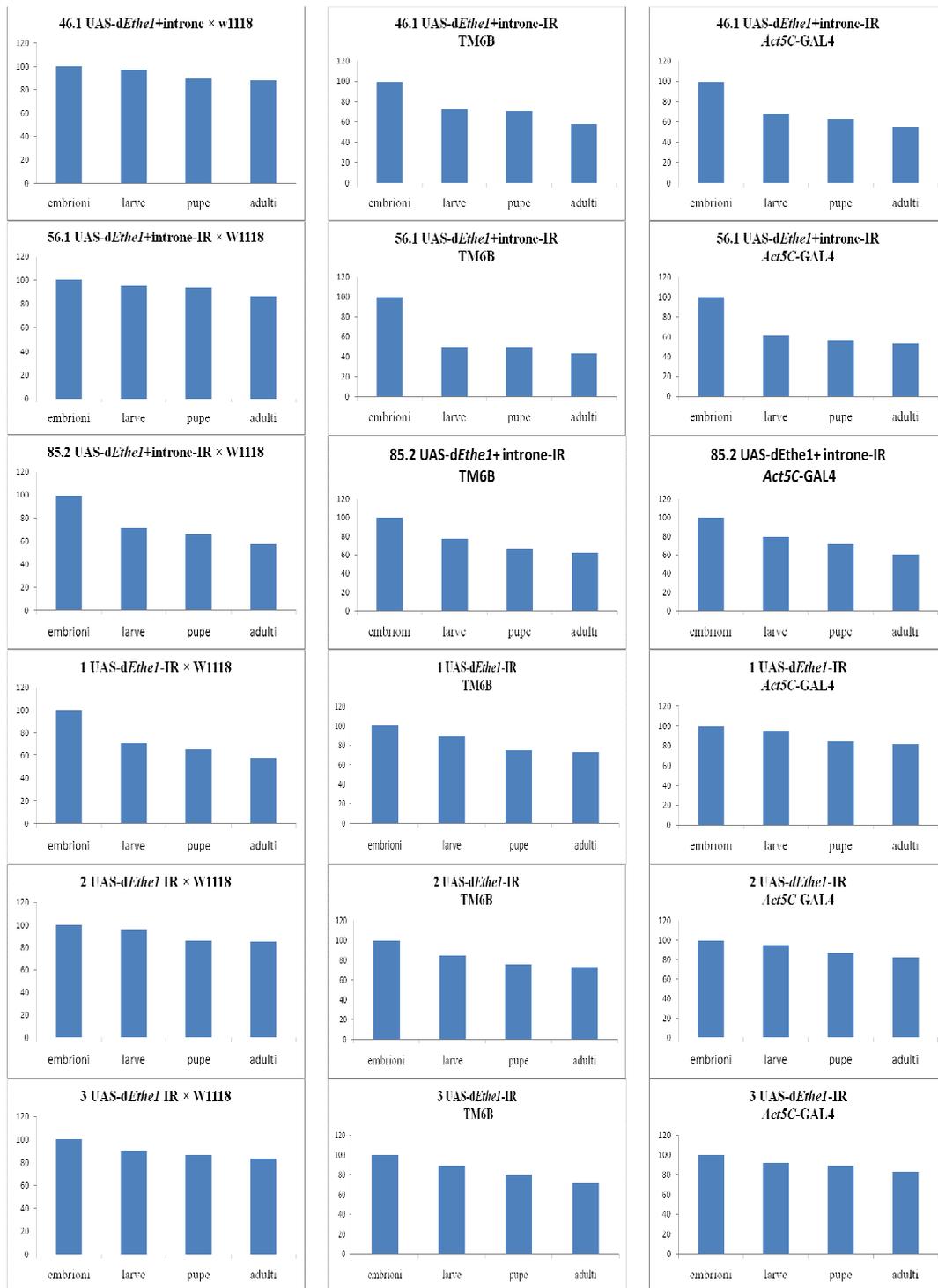


Figura 7.5: Linee transgeniche 46.1, 56.1, 85.2, 1, 2 e 3. I grafici a sinistra rappresentano, nelle diverse fasi dello sviluppo, la percentuale di individui UAS-d*Ethel*+introne-IR × w¹¹¹⁸ e UAS-d*Ethel*-IR × w¹¹¹⁸. I grafici al centro si riferiscono agli individui UAS-d*Ethel*+introne-IR TM6B e UAS-d*Ethel*-IR TM6B. I grafici a destra sono relativi agli individui UAS-d*Ethel*+introne-IR Act5C-GAL4 e UAS-d*Ethel*-IR Act5C-GAL4

In tutte le linee analizzate gli individui interferati raggiungono lo stadio adulto in modo non significativamente differente rispetto alle linee utilizzate come controllo. La leggera letalità che si osserva nel passaggio uova → larva può essere imputabile ad una ridotta fertilità dei maschi del ceppo *yw;Act5C-GAL4/TM6B* e quindi è, con ogni probabilità, indipendente dagli effetti dell'abbattimento del gene *dEthel*.

VITALITÀ DEGLI INDIVIDUI ADULTI

L'analisi della vitalità è stata effettuata su individui adulti interferati UAS-*dEthel*+*introne-IR Act5C-GAL4*, ottenuti dall'incrocio tra individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel*+*introne-IR* ed individui appartenenti alla linea *yw;Act5C-GAL4/TM6B*.

Il campione di controllo è costituito da individui UAS-*dEthel*+*introne-IR* × *w¹¹¹⁸*, ottenuti dall'incrocio tra individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel*+*introne-IR* ed individui appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸*.

Il tempo di sopravvivenza di ciascun campione è stato valutato contando, ogni cinque giorni, gli individui vivi.

I dati raccolti, rappresentati graficamente in figura 7.6, sono espressi come percentuale rispetto al numero iniziale di individui adulti.

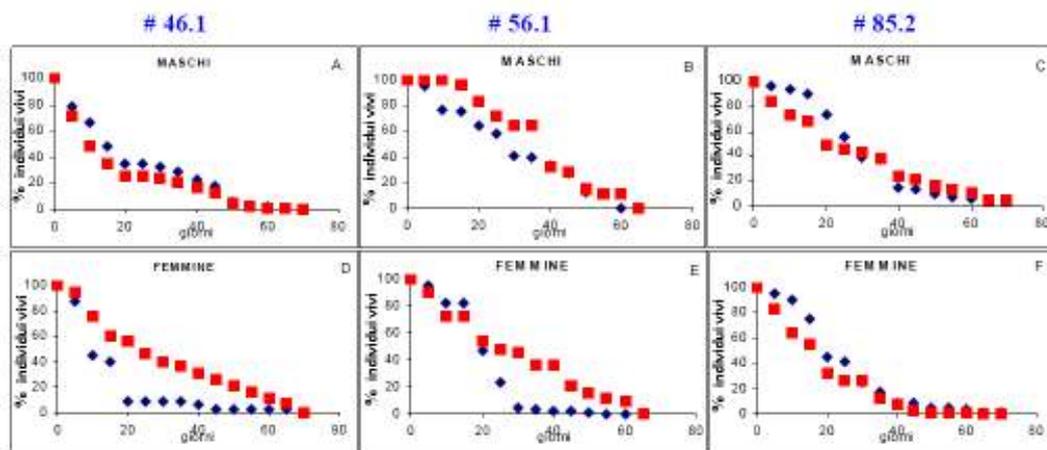


Figura 7.6: Rappresentazione grafica della sopravvivenza degli individui adulti interferati UAS-*dEthel*+*introne-IR Act5C-GAL4* (quadrati rossi) appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 ed 85.2, confrontata con quella dei controlli UAS-*dEthel*+*introne-IR* × *w¹¹¹⁸* (rombi blu). I grafici A, B e C si riferiscono ad individui maschi; i grafici D, E ed F alle femmine. Per ogni grafico sono riportati, in ascissa, il tempo espresso in giorni e, in ordinata, la percentuale di organismi vivi rispetto al numero iniziale.

Il confronto dei dati, effettuato mediante Test t, non rivela differenze statisticamente significative tra individui interferati ed i relativi controlli.

Unica eccezione è rappresentata dalle femmine interferate appartenenti alle linee 46.1 e 56.1 per le quali si osserva una sopravvivenza maggiore rispetto ai controlli (femmine 46.1 UAS-*dEthel*+*introne-IR Act5C-GAL4* vs. femmine 46.1 UAS-

dEthel1+introne-IR × *w¹¹¹⁸*: P=0.000078) (femmine 56.1 UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* vs. femmine 56.1 UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸*: P=0.015) ($\alpha=0.05$).

ANALISI DELLA MOTILITÀ

TEST DI LOCOMOZIONE DELLA LARVA III STADIO

La velocità di locomozione larvale è stata valutata su larve III stadio interferate UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4*, ottenute dall'incrocio tra individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* ed individui appartenenti alla linea *yw;Act5C-GAL4/TM6B*.

I campioni di controllo sono costituiti da larve III stadio UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸*, ottenute dall'incrocio tra individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2 ed individui appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸*.

Per ciascun genotipo, sono state analizzate 20 larve. La velocità media relativa a ciascun campione, ottenuta da tre repliche indipendenti, è rappresentata graficamente in figura 7.7.

L'analisi statistica (Test t), indica che non esistono differenze significative tra gli individui interferati della linea 46.1 ed il relativo campione di controllo.

Gli individui delle linee 56.1 ed 85.2 mostrano, invece, una velocità di locomozione significativamente maggiore rispetto ai relativi controlli (Test t: 56.1 UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* vs. 56.1 UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸*: P= 0.041) (Test t: 85.2 vs. 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸*: P= 0.006) ($\alpha=0.05$).

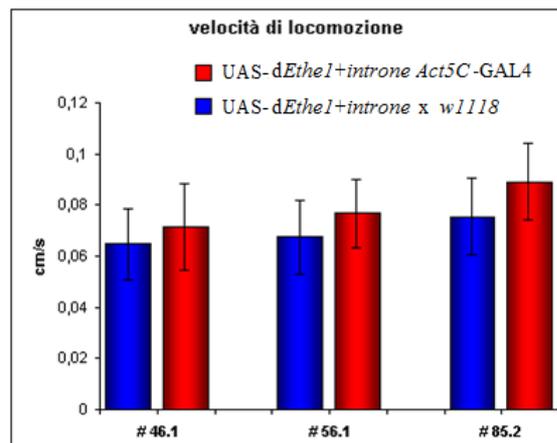


Figura 7.7: Rappresentazione grafica dei valori medi di velocità di locomozione larvale relativa ad individui interferati UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* (istogrammi rossi) appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 ed 85.2 ed agli individui di controllo UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸* (istogrammi blu).

CONTRAZIONI PERISTALTICHE

Questo tipo di analisi è stata condotta su larve III stadio interferate UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4*, ottenute dall'incrocio tra individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne* ed individui appartenenti alla linea *yw;Act5C-GAL4/TM6B*.

I campioni di controllo sono costituiti da larve III stadio UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸*, ottenute dall'incrocio tra individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne* ed individui appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸*.

Per ciascun campione, sono state prese in esame 20 larve, analizzate in tre repliche indipendenti.

In figura 7.8 sono rappresentati graficamente, per ciascun campione, il numero medio di contrazioni peristaltiche effettuate durante la locomozione, in un intervallo di 30 secondi.

L'analisi statistica (Test t), indica che, per le linee transgeniche esaminate, non esistono differenze significative tra gli individui interferati ed i relativi campioni di controllo ($\alpha = 0.05$).

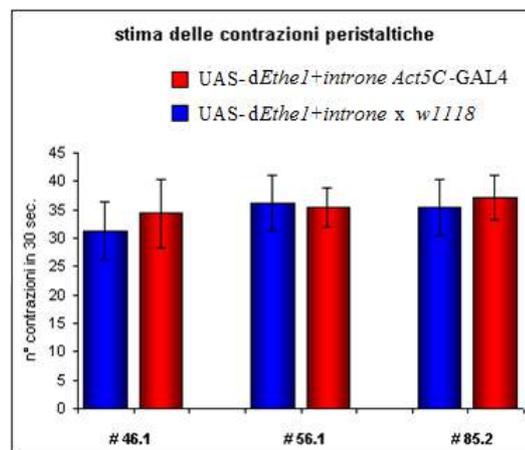


Figura 7.8: Rappresentazione grafica del numero medio di contrazioni peristaltiche compiute, durante la locomozione, da larve III stadio. I campioni analizzati sono costituiti da individui interferati UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* (istogrammi rossi) appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 ed 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* e dai relativi individui di controllo UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸* (istogrammi blu).

TEST “ROLL-OVER”

Questo tipo di analisi è stata condotta su larve III stadio interferate UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4*, ottenute dall'incrocio tra individui appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* ed individui appartenenti alla linea *yw;Act5C-GAL4/TM6B*.

I campioni di controllo sono costituiti da larve III stadio UAS-*dEthel1+introne-IR* × *w¹¹¹⁸*, ottenute dall'incrocio di individui appartenenti alle linee transgeniche

46.1, 56.1 e 85.2 UAS-*dEthel1+introne-IR* con individui appartenenti alla linea w^{1118} .

Per ciascun campione, sono state prese in esame 20 larve, analizzate in tre repliche indipendenti.

I valori medi del tempo impiegato dalle larve III stadio per ritornare in posizione ventrale dopo essere state “ribaltate” in posizione dorsale sono rappresentati graficamente in figura 7.9.

L’analisi statistica (Test t) ha evidenziato che, per le tre linee esaminate, non ci sono differenze significative tra gli individui interferati UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* ed i relativi controlli UAS-*dEthel1+introne-IR* $\times w^{1118}$ ($\alpha = 0.05$).

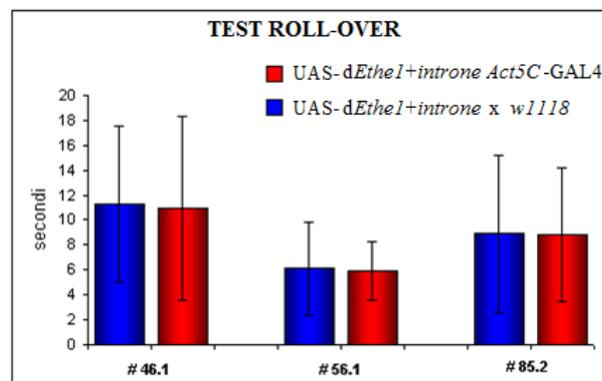


Figura 7.9: Rappresentazione grafica del tempo medio impiegato dalle larve III stadio nel test “roll-over”. I campioni analizzati sono costituiti da individui interferati UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* (istogrammi rossi) appartenenti alle linee transgeniche 46.1, 56.1 ed 85.2 e dai relativi individui di controllo UAS-*dEthel1+introne-IR* $\times w^{1118}$ (istogrammi blu).

REAL-TIME PCR

Allo scopo di valutare, negli individui interferati UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* (linee 46.1, 56.1 e 85.2), il livello di espressione trascrizionale del gene *dEthel1*, sono state effettuate estrazioni di RNA a partire dai seguenti campioni:

- 10 maschi interferati;
- 10 femmine interferate;
- 10 individui adulti appartenenti al ceppo w^{1118} , come controllo.

1 μ g dell’RNA totale ottenuto per ciascun campione, valutato da un punto di vista sia qualitativo che quantitativo allo spettrofotometro, è stato retrotrascritto in cDNA ed amplificato mediante Real Time PCR, secondo quanto descritto nella sezione “materiali e metodi” (capitolo 6). Oltre al gene *dEthel1*, è stato amplificato, come gene di riferimento (“reference”), il gene *rp49*, codificante per la proteina ribosomale RP49, la cui espressione viene considerata costante nel corso dello sviluppo di *Drosophila melanogaster*. Questo ha consentito di normalizzare le differenze quantitative tra i campioni analizzati, dovute ad errori

sperimentali. I livelli relativi di mRNA del gene *dEthel* negli individui interferati sono stati determinati tramite il confronto con quelli relativi al campione di riferimento (controllo).

Dall'analisi dei dati, rappresentati graficamente nell'istogramma in figura 7.10, si evidenzia, negli individui interferati, sia maschi sia femmine, delle linee 46.1, 56.1 e 85.2, un decremento dei livelli di trascrizione del gene *dEthel* pari a circa il 40%, rispetto al ceppo selvatico; nel caso dei maschi interferati della linea 56.1 è stato rilevato un livello relativo di mRNA del gene *dEthel* pari a circa il 18%, rispetto al controllo.

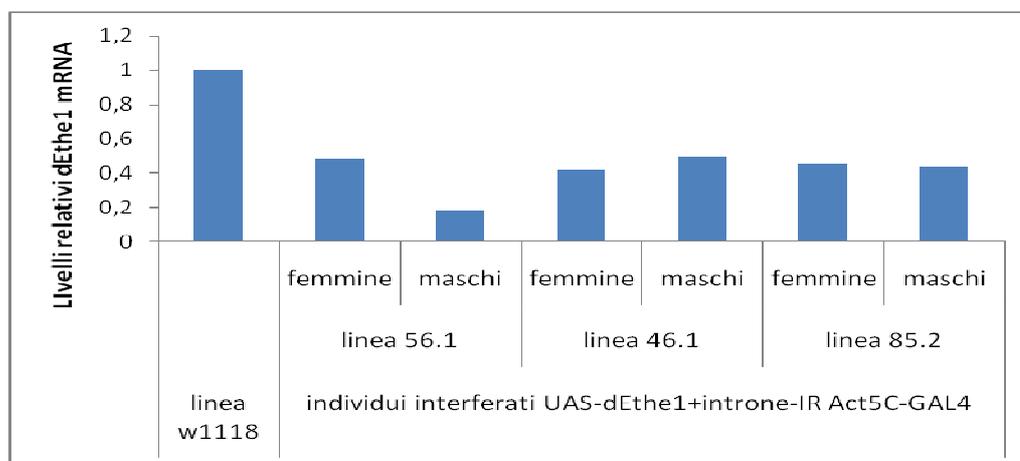


Figura 7.10: rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dagli esperimenti di Real Time PCR condotti su 10 individui interferati UAS-*dEthel*+*introne-IR Act5C-GAL4*, maschi e femmine, appartenenti alle linee 46.1, 56.1 ed 85.1. Come controllo, sono stati utilizzati individui adulti della linea *w¹¹¹⁸*.

WESTERN BLOT

Mediante analisi di western blot, è stata valutata l'espressione proteica del gene *dEthel* negli individui transgenici interferati UAS-*dEthel*+*introne-IR Act5C-GAL4* delle linee 46.1, 56.1, 85.2 e negli individui transgenici interferati UAS-*Ethel-IR Act5C-GAL4* delle linee 1, 2 e 3.

Per ciascuna linea, è stata effettuata una estrazione di proteine totali, a partire dai seguenti campioni:

- 10 larve III stadio;
- 10 pupe;
- 10 adulti.

In parallelo, tali campioni sono stati analizzati anche a partire dalla linea *w¹¹¹⁸*, utilizzata come controllo.

Quantità equivalenti degli estratti proteici di ciascun campione sono state separate elettroforeticamente mediante gel di poliacrilammide al 10%. Nelle figure 7.11 e 7.12 viene riportato, a titolo esemplificativo, il risultato ottenuto da due esperimenti condotti su individui interferati delle linee 56.1 UAS-*dEthel1+introne-IR* e 1 UAS-*dEthel1+-IR*.

Il segnale relativo alla proteina codificata dal gene *dEthel1* che, putativamente, ha un peso molecolare di circa 28 KDa, è identificabile in quanto viene inibito in maniera specifica in seguito a pre-adsorbimento dell'anticorpo primario con i relativi peptidi, utilizzati in tampone di bloccaggio (Blocking Buffer 5%), ad una concentrazione finale di 300 μ M.

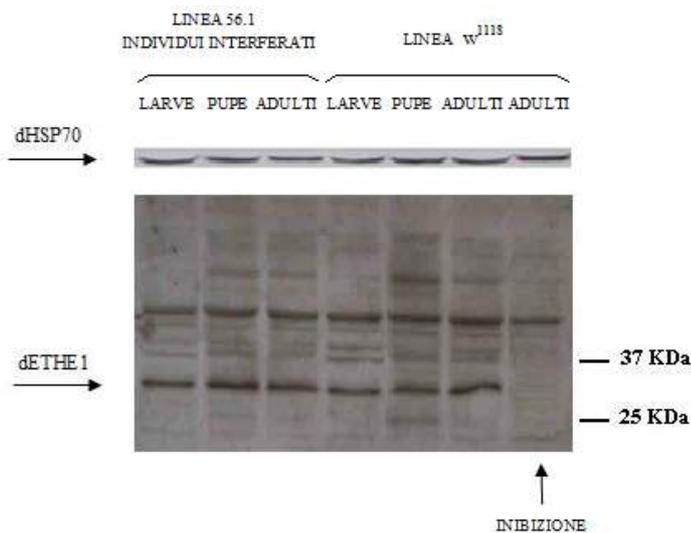


Figura 7.11: Western Blot: lastra radiografica. Le frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento dHSP70 ed alla proteina dETHE1. Ciascun campione, costituito, rispettivamente, da 10 larve, 10 pupe e 10 adulti, è stato raccolto da individui interferati UAS-*dEthel1+introne-IR Act5C-GAL4* appartenenti alla linea 56.1 e da individui appartenenti alla linea di controllo *w¹¹¹⁸*. Il segnale relativo alla proteina dETHE1 ottenuta dagli estratti proteici di 10 individui adulti della linea *w¹¹¹⁸* scompare in seguito a specifica inibizione tramite pre-adsorbimento peptidico.

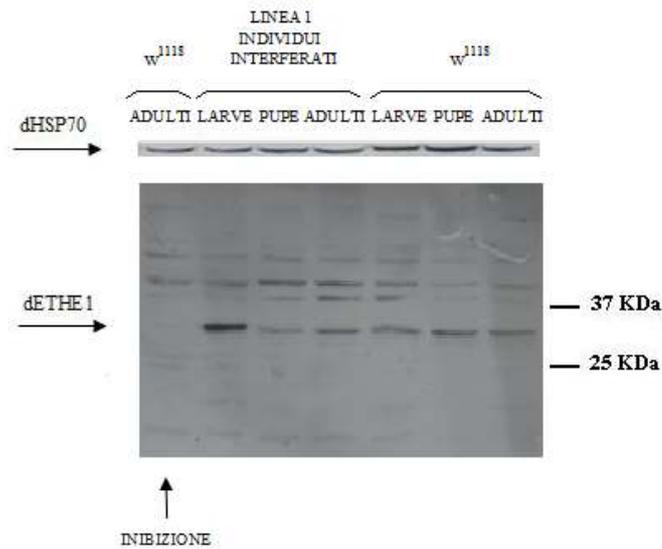


Figura 7.12: Western Blot: lastra radiografica. La frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento dHSP70 ed alla proteina dETHE1. Ciascun campione è costituito, rispettivamente, da 10 larve, 10 pupe e 10 adulti, è stato raccolto da individui interferati UAS-*dEthel-IR Act5C-GAL4* appartenenti alla linea transgenica 1 UAS-*dEthel-IR* e da individui appartenenti alla linea di controllo *w¹¹¹⁸*. Il segnale relativo alla proteina dETHE1, ottenuta dagli estratti proteici di 10 individui adulti della linea *w¹¹¹⁸*, scompare in seguito a specifica inibizione tramite pre-adsorbimento peptidico.

Per poter effettuare una normalizzazione dei dati, ciascun blot è stato ibridato con anticorpo anti-HSP70, utilizzato come standard interno. Al fine di avere una stima semiquantitativa del livello di espressione nei diversi campioni utilizzati per l'analisi della linea transgenica, le immagini del Western Blot sono state lette con un analizzatore di immagini che, per ciascuna banda, ha valutato la densità ottica (OD), mediante il software Quantità-One 4.2.0 (BioRad). A questi valori è stata sottratta la densità relativa al rumore di fondo. Inoltre, per confrontare i differenti campioni ed avere una stima dei livelli di espressione della proteina dETHE1 nella linea transgenica, per ogni pool analizzato è stato calcolato il seguente rapporto:

$$DO_{dETHE1 \text{ normalizzata}} = \frac{DO_{dETHE1} - DO_{\text{rumore di fondo}}}{DO_{Hsp70} - DO_{\text{rumore di fondo}}}$$

I valori di $DO_{dETHE1 \text{ normalizzata}}$ della linea transgenica sono stati poi rapportati ai valori di $DO_{dETHE1 \text{ normalizzata}}$ della linea di controllo. I valori ottenuti sono stati infine espressi come percentuale.

In figura 7.13 vengono rappresentati graficamente i livelli di espressione proteica del gene *dEthel* negli individui interferati, rispetto agli individui di controllo; in nessun caso emergono differenze significative tra gli individui interferati ed il wild-type (Test t).

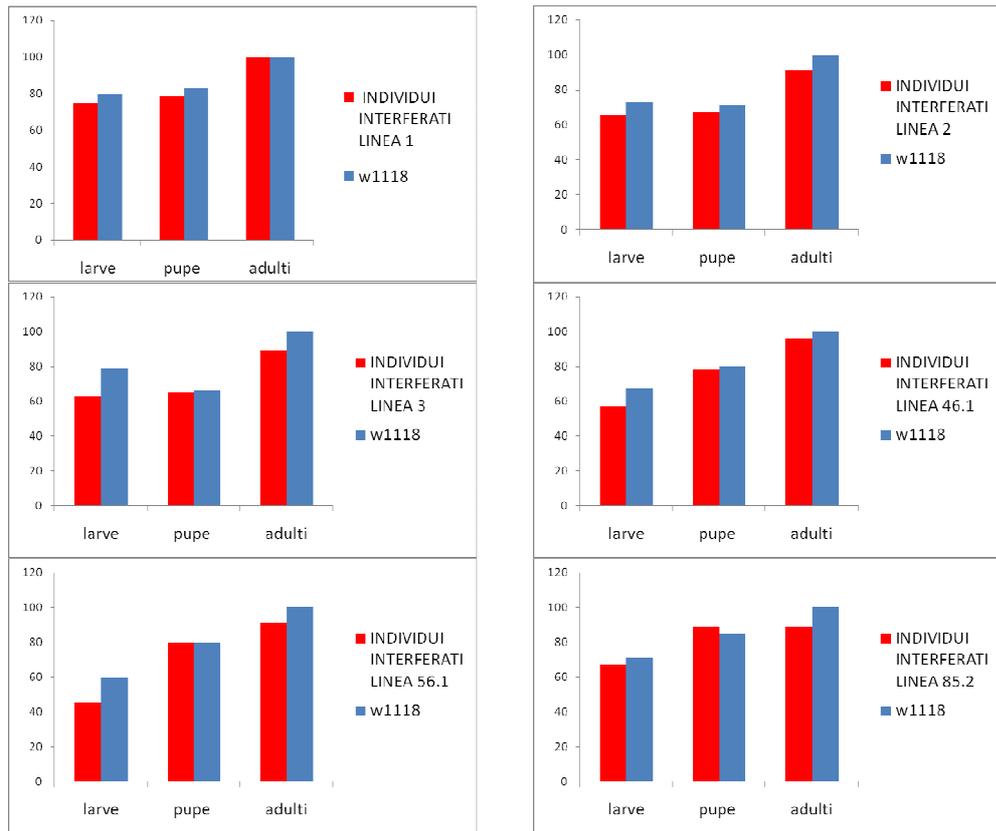


Figura 7.13: Livelli di espressione della proteina codificata dal gene *dEthe1* nei diversi stadi di sviluppo di individui interferati UAS-*dEthe1*+*introne-IR Act5C-GAL4* delle linee transgeniche 46.1, 56.1, 85.2 e di individui interferati UAS-*dEthe1*-IR *Act5C-GAL4* delle linee transgeniche 1, 2 (istogrammi rappresentati in rosso). Gli individui di controllo (istogrammi rappresentati in blu) appartengono alla linea *w¹¹¹⁸*.

CAPITOLO 8
RISULTATI
CARATTERIZZAZIONE
LINEE 0017965 e 104009

LINEE 0017965 e 104009

Recentemente, è stato reso disponibile, presso lo “*Stock Center*” di Bloomington, il ceppo mutante 0017965, caratterizzato dall’inserzione di un elemento trasponibile (*PiggyBac*) nella regione 5’ UTR del gene *dEthel*, 144 paia di basi a monte del sito d’inizio della traduzione (Thibault *et al.*, 2004).

Inoltre, presso lo “*Stock Center*” di Kyoto è reperibile il ceppo mutante 104009, caratterizzato dall’inserzione di un elemento trasponibile (Elemento P) nell’esone I del gene *dEthel*.

Considerata la localizzazione di tali elementi trasponibili, sono stati analizzati eventuali loro effetti sull’espressione del gene *dEthel* a livello trascrizionale (linea 104009) e traduzionale (linee 104009 e 0017965).

Negli esperimenti condotti, individui delle linee transgeniche in esame sono stati confrontati con il ceppo w^{1118} , utilizzato come controllo.

Va tenuto presente che la linea transgenica 0017965 viene mantenuta come stock bilanciato e presenta, nel cromosoma omologo rispetto all’inserzione (cromosoma 2), inversioni multiple ed il marcatore *Curly* (*Cy*), responsabile del fenotipo “ali arricciate” e letale in omozigosi. Ne risulta che i moscerini eterozigoti sono facilmente distinguibili dagli omozigoti per la presenza di ali arricciate.

La linea transgenica 104009, invece, viene mantenuta come stock omozigote. Per questa linea sono stati quindi sottoposti ad indagini molecolari solamente individui omozigoti per l’inserzione.

REAL TIME PCR

Allo scopo di rendere robusta l’analisi dell’espressione trascrizionale del gene *dEthel* nella linea transgenica 0017965, sono state effettuate sei estrazioni di RNA indipendenti su tre diversi campioni, ciascuno costituito da:

- 7 moscerini adulti omozigoti per l’inserzione;
- 7 moscerini adulti eterozigoti per l’inserzione;
- 7 moscerini adulti appartenenti al ceppo w^{1118} , come controllo.

1 µg dell’RNA totale ottenuto per ciascun campione, valutato da un punto di vista sia qualitativo che quantitativo allo spettrofotometro, è stato retrotrascritto in cDNA ed amplificato mediante Real Time PCR, secondo quanto descritto nella sezione “materiali e metodi” (capitolo 6). Oltre al gene “target” *dEthel*, è stato amplificato, come gene di riferimento (“reference”), il gene *rp49*, codificante per la proteina ribosomale RP49, la cui espressione viene considerata costante nel corso dello sviluppo di *Drosophila melanogaster*. Ciò ha consentito di normalizzare le differenze quantitative tra i campioni analizzati, dovute ad errori sperimentali. I livelli relativi di mRNA di *dEthel*, in entrambi i genotipi analizzati (omozigoti ed eterozigoti per l’inserzione), sono stati determinati tramite il confronto con quelli relativi al campione di riferimento (controllo), costituito da individui w^{1118} .

L’analisi dei dati, rappresentati graficamente nell’istogramma in figura 8.1, si evidenzia:

- negli individui eterozigoti, un decremento dei livelli di trascrizione del gene *dEthel* pari al 40%, rispetto al ceppo selvatico.
- negli individui omozigoti, un decremento dei livelli di trascrizione del gene *dEthel* pari al 60 %, rispetto al ceppo selvatico.

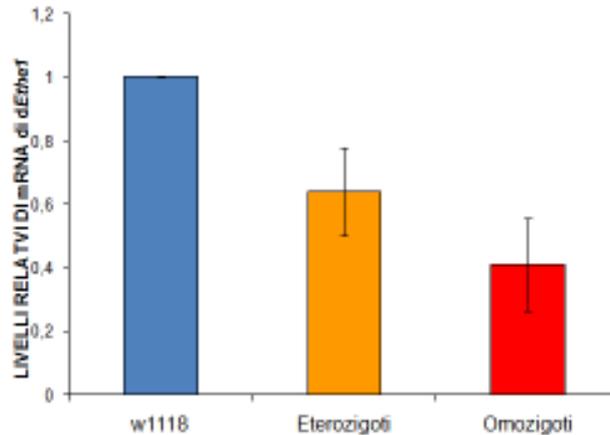


Figura 8.1: Linea 0017965: Rappresentazione grafica dei risultati ottenuti dagli esperimenti di Real Time PCR (Media +/- Deviazione Standard) sui tre genotipi analizzati: w^{1118} , eterozigoti per l'inserzione ed omozigoti per l'inserzione,

Si può dunque ipotizzare che la presenza dell'inserzione sia in grado di incidere sul livello di trascrizione del gene *dEthel*. Tuttavia, la quantità relativa di mRNA risulta sostanzialmente paragonabile a quella osservata nelle linee transgeniche ottenute mediante *knockdown* via dsRNA interference.

WESTERN BLOT

Per analizzare l'espressione proteica del gene *dEthel* nella linea 0017965, sono state effettuate 2 estrazioni indipendenti di proteine totali, partendo da 10 adulti maschi e da 10 adulti femmine transgenici, sia omozigoti che eterozigoti per l'inserzione, e w^{1118} (controllo).

Quantità equivalenti degli estratti proteici di ciascun campione sono state separate elettroforeticamente mediante gel di poliaccrilammide al 10%.

Il segnale relativo alla proteina codificata dal gene *dEthel* che, putativamente, ha un peso molecolare di circa 28 KDa, è identificabile in quanto viene inibito in maniera specifica in seguito a pre-adsorbimento dell'anticorpo primario con i relativi peptidi, utilizzati in tampone di bloccaggio (Blocking Buffer al 5%) ad una concentrazione finale pari a 300 μ M.

Per poter effettuare una normalizzazione dei dati, ciascun blot è stato ibridato con anticorpo anti-HSP70, utilizzato come standard interno.

Al fine di ottenere una stima semiquantitativa del livello di espressione nei diversi campioni utilizzati per l'analisi della linea transgenica è stata valutata, per ciascun segnale, la densità ottica (OD); a questi valori è stata sottratta la densità relativa al

rumore di fondo. Inoltre, per confrontare i differenti campioni ed avere una stima dei livelli di espressione della proteina dTHE1 nella linea transgenica, per ogni pool analizzato è stato calcolato il seguente rapporto:

$$DO_{dTHE1 \text{ normalizzata}} = \frac{DO_{dTHE1} - DO_{\text{rumore di fondo}}}{DO_{dHSP70} - DO_{\text{rumore di fondo}}}$$

I valori di $DO_{dTHE1 \text{ normalizzata}}$ della linea transgenica sono stati poi rapportati ai valori di $DO_{dTHE1 \text{ normalizzata}}$ della linea di controllo. I valori ottenuti sono stati infine espressi come percentuale.

In figura 8.2 viene riportato, a titolo esemplificativo, il risultato ottenuto in seguito ad immunosaggio e sviluppo di una delle repliche effettuate.

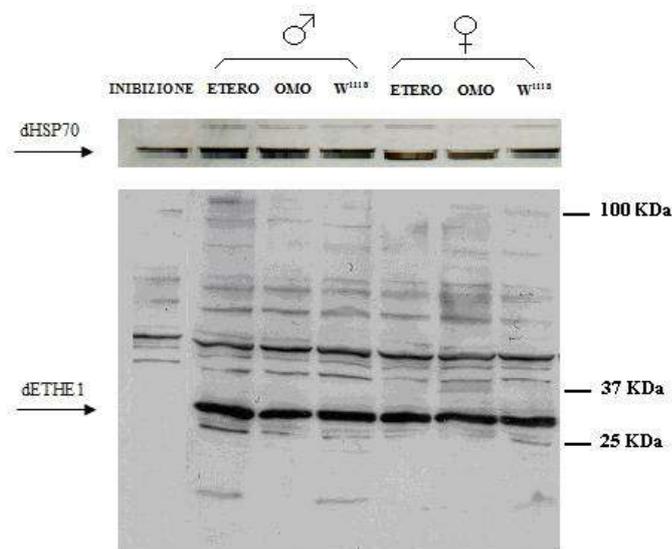


Figura 8.2: Linea 0017965: Western Blot: lastra radiografica. La frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento dHSP70 ed alla proteina dTHE1, ottenute dagli estratti proteici di 10 individui maschi (ETEROZIGOTI; OMOZIGOTI; w^{118}) e di 10 individui femmine (ETEROZIGOTI; OMOZIGOTI; w^{118}). Il segnale relativo alla proteina dTHE1, ottenuta dagli estratti proteici di 10 individui adulti w^{118} , scompare in seguito a specifica inibizione tramite pre-adsorbimento peptidico (INIBIZIONE).

In figura 8.3 vengono rappresentati graficamente i livelli di espressione proteica del gene *dEthel* in individui eterozigoti ed omozigoti della linea 0017965, rispetto alla linea di controllo; in particolare, viene riportata, per ciascun campione, la media calcolata a partire da due estrazioni proteiche indipendenti.

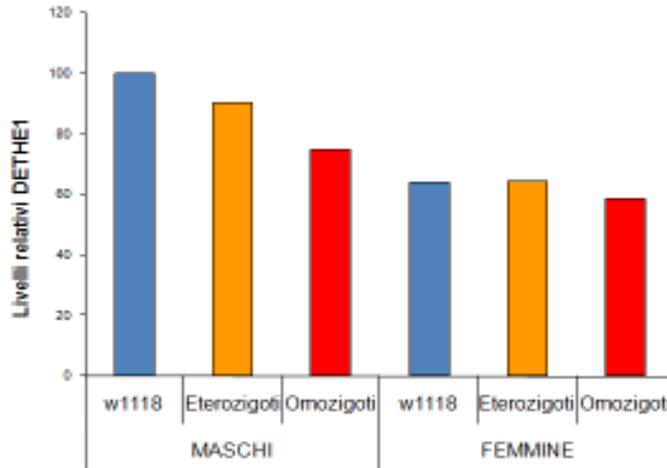


Figura 8.3: Linea 0017965: Livelli di espressione della proteina codificata dal gene *dEthel*, ottenuti dalla media calcolata a partire da due estrazioni proteiche indipendenti di 10 individui maschi (omozigoti; eterozigoti; w^{1118}) e di 10 individui femmine Fe (omozigoti; eterozigoti; w^{1118}).

Questi risultati indicano una diminuzione del livello proteico negli individui transgenici rispetto ai wild-type, compatibile con un possibile effetto sull'espressione genica causata dall'inserzione del *PiggyBac* nella regione 5'UTR del gene *dEthel*. Tale effetto risulta maggiormente evidente nel campione costituito da maschi, con una riduzione del livello proteico più accentuata negli omozigoti rispetto agli eterozigoti. Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti, si può ipotizzare che il livello relativo della proteina dTHE1 sia minore nelle femmine rispetto ai maschi, appartenenti sia alla linea 0017965 che alla linea w^{1118} .

Per analizzare l'espressione proteica del gene *dEthel* nella linea 104009, sono state effettuate 3 estrazioni indipendenti di proteine totali, partendo da campioni costituiti da:

- 10 larve III stadio;
- 10 pupe;
- 10 adulti.

Tali individui sono stati campionati a partire dalla linea transgenica 104009 e dalla linea w^{1118} , utilizzata come controllo.

Anche in questo caso, quantità equivalenti degli estratti proteici di ciascun campione sono state separate elettroforeticamente mediante gel di poliaccrilammide al 10%; inoltre, ciascun blot è stato ibridato con anticorpo anti-HSP70, utilizzato come standard interno.

In figura 8.4 viene riportato il risultato ottenuto in seguito ad immunosaggio e sviluppo di una delle repliche effettuate.

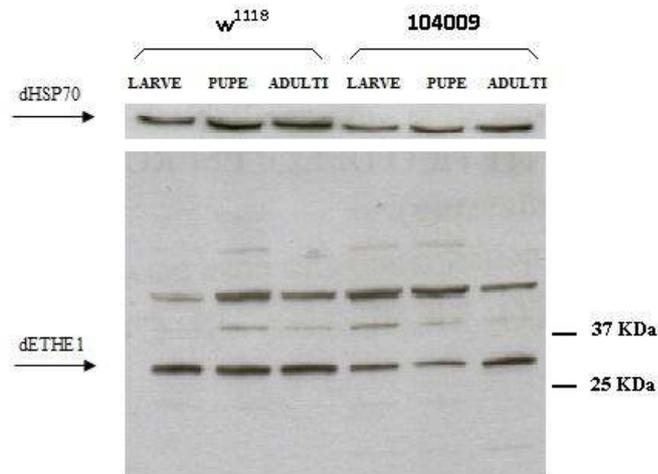


Figura 8.4: Linea 104009: Western Blot: lastra radiografica. La frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento dHSP70 ed alla proteina dETHE1, ottenute dagli estratti proteici di tre campioni, costituiti da 10 larve, 10 pupe e 10 individui adulti appartenenti alla linea transgenica 104009 ed alla linea di controllo w^{1118} .

I valori di DO_{dETHE1} normalizzata ottenuti per la linea transgenica, rapportati ai valori di DO_{dETHE1} normalizzata della linea di controllo, sono stati espressi come valori percentuale. La media (+/- Deviazione Standard) di tali valori percentuali, calcolata, per ciascun campione, a partire da tre estrazioni proteiche indipendenti, viene rappresentata graficamente in figura 8.5. Non sono state rilevate differenze significative tra individui della linea 104009 e la linea di controllo, in nessuno stadio di sviluppo analizzato.

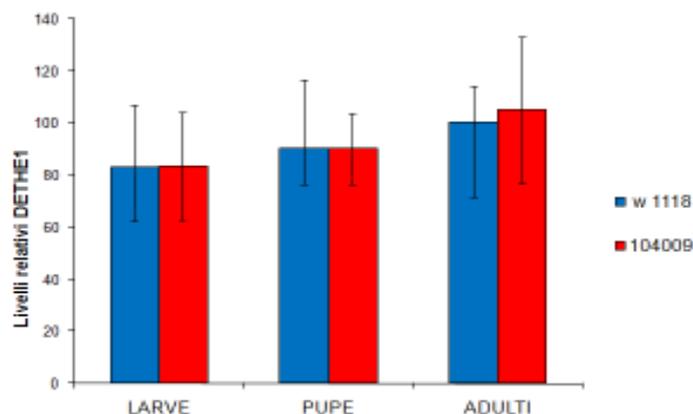


Figura 8.5: Linea 104009: Livelli di espressione della proteina codificata dal gene *dEthel*, ottenuti dalla media calcolata a partire da tre estrazioni proteiche di campioni costituiti da 10 larve, 10 pupe e 10 individui adulti appartenenti alla linea transgenica 104009 (rappresentata in rosso) ed alla linea di controllo w^{1118} (rappresentata in blu).

CAPITOLO 9
RISULTATI
GENE TARGETING

ALLESTIMENTO DEL COSTRUTTO RICOMBINOGENO

Considerate le piccole dimensioni del gene *dEthel* (1462 bp), si è fatto riferimento al metodo di “*ends in targeting*” utilizzato da Xie e Golic (2004).

Sulla base di queste indicazioni, è stato utilizzato il vettore pTV2 che contiene le componenti necessarie per generare la molecola ricombinogena (2 sequenze FRT; sito per l'endonucleasi I-CreI) ed il gene marker w^{hs} , necessario per individuare gli eventi di targeting.

In particolare, è stato progettato uno schema di clonaggio per poter introdurre in pTV2 le regioni di DNA che fiancheggiano, a monte (A) e a valle (C), il gene CG30022. In accordo con il modello di costrutto donatore progettato da Xie e Golic (2004), è stato introdotto all'interno della regione A, mediante PCR, il sito di riconoscimento per l'endonucleasi di lievito I-SceI, essenziale per la ricombinogenicità del vettore.

La regione A e la regione C si estendono, rispettivamente, per circa 7.2 Kb e 4.2 Kb a monte e a valle rispetto al gene da sottoporre a delezione (figura 9.1).

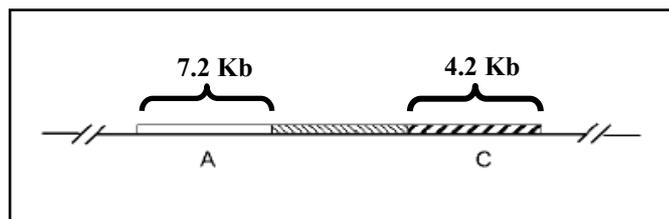


Figura 9.1: Regioni A e C scelte per l'allestimento del costrutto donatore. Immagine modificata da Xie e Golic (2004).

Per verificare la corretta inserzione dei frammenti A e C all'interno del vettore pTV2, il costrutto finale è stato sottoposto a restrizioni di controllo con opportuni enzimi di restrizione. Poiché pTV2 (A+C) contiene un unico sito di restrizione per KpnI, in seguito a restrizione enzimatica con tale enzima è attesa un'unica banda di circa 22100 bp (figura 9.2). Inoltre, in seguito a restrizione enzimatica con EcoRV e XhoI, sono attese quattro bande, aventi dimensione di 1400 bp (A_4), 2100 bp (C_1), 5100 bp (C_2+3000 bp del vettore) e 12700 bp ($pTV2+A_1, A_2, A_3$) (figura 9.2).

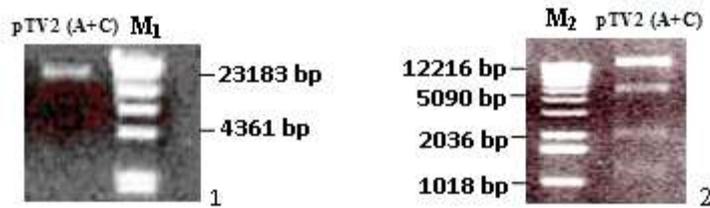


Figura 9.2: Digestioni di controllo del costrutto (A+C) mediante gli enzimi di restrizione KpnI (1) ed EcoRV-XhoI (2). M₁: 200 ng marker λ HindIII (Promega); M₂: 200 ng marker 1Kb (Invitrogen). Gel di agarosio 0.9%.

Una ulteriore conferma della corretta inserzione dei frammenti A e C nel vettore pTV2, è stata ottenuta mediante sequenziamento.

Il vettore pTV2, contenente i frammenti A e C (figura 9.3), allestito nel presente lavoro di tesi, è stato utilizzato per dare inizio alla procedura di “*ends-in targeting*”, finalizzata alla realizzazione del knockout del gene *dEthel*. Tale vettore contiene infatti le sequenze necessarie alla trasposizione ed integrazione, nel genoma di *D. melanogaster*, del costrutto compreso tra le due estremità ripetute ed invertite di un elemento P.

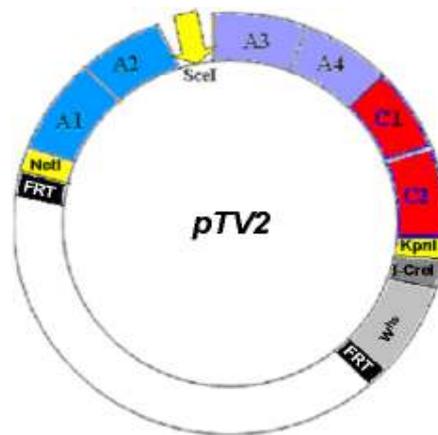


Figura 9.3: Vettore pTV2 contenente i frammenti A, C e le componenti necessarie per generare la molecola ricombinogena.

TRASFORMAZIONE DI EMBRIONI w^{1118} MEDIANTE MICROINIEZIONE DEL COSTRUTTO pTV2 (A+C)

Il costrutto pTV2 (A+C) è stato iniettato in embrioni del ceppo w^{1118} . Gli adulti sviluppati dagli embrioni sopravvissuti alla microiniezione sono stati numerati

progressivamente ed incrociati con individui appartenenti allo stesso ceppo di partenza w^{1118} ; da due di questi incroci sono nati individui transgenici.

Per ciascun evento di inserzione, è stata fondata una sola linea transgenica stabile. Ciascuna linea ottenuta è stata denominata con il nome del costrutto microiniettato (pTV2) e con due numeri di cui il primo identifica l'individuo che ha subito la microiniezione e ha originato la progenie transgenica, mentre il secondo identifica l'individuo trasformato della F1 da cui è stata originata la linea. Sono state ottenute le linee transgeniche: 44.1 e 62.1.

I dati relativi all'efficienza della trasformazione ottenuta negli esperimenti di microiniezione del costrutto pTV2 (A+C) sono riportati in tabella 9.1.

	EMBRIONI INIETTATI	LARVE OTTENUTE	ADULTI OTTENUTI	ADULTI FERTILI	INCROCI CON PROGENIE TRASFORMATA
TOTALE	5012	260	160	141	2
VALORE PERCENTUALE		5.2	3.2 (61.5)	2.8 (88)	0.04 (1.4)

Tabella 9.1: Quadro riassuntivo dei dati riguardanti l'efficienza di trasformazione degli embrioni microiniettati con il costrutto pTV2. I valori di percentuale sono calcolati in funzione del numero totale di embrioni microiniettati; i valori di percentuale indicati in corsivo, tra parentesi, sono calcolati in funzione del valore della colonna precedente.

Inoltre, il costrutto pTV2 (A+C) è stato microiniettato in embrioni del ceppo w^{1118} dal servizio di microiniezione fornito dalla ditta "Bestgene".

In questo modo, sono state ottenute 6 ulteriori linee transgeniche per il costrutto pTV2 (A+C), numerate da 1 a 6, secondo l'ordine di produzione della ditta fornitrice.

CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE TRASFORMATE E BILANCIAMENTO DEGLI INSERTI

Allo scopo di verificare una eventuale inserzione del costrutto pTV2 (A+C) nel cromosoma X, sono stati allestiti, per ogni linea transgenica, degli incroci con il ceppo w^{1118} .

Per quanto riguarda la linea transgenica 6, l'incrocio con femmine vergini della linea w^{1118} ha dato origine ad una progenie F1 costituita da maschi con occhio bianco e femmine con occhio rosso, indicando l'avvenuta inserzione nel cromosoma X. Attraverso l'incrocio di maschi emizigoti per l'inserito con femmine omozigoti, selezionate in base al colore più intenso dell'occhio, è stata ottenuta la linea omozigote stabile.

Per quanto riguarda le altre linee transgeniche, una volta esclusa l'inserzione del costrutto pTV2 (A+C) nel cromosoma X, si è proceduto all'allestimento di incroci con il doppio bilanciatore $w;CyO/Scy;MKRS/TM6B$. La progenie ottenuta è stata

analizzata secondo quanto riportato nella sezione “materiali e metodi” (capitolo 6).

La tabella 9.2 indica, per ogni linea, il cromosoma nel quale è avvenuto l’evento di inserzione.

LINEA TRANSGENICA	CROMOSOMA DI INSERZIONE
1; 5; 4	II
44.1; 62.1; 2; 3	III
6	X

Tabella 9.2: Linee transgeniche ottenute per il costrutto pTV2 (A+C), con indicazione del cromosoma che ha subito inserzione. Sono evidenziate le linee utilizzate nella successiva sperimentazione.

Nella progenie derivante dal primo incrocio con il bilanciatore, sono stati selezionati individui transgenici caratterizzati dalla presenza dei marcatori CyO e MKRS e incrociati tra loro al fine di ottenere ceppi stabili in omozigosi.

ALLESTIMENTO DI INCROCI PER INDURRE RICOMBINAZIONE OMOLOGA

La tecnica di “*ends-in targeting*” adottata per ottenere knockout del gene *dEthel*, prevede due eventi di ricombinazione omologa, indotti in due “step” successivi, ciascuno articolato nei seguenti punti:

STEP 1

1. Si effettua un incrocio (G_0) tra individui appartenenti alla linea omozigote per il costrutto ricombinogeno ed individui appartenenti alla linea contenente i transgeni che codificano per gli enzimi flippasi (FLP) e ricombinasi (I-SceI), così da generare individui transgenici contenenti il costrutto pTV2, il gene FLP ed I-SceI.
2. Tali individui (G_1) vengono sottoposti a shock termico nelle prime fasi dello sviluppo, in modo tale da indurre excisione della molecola donatrice ricombinogena, il cui taglio a doppio filamento stimola la ricombinazione omologa a livello della regione A, localizzata a monte rispetto al gene target.
3. Poiché la frequenza di gene targeting è maggiore nella linea germinale femminile, vengono ricercate, tra le femmine sottoposte a shock termico nelle prime fasi dello sviluppo, quelle in cui si è verificato un potenziale evento di ricombinazione omologa.
4. Le femmine selezionate (G_2) vengono sottoposte ad opportuni incroci allo scopo di verificare l’avvenuta mobilizzazione del costrutto ricombinogeno dal cromosoma donatore al cromosoma target. In

seguito, si effettua una caratterizzazione molecolare per ricercare eventi di targeting appartenenti alla classe II. Tali individui presenteranno il locus target con il gene marker fiancheggiato, a monte, dalle regioni omologhe A e C e, a valle, dal gene *dEthel*, localizzato tra A e C.

STEP 2

5. Induzione di un secondo evento di ricombinazione omologa a livello del locus target. In termini pratici, ciò viene ottenuto mediante incrocio di individui appartenenti alla linea ottenuta precedentemente (STEP 1) con individui appartenenti ad una linea che contenga il gene per la ricombinasi I-CreI, inducibile mediante shock termico.
6. Individuazione degli eventi di ricombinazione omologa, riconoscibili per la perdita del gene marker. Il knockout del gene target si verifica solo quando la ricombinazione avviene a livello della regione omologa C.

Nel presente lavoro è stato sviluppato lo step 1, secondo quanto schematizzato in figura 9.4. In particolare, lo screening è stato effettuato a partire da individui omozigoti per il costrutto ricombinogeno pTV2(A+C) appartenenti alle linee transgeniche 6, 44.1 e 62.1.

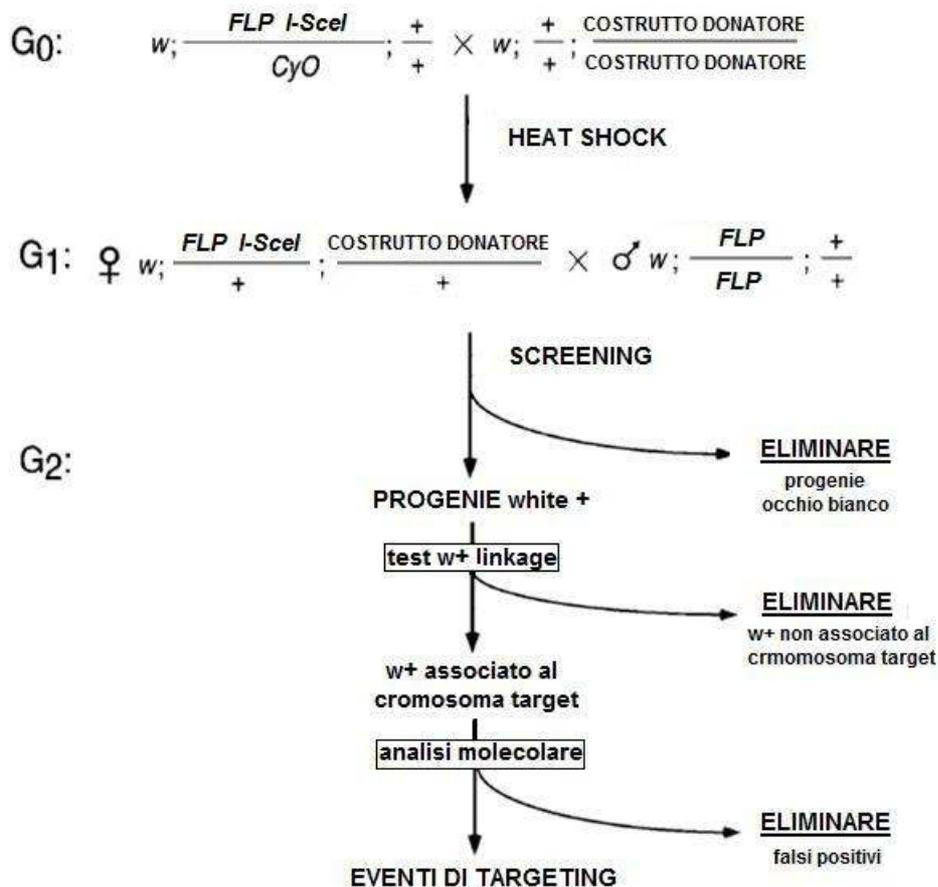


Figura 9.4: Gene targeting: step 1.

Femmine vergini omozigoti per il costrutto pTV2 (A+C), appartenenti alle linee 44.1 e 62.1 sono state quindi incrociate con maschi della linea $yw; P\{70FLP\}11 P\{70I-SceI\}2B noc^{Sco}/CyO S^2$. Ciascun incrocio (G_0), replicato 3 volte, è stato allestito con 25 femmine omozigoti e 10 maschi, portatori dei geni codificanti gli enzimi FLP ed I-SceI.

La progenie (G_1) di ciascun incrocio è stata sottoposta a shock termico, 48 ore dopo la deposizione, alla temperatura di 37°C per 60 minuti.

Poiché solo la metà circa di tale progenie è portatrice del costrutto ricombinogeno e dei transgeni che codificano per gli enzimi flippasi e ricombinasi, tra gli adulti sono stati selezionati gli individui dotati di ali non arricciate, che marcano fenotipicamente il genotipo desiderato.

Per quanto riguarda la linea 6, femmine vergini omozigoti per il costrutto pTV2(A+C) sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea $yw; P\{70FLP\}23 P\{70I-SceI\}4A/TM6$.

Anche in questo caso, la progenie (G_0) di ciascun incrocio, è stata sottoposta a shock termico nelle prime fasi di sviluppo.

Le femmine vergini contenenti il costrutto ricombinogeno ed i geni FLP ed I-SceI sono state selezionate sulla base dell'assenza del marcatore *Tubby*.

La maggior parte delle femmine selezionate (G_1), presentano occhio bianco in seguito a perdita del costrutto ricombinogeno; nella maggior parte dei casi, infatti, il costrutto pTV2, per azione dell'enzima flippasi, subisce excisione somatica senza successiva reintegrazione nel genoma.

Benchè si possa presumere che la probabilità di ricombinazione omologa, a livello della linea germinale, sia maggiore negli individui G_1 con occhi rossi o mosaico, è necessario verificare la presenza di possibili eventi di ricombinazione omologa nella linea germinale.

A tale scopo, le femmine vergini selezionate (G_1), sono state incrociate con maschi della linea $w^{1118}; P\{70FLP\}10$, nei quali l'enzima flippasi è espresso in maniera costitutiva.

La progenie (G_2) di tali incroci è stata sottoposta a *screening* per la ricerca di individui caratterizzati da occhi rossi.

In particolare, viene sfruttato il fatto che, se il costrutto non è stato exciso, è ancora fiancheggiato da due sequenze FRT. Diversamente, in caso di excisione e successiva integrazione, il costrutto presenta una sola sequenza FRT, risultando così resistente alla azione della flippasi.

Nello screening della linea 6, è stato selezionato un individuo con occhi rossi, espressione di un potenziale evento di targeting. Tuttavia, purtroppo, tale individuo non è stato sottoposto ad ulteriori indagini a causa della sua sterilità.

Anche nello screening della linea 62.1, è stato rilevato un individuo che rappresentava un possibile evento di targeting.

Allo scopo di verificare se, in questo caso, il costrutto pTV2(A+C) si fosse mobilizzato dal cromosoma donatore (III) al cromosoma target (II), sono stati allestiti incroci con il ceppo bilanciante $CyO/Sco; MKRS/TM6B$.

L'analisi della progenie ha rivelato che il costrutto ricombinogeno risiedeva ancora nel cromosoma donatore (II). Sulla base di tali risultati, non si è proceduto con successive indagini molecolari.

Secondo quanto riportato da Xie & Golic (2004), la resistenza di un costrutto ricombinogeno all'azione della flippasi può essere osservata anche nel caso in cui un vettore, pur non subendo excisione, perda, dopo il taglio ad opera di I-SceI e la

conseguente azione dei sistemi di riparo del DNA, una sequenza FRT. Tale vettore, diventerà, quindi, resistente alla azione della flippasi, senza che si sia verificata mobilitazione dal cromosoma donatore.

In Tabella 9.3 sono riportati, per ciascuna delle tre linee utilizzate:

- Il numero totale di *vials* contenenti l'incrocio iniziale (G_0), la cui progenie è stata sottoposta a shock termico.
- Il numero totale di femmine vergini contenenti il costrutto ricombinogeno, il gene FLP ed il gene I-SceI, ottenute dalla progenie (G_1) sottoposta ad *heat-shock* durante le prime fasi di sviluppo.
- Il numero di gameti (G_2) sottoposti a screening.
- I potenziali eventi di targeting individuati.

SCREENING	G_0	G_1	G_2	POTENZIALI EVENTI DI TARGETING
	VIALS	FEMMINE	GAMETI	
LINEA 6	120	370	4553	1♂
LINEA 44.1	50	319	3903	0
LINEA 62.1	80	358	2125	15♂ 41♀
	250	1047	10581	57
TOTALE				

Tabella 9.3: Screening effettuato per lo step 1 previsto dalla strategia di “*ends-in targeting*”. Sono riportati, per ciascuna linea sottoposta a screening (linee 6, 44.1 e 62.1): il numero totale di *vials* contenenti l'incrocio iniziale (G_0), la cui progenie è stata sottoposta a shock termico; il numero totale di femmine vergini contenenti il costrutto ricombinogeno, il gene FLP ed il gene I-SceI, raccolte dalla progenie (G_1); il numero di gameti (G_2) ottenuti; i potenziali eventi di targeting individuati.

CAPITOLO 10
RISULTATI
TILLING

TILLING

La tecnica del *Tilling* consente di ricercare mutazioni, in una regione di interesse, mediante lo *screening* di linee di *Drosophila melanogaster* precedentemente mutagenizzate con EMS.

Grazie alle piccole dimensioni del gene *dEthel*, è stato possibile eseguire uno *screening* sull'intera sequenza codificante. Poiché la regione da sottoporre a *screening* deve avere una dimensione minima di 1400 bp, sono state incluse anche le sequenze che si estendono a monte (72 bp) ed a valle (337 pb) rispetto al gene *dEthel*.

Mediante la tecnica del *Tilling*, sono state identificate, nel gene *dEthel*, 21 mutazioni, ciascuna delle quali è riconducibile ad una differente linea mutagenizzata.

Tali mutazioni, riportate in tabella 10.1, possono ricadere in esoni, introni o all'interno delle regioni non codificanti che si estendono a monte ed a valle del gene *dEthel*.

Tra le mutazioni a localizzazione esonica, è possibile distinguere:

- 7 mutazioni missense (L65M; D67N; T120S; P157S; P237S; G262S);
- 3 mutazioni silenti (K69; V74; V167);
- 2 mutazioni frameshift, a carico dei residui D264 e K275.

In particolare, le mutazioni frameshift determinano i seguenti cambiamenti nella sequenza aminoacidica:

- *dEthel* selvatico:
sequenza aminoacidica originale:
PYPKKIGGDVNILLYASFTKFNIF.
- *dEthel* mutazione frameshift residuo D264
sequenza aminoacidica modificata:
PYPKKIGGD**MRSMHITICVFY**.
- *dEthel* mutazione frameshift residuo K275
sequenza aminoacidica modificata:
PYPKKIGGDVNILLYASFTK**SFICLMARRPTVRSVGCTI**.

Le successive indagini sono state condotte sulle linee di *Drosophila melanogaster* portatrici di mutazioni a localizzazione esonica, di tipo missense o frameshift, per le quali è maggiore la probabilità di possibili effetti deleteri sulla funzionalità della proteina dETHE1.

Le linee selezionate (2952; 6043; 2788; 0242; 0493; 3976; 2770) sono evidenziate in tabella 10.1. La linea 2002, pur essendo portatrice di una mutazione missense potenzialmente deleteria, non è stata caratterizzata dal momento che una verifica della corrispondenza genotipo/fenotipo ha evidenziato la possibile contaminazione con un'altra linea.

#	SOSTITUZIONE NUCLEOTIDICA	LOCALIZZAZIONE	TIPO DI MUTAZIONE	SOSTITUZIONE AMINOACIDICA	LINEA
1	C330A	ESONE II	missense	L65M	2002
2	C336A	ESONE II	missense	D67N	2952
3	C344A	ESONE II	silente	K69=	/
4	A359G	ESONE II	silente	V74=	/
5	T445C	INTRONE II	/	/	/
6	T455GAGA	INTRONE II	/	/	/
7	C462T	INTRONE II	/	/	/
8	G483A	INTRONE II	/	/	/
9	A586T	ESONE III	missense	T120S	6043
10	C697T	ESONE III	missense	P157S	2788
11	G729A	ESONE III	silente	V167=	/
12	C991T	ESONE IV	missense	P237S	0242
13	G1066A	ESONE IV	missense	G262S	0493
14	G1075ATGCGTA GTATG	ESONE IV	Frameshift	D264MRSMHITI CVFY	3976
15	T1108TTATA	ESONE IV	Frameshift	K275FICLMARR PTVRSVGCTI	2770
16	C1129T	Regione non codificante	/	/	/
17	C1134T	Regione non codificante	/	/	/
18	G1153A	Regione non codificante	/	/	/
19	A1259T	Regione non codificante	/	/	/
20	C1304T	Regione non codificante	/	/	/
21	G1368A	Regione non codificante	/	/	/

Tabella 10.1: Mutazioni identificate mediante *Tilling*. Per ciascuna mutazione identificata, si riporta la sostituzione nucleotidica (sequenza genomica), la localizzazione (esonica, intronica o in regioni non codificanti). Per le mutazioni a localizzazione esonica, vengono riportati, sulla base della sostituzione aminoacidica determinata, la natura della mutazione (missense, frameshift o silente) ed il corrispondente numero di linea. Vengono evidenziate le linee mutagenizzate di *Drosophila melanogaster* che sono state selezionate per le successive indagini.

VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO UOVO-ADULTO

Le linee di *Drosophila melanogaster*, mutanti al gene *dEthel* ed identificate mediante *Tilling*, vengono mantenute come stock bilanciati che presentano, nel cromosoma omologo rispetto al cromosoma mutagenizzato (II), inversioni multiple ed il marcatore *Curly (Cy)*, responsabile del fenotipo “ali arricciate” e letale in omozigosi (Koudakjian *et al.*, 2004)..

Ne risulta che i moscerini eterozigoti per il cromosoma mutagenizzato sono facilmente distinguibili dagli omozigoti per la presenza di ali arricciate. Inoltre, gli individui omozigoti sono caratterizzati da occhi bianchi, in seguito alla presenza, in omozigosi, degli alleli *cn* e *bw*, localizzati sul cromosoma II mutagenizzato.

Sulla base di tali premesse, si è osservato che:

- nelle linee 2788, 3976 e 6043 sono presenti individui adulti, sia omozigoti che eterozigoti per il cromosoma mutagenizzato.
- nelle linee 2770, 0242, 2952 e 0493 gli individui adulti omozigoti per il cromosoma mutagenizzato non sono vitali.

I dati relativi allo sviluppo uovo-adulto degli individui delle linee mutanti identificate mediante *Tilling* sono riportati in tabella 10.2.

In tabella 10.3 sono riportati i dati relativi allo sviluppo uovo-adulto degli individui omozigoti appartenenti alle linee 3976 e 6043. Questo dato non è disponibile per la linea 2788 poiché gli individui omozigoti appartenenti a tale linea, incrociati tra loro, non producono progenie.

In figura 10.1, i dati relativi allo sviluppo vengono espressi come percentuale rispetto al totale di embrioni deposti per ogni incrocio. Per ciascuna linea, è stata calcolata la media (+/- Deviazione Standard) di tre repliche indipendenti.

LINEA	STADIO DI SVILUPPO	REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3
0493	embrioni	271	249	160
	larve	95	147	63
	pupe	66	115	46
	adulti eterozigoti	36	63	21
	adulti omozigoti	0	0	0
2788	embrioni	247	106	360
	larve	160	73	245
	pupe	120	59	187
	adulti eterozigoti	75	37	126
	adulti omozigoti	20	10	34
6043	embrioni	290	283	162
	larve	178	157	107
	pupe	154	137	97
	adulti eterozigoti	94	91	65
	adulti omozigoti	45	39	32
0242	embrioni	232	212	138
	larve	106	81	65
	pupe	98	74	57
	adulti eterozigoti	69	71	54
	adulti omozigoti	0	0	0
2770	embrioni	257	285	271
	larve	121	115	99
	pupe	89	99	78
	adulti eterozigoti	78	90	71
	adulti omozigoti	0	0	0
2952	embrioni	103	373	278
	larve	33	181	100
	pupe	33	157	94
	adulti eterozigoti	31	150	83
	adulti omozigoti	0	0	0
3976	embrioni	163	223	212
	larve	104	155	108
	pupe	85	138	99
	adulti eterozigoti	48	96	69
	adulti omozigoti	16	33	26

Tabella 10.2: Quadro riassuntivo dei dati relativi allo sviluppo di individui appartenenti alle linee 0493, 2788, 6043, 0242, 2770, 2952 e 3976. Per ciascuna linea sono state effettuate 3 repliche, in ciascuna delle quali sono stati conteggiati il numero di embrioni, larve, pupe ed adulti, sia omozigoti che eterozigoti per il cromosoma mutagenizzato.

LINEA	STADIO DI SVILUPPO	REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3
3976 OMOZIGOTI	embrioni	149	157	233
	larve	80	110	115
	pupe	73	110	110
	adulti omozigoti	68	105	101
6043 OMOZIGOTI	embrioni	123	123	288
	larve	28	28	109
	pupe	17	17	93
	adulti omozigoti	15	15	77

Tabella 10.3: Quadro riassuntivo dei dati relativi allo sviluppo di individui appartenenti alle linee omozigoti 6043 e 3976. Per ciascuna linea, sono state effettuate 3 repliche, in ciascuna delle quali sono stati conteggiati il numero di embrioni, larve, pupe ed adulti omozigoti.

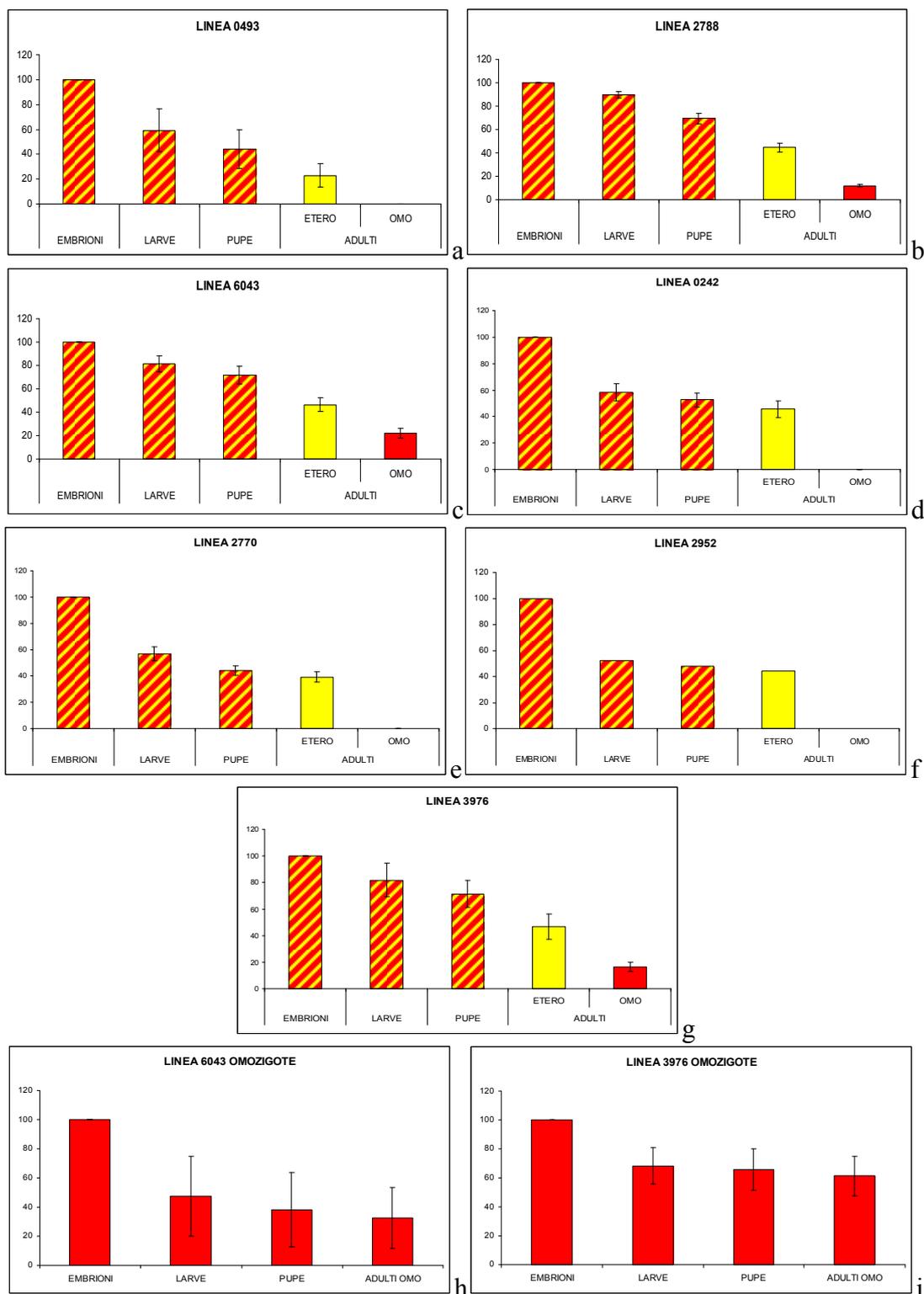


Figura 10.1: Rappresentazione grafica della percentuale di individui delle linee 0493 (a), 2788 (b), 6043 (c), 0242 (d), 2770 (e), 2952 (f) e 3976 (g) nelle diverse fasi dello sviluppo. Sono riportati anche i dati relativi allo sviluppo delle linee omozigote 6043 (h) e 3976 (i). Per ciascuna linea, è riportata la media (+/- Deviazione Standard) di tre repliche indipendenti, espressa come percentuale di individui conteggiati ad ogni stadio, rispetto al numero iniziale di embrioni deposti per ciascun incrocio. Gli istogrammi relativi agli individui adulti omozigoti ed eterozigoti sono rappresentati, rispettivamente, in rosso ed in giallo. Negli stadi di embrione, larva e pupa, non è possibile distinguere il genotipo degli individui.

ESPERIMENTI DI COMPLEMENTAZIONE

Le linee 2770, 0242, 2952 e 0493, nelle quali il cromosoma mutagenizzato causa, in omozigosi, letalità, sono state sottoposte ad incroci reciproci allo scopo di verificare l'eventuale esistenza di complementazione tra le diverse mutazioni.

In tabella 10.4 viene riportata la numerosità della progenie ottenuta da ciascun incrocio reciproco, allestito incrociando tra loro, nelle diverse combinazioni possibili, maschi e femmine vergini appartenenti alle linee in questione.

Come descritto nella sezione "materiali e metodi" (capitolo 6), la progenie attesa è costituita da:

- individui "doppi eterozigoti", ovvero individui portatori di entrambe le mutazioni, ciascuna ereditata dalle due linee parentali. La proporzione attesa per tali individui è pari ad 1/3 della progenie totale nata.
- individui eterozigoti, portatori di una delle due mutazioni ereditate dalle linee parentali. La proporzione attesa per tali individui è pari a 2/3 della progenie totale nata.

I due genotipi sono distinguibili grazie al colore degli occhi ed al marcatore morfologico Cy; in particolare, gli individui eterozigoti presentano ali arricciate ed occhi rossi, mentre gli individui doppi omozigoti presentano ali dritte ed occhi bianchi.

La presenza, nella progenie di tutti gli incroci, di individui doppi eterozigoti, presenti secondo proporzioni che rispecchiano i valori attesi, indica che le mutazioni in esame complementano tra loro.

LINEE TILLING	2952	0493	2770	0242
2952	/	+ 62 CyO 31 Doppi eterozigoti	+ 70 CyO 25 Doppi eterozigoti	+ 68 CyO 42 Doppi eterozigoti
0493	+ 51 CyO 30 Doppi eterozigoti	/	+ 110 CyO 40 Doppi eterozigoti	+ 80 CyO 37 Doppi eterozigoti
2770	+ 50 CyO 30 Doppi eterozigoti	+ 73 CyO 29 Doppi eterozigoti	/	+ 98 CyO 44 Doppi eterozigoti
0242	+ 77 CyO 41 Doppi eterozigoti	+ 112 CyO 53 Doppi eterozigoti	+ 41 CyO 18 Doppi eterozigoti	/

Tabella 10.4: Esperimenti di complementazione. Le linee 2952, 0493, 2770 e 0242 sono state sottoposte ad incroci reciproci allo scopo di verificare una eventuale complementazione tra le mutazioni in questione. Per ciascun incrocio effettuato, è riportata la progenie ottenuta, distinguendo tra eterozigoti per una singola mutazione (individui CyO) ed eterozigoti per entrambe le mutazioni (doppi eterozigoti), ereditate dalle linee parentali. Si è in presenza di complementazione (+) quando i doppi eterozigoti nascono secondo le proporzioni attese (1/3 Cyo; 2/3 doppi eterozigoti).

INCROCI CON LINEE PORTATRICI DI DELEZIONI

Allo scopo di determinare se la letalità degli individui omozigoti nelle linee 2770, 0242, 2952 e 0493 sia imputabile alla mutazione presente nel gene *dEthel* o a mutazioni deleterie localizzate in altre regioni del cromosoma II mutagenizzato, sono state utilizzate linee di *Drosophila melanogaster* con delezioni associate a perdita del gene *dEthel*.

In particolare, sono state selezionate le linee 190, 9344 e 8910 in quanto presentano specifiche delezioni che si estendono, rispettivamente, per circa 600 Kb, 500 Kb e 470 Kb e nelle quali risulta localizzato il gene *dEthel*.

Tali delezioni sono rappresentate in figura 10.2.

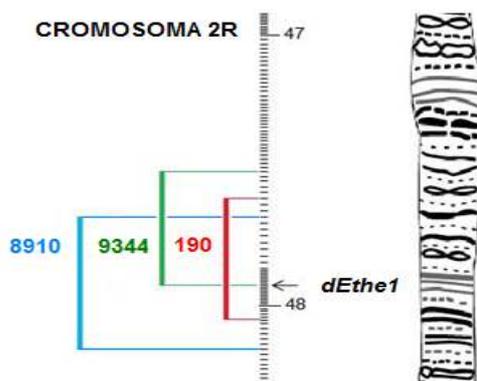


Figura 10.2: Localizzazione citologica delle delezioni presenti nelle linee 190, 9344 e 8910. Le delezioni selezionate si estendono per circa 600 Kb (linea 190), 500 Kb (linea 9344) e 470 Kb (linea 8910) e sono tutte associate a delezione dell'intero gene *dEthel*. Figura modificata da <http://www.Flybase.it>.

In tabella 10.5 viene riportata la numerosità della progenie ottenuta da ciascun incrocio, allestito incrociando, in tre repliche indipendenti, femmine vergini, appartenenti alle linee bilanciate per la delezione, con maschi eterozigoti per le mutazioni al gene *dEthel*, ottenute tramite *Tilling* e bilanciate con il cromosoma bilanciante CyO.

LINEA TILLING	LINEA CON DELEZIONE	GENOTIPO PROGENIE	PROGENIE OTTENUTA		
			REPLICA 1	REPLICA 2	REPLICA 3
2952	190	eterozigoti	164	89	126
		emizigoti	81	41	74
	9344	eterozigoti per la delezione	137	182	136
		eterozigoti per la mutazione	50	50	49
		emizigoti	89	149	77
		emizigoti	94	114	118
8910	eterozigoti per la delezione	26	33	39	
	eterozigoti per la mutazione	55	68	60	
	emizigoti	55	68	60	
0493	190	eterozigoti	388	201	119
		emizigoti	204	108	60
	9344	eterozigoti per la delezione	91	137	89
		eterozigoti per la mutazione	25	47	24
		emizigoti	52	98	41
	8910	eterozigoti per la delezione	77	99	120
		eterozigoti per la mutazione	20	26	31
		emizigoti	47	55	66
		emizigoti	47	55	66
2770	190	eterozigoti	267	170	110
		emizigoti	90	72	31
	9344	eterozigoti per la delezione	210	267	95
		eterozigoti per la mutazione	55	79	21
		emizigoti	122	139	36
	8910	eterozigoti per la delezione	117	88	61
		eterozigoti per la mutazione	42	37	22
		emizigoti	83	61	49
		emizigoti	83	61	49
0242	190	eterozigoti	80	120	157
		emizigoti	43	63	72
	9344	eterozigoti per la delezione	104	125	79
		eterozigoti per la mutazione	40	37	26
		emizigoti	69	80	55
	8910	eterozigoti per la delezione	94	89	41
		eterozigoti per la mutazione	43	36	17
		emizigoti	71	54	30

Tabella 10.5: Progenie ottenuta dagli incroci tra individui delle linee 2952, 0493, 2770 e 0242 ed individui delle linee 190, 9344 8910, portatrici di delezioni associate a perdita del gene *dEth1*. Ciascun incrocio è stato allestito in tre repliche indipendenti.

Nell'analisi della progenie ottenuta dagli suddetti incroci, è necessario tenere presente i seguenti aspetti:

- negli individui appartenenti alle linee 8910 e 9344, la delezione cromosomica associata a perdita dell'intero gene *dEth1* è bilanciata con il cromosoma *SM6*. Tale cromosoma, che funge da inibitore della ricombinazione di tutto il cromosoma II, è caratterizzato dalla presenza dell'allele *cn* che, in omozigosi, determina il fenotipo "occhi bianchi".
- negli individui appartenenti alla linea 190, la delezione cromosomica associata a perdita dell'intero gene *dEth1* è bilanciata con il cromosoma bilanciatore *CyO*, letale in omozigosi per la presenza del marcatore morfologico *Curly*.

Pertanto, incrociando individui appartenenti alle linee 8910 e 9344 con individui eterozigoti per le mutazioni al gene *dEth1*, la progenie attesa è costituita da:

- individui eterozigoti per la delezione. La proporzione attesa per tali individui, caratterizzati da ali arricciate, per la presenza di CyO, e da occhi rossi, è pari a 1/3 della progenie totale nata.
- Individui eterozigoti per la mutazione del gene *dEthe1*, caratterizzati da ali arricciate ed occhi bianchi ed attesi in una proporzione pari a 1/3 della progenie totale nata. In questi individui, gli occhi bianchi sono dovuti alla presenza di *cn* in omozigosi; tale allele è infatti presente sia nel cromosoma II sottoposto alla mutagenesi chimica prevista dal *Tilling* che nel cromosoma bilanciatore *SM6*.
- Individui emizigoti, portatori sia della mutazione che della delezione e caratterizzati da occhi rossi ed ali non arricciate. La proporzione attesa per tali individui è pari a 1/3 della progenie totale nata.

Inoltre, incrociando individui appartenenti alla linea 190, portatrice di una delezione di circa 600 Kb, con individui eterozigoti per le mutazioni al gene *dEthe1*, la progenie attesa è costituita da:

- individui eterozigoti per la delezione ed individui eterozigoti per la mutazione del gene *dEthe1*. In questo caso i due genotipi risultano indistinguibili in quanto sono entrambi caratterizzati dalla presenza di occhi rossi ed ali arricciate. La proporzione attesa per tali individui è pari a 2/3 della progenie totale nata.
- individui emizigoti, portatori sia della mutazione che della delezione del gene *dEthe1*, caratterizzati da occhi rossi ed ali non arricciate. La proporzione attesa per tali individui è pari a 1/3 della progenie totale nata

Dall'analisi della progenie ottenuta emerge che:

- Quando individui appartenenti alle linee 2952, 0493 e 0242 vengono incrociati con individui della linea 190, portatori di una delezione di circa 600 Kb, nella progenie viene rispettato il rapporto atteso, tra eterozigoti ed emizigoti, pari a 2:1. Questo dato indica che la letalità degli individui omozigoti appartenenti alle linee 2952, 0493 e 0242 è probabilmente causata da mutazioni deleterie situate in una regione cromosomica non interessata dalla delezione presente nella linea 190.

Nella progenie ottenuta dall'incrocio tra individui appartenenti alla linea 2770 ed individui appartenenti alla linea 190, il numero di emizigoti risulta inferiore rispetto all'atteso suggerendo che, in questo caso, la letalità degli individui omozigoti della linea 2770 potrebbe essere, almeno in parte, attribuibile alla mutazione presente nel gene *dEthe1*.

- Quando individui appartenenti alle linee 2952, 0493 2770 e 0242 vengono incrociati con individui appartenenti alla linea 9344, caratterizzata da una delezione di circa 500 Kb, nella progenie ottenuta non viene rispettato il rapporto atteso, pari ad 1/3:1/3:1/3, tra eterozigoti per la delezione, eterozigoti per la mutazione ed emizigoti.

Gli individui eterozigoti per la mutazione nel gene *dEthe1*, presentano, in tutti gli esperimenti, una letalità maggiore rispetto agli individui eterozigoti per la delezione. Il cromosoma II mutagenizzato, presente negli

individui delle linee 2952, 0493, 2770 e 0242, ha, dunque, in eterozigosi, effetti deleteri più gravi rispetto a quelli causati dalla presenza, in eterozigosi, della delezione presente negli individui della linea 9344. Poiché tale delezione comporta perdita dell'intero gene *dEthel1*, la letalità degli individui omozigoti appartenenti alle linee 2952, 0493, 2770 e 0242 non è imputabile alla mutazione presente nel gene *dEthel1*.

Tuttavia, non si può escludere che la letalità degli individui omozigoti appartenenti alle linee 2952, 0493, 2770 e 0242 possa essere, almeno in parte, causata da mutazioni nella regione cromosomica che risulta deleta negli individui appartenenti alla linea 9344. Infatti, gli individui emizigoti sono presenti, nella progenie di tutti gli incroci, secondo una proporzione inferiore rispetto all'atteso.

- Quando individui appartenenti alle linee 2952, 0493 2770 e 0242 vengono incrociati con individui appartenenti alla linea 8910, caratterizzata da una delezione di circa 470 Kb, nella progenie ottenuta non viene rispettato il rapporto atteso, pari ad 1/3:1/3:1/3, tra eterozigoti per la delezione, eterozigoti per la mutazione ed emizigoti.

Anche in questo caso, gli individui eterozigoti per la mutazione nel gene *dEthel1*, presentano, in tutti gli esperimenti, una letalità maggiore rispetto agli individui eterozigoti per la delezione. Inoltre, gli individui emizigoti sono presenti, nella progenie di tutti gli incroci, secondo una proporzione inferiore rispetto all'atteso.

Questi dati suggeriscono che la letalità degli individui omozigoti appartenenti alle linee 2952, 0493, 2770 e 0242 non è causata unicamente dalla mutazione presente nel gene *dEthel1*; tuttavia, non si può escludere che il gene *dEthel1* mutato contribuisca, almeno in parte, alla espressione di tale fenotipo.

ANALISI BIOINFORMATICA DELLA PROTEINA dETHE1

STRUTTURA TRIDIMENSIONALE

Con la collaborazione del Prof. S. Tosatto (Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova), è stato costruito un modello per la struttura tridimensionale della proteina ETHE1 in *Drosophila melanogaster*, i cui aspetti peculiari vengono di seguito riportati.

- SITO ATTIVO

Nella proteina ETHE1 di *Drosophila melanogaster*, risultano conservati i residui aminoacidici (cinque istidine e due residui di aspartato) responsabili, nelle gliossalasi II, del legame a cofattori metallici.

Similmente a quanto osservato in seguito a risoluzione cristallografica della proteina ETHE1 di *A. thaliana* (AtETHE1) (McCoy *et al.*, 2006), il sito attivo in dETHE1 risulta accessibile a substrati di dimensione minore rispetto a quelli caratteristici delle gliossalasi.

- REGIONE C-TERMINALE

La regione C-terminale della proteina dETHE1 presenta una composizione aminoacidica diversa rispetto al medesimo segmento degli omologhi in *Arabidopsis thaliana* ed *Homo sapiens*. Infatti, mentre questi ultimi mostrano una composizione aminoacidica simile, ricca di residui carichi, la regione C-terminale di dETHE1 è costituita da numerosi aminoacidi aromatici ed alifatici (quali Tirosina e Fenilalanina). Come previsto per AtETHE1, la regione C-terminale di dETHE1 si posiziona in prossimità dell'entrata del canale di passaggio per il sito attivo, limitando così l'accessibilità del possibile substrato. In particolare, si può ipotizzare che la porzione C-terminale di dETHE1 si estenda in prossimità del sito attivo "appoggiandosi" sulla superficie del dominio β -lattamico ed interagendo con essa mediante regioni ad α - elica ricche in aminoacidi idrofobici che si dirigono verso la superficie della proteina.

- REGIONE N-TERMINALE

La regione N-terminale di dETHE1 si compone di 45 aminoacidi, organizzati in due α -eliche centrali connesse da un "loop".

Si può ipotizzare che la regione N-terminale rappresenti una sequenza di *targeting* mitocondriale, peraltro più estesa di quella identificata in ETHE1 di *Homo sapiens*, che consiste di circa 20 aminoacidi.

In particolare, la prima elica potrebbe venire eliminata dopo l'entrata nel mitocondrio, in seguito all'azione della Proteasi I. In un secondo momento, probabilmente successivo al completamento del *fold*ing, potrebbe venire eliminata anche la seconda elica, per azione della Proteasi II.

La seconda elica, caratteristica di *Drosophila*, potrebbe contribuire alla stabilizzazione del *fold*ing proteico interagendo con la regione C-terminale, ricca in aminoacidi idrofobici. Tale azione di stabilizzazione potrebbe permanere anche dopo l'azione della Proteasi II; infatti, il *loop* iniziale della proteina matura presenta comunque due Fenilalanine che possono mantenere stabilmente ancorata la regione C-terminale al resto della proteina.

ANALISI DELLE MUTAZIONI

Sulla base del modello di struttura tridimensionale della proteina ETHE1 in *Drosophila melanogaster*, è stato possibile valutare le probabili implicazioni funzionali delle mutazioni del gene *dEthel*, individuate mediante *Tilling*.

Di seguito sono riportate, per ciascuna mutazione, la localizzazione nella struttura tridimensionale e le possibili conseguenze sulla funzionalità proteica.

D67N

Tipo di mutazione: puntiforme

Localizzazione: aminoacido successivo al 2° foglietto β del dominio β -lattamico

La sostituzione D67N impedisce la formazione di un ponte salino con il residuo K69, modificando localmente la struttura proteica. D67, inoltre, interagisce con i residui D47, G71, Q72, F146, T148. La sostituzione aminoacidica D67N

determina la formazione di un contatto polare libero in D67 che potrebbe interagire con un aminoacido nella regione N-terminale.

T120S

Tipo di mutazione: puntiforme

Localizzazione: dopo la seconda α -elica del dominio β -lattamico

La mutazione T120S determina la sostituzione di un aminoacido polare (Treonina) con un altro aminoacido polare (Serina). Poiché la mutazione ricade sulla superficie esterna della molecola, lontano dal sito attivo, risulta improbabile una alterazione della struttura proteica.

P157S

Tipo di mutazione: puntiforme

Localizzazione: nel *loop* tra l'ultimo ed il penultimo foglietto β del dominio β -lattamico

La mutazione P157S è localizzata vicino al sito attivo. La posizione aminoacidica 157 richiede la presenza di un aminoacido di dimensioni piccole quale è, appunto, la Serina. Tuttavia, poiché la Prolina viene sostituita da un aminoacido polare, si potrebbe verificare una alterazione dell'affinità per il substrato, anche se in modo indiretto, in quanto la mutazione non coinvolge residui specifici per il legame. Inoltre, la mutazione P157S potrebbe provocare una destabilizzazione locale della struttura, in seguito ad una repulsione con gli aminoacidi adiacenti.

P237S

Tipo di mutazione: puntiforme

Localizzazione: regione di α -eliche

L'aminoacido P237 interagisce con il residuo K241.

Si presume che il dominio di α -eliche di cui questo aminoacido fa parte sia importante per il corretto posizionamento della regione C-terminale. Ne consegue che la mutazione P237S potrebbe modificare il posizionamento della regione C-terminale ed alterare l'accessibilità del sito attivo.

G262S

Localizzazione: nella regione C-terminale, all'inizio dell'ultima α -elica

Come per la mutazione P237S, anche G262 potrebbe destabilizzare il corretto posizionamento della regione C-terminale rispetto al resto della proteina, con possibili variazioni nell'accessibilità del sito attivo.

D264

Tipo di mutazione: frameshift

Localizzazione: regione C-terminale, nell'ultima α -elica

La mutazione frameshift a livello del residuo V265 determina perdita degli ultimi 15 aa ed aggiunta di 12 residui (MRSMHITICVFY), impedendo la formazione dell'elica nella regione C-terminale. Tra gli aminoacidi inseriti vi sono alcuni aminoacidi polari (quali Metionina, Isoleucina, Cisteina, Valina e

Fenilalanina) che potrebbero essere sufficienti per garantire il legame della regione C-terminale al resto della proteina.

K275

Tipo di mutazione: frameshift

Localizzazione: regione C-terminale

La mutazione frameshift a livello del residuo K275 determina l'eliminazione degli ultimi 4 aminoacidi e l'aggiunta di 19 residui (SFICLMARRPTVRSVGCTI). In particolare, ciò comporta perdita della porzione iniziale dell'ultima α -elica al C-terminale e la contemporanea formazione di un'ulteriore α -elica successiva. L'inserzione di 15 residui provoca dunque la formazione di una regione C-terminale più lunga che potrebbe interagire negativamente con la regione N-terminale, impedendo il corretto *folding* proteico. Alternativamente, l'allungamento della regione C-terminale potrebbe rendere inaccessibili residui importanti per l'attività funzionale della proteina (coinvolti, ad esempio, nella dimerizzazione) o modificare la stabilità del peptide di *targeting* mitocondriale.

Nelle figure 10.3a e 10.3b sono rappresentate, secondo prospettive diverse, l'ipotetica struttura tridimensionale della proteina dETHE1 e la relativa posizione delle mutazioni identificate mediante *Tilling*.

In figura 10.4 è raffigurata la proteina dETHE1, prima del taglio del segnale di localizzazione mitocondriale, costituito da due α -eliche localizzate nella regione N-terminale.

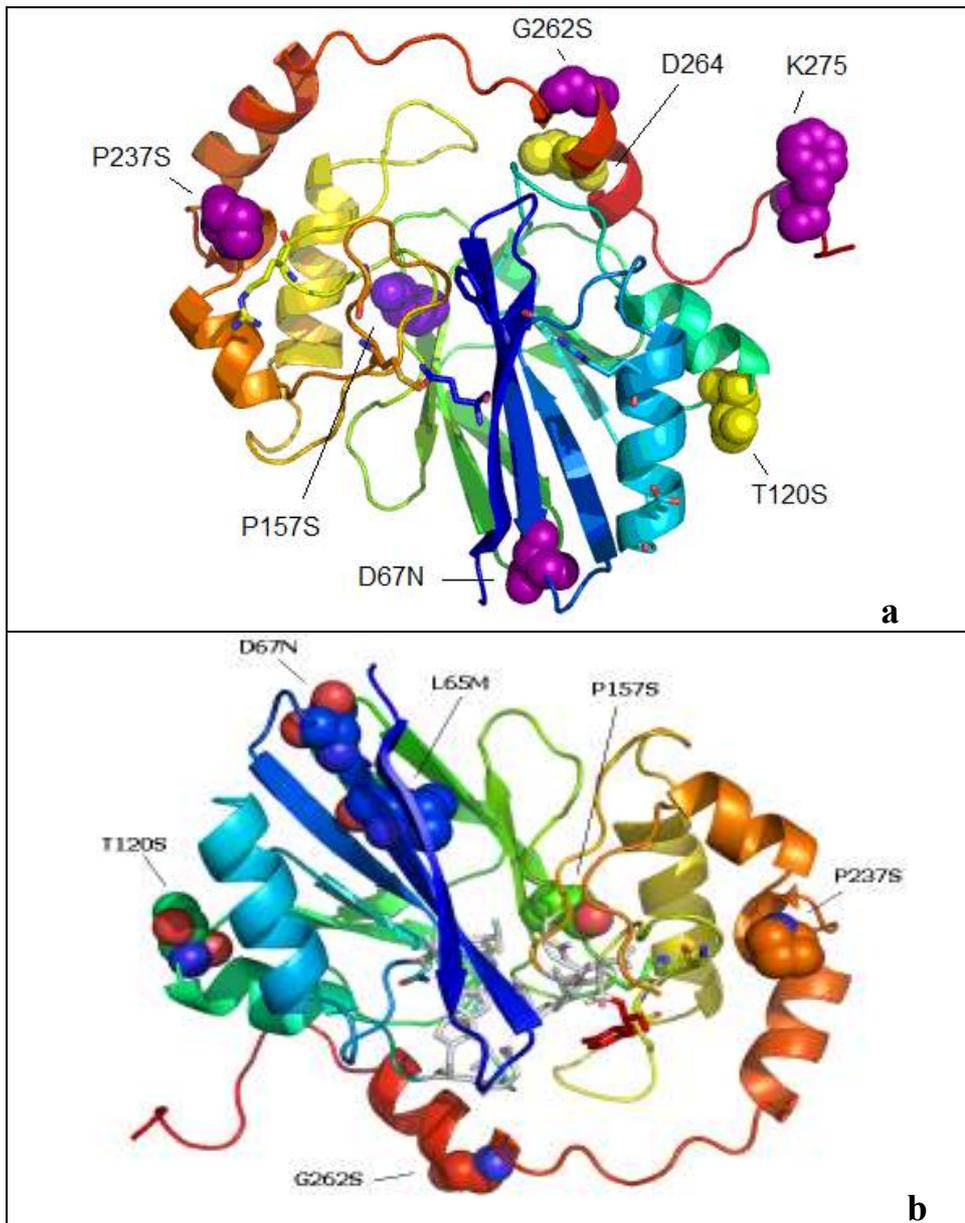


Figura 10.3: Ipotetica struttura tridimensionale della proteina dTHE1. La catena aminoacidica è rappresentata, dalla regione C-terminale alla regione N-terminale, con diverse tonalità di colori che variano dal rosso al blu (rosso-arancio-giallo-verde-azzurro-blu). In particolare, si noti, in rosso, la regione C-terminale, con le caratteristiche α -eliche. Tale regione si estende in prossimità dell'apertura per il sito attivo, posizionato nella regione centrale della proteina, limitando l'accessibilità per il substrato. In blu viene evidenziata la regione N-terminale, dopo il taglio delle due α -eliche che costituiscono il segnale di localizzazione mitocondriale. Le barrette indicano le porzioni coinvolte nella dimerizzazione; le mutazioni sono rappresentate come strutture globulari, localizzate in corrispondenza del residuo aminoacidico coinvolto. Si noti che le mutazioni a carico degli aminoacidi G262, D264 e K275, localizzate nella regione C-terminale, potrebbero alterare il corretto posizionamento di tale regione. La mutazione del residuo P237 si inserisce in un dominio di α -eliche importante per il posizionamento della regione C-terminale. Va evidenziata, infine, la vicinanza del residuo P157 al sito attivo e la localizzazione dell'aminoacido T120 sulla superficie esterna della proteina.

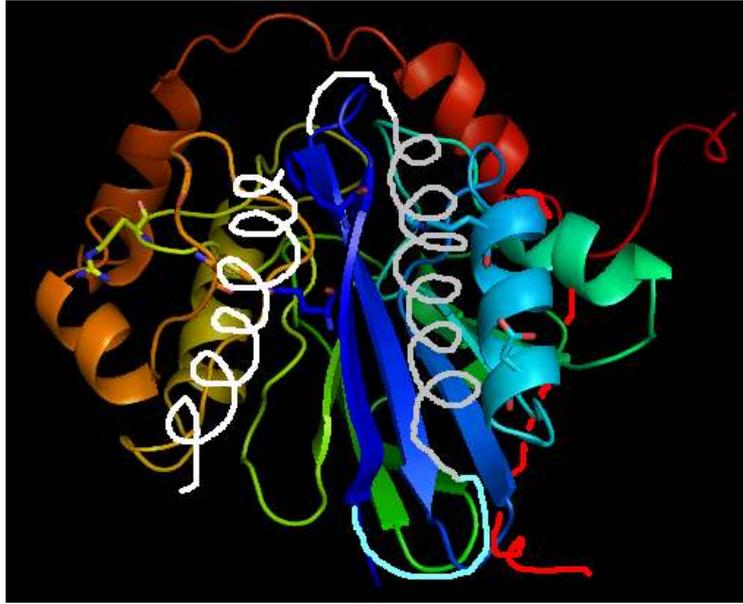


Figura 10.4: Ipotetica struttura tridimensionale della proteina dETHE1. La catena aminoacidica è rappresentata, dalla regione C-terminale alla regione N-terminale, con diverse tonalità di colori che variano dal rosso al blu (rosso-arancio-giallo-verde-azzurro-blu). Si noti, in bianco, la struttura costituita da due α -eliche che rappresenta il segnale di localizzazione mitocondriale.

PARTE II

dSurf1

CAPITOLO 11
MATERIALI E METODI

GENE SINTETICO *dSurf1*-SINONIMO

PROGETTAZIONE E SINTESI

La sequenza nucleotidica del gene sintetico “*dSurf1*-sinonimo” (*dSurf1-s*) è stata progettata sulla base dei seguenti parametri:

- quando possibile, ciascun codone del gene *dSurf1* nativo è stato sostituito con un codone di tipo sinonimo. Preferenzialmente, è stato scelto il codone sinonimo utilizzato con maggiore frequenza, secondo quanto previsto dal *codon usage* di *D. melanogaster* (Sharp *et al.*, 1988).
- Sono state mantenute invariate, rispetto al gene *dSurf1* nativo, regioni importanti nel processo di traduzione. In particolare, non è stata modificata la regione simmetrica localizzata a valle rispetto al codone di inizio ATG (posizione: +4-+24). Si ritiene che tale regione formi una struttura a forcina implicata nel rallentamento del ribosoma e nel conseguente riconoscimento del codone di inizio (Kozak, 1990).
- È stata introdotta una sequenza *tag* per le successive indagini molecolari. In particolare, è stata aggiunta, a monte del codone di stop TAG, il *tag* HA (HemoAgglutina) la cui sequenza nucleotidica e proteica viene di seguito riportata:

sequenza nucleotidica: 5'-taccctacgatgtgcccgattaccgccc-3'
sequenza proteica: 5'-YPYDVPDYA-3'

- E' stato confrontato il contenuto in GC tra la sequenza originale e quella sinonimo, prestando particolare attenzione alla terza posizione, nella quale è stato mantenuto un contenuto in GC maggiore del 50% (Shields *et al.*, 1988).
- Rispetto al gene *dSurf1* nativo, non sono stati eliminati né aggiunti possibili siti di splicing accettori e/o donatori, individuati mediante il programma *Splice site prediction* (<http://www.fruitfly.org>).

Il gene *dSurf1*-sinonimo è stato prodotto dalla ditta “*Genscript Corporation*” (<http://www.genscript.com>) che sintetizza una qualsiasi sequenza a doppio filamento, clonata nel vettore pUC57, in una quantità massima di 4 µg.

SUBCLONAGGIO DEL GENE *dSurf1*-SINONIMO NEL VETTORE pUAST

Il gene *dSurf1*-sinonimo è stato estratto dal plasmide pUC57 mediante digestione enzimatica con le endonucleasi di restrizione EcoRI e XhoI, i cui siti di restrizione sono localizzati, rispettivamente, alle estremità 5' e 3' del gene sintetico.

Il vettore pP[UAST] è stato linearizzato mediante le endonucleasi di restrizione EcoRI e XhoI.

Il vettore pP[UAST] ed il gene sintetico sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio e purificati da gel con l'uso del kit “Qiaex II”

(QIAGEN[®]). In seguito, è stata effettuata la seguente reazione di ligazione, condotta in 15 µl finali (16°C, over-night):

- Vettore (25 ng/µl):	6 µl
- Insetto (25 ng/µl):	6.5 µl
- Buffer 10×:	1.5 µl
- T4 DNA ligasi (1 U/µl):	1 µl

Un'aliquota della miscela di ligazione è stata utilizzata per trasformare i batteri competenti.

Il costrutto pP[UAST] d*Surf1-s* è stato purificato mediante il "Plasmid Miniprep Kit" (Sigma[®]).

MICROINIEZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE TRASFORMATE

La microiezione del costrutto pP[UAST] d*Surf1-s* e la caratterizzazione delle linee transgeniche ottenute sono state effettuate secondo i protocolli descritti nel capitolo 6.

ALLESTIMENTO DEGLI INCROCI

LINEE DI *Drosophila melanogaster* UTILIZZATE

Linea *yw; Act5C-GAL4/TM6B*

La linea *yw; Act5C-GAL4/TM6B* è stata utilizzata per indurre una attivazione precoce ed ubiquitaria del costrutto d*Surf1-simonimo*.

Le caratteristiche di tale linea sono descritte nel capitolo 6.

Linea *w;hsp70-GAL4/CyO*

La linea *w;hsp70-GAL4/CyO* è stata utilizzata per attivare la trascrizione del costrutto d*Surf1-simonimo* durante uno stadio di sviluppo scelto ed è caratterizzato da:

- *white* (*w*, 1-1.5): allele recessivo che determina il fenotipo "occhio bianco";
- *hsp-GAL4*: la sequenza GAL4 è controllata dal promotore del gene *heat-shock hsp70*; in questo modo la sequenza viene trascritta in maniera generalizzata in seguito ad un impulso di calore (37°C), permettendo l'attivazione del costrutto in esame in uno specifico stadio di sviluppo.
- *CyO*: cromosoma bilanciante letale in omozigosi per la presenza di *Curly* (*Cy*, 2-6.1), allele dominante responsabile del fenotipo "ali aricciate".

SELEZIONE DEGLI INDIVIDUI OMOZIGOTI PER L'INSERTO

Allo scopo di ottenere individui omozigoti per il costrutto *dSurfl-s*, sono stati allestiti gli incroci descritti nel capitolo 6.

INCROCIO PER L'ESPRESSIONE DEL COSTRUTTO pP[UAST] *dSurfl-s*

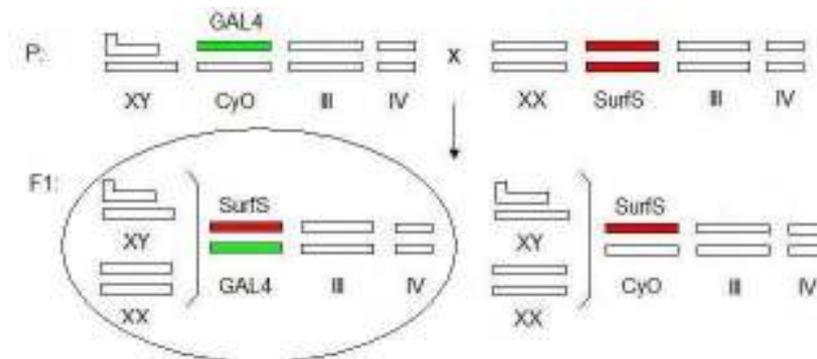
Driver *Act5C-GAL4*

Femmine vergini adulte transgeniche, omozigoti per il costrutto pP[UAST] *dSurfl-s*, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *yw;Act5C-GAL4/TM6B*.

La progenie ottenuta è stata selezionata secondo quanto descritto nel capitolo 6, relativamente all'induzione dell'espressione del costrutto pP[UAST] 5'-*dEthel-3'*/GFP/3'-*dEthel-5'*.

Driver *Hsp70-GAL4*

Femmine vergini adulte transgeniche, omozigoti per il costrutto pP[UAST] *dSurfl-s*, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *w;hsp70-GAL4/CyO*. Nella progenie ottenuta, sono stati selezionati gli individui che presentano le sequenze sia UAS che GAL4; tali individui sono caratterizzati dalla presenza di ali non arricciate. Nello schema seguente viene rappresentato, a titolo di esempio, il caso in cui il costrutto pP[UAST] *dSurfl-s* sia localizzato sul cromosoma II.



ALLESTIMENTO DI INCROCI PER LA CREAZIONE DI LINEE OMOZIGOTI PER IL COSTRUTTO pP[UAST] *dSurfl-s* E PER IL COSTRUTTO pP[UAST] *dSurfl-IR*

Allo scopo di ottenere linee di *Drosophila melanogaster* omozigoti sia per il costrutto pP[UAST] *dSurfl-s* che per il costrutto pP[UAST] *dSurfl-IR*, sono stati effettuati i seguenti passaggi:

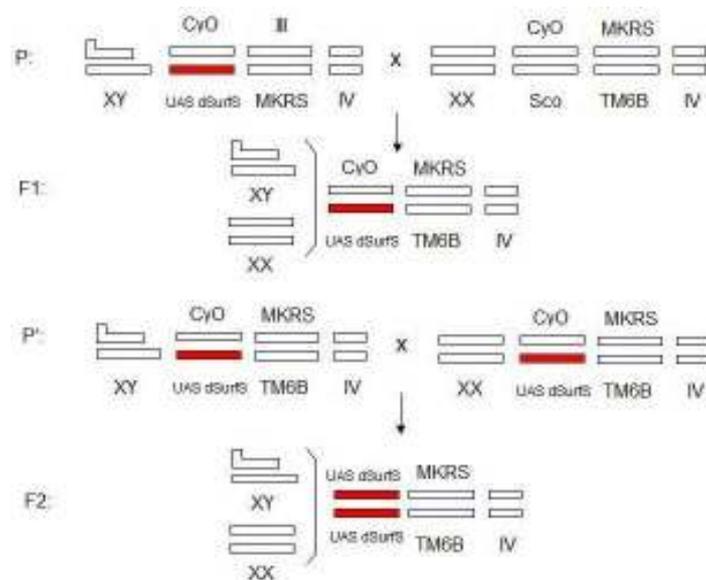
1. creazione di linee omozigoti bilanciate per il costrutto pP[UAST] *dSurfl-s*. Poiché le linee transgeniche disponibili presentano inserzione a livello del II cromosoma, nella progenie dell'incrocio con il ceppo bilanciatore per localizzare la posizione dell'inserto (si veda il capitolo 6), sono stati selezionati gli individui caratterizzati da:

- occhi rossi per la presenza di w^+ ;
- setole corte e spesse per la presenza di *Sb*;
- ali arricciate per la presenza di *CyO*.

Tali individui sono stati incrociati nuovamente con individui appartenenti al ceppo bilanciatore w ; *CyO/Sco*;MKRS/TM6B. Nella progenie di questo incrocio sono stati selezionati gli individui caratterizzati da:

- occhi rossi (w^+) per la presenza dell'inserto;
- setole corte e spesse per la presenza di *Sb*;
- morfologia corta e tozza per la presenza di *Tb*;
- ali arricciate per la presenza di *CyO*.

Tali individui sono stati incrociati tra loro e la progenie è stata mantenuta come ceppo omozigote bilanciato. Gli incroci effettuati vengono di seguito illustrati:



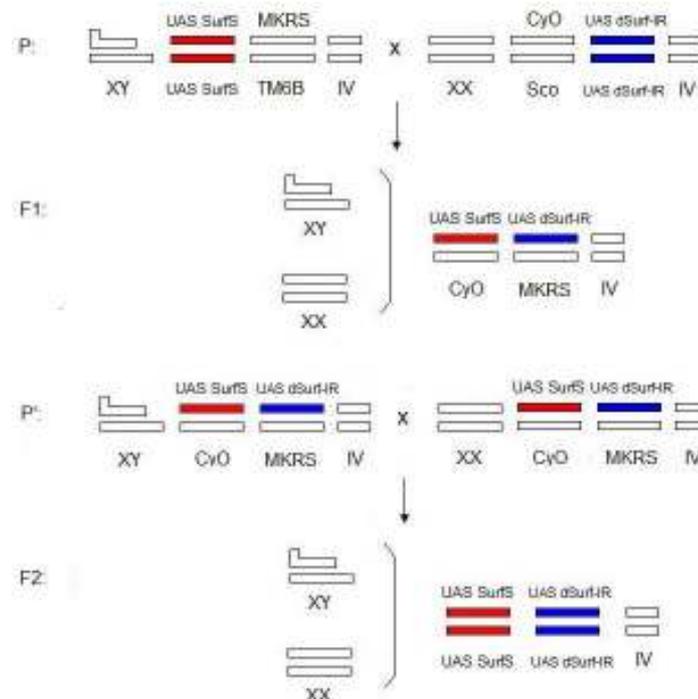
Per quanto riguarda il costrutto pP[UAST] *dSurf1-IR*, sono stati utilizzati individui appartenenti alla linea transgenica 79.1 che presenta l'inserzione sul cromosoma III ed è mantenuta come ceppo omozigote bilanciato.

2. Incrocio tra individui omozigoti bilanciati per il costrutto pP[UAST] *dSurf1-s* ed individui omozigoti bilanciati per il costrutto pP[UAST] *dSurf1-IR*. Dalla progenie di questo incrocio vengono selezionati individui che presentano:

- occhi rossi per la presenza dell'inserto (w^+);
- setole corte e spesse per la presenza di *Sb*.

Tali individui sono stati incrociati tra loro così da poter selezionare, nella progenie ottenuta, gli individui “doppi omozigoti”, riconoscibili per l’assenza di qualsiasi marcatore.

Gli incroci effettuati vengono di seguito illustrati:



ALLESTIMENTO DI INCROCI PER L’ATTIVAZIONE SIMULTANEA DEI COSTRUTTI pP[UAST] d*Surf1-s* E pP[UAST] d*Surf1-IR*

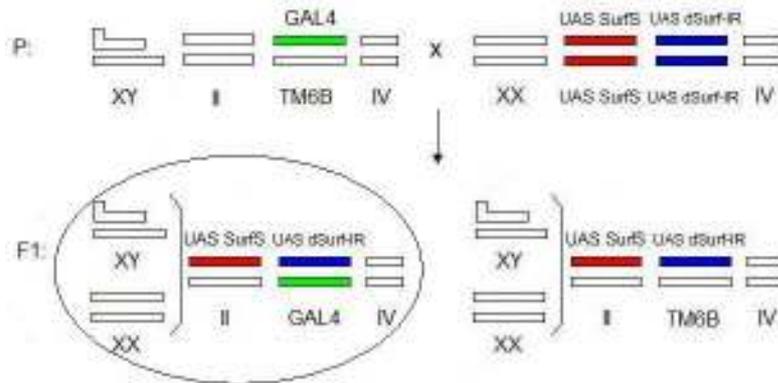
Driver Act5C-GAL4

Femmine vergini adulte transgeniche, omozigoti sia per il costrutto pP[UAST] d*Surf1-s* che per il costrutto pP[UAST] d*Surf1-IR*, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *yw*; *Act5C-GAL4/TM6B*.

Nella progenie ottenuta, sono stati selezionati gli individui che presentano:

- il costrutto pP[UAST] d*Surf1-IR*;
- il costrutto pP[UAST] d*Surf1-s*;
- la sequenza GAL4.

Tali individui sono riconoscibili in quanto privi del marcatore *Tb*, come illustrato nello schema seguente:

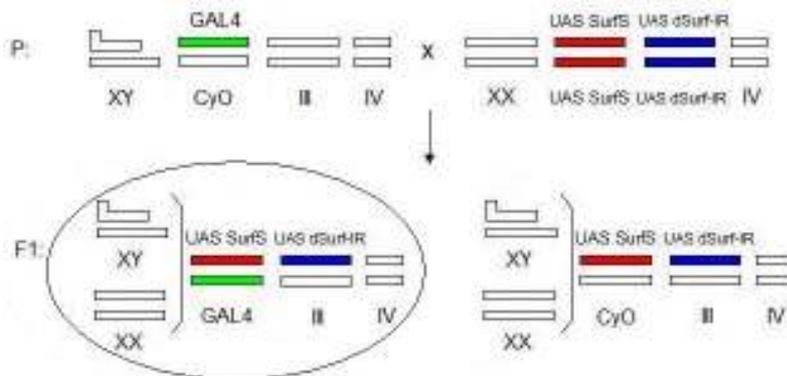


Driver *Hsp70-GAL4*

Femmine vergini adulte transgeniche, omozigoti sia per il costrutto pP[UAST] *dSurf1-s* che per il costrutto pP[UAST] *dSurf1-IR*, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *w;hsp70-GAL4/CyO*. Nella progenie ottenuta, sono stati selezionati gli individui che presentano:

- il costrutto pP[UAST] *dSurf1-IR*;
- il costrutto pP[UAST] *dSurf1-s*;
- la sequenza GAL4.

Tali individui sono caratterizzati da ali non arricciate, come illustrato nello schema seguente:



WESTERN BLOT

Per quanto riguarda le soluzioni ed i protocolli utilizzati negli esperimenti di western blot, si faccia riferimento a quanto descritto nel capitolo 6.

IMMUNOSAGGIO

La membrana è stata incubata over-night a 4°C con l'anticorpo primario anti-HA (SIGMA®), prodotto in topo e diluito 1:2500 in BB 5%.

Dopo 3 lavaggi con TBST 1x a temperatura ambiente, la membrana è stata incubata per 1 ora con un anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato con HRP (*Horse Radish Peroxidase*) (SIGMA®), diluito 1:1000 in tampone di bloccaggio (Blocking buffer) 1%. Dopo l'incubazione, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi in TBST 1x.

REAL TIME PCR

Per quanto riguarda i protocolli utilizzati negli esperimenti di Real Time PCR, si faccia riferimento a quanto descritto nel capitolo 6.

CONDIZIONI DI AMPLIFICAZIONE

La reazione di amplificazione è stata così allestita:

- Sybr Green master mix 10x:	2.5 µl
- dNTPs (10 mM):	0.4 µl
- MgCl ₂ (2 mM):	2 µl
- primer Forward (10 µM):	0.75 µl
- primer Reverse (10 µM):	0.75 µl
- Ampli Taq Gold (5 U/µl):	0.125 µl
- H ₂ O:	0.5 µl
- cDNA opportunamente diluito:	18 µl

Ogni ciclo prevede:

- denaturazione a 95°C per 30 secondi;	} 45 cicli
- annealing a 60°C per 30 secondi;	
- estensione a 72°C per 45 secondi.	

Di seguito vengono riportati i primer utilizzati :

dSurf1 5'	5'-ATACAGACTGTATTCCGAAAC-3'
dSurf1 3'	5'-GTCAAGAGGATACCCTTCTGA-3'
dSurf1-s 5'	5'-CAGACTGCAGCTCACGCACC-3'

dSurfl-s 3'
rp49 5' (169-188)
rp49 3' (314-333)

5'-CACAACTGCCGGTACCACAG-3'
5'-ATCGGTTACGGATCGAACAA-3'
5'-GACAATCTCCTTGCGCTTCT-3'

CARATTERIZZAZIONE DEGLI INDIVIDUI “RESCUE”

TEST OTTICO-MOTORIO

Il test ottico-motorio permette di misurare l'abilità di coordinare il movimento in risposta a stimoli visivi. Gli esperimenti sono stati condotti secondo il metodo descritto da Burnet & Beck (1968).

Lo strumento utilizzato per il test ottico-motorio consiste in un cilindro rotante di plexiglass (diametro: 8 cm; altezza: 9 cm) dotato di strisce verticali alternate bianche e nere che sottendono un angolo di 12.4°; la velocità di rotazione è pari a 30 giri/min (figura 11.1).

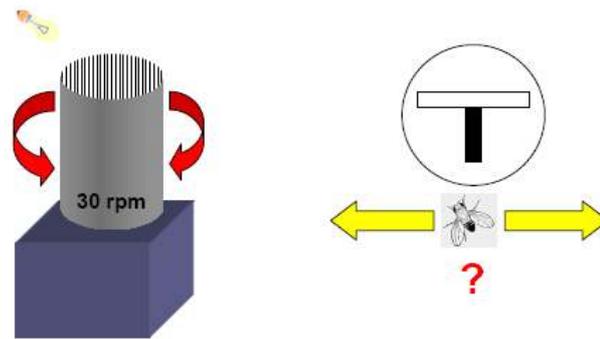


Figura 11.1: Illustrazione dello strumento utilizzato nel test ottico-motorio. Lo strumento consiste in un cilindro rotante di plexiglass dotato di strisce verticali alternate bianche e nere. La velocità di rotazione è di 30 rpm (*round per minute*) e la luce è posizionata centralmente e perpendicolarmente al cilindro. Ciascun moscerino è stato posto nel braccio centrale, dipinto di nero, di un tubo di vetro a forma di T mentre le due braccia orizzontali del tubo sono trasparenti. La risposta viene considerata corretta quando il moscerino, uscito dal braccio nero del tubo a T, si muove nel senso corrispondente alla rotazione delle strisce. Modificato da Burnet & Beck (1968).

I moscerini sono stati posti nel braccio centrale, dipinto di nero, di un tubo di vetro a forma di T, avente le due braccia orizzontali trasparenti. Gli individui sono stati mantenuti nel tubo a T per 10 minuti prima di iniziare l'esperimento allo scopo di minimizzare l'effetto di stress dovuto al trasferimento. Il tubo a T è stato posto al centro del cilindro e la luce fredda proveniente da una lampada a fibre ottiche (Highlight 3100, OLYMPUS EUROPE) è stata orientata perpendicolarmente al cilindro e posizionata ad un'altezza costante di 30 cm dal fondo del cilindro.

Gli individui di *D. melanogaster* di linee selvatiche mostrano la tendenza a “girare” in direzione del movimento delle strisce nel loro campo visivo e quindi ogni moscerino risponde in maniera corretta qualora, una volta uscito dal braccio nero, giri nella stessa direzione della rotazione delle strisce bianche e nere.

Ciascun individuo è stato testato 10 volte di seguito, cambiando in maniera casuale, ad ogni prova, la direzione della rotazione onde evitare il verificarsi di fenomeni di abitudine. Per ogni campione sono stati testati almeno 10 individui.

CHECKER TEST

La misurazione della risposta fotocomportamentale delle larve è stata effettuata mediante il “checker test” (Hassan *et al.*, 2000).

Il checker test prevede l’uso di piastre Petri (140 x 15 mm) contenenti circa 30 ml di agar (1%) solidificato. Poiché le irregolarità della superficie di agar incidono sul comportamento larvale, il test è stato condotto escludendo la porzione di superficie più vicina (1 cm) al bordo della piastra.

Gli esperimenti alla luce sono stati effettuati mediante una lampada a fibra ottica (100 W) con una intensità luminosa di 60 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$; gli esperimenti al buio sono stati condotti utilizzando una lampada a luce rossa.

Larve di 4 giorni (dopo la deposizione) sono state poste in una piastra al buio per circa 1 minuto, dopo aver accuratamente rimosso con un pennello ed acqua distillata i residui del terreno di coltura.

Ciascuna larva è stata in seguito posizionata al centro della piastra, a contatto con una scacchiera costituita da quadrati (1cm x 1cm) chiari e scuri. I quadrati scuri non permettono il passaggio della luce, mentre i quadrati chiari lasciano filtrare la luce.

La piastra e la scacchiera sono state in seguito riposte su una scatola costruita in modo tale che la larva venga illuminata da un flusso di luce proveniente dal basso. I movimenti larvali sono stati registrati misurando il tempo trascorso sui quadrati chiari, fino al raggiungimento di una distanza pari ad 1 cm dal bordo della piastra o per un tempo massimo di 180 secondi. Per ciascun genotipo sono state testate almeno 10 larve. L’indice di risposta (R. I.), definito come

$$(R. I.) = (\text{tempo trascorso alla luce} - \text{tempo trascorso al buio}) / \text{tempo totale dell'esperimento}$$

è stato calcolato, con la luce accesa (R.I.on) e con la luce spenta (R.I.off), per ciascuna larva e, come valore medio, per ciascun genotipo.

Una risposta alla luce è presente quando il valore di R.I.on è significativamente maggiore ($p < 0.05$) rispetto a quello ottenuto al buio.

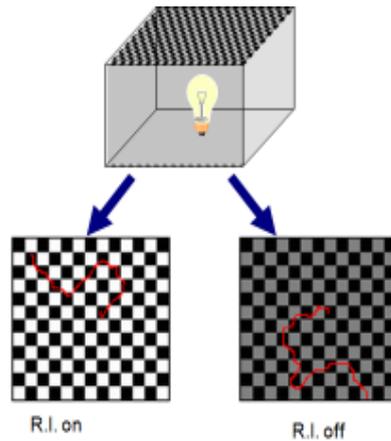


Figura 11.2: Illustrazione dello strumento utilizzato nel checker test. Lo strumento consiste in una scatola costruita in modo tale che la larva, posta in una piastra Petri a contatto con una scacchiera di quadrati bianchi e neri, venga illuminata da un flusso luminoso proveniente dal basso.

VELOCITÀ DI LOCOMOZIONE LARVALE

La velocità di locomozione di larve III stadio è stata analizzata secondo quanto descritto nel capitolo 6.

ELETTRORETINOGRAMMI

Gli elettroretinogrammi (ERG) sono una registrazione extracellulare dell'occhio di *Drosophila* in grado di misurare la depolarizzazione, indotta dalla luce, dei fotorecettori e l'attivazione sinaptica dei neuroni del secondo ordine nel *pathway* visivo (Heisenberg, 1971; Hotta & Benzer, 1969; Pak *et al.* 1969). L'attivazione sinaptica si verifica all'inizio ed alla fine dello stimolo luminoso ed è rappresentata dai transienti ON ed OFF.

Moscerini anestetizzati con il ghiaccio sono stati immobilizzati in paraffina (Bellevue); un microelettrodo di vetro (elettrodo di riferimento) è stato inserito nella regione mediana della testa, mentre l'elettrodo di registrazione è stato inserito all'interno dell'occhio, al di sotto della cornea (Heisenberg, 1971; Sandrelli *et al.*, 2001).

Dopo 10 minuti di attesa per il recupero, i moscerini sono stati lasciati al buio per 5 minuti ed in seguito sottoposti ad impulsi di luce, della durata di 2-5 secondi, utilizzando una lampadina alimentata a corrente continua. I segnali registrati sono stati amplificati mediante un amplificatore cellulare (705, WPI Instruments), successivamente trasferiti ad un condizionatore di segnale (CyberAmp, Axon Instruments) ed infine filtrati da un filtro "low-pass" (3 kHz) ed inviati ad un PC mediante un convertitore analogico-digitale (Digidata 1200, Axon Instruments).

CAPITOLO 12
RISULTATI d*Surf1*

PROGETTAZIONE DEL GENE SINTETICO *dSurf1* SINONIMO

Il metodo denominato “*trans-complementation by a synthetic gene*” (Kumar *et al.*, 2006), prevede l'utilizzo di un gene sintetico che, codificando la stessa proteina del gene nativo, è in grado di complementare il fenotipo *knockdown* indotto dal silenziamento post-trascrizionale via *double-stranded RNA interference*. La variante sintetica del gene di interesse viene progettata in modo tale che la sua sequenza nucleotidica sia sufficientemente differente rispetto a quella del gene nativo, così da sfuggire al silenziamento post-trascrizionale.

In accordo con questo metodo, la sequenza nucleotidica del gene sintetico *dSurf1*-sinonimo (*dSurf1-s*) è stata progettata sostituendo ciascun codone del gene *dSurf1* nativo con una tripletta di tipo sinonimo. Le sostituzioni nucleotidiche sono state scelte in modo da massimizzare la differenza tra le due sequenze nucleotidiche; si è cercato, nel contempo, di rispettare il *codon bias* e di evitare l'introduzione di nuovi siti di splicing (si veda la sezione “materiali e metodi”, capitolo 11).

Complessivamente, la sequenza nucleotidica del gene *dSurf1-s*, riportata in figura 12.1, differisce del 29.1%, rispetto a quella nativa.

All'interno della regione target per l'RNAi, compresa tra le posizioni +45 e +859 del gene *dSurf1*, la lunghezza media dei frammenti nucleotidici che presentano identità di sequenza rispetto al gene nativo è di 2.6 pb, con una lunghezza massima di 11 pb.



Figura 12.1: Sequenza nucleotidica del gene dSurf1-sinonimo. I nucleotidi modificati, rispetto alla sequenza nativa, sono evidenziati in viola. La regione target per l'RNAi, utilizzata nell'allestimento del costrutto pP[UAST] dSurf1-IR, è sottolineata in blu. A monte del codone di STOP, è stata aggiunta la sequenza Tag HA, utile per le successive indagini molecolari.

Per quanto riguarda la composizione nucleotidica del gene dSurf1-s, non sono state introdotte differenze sostanziali rispetto alla sequenza nativa, mantenendo pressoché inalterata la composizione percentuale di ciascuna base, come si evidenzia in tabella 12.1. Inoltre, si è confrontato il contenuto in GC tra la sequenza originale e quella di tipo sinonimo, con particolare riguardo per la terza posizione, nella quale è stato mantenuto un contenuto in GC di circa il 60%. Infatti, secondo quanto riportato da Shields *et al.* (1988), in genere, i codoni utilizzati con maggiore frequenza nei geni di *Drosophila melanogaster*, sono quelli che presentano, in terza posizione, le basi G o C.

dSurf1	COMPOSIZIONE IN BASI				CONTENUTO % IN GC		
	A%	T%	C%	G%	PRIMA POSIZIONE	SECONDA POSIZIONE	TERZA POSIZIONE
NATIVO	24.03	19.49	28.35	28.13	59.14	43.52	66.78
SINONIMO	24.73	20.65	28.06	26.56	60.32	43.23	60.32

Tabella 12.1: Composizione in basi del gene dSurf1 sinonimo e del gene dSurf1 nativo. Per le due sequenze, sono riportati la composizione percentuale relativa a ciascuna base ed il contenuto percentuale in GC a livello della prima, della seconda e della terza posizione delle triplette aminoacidiche.

ALLESTIMENTO DEL COSTRUTTO pP[UAST] d*Surf1-s*

Il gene d*Surf1-s*, sintetizzato dalla ditta “Genscript Corporation”, è stato subclonato dal vettore pUC57 al vettore di microiniezione pP[UAST], secondo quanto descritto nella sezione “materiali e metodi” (capitolo 11)

Per confermare l’avvenuta inserzione del gene sintetico nel vettore pP[UAST], il costrutto finale è stato sottoposto a restrizioni di controllo con opportuni enzimi di restrizione. Come mostrato in figura 12.2, dopo digestione enzimatica con le endonucleasi di restrizione EcoRI e XhoI, si rende visibile un frammento di 980 pb, corrispondente al gene d*Surf1-s*; la banda relativa al vettore pP[UAST] presenta la dimensione attesa di 9050 pb.

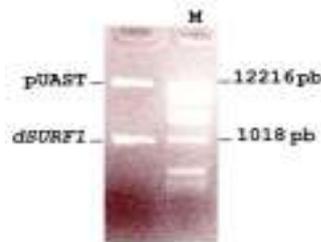


Figura 12.2: Digestioni di controllo del costrutto pP[UAST] d*Surf1-s* mediante gli enzimi di restrizione EcoRI e XhoI. M: 200 ng marker 1Kb (Invitrogen). Gel di agarosio 1%.

L’esatta corrispondenza tra la sequenza clonata nel vettore pP[UAST] e quella progettata è stata confermata mediante sequenziamento.

TRASFORMAZIONE DI EMBRIONI w^{1118} MEDIANTE MICROINIEZIONE DEL COSTRUTTO pP[UAST] d*Surf1-s*

Il costrutto pP[UAST] d*Surf1-s* è stato microiniettato in embrioni della linea w^{1118} . Gli adulti sviluppati dagli embrioni sopravvissuti alla microiniezione sono stati numerati progressivamente ed incrociati con individui w^{1118} . Per ciascun evento di inserzione, è stata fondata una sola linea transgenica stabile. Ciascuna linea ottenuta è stata denominata con il nome del costrutto microiniettato (pP[UAST] d*Surf1-s*) e con due numeri di cui, il primo, identifica l’individuo che ha prodotto progenie transgenica, mentre il secondo identifica l’individuo trasformato della F1 da cui è stata originata la linea.

Complessivamente, sono state ottenute quattro linee transgeniche, denominate: 2.4, 1.1, 10.8 e 13.6.

I dati relativi all’efficienza di trasformazione ottenuta negli esperimenti di microiniezione del costrutto pP[UAST] d*Surf1-s* sono riportati in tabella 12.2.

	EMBRIONI INIETTATI	LARVE OTTENUTE	ADULTI OTTENUTI	ADULTI FERTILI	INCROCI CON PROGENIE TRASFORMATA
TOTALE	1250	190	117	99	4
VALORE PERCENTUALE		25.2	9.4 (61.5%)	7.9 (84.6%)	0.32 (4.04%)

Tabella 12.2: Quadro riassuntivo dei dati riguardanti l'efficienza di trasformazione degli embrioni microiniettati con il costrutto pP[UAST] d*Surf1-s*. I valori di percentuale sono calcolati in funzione del numero totale di embrioni microiniettati; i valori di percentuale indicati in corsivo, tra parentesi, sono calcolati in funzione del valore della colonna precedente.

CARATTERIZZAZIONE DELLE LINEE TRASFORMATE E BILANCIAMENTO DEGLI INSERTI

Allo scopo di verificare una eventuale inserzione del costrutto pP[UAST] d*Surf1-s* nel cromosoma X, sono stati allestiti, per ogni linea transgenica, degli incroci con individui appartenenti al ceppo *w¹¹¹⁸*. Una volta esclusa l'inserzione del costrutto nel cromosoma X, si è proceduto all'allestimento di incroci con individui appartenenti alla linea *w;CyO/Sco;MKRS/TM6B*. La progenie ottenuta è stata analizzata secondo quanto riportato nella sezione "materiali e metodi" (capitolo 11).

La tabella 12.3 indica, per ogni linea transgenica, il cromosoma nel quale è avvenuto l'evento di inserzione.

LINEA TRANSGENICA	CROMOSOMA DI INSERZIONE
2.4	III
1.1	II
10.8	II
13.6	II

Tabella 12.3: Linee transgeniche ottenute per il costrutto pP[UAST] d*Surf1-s*, con relativa indicazione del cromosoma che ha subito inserzione. Sono evidenziate le linee utilizzate nelle successive sperimentazioni.

Nella progenie derivante dal primo incrocio con il bilanciamento, sono stati selezionati individui transgenici caratterizzati dalla presenza dei marcatori morfologici *Curly* e *Stubble* ed incrociati tra loro al fine di ottenere ceppi stabili in omozigosi.

La linea 2.4 presenta una inserzione sul cromosoma III letale in omozigosi; pertanto, tale linea, mantenuta come stock eterozigote bilanciato, non è stata utilizzata per le indagini successive.

CREAZIONE DI LINEE “DOPPIE OMOZIGOTI”

Per valutare l'eventuale reversione del fenotipo *knockdown* in seguito ad espressione del gene *dSurf1-s*, è necessario disporre di linee transgeniche contenenti sia il costrutto pP[UAST] *dSurf-s*, in grado di esprimere la proteina dSURF1-HA, sia il costrutto pUAST *dSurf1-IR*, in grado di indurre il silenziamento post-trascrizionale del gene nativo *dSurf1*.

Tali linee, omozigoti per entrambi i costrutti e pertanto denominate “doppie omozigoti”, sono state prodotte, mediante opportuni incroci (si veda la sezione “materiali e metodi”, capitolo 11), a partire dalle seguenti linee transgeniche:

- 1.1, 10.8 e 13.6, contenenti il costrutto pP[UAST] *dSurf-s*;
- 79.1, contenente il costrutto pUAST *dSurf1-IR*, localizzato nel III cromosoma (3R, 88D) (Zordan *et al.*, 2006).

Come schematizzato in tabella 12.4, sono state ottenute le seguenti linee doppie omozigoti:

- 1.1;79.1
- 10.8;79.1
- 13.6;79.1.

LINEE DOPPIE OMOZIGOTI		LINEE TRANSGENICHE CONTENENTI IL COSTRUTTO pP[UAST] <i>dSurf-s</i>		
		1.1	10.8	13.6
LINEA TRANSGENICA CONTENENTE IL COSTRUTTO pUAST <i>dSurf1-IR</i>	79.1	1.1;79.1	10.8;79.1	13.6;79.1

Tabella 12.4: Linee doppie omozigoti 1.1;79.1, 10.8;79.1 e 13.6;79.1 nelle quali è possibile indurre l'espressione del gene *dSurf1* sinonimo e l'attivazione dell'RNAi. I doppi omozigoti sono stati prodotti a partire da tre diverse linee transgeniche contenenti il costrutto pP[UAST] *dSurf-s* (1.1, 10.8 e 79.1) e da una singola linea transgenica contenente il costrutto pUAST *dSurf1-IR* (79.1).

Nelle linee doppie omozigoti, i costrutti pP[UAST] *dSurfS* e pUAST *Surf1-IR* sono inducibili contemporaneamente, utilizzando il sistema binario UAS-GAL4. Nel presente lavoro di tesi, l'attivazione dell'RNA interference e la simultanea espressione del gene sintetico *dSurf-s* sono stati posti sotto il controllo alternativo dei seguenti promotori:

- *Act5C*, ad espressione ubiquitaria;
- *hsp70*, inducibile mediante shock termico.

CARATTERIZZAZIONE DEL DRIVER *Act5C-GAL4*

Analisi di western blot

Femmine vergini adulte transgeniche delle linee 1.1, 10.8 e 13.6, omozigoti per il costrutto pP[UAST] *dSurf1-s*, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *yw;Act5C-GAL4/TM6B*. Nella progenie ottenuta, sono stati selezionati gli individui che presentano le sequenze sia UAS che GAL4, nei quali è stata indotta una attivazione precoce ed ubiquitaria del gene *dSurf1-s*.

Per verificare se l'induzione del gene *dSurf1-s* mediante il driver *Act5C-GAL4* sia in grado di determinare la produzione della proteina dSURF1-HA, distinguibile dalla proteina SURF1 endogena per la presenza del *tag* HA, sono state effettuate 3 estrazioni indipendenti di proteine totali, partendo dai seguenti individui pP[UAST] *dSurf1-s Act5C-GAL4*:

- 10 larve III stadio;
- 10 pupe;
- 10 individui adulti.

Quantità equivalenti degli estratti proteici di ciascun campione sono state separate elettroforeticamente mediante gel di poliacrilammide al 12%.

L'analisi di western blot evidenzia che il trascritto del gene sintetico è riconosciuto ed efficacemente tradotto in una proteina con lo stesso peso molecolare previsto per la proteina endogena SURF1. Il segnale relativo alla proteina codificata dal gene *dSurf1-s* che, putativamente, ha un peso molecolare di circa 34 KDa, è rilevabile, nelle tre linee analizzate, solo a livello pupale.

Nelle figure 12.3 e 12.4 viene riportato, a titolo esemplificativo, il risultato ottenuto in seguito ad immunosaggio e sviluppo di una delle repliche effettuate.

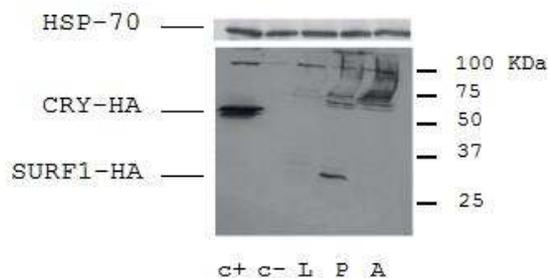


Figura 12.3: Linea 10.8: Western Blot: lastra radiografica. La frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento HSP-70, alla proteina CRY-HA ed alla proteina dSURF1-HA. Gli estratti di proteine totali sono stati ottenuti dai seguenti campioni: 10 individui adulti appartenenti ad una linea caratterizzata da espressione costitutiva della proteina CRY-HA (controllo positivo, C+); 10 individui adulti appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸* (controllo negativo, C-); 10 larve III stadio (L), 10 pupe (P) e 10 adulti (A) appartenenti alla linea 10.8 e nei quali è stata indotta l'attivazione del gene *dSurf1-s* mediante il driver *Act5C-GAL4*.

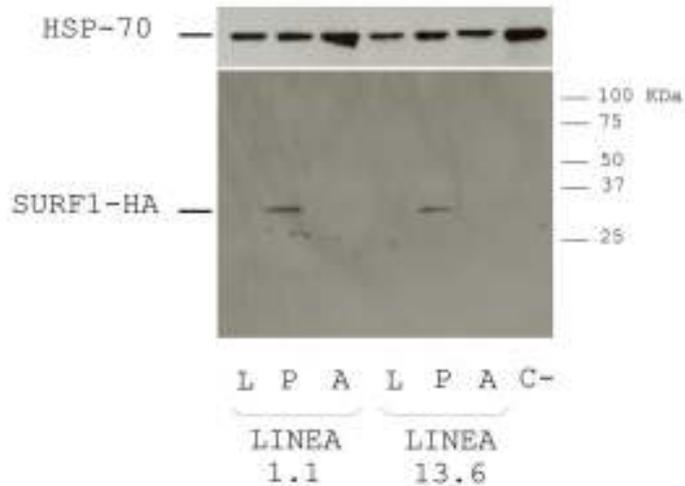


Figura 12.4: Linee 1.1 e 13.6: Western Blot: lastra radiografica. Le frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento HSP-70 ed alla proteina dSURF1-HA. Gli estratti di proteine totali sono stati ottenuti dai seguenti campioni: 10 larve III stadio (L), 10 pupe (P) e 10 adulti (A) appartenenti alla linea 1.1 e nei quali è stata indotta l'attivazione del gene *dSurf1-s* mediante il driver *Act5C-GAL4*; 10 larve III stadio (L), 10 pupe (P) e 10 adulti (A) appartenenti alla linea 13.6 e nei quali è stata indotta l'attivazione del gene *dSurf1-s* mediante il driver *Act5C-GAL4*; 10 individui adulti appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸*, utilizzata come controllo negativo (C-).

Espressione del gene dSurf1 sinonimo ed attivazione dell'RNAi in individui doppi omozigoti

Femmine vergini adulte transgeniche, appartenenti alle linee 1.1;79.1, 10.8;79.1 e 13.6;79.1, omozigoti per i costrutti pP[UAST] *dSurf-s* e pP[UAST] *dSurf1-IR*, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *yw;Act5C-GAL4/TM6B*. Nella progenie ottenuta, sono stati analizzati gli individui nei quali è presente attivazione dell'RNAi e la simultanea espressione del gene sintetico; tali individui sono riconoscibili per l'assenza del marcatore *Tubby*.

Premesso che l'attivazione, mediante il driver *Act5C-GAL4*, del silenziamento post-trascrizionale del gene *dSurf1* in individui appartenenti alla linea transgenica 79.1, determina letalità allo stadio larvale, con larve di dimensione ridotta e movimenti rallentati, si è osservato quanto segue:

- assenza del fenotipo *knockdown* e sopravvivenza fino allo stadio adulto negli individui 1.1;79.1 *Act5C-GAL4*;
- presenza del fenotipo *knockdown* negli individui 10.8;79.1 *Act5C-GAL4* e negli individui 13.6;79.1 *Act5C-GAL4*.

Individui 1.1; 79.1 Act5C-GAL4: esperimenti di Real Time PCR

Allo scopo di valutare, negli individui 1.1; 79.1 Act5C-GAL4, l'espressione trascrizionale del gene *dSurfl* e del transgene *dSurfl-s*, sono state effettuate estrazioni di RNA a partire da tre diversi campioni, costituiti rispettivamente da:

- 10 individui adulti 1.1; 79.1 Act5C-GAL4;
- 10 individui adulti 1.1 Act5C-GAL4, utilizzati come controllo per l'espressione del trascritto *dSurfl-s*;
- 10 individui adulti appartenenti al ceppo w^{1118} , utilizzati come controllo per l'espressione del trascritto *dSurfl*.

1 µg dell'RNA totale ottenuto per ciascun campione è stato retrotrascritto in cDNA ed amplificato mediante Real Time PCR (si veda la sezione "materiale e metodi", capitolo 11). Oltre ai geni "target" *dSurfl* nativo e *dSurfl-s*, è stato amplificato, come gene di riferimento, il gene *rp49*. In questo modo, è stato possibile normalizzare le differenze quantitative tra i campioni analizzati, dovute ad errori sperimentali. I livelli relativi di mRNA di *dSurfl* e *dSurfl-s* sono stati determinati tramite il confronto con i corrispondenti campioni di controllo, costituiti, rispettivamente, da individui w^{1118} e da individui 1.1 Act5C-GAL4.

Dall'analisi dei dati, replicati in due esperimenti indipendenti, si evidenzia, negli individui 1.1;79.1 Act5C-GAL4:

- un decremento dei livelli di trascrizione del gene sintetico *dSurfl-s*, pari al 48.5% rispetto agli individui di controllo 1.1 Act5C-GAL4;
- un livello di trascrizione del gene nativo *dSurfl* comparabile a quello rilevato negli individui di controllo w^{1118} .

Ne deriva che, negli individui 1.1;79.1 Act5C-GAL4, l'RNAi non risulta attivata, dato che non viene rilevato alcun abbattimento post-trascrizionale del gene *dSurfl*.

Individui 10.8;79.1 Act5C-GAL4: esperimenti di Real Time PCR

Mediante esperimenti di Real Time PCR, è stato possibile stimare, nelle larve 10.8;79.1 Act5C-GAL4, l'espressione, a livello trascrizionale, dei geni *dSurfl* e *dSurfl-s*, utilizzando come riferimento il gene "housekeeping" *rp49*.

Sono state effettuate estrazioni totali di RNA a partire da tre diversi campioni, ciascuno costituito da:

- circa 50 larve 10.8; 79.1 Act5C-GAL4;
- 10 larve II stadio 10.8 Act5C-GAL4, utilizzate come controllo per l'espressione del trascritto *dSurfl-s*;
- 10 larve II appartenenti al ceppo w^{1118} , utilizzate come controllo per l'espressione del trascritto *dSurfl*.

Le larve 10.8; 79.1 Act5C-GAL4, benché mostrino uno sviluppo fortemente ritardato, presentano strutture cuticolari tipiche del secondo stadio larvale; per questo motivo, come campione di controllo, sono state utilizzate larve II stadio.

Inoltre, data la ridotta dimensione delle larve 10.8; 79.1 *Act5C-GAL4*, è stato necessario partire da un campione più numeroso, rispetto ai controlli, per ottenere una quantità di RNA sufficiente per la retrotrascrizione.

Dall'analisi dei dati, ottenuti da una singola replica, si è evidenziato, negli individui 10.8; 79.1 *Act5C-GAL4*:

- un decremento dei livelli di trascrizione del gene sintetico *dSurfl-s*, pari al 10%, rispetto agli individui di controllo 10.8 *Act5C-GAL4*;
- un decremento dei livelli di trascrizione del gene nativo *dSurfl*, pari al 3,8%, rispetto agli individui di controllo *w¹¹¹⁸*.

Si deduce che, negli individui 10.8; 79.1 *Act5C-GAL4*, l'RNAi è stata attivata. Inoltre, la riduzione del livello di trascrizione del gene sintetico *dSurfl-s*, rispetto al controllo, ne suggerisce un possibile abbattimento via dsRNA interference. In tabella 12.5 vengono riassunti i dati relativi agli esperimenti di Real Time PCR condotti sugli individui 1.1; 79.1 *Act5C-GAL4* e 10.8; 79.1 *Act5C-GAL4*.

LIVELLO DI ESPRESSIONE TRASCRIZIONALE	INDIVIDUI 1.1; 79.1 <i>Act5C-GAL4</i>	INDIVIDUI 10.8; 79.1 <i>Act5C-GAL4</i>
% livelli di espressione mRNA <i>dSurfl-sinonimo</i>	48,50%	3,80%
% livelli di espressione mRNA <i>dSurfl</i>	100%	10%

Tabella 12.5: Real-time PCR: livelli % di espressione dei trascritti di *dSurfl-s* e *dSurfl*, negli individui 10.8-79.1 *Act5C-GAL4* e 1.1-79.1 *Act5C-GAL4*. I valori relativi al trascritto di *dSurfl* sono stati calcolati utilizzando, come controllo, individui appartenenti alla linea *w¹¹¹⁸*. I valori relativi al trascritto di *dSurfl-s* sono stati calcolati utilizzando, come controllo, gli individui 10.8 *Act5C-GAL4* e 1.1 *Act5C-GAL4*, per gli individui 10.8-79.1 *Act5C-GAL4* e 1.1-79.1 *Act5C-GAL4*, rispettivamente. I dati relativi agli individui 1.1-79.1 *Act5C-GAL4* sono la media calcolata a partire da due estrazioni proteiche indipendenti; i dati relativi agli individui 10.8-79.1 *Act5C-GAL4* si riferiscono ad un unico esperimento.

CARATTERIZZAZIONE DEL DRIVER *Hsp70-GAL4*

Analisi di western blot

Femmine vergini adulte transgeniche delle linee 1.1, 10.8 e 13.6, omozigoti per il costrutto pP[UAST] *dSurfl-s*, sono state incrociate con maschi appartenenti alla linea *w;hsp70-GAL4/CyO*.

Nella progenie ottenuta, sono stati selezionati gli individui che presentano le sequenze sia UAS che GAL4, caratterizzati da ali non arricciate; poiché, in questo caso, il genotipo della progenie è riconoscibile nello stadio adulto, le indagini successive sono state condotte solo su individui adulti.

Per verificare se il driver *hsp70*-GAL4 sia in grado di indurre, in seguito a shock termico, l'espressione del gene *dSurf1-s*, si sono effettuate estrazioni indipendenti di proteine totali, partendo da

- 10 individui adulti 1.1 *hsp70*-GAL4, 10.8 *hsp70*-GAL4 e 13.6 *hsp70*-GAL4, sottoposti a shock termico (37°C, 60 minuti) nelle prime fasi dello sviluppo, dopo 24, 48 o 72 ore dalla deposizione;
- 10 individui adulti, appartenenti alle linea w^{1118} , come controllo.

Quantità equivalenti degli estratti proteici di ciascun campione sono state separate elettroforeticamente mediante gel di poliacrilammide al 12%.

Il segnale relativo alla proteina codificata dal gene *dSurf1-s* (34 KDa) è rilevabile negli individui adulti delle tre linee analizzate.

In figura 12.5 è riportato il risultato ottenuto in seguito ad immunosaggio e sviluppo di una delle repliche effettuate; in questo caso, gli individui sono stati sottoposti ad heat-shock 48 ore dopo la deposizione.

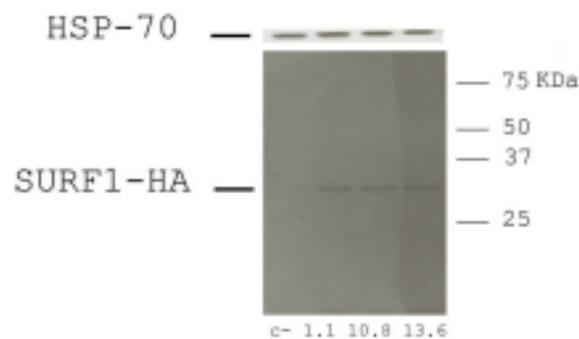


Figura 12.5: Linee 1.1, 10.8 e 13.6: Western Blot: lastra radiografica. Le frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento HSP-70 ed alla proteina dSURF1-HA. Gli estratti di proteine totali sono stati ottenuti dai seguenti campioni: 10 individui adulti appartenenti alla linea w^{1118} , utilizzata come controllo negativo (C-); 10 individui adulti 1.1 *Hsp70*-GAL4, 10.8 *Hsp70*-GAL4 e 13.6 *Hsp70*-GAL4, nei quali è stata indotta, 48 ore dopo la deposizione, l'attivazione del gene *dSurf1-s* mediante heat-shock (1 ora, 37°C).

Per poter effettuare una normalizzazione dei dati, ciascun blot è stato ibridato con anticorpo anti-HSP-70, utilizzato come standard interno.

Al fine di avere una stima semiquantitativa del livello di espressione nei diversi campioni, è stata stimata, per ciascuna banda, la densità ottica (OD), con sottrazione della densità relativa al rumore di fondo. Inoltre, per confrontare i differenti campioni ed avere una stima dei livelli di espressione della proteina dSURF1-HA, è stato calcolato il seguente rapporto:

$$DO_{\text{dSURF1-HA normalizzata}} = \frac{DO_{\text{dSURF1-HA}} - DO_{\text{rumore di fondo}}}{DO_{\text{HSP70}} - DO_{\text{rumore di fondo}}}$$

I valori di $DO_{dSURF1-HA}$ normalizzata degli individui transgenici sono stati poi rapportati ai valori di $DO_{dSURF1-HA}$ normalizzata della linea di controllo. I valori ottenuti sono stati infine espressi come percentuale.

In figura 12.6 vengono rappresentati graficamente i livelli di espressione proteica del gene *dSurf1-s* in individui 10.8 *Hsp70-GAL4*, rispetto alla linea di controllo; è riportata, per ciascun campione, la media calcolata a partire da tre estrazioni proteiche indipendenti.

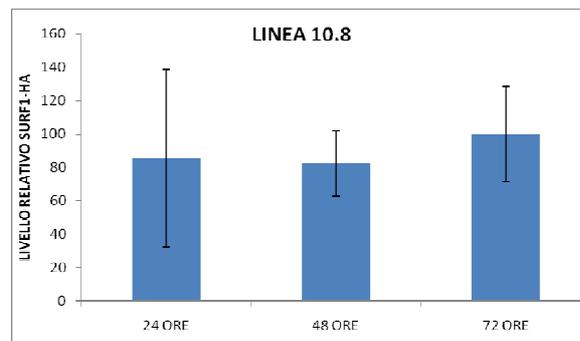


Figura 12.6: Livelli di espressione della proteina codificata dal gene *dSurf1-s*, ottenuti dalla media calcolata a partire da tre estrazioni proteiche indipendenti di 10 individui adulti 10.8 *Hsp70-GAL4* nei quali è stata indotta l'attivazione del gene *dSurf1-s* mediante heat-shock (60 minuti; 37°C), effettuato 24, 48 e 72 ore dopo la deposizione.

Espressione del gene *dSurf1* sinonimo e contemporanea attivazione dell'RNAi in individui doppi omozigoti

Considerato che, negli individui adulti 10.8 *hsp70-GAL4*, 1.1 *hsp70-GAL4* e 13.6 *hsp70-GAL4*, sottoposti ad heat shock nelle prime fasi dello sviluppo, è possibile rilevare la proteina dSURF1-HA, si è proceduto, mediante il driver *hsp70-GAL4*, all'induzione dell'espressione del gene *dSurf1-s* e della contemporanea attivazione dell'RNAi, in individui appartenenti a linee doppie omozigoti.

In particolare, sono stati allestiti esperimenti preliminari nei quali, modificando i seguenti parametri:

- stadio di sviluppo nel quale gli individui vengono sottoposti a shock termico
- durata dello shock termico
- numero di trattamenti nel corso dello sviluppo

è stata ricercata quella condizione sperimentale che comportasse:

- elevata espressione del gene *dSurf1*-sinonimo
- completa attivazione della RNAi
- minima tossicità indotta dalla proteina GAL4 e/o dalla proteina dSURF1-HA.

Le linee transgeniche utilizzate sono di seguito riportate:

- linea 79.1, omozigote per il costrutto pP[UAST] d*Surf1*-IR;
- linea 10.8, omozigote per il gene sintetico d*Surf1*-sinonimo;
- linea 10.8-79.1, omozigote per il costrutto pP[UAST] d*Surf1*-IR e per il gene sintetico d*Surf1*-sinonimo.

In particolare, è stata analizzata la progenie dei seguenti incroci:

- femmine vergini della linea transgenica 79.1, incrociate con maschi della linea *w;hsp70-GAL4/CyO*.
Attraverso l'analisi della progenie di questo incrocio, si è valutato se la condizione sperimentale utilizzata fosse in grado di indurre una RNA interference completa; in tal caso, nessun individuo interferato 79.1 *Hsp70-GAL4* raggiunge lo stadio adulto.
- Femmine vergini della linea transgenica 10.8, incrociate con maschi della linea *w;hsp70-GAL4/CyO*.
In questo caso, analizzando la progenie è possibile valutare il grado di tossicità di GAL4; dall'analisi di questa progenie non è tuttavia possibile distinguere l'eventuale tossicità derivante dalla sovraespressione di d*Surf1* sinonimo. Nel caso non ci siano effetti tossici, metà della progenie nata dovrà presentare il genotipo d*Surf1-s hsp70-GAL4*, riconoscibile per la presenza di ali non arricciate.
- Femmine vergini della linea transgenica 10.8;79.1, incrociate con maschi della linea *w;hsp70-GAL4/CyO*.
Questa progenie è stata analizzata per valutare l'esistenza di una eventuale "rescue" del fenotipo *knockdown*.

La numerosità della progenie ottenuta dai suddetti incroci è riportata in tabella 12.6.

HEAT SHOCK				CONDIZIONI HEAT SHOCK									
				ORE TRASCORSE DALLA DEPOSIZIONE									
				24	48	72	72, 120, 168	72, 120, 168, 216	72	48, 72			
				DURATA HEAT SHOCK									
				60'	60'	60'	30'	30'	30'	30'			
INCROCIO	79.1 x w;hsp70- GAL4CyO	replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	18	20	0	0	0	4	21		
				INDIVIDUI 79.1	45	39	53	51	48	32	47		
				INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	9	53	0		0	8	18		
		replica 2		INDIVIDUI 79.1	15	34	65	REPLICA NON EFFETTUA TA	22	48	81		
				INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	4	43	0		REPLICA NON EFFETTUA TA	REPLICA NON EFFETTUA TA	90		
				INDIVIDUI 79.1	8	52	50		REPLICA NON EFFETTUA TA	REPLICA NON EFFETTUA TA	82		
	replica 3	INDIVIDUI 10.8 hsp70-GAL4	10	18	13	0	0		13	45			
		INDIVIDUI 10.8	30	16	16	6	23		19	50			
		INDIVIDUI 10.8 hsp70-GAL4	14	22	4	REPLICA NON EFFETTUA TA	22		39				
	replica 2	INDIVIDUI 10.8	18	16	4		10	44					
		INDIVIDUI 10.8 hsp70-GAL4	10	14	6		REPLICA NON EFFETTUA TA						
		replica 3	INDIVIDUI 10.8	7	9			13					
	10.8;79.1 x w;hsp70- GAL4CyO		replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 10.8;79.1 hsp70-GAL4			16	21	7	0	0	19
					INDIVIDUI 10.8;79.1		28	32	56	68	57	55	56
		replica 2	INDIVIDUI 10.8;79.1 hsp70-GAL4		13	31	13	REPLICA NON EFFETTUA TA	1	13	55		
INDIVIDUI 10.8;79.1			35		54	83	40		37	56			
replica 3		INDIVIDUI 10.8;79.1 hsp70-GAL4	REPLICA NON EFFETTUA TA		53	13	REPLICA NON EFFETTUA TA		6	49			
	INDIVIDUI 10.8;79.1	42	102	REPLICA NON EFFETTUA TA	15	117							

Tabella 12.6: Esperimenti preliminari con il driver *hsp70-GAL4*, inducibile mediante shock termico. Variando le condizioni di shock termico (ore trascorse dalla deposizione in cui viene effettuato l'heat-shock; durata dell'heat-shock; numero di heat-shock), è stata ricercata quella condizione sperimentale che consentisse completa attivazione dell'*RNAi*, ridotta tossicità di *GAL4* e/o di *dSURF1-HA* ed eventuale presenza di rescue. In particolare, è stata analizzata la progenie ottenuta incrociando individui della linea *w;hsp70-GAL4/CyO* con individui appartenenti alle linee transgeniche 79.1 (omozigote per il costrutto *dSurf1-IR*), 10.8 (omozigote per il costrutto *dSurf1-s*) e 10.8;79.1 (omozigote per i costrutti *dSurf1-IR* e *dSurf1-s*). Nella progenie di ciascun incrocio, replicato 3 volte, è stato conteggiato il numero di individui che presentano attivazione del costrutto *dSurf1-IR* (individui 79.1 *hsp70-GAL4*), del costrutto *dSurf1-s* (individui 10.8 *hsp70-GAL4*) o di entrambi (individui 10.8;79.1 *hsp70-GAL4*).

Dall'analisi della progenie si sono evidenziate le tre seguenti condizioni:

- Attivazione incompleta dell'RNA interference
Si osserva sopravvivenza degli individui 79.1 *hsp70-GAL4*, causata da una attivazione incompleta dell'*RNAi*, in queste condizioni sperimentali:
 - singolo heat-shock (60 minuti) dopo 24 o 48 ore dalla deposizione;
 - singolo heat-shock (30 minuti) dopo 72 ore dalla deposizione;
 - duplice trattamento di heat-shock (30 minuti ciascuno), effettuato dopo 48 e 72 ore dalla deposizione.
- Elevata tossicità di GAL4 e/o di dSURF1-HA
Allo scopo di ottenere una attivazione completa della *RNAi*, la progenie è stata sottoposta a ripetuti heat-shock (72, 120 e 168 ore dalla deposizione; 30 minuti ciascuno) (72, 120, 168 e 216 ore dalla deposizione; 30 minuti ciascuno). In queste condizioni, l'*RNAi* è completamente attiva ma si

osserva una elevata la tossicità di GAL4 e/o di dSURF1-HA, in quanto nessun individuo 10.8 *hsp70*-GAL4 raggiunge lo stadio adulto.

- Completa attivazione dell'RNA interference e possibile rescue
Quando viene effettuato un singolo trattamento di heat-shock (60 minuti), 72 ore dopo la deposizione, si ottiene una condizione di interference completa; inoltre, in questa condizione, si osserva sopravvivenza di individui “rescued” 10.8-79.1 *hsp70*-GAL4.

L'efficacia della condizione sperimentale messa a punto (heat-shock di 60 minuti, 72 ore dopo la deposizione) è stata verificata analizzando la progenie ottenuta dagli incroci riportati in tabella 12.7.

Inoltre, è stata sottoposta ad heat-shock (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione), la progenie dei seguenti incroci:

- femmine vergini della linea transgenica 79.1, incrociate con maschi della linea *w;hsp70*-GAL4/CyO, per valutare l'attivazione dell'RNA interference;
- femmine vergini della linea transgenica 13.6, omozigote per il costrutto *dSurf1-s*, incrociate con maschi della linea *w;hsp70*-GAL4/CyO, per valutare il grado di tossicità di GAL4 e/o di dSURF1-HA;
- femmine vergini della linea transgenica 13.6;79.1 incrociate con maschi della linea *w;hsp70*-GAL4/ CyO, per valutare l'esistenza di una eventuale “rescue”.

I dati ottenuti sono riportati in tabella 12.8.

La linea 1.1;79.1 non è stata sottoposta a questo tipo di esperimenti, vista la mancata attivazione dell'RNAi osservata con il driver *Act5C*-GAL4.

HEAT-SHOCK					
ORE TRASCORSE DALLA DEPOSIZIONE: 72					
DURATA HEAT-SHOCK: 60'					
INCROCIO	79.1 x w;hsp70- GAL4/CyO	replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	0
				INDIVIDUI 79.1	269
		replica 2		INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	0
				INDIVIDUI 79.1	262
		replica 3		INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	0
				INDIVIDUI 79.1	256
	10.8 x w;hsp70- GAL4/CyO	replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 10.8 hsp70-GAL4	156
				INDIVIDUI 10.8	169
		replica 2		INDIVIDUI 10.8 hsp70-GAL4	131
				INDIVIDUI 10.8	178
		replica 3		INDIVIDUI 10.8 hsp70-GAL4	97
				INDIVIDUI 10.8	120
	10.8;79.1 x w;hsp70- GAL4/CyO	replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 10.8;79.1 hsp70-GAL4	80
				INDIVIDUI 10.8;79.1	353
		replica 2		INDIVIDUI 10.8;79.1 hsp70-GAL4	19
INDIVIDUI 10.8;79.1				105	
replica 3		INDIVIDUI 10.8;79.1 hsp70-GAL4		33	
		INDIVIDUI 10.8;79.1		556	

Tabella 12.7: Esperimenti con il driver *hsp70-GAL4*, indotto mediante shock termico (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione). Individui appartenenti alla linea *w;hsp70-GAL4/CyO* sono stati incrociati con individui appartenenti alle linee transgeniche 79.1 (omozigote per il costrutto *dSurfl-IR*), 10.8 (omozigote per il costrutto *dSurfl-s*) e 10.8;79.1 (omozigote per i costrutti *dSurfl-IR* e *dSurfl-s*). Nella progenie di ciascun incrocio, replicato 3 volte, è stato conteggiato il numero di individui che presentano attivazione del costrutto *dSurfl-IR* (individui 79.1 *hsp70-GAL4*), del costrutto *dSurfl-s* (individui 10.8 *hsp70-GAL4*) o di entrambi (individui 10.8;79.1 *hsp70-GAL4*).

HEAT-SHOCK					
ORE TRASCORSE DALLA DEPOSIZIONE: 72					
DURATA HEAT-SHOCK: 60'					
INCROCIO	79.1 x w;hsp70- GAL4/CyO	replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	0
		replica 2		INDIVIDUI 79.1	156
				INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	0
		replica 3		INDIVIDUI 79.1	262
				INDIVIDUI 79.1 hsp70-GAL4	0
				INDIVIDUI 79.1	256
	13.6 x w;hsp70- GAL4/CyO	replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 13.6 hsp70-GAL4	87
		replica 2		INDIVIDUI 13.6	142
				INDIVIDUI 13.6 hsp70-GAL4	50
		replica 3		INDIVIDUI 13.6	75
				INDIVIDUI 13.6 hsp70-GAL4	123
				INDIVIDUI 13.6	190
	13.6;79.1 x w;hsp70- GAL4/CyO	replica 1	PROGENIE	INDIVIDUI 13.6;79.1 hsp70-GAL4	11
		replica 2		INDIVIDUI 13.6;79.1	106
				INDIVIDUI 13.6;79.1 hsp70-GAL4	43
replica 3		INDIVIDUI 13.6;79.1		278	
		INDIVIDUI 13.6;79.1 hsp70-GAL4		81	
		INDIVIDUI 13.6;79.1		503	

Tabella 12.8: Esperimenti con driver *hsp70-GAL4*, indotto mediante shock termico (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione). Individui appartenenti alla linea *w;hsp70-GAL4/CyO* sono stati incrociati con individui appartenenti alle linee transgeniche 79.1 (omozigote per il costrutto *dSurf1-IR*), 13.6 (omozigote per il costrutto *dSurf1-s*) e 13.6;79.1 (omozigote per i costrutti *dSurf1-IR* e *dSurf1-s*). Nella progenie di ciascun incrocio, replicato 3 volte, è stato conteggiato il numero di individui che presentano attivazione del costrutto *dSurf1-IR* (individui 79.1 *hsp70-GAL4*), del costrutto *dSurf1-s* (individui 13.6 *hsp70-GAL4*) o di entrambi (individui 13.6;79.1 *hsp70-GAL4*).

A partire dalla progenie ottenuta, è stata calcolata, per ciascun campione considerato, la sopravvivenza percentuale, espressa come media calcolata a partire da tre repliche indipendenti.

I valori ottenuti sono riportati in tabella 12.9.

La percentuale media di sopravvivenza degli individui 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* è stata corretta in base alla tossicità indotta da GAL4 e/o da *dSURF1-HA*, registrata, rispettivamente, negli individui 10.8 *hsp70-GAL4* e 13.6 *hsp70-GAL4*.

Sulla base di tali valori, si può affermare che, inducendo uno shock termico (60 minuti), 72 ore dopo la deposizione, si ottiene:

- una completa attivazione dell'RNAi (sopravvivenza degli individui 79.1 *hsp70-GAL4* pari allo 0 %);
- una parziale tossicità di GAL4 e/o di *dSURF1-HA*, riscontrabile sia negli individui 10.8 *hsp70-GAL4* (sopravvivenza media: 81,65 %) che negli individui 13.6 *hsp70-GAL4* (sopravvivenza media: 64,22 %);

- una rescue, anche se parziale, nelle linee doppie omozigoti che mostrano una sopravvivenza pari a 21,16 %, negli individui 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e a 18,99 %, negli individui 13.6;79.1 *hsp70-GAL4*.

INCROCIO	INDIVIDUI	% DI SOPRAVVIVENZA MEDIA
<i>w;hsp70-GAL4/CyO</i> x 79.1 <i>dSurf1-IR</i>	79.1 <i>hsp70-GAL4</i>	0 %
<i>w;hsp70-GAL4/CyO</i> x 10.8 <i>dSurf1-sinonimo</i>	10.8 <i>hsp70-GAL4</i>	81,65 % DS= +/- 8,49
<i>w;hsp70-GAL4/CyO</i> x 13.6 <i>dSurf1-sinonimo</i>	13.6 <i>hsp70-GAL4</i>	64,22 % DS= +/- 3,14
<i>w;hsp70-GAL4/CyO</i> x 10.8;79.1 <i>dSurf1-sinonimo; dSurf1-IR</i>	10.8;79.1 <i>hsp70-GAL4</i>	21,16 % (17,88%) DS= +/- 4,89
<i>w;hsp70-GAL4/CyO</i> x 10.8;79.1 <i>dSurf1-sinonimo ;dSurf1-IR</i>	13.6;79.1 <i>hsp70-GAL4</i>	18,99 % (13,98%) DS= +/- 2,73

Tabella 12.9: Sopravvivenza percentuale media. Sono riportati i valori di sopravvivenza espressi come percentuale rispetto all'atteso e calcolati sulla meda (+/- Deviazione Standard, DS) di tre repliche indipendenti. I valori relativi agli individui 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* sono stati corretti sulla base della letalità causata da GAL4 e/o da dSURF1-HA osservata negli individui 10.8 *hsp70-GAL4* e 13.6 *hsp70-GAL4*, rispettivamente. I valori di sopravvivenza non corretti sono riportati tra parentesi.

CARATTERIZZAZIONE DEGLI INDIVIDUI "RESCUED"

Analisi di western blot

Per verificare la presenza della proteina dSURF1-HA negli individui "rescued" 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4*, sono state effettuate estrazioni indipendenti di proteine totali, partendo dai seguenti campioni:

- 10 individui adulti 10.8;79.1 *hsp70-GAL4*, sottoposti ad heat-shock (60 minuti) 24, 48 o 72 ore dalla deposizione;
- 10 individui adulti 13.6;79.1 *hsp70-GAL4*, sottoposti ad heat-shock (60 minuti), 72 ore dopo la deposizione;
- 10 individui adulti, appartenenti alle linea *w¹¹¹⁸*, come controllo.

Il segnale relativo alla proteina codificata dal gene *dSurf1-s* (34 KDa) è rilevabile negli individui 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4*.

In figura 12.7, viene riportato il risultato ottenuto in seguito ad immunosaggio e sviluppo di una delle repliche effettuate.

Per poter normalizzare i dati, ciascun blot è stato ibridato con anticorpo anti-HSP-70, utilizzato come standard interno.

Al fine di avere una stima semiquantitativa del livello di espressione della proteina dSURF1-HA, è stata stimata, per ciascuna banda, la densità ottica (OD). Il livello di espressione della proteina dSURF1-HA è stato calcolato mediante il seguente rapporto:

$$DO_{dSURF1-HA} = DO_{dSURF1-HA} / DO_{Hsp70}$$

I valori di $DO_{dSURF1-HA}$ delle linee transgeniche sono stati riportati a quelli della linea di controllo ed espressi come percentuale.

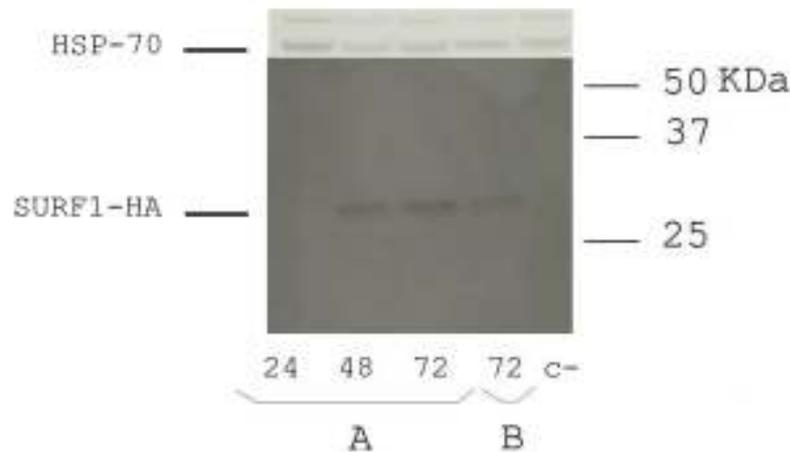


Figura 12.7: Western Blot: lastra radiografica. Le frecce indicano il segnale relativo alla proteina di riferimento HSP-70 ed alla proteina dSURF1-HA. Gli estratti di proteine totali sono stati ottenuti dai seguenti campioni: 10 individui adulti 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 (A) sottoposti ad heat-shock nelle prime fasi dello sviluppo, 24 (corsia 1), 48 (corsia 2) o 72 (corsia 3) ore dopo la deposizione; 10 individui adulti 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4 (B), sottoposti ad heat-shock 72 ore dopo la deposizione; 10 individui adulti appartenenti alla linea w^{1118} , utilizzata come controllo negativo (C-).

In figura 12.8 vengono rappresentati graficamente i livelli di espressione proteica del gene *dSurf1-s* in individui 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4, rispetto alla linea di controllo; per ciascun campione, è riportato il valore medio, calcolato a partire da tre estrazioni proteiche indipendenti.

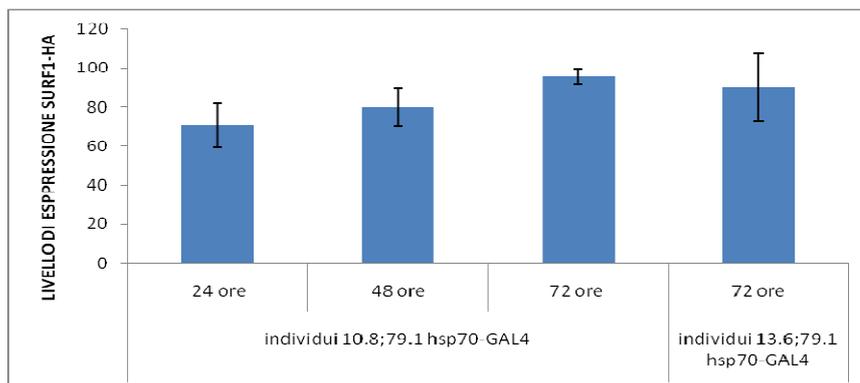


Figura 12.8: Livelli di espressione della proteina dSURF1-HA, ottenuti dalla media calcolata a partire da tre estrazioni proteiche indipendenti dei seguenti campioni: 10 individui adulti 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 sottoposti ad heat-shock nelle prime fasi dello sviluppo 24, 48 o 72 ore dopo la deposizione; 10 individui adulti 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4 sottoposti ad heat-shock 72 ore dopo la deposizione.

L'analisi statistica non rivela differenze significative tra i campioni analizzati; tuttavia, il livello di espressione della proteina dSURF1-HA risulta significativamente differente tra gli individui 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4, sottoposti ad heat-shock 24 e 72 ore dopo la deposizione (TEST ANOVA $p=0.021$).

Test ottico-motorio

Le risposte ottico-motorie di individui “*rescued*” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70*, sono state valutate rispetto ai seguenti controlli:

- individui adulti ottenuti dall'incrocio tra individui delle linee doppie omozigoti (10.8;79.1 e 13.6;79.1) ed individui della linea w^{1118} .
- individui adulti appartenenti alla linea w ; *hsp70*-GAL4/CyO.
- individui adulti appartenenti alla linea selvatica WT-ALA.

Gli individui utilizzati come controllo sono stati testati sia in assenza che in presenza di shock termico (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione).

Per ogni campione, sono stati analizzati 10 individui, sia maschi che femmine; ciascun individuo è stato valutato 10 volte di seguito, cambiando in maniera casuale, ad ogni prova, la direzione della rotazione dell'apparato per la determinazione della risposta optomotoria (vedi “materiali e metodi”, capitolo 11).

Nelle figure 12.9 e 12.10 viene riportata, per ciascun gruppo di individui testati, la percentuale di risposte corrette ottenute.

L'analisi statistica (Test t) evidenzia che gli individui “*rescued*” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4, presentano un numero di risposte corrette che non si discosta significativamente dai controlli non sottoposti ad heat-shock.

La percentuale di risposte corrette si attesta al valore atteso (80-90 %) solo nei controlli in cui non sia stato effettuato heat-shock, suggerendo, quindi, che tale trattamento può ridurre le capacità di risposta ottico-motoria di *D. melanogaster*.

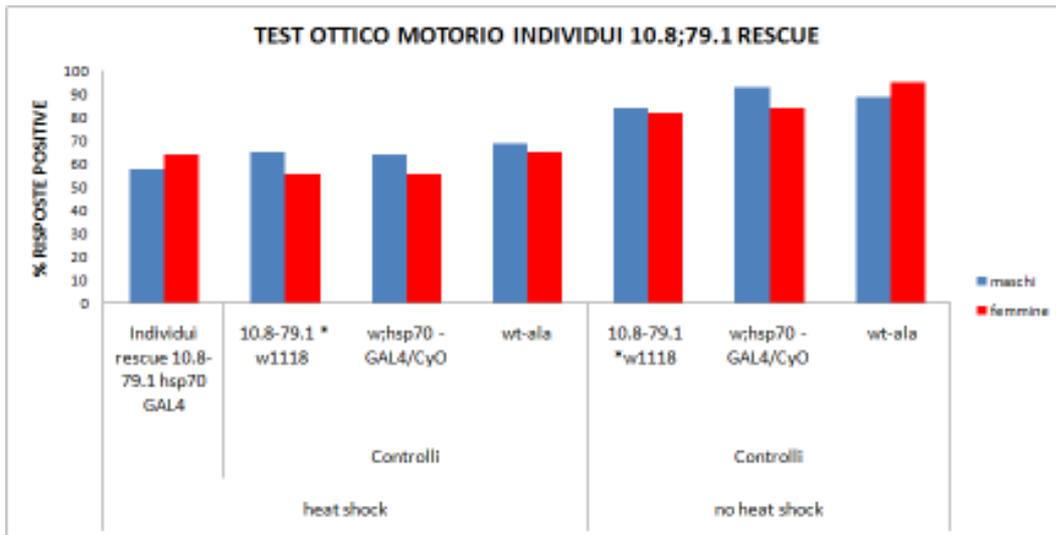


Figura 12.9: Test ottico-motorio condotto su individui rescue 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4. I campioni utilizzati come controllo sono costituiti dai seguenti individui, sottoposti e non sottoposti a shock termico: adulti ottenuti dall'incrocio tra individui appartenenti alla linea w^{1118} ed individui appartenenti alla linea 10.8;79.1 (10.8;79.1 x w^{1118}); individui della linea *w*; *hsp70*-GAL4/CyO; individui della linea WT-ALA. Per ciascun campione, sono stati testati 10 maschi e 10 femmine. Nel grafico è rappresentata la percentuale di risposte corrette ottenute per ciascun campione.

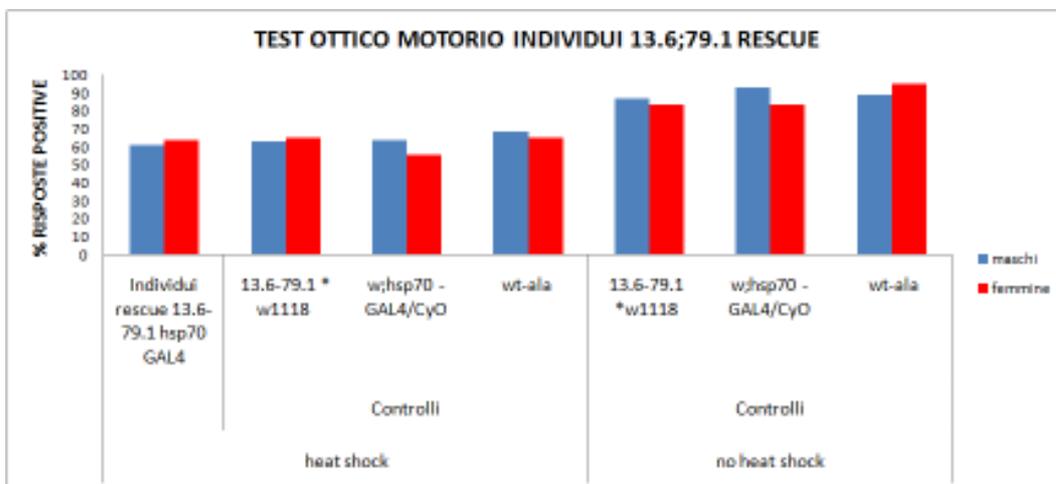


Figura 12.10: Test ottico-motorio condotto su individui rescue 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4. I campioni utilizzati come controllo sono costituiti dai seguenti individui, sottoposti e non sottoposti a shock termico: adulti ottenuti dall'incrocio tra individui appartenenti alla linea w^{1118} ed individui appartenenti alla linea 13.6;79.1 (13.6;79.1 x w^{1118}); individui della linea *w*; *hsp70*-GAL4/CyO; individui della linea WT-ALA. Per ciascun campione, sono stati testati 10 maschi e 10 femmine. Nel grafico è rappresentata la percentuale di risposte corrette ottenute per ciascun campione.

Velocità di locomozione larvale

La velocità di locomozione larvale (larve II stadio) di individui “rescued” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4, è stata valutata rispetto ai seguenti controlli:

- larve II stadio ottenute dall’incrocio tra individui appartenenti alle linee doppie omozigoti (10.8;79.1 e 13.6;79.1) ed individui appartenenti alla linea w^{1118} ;
- larve II stadio appartenenti alla linea w ; *hsp70*-GAL4/CyO;
- larve II stadio appartenenti alla linea selvatica WT-ALA;
- larve II stadio appartenenti alla linea selvatica OREGON R.

Gli individui utilizzati come controllo sono stati testati sia in assenza che in presenza di shock termico (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione).

Inoltre, è stata valutata la velocità di locomozione larvale di individui interferati 79.1 *Act5C*-GAL4.

Per ciascun campione, costituito da 5 larve, è riportato il valore di velocità mediato su tre misure (+/- Deviazione Standard), come rappresentato in figura 12.11.

L’analisi statistica indica che gli individui “rescue” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4 mostrano una velocità di locomozione significativamente differente rispetto a quella delle larve interferate 79.1 *Act5C*-GAL4 (Test t: 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 vs. 79.1 *Act5C*-GAL4: P=0.0000081) (Test t: 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4 vs. 79.1 *Act5C*-GAL4: P=0.000051).

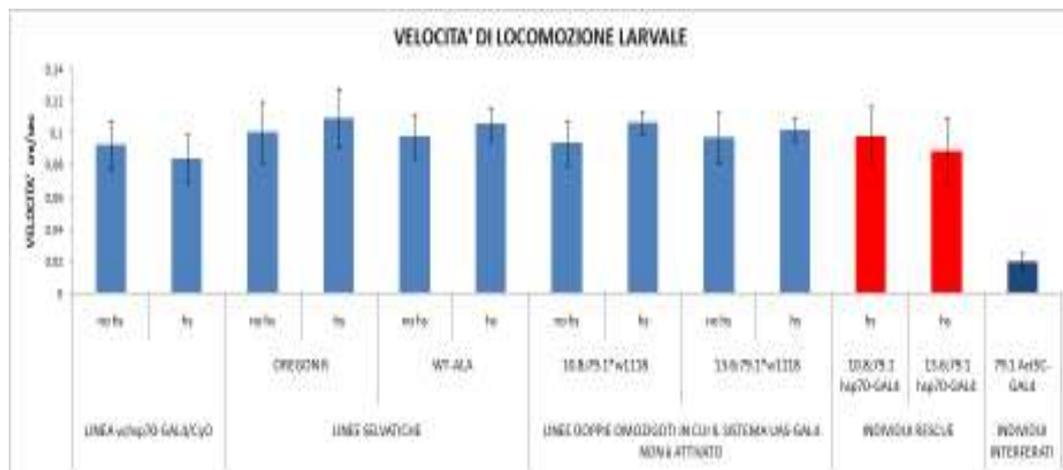


Figura 12.11: Rappresentazione grafica dei valori medi di velocità di locomozione larvale relativa ad individui “rescue” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4 (istogrammi rossi). I controlli (istogrammi blu) sono costituiti dai seguenti campioni, sottoposti e non sottoposti a shock termico (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione): individui della linea *hsp70*-GAL4; individui delle linee selvatiche Oregon R e WT-ALA; larve ottenute dall’incrocio tra individui appartenenti alle linee doppie omozigoti (10.8;79.1 e 13.6;79.1) ed individui appartenenti alla linea w^{1118} (10.8;79.1 X w^{1118} e 13.6;79.1 X w^{1118}). Inoltre, sono state testate larve interferate 79.1 *Act5C*-GAL4 (istogramma blu scuro).

Checker test

La risposta fotocomportamentale di individui “*rescued*” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70*, è stata valutata rispetto ai seguenti controlli:

- larve ottenute dall’incrocio tra individui appartenenti alle linee doppie omozigoti 10.8;79.1 e 13.6;79.1 ed individui appartenenti alla linea w^{1118} .
- larve *hsp70*-GAL4, appartenenti alla linea w ; *hsp70*-GAL4/CyO.
- larve appartenenti alla linea selvatica WT-ALA.
- larve appartenenti alla linea selvatica OREGON R.

Gli individui utilizzati come controllo sono stati testati sia in assenza che in presenza di shock termico (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione).

Inoltre, è stata valutata la risposta fotocomportamentale di individui interferati 79.1 *Act5C*-GAL4.

Per ciascun campione sono state testate 10 larve. In figura 12.12, sono riportati, per ogni genotipo, i valori di R.I. on (indice di risposta con la luce accesa) mediato su tre misure indipendenti (+/- Deviazione Standard).

Gli individui “*rescued*” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70* mostrano un recupero della risposta fotocomportamentale che è invece profondamente alterata nelle larve interferate 79.1 *Act5C*-GAL4 (Test t: 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 vs. 79.1 *Act5C*-GAL4: P=0.0000004) (Test t: 13.6;79.1 *hsp70*-GAL4 vs. 79.1 *Act5C*-GAL4: P=0.000005).

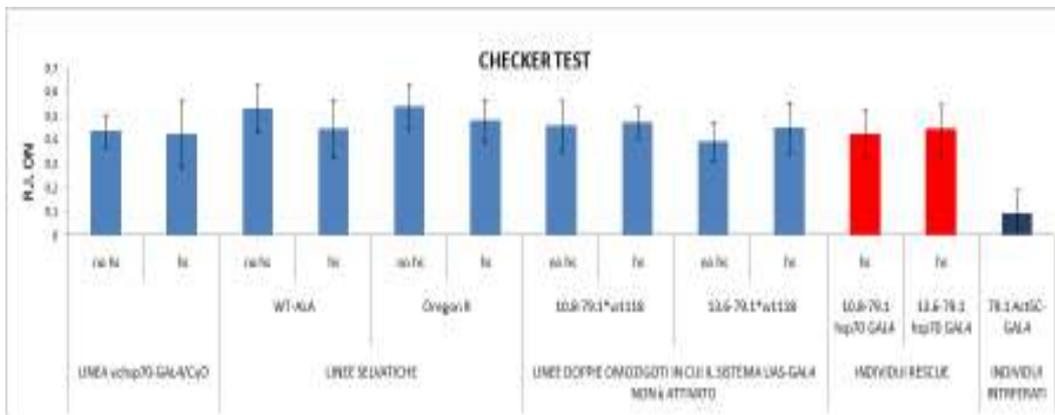


Figura 12.12: Rappresentazione grafica dei valori medi di R.I. on di individui “*rescue*” 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70* GAL4 (istogrammi rossi). I controlli (istogrammi blu) sono costituiti dai seguenti campioni, sottoposti e non sottoposti a shock termico (60 minuti, 72 ore dopo la deposizione): individui della linea *hsp70*-GAL4; individui delle linee selvatiche Oregon R e WT-ALA; larve ottenute dall’incrocio tra individui appartenenti alle linee doppie omozigoti (10.8;79.1 e 13.6;79.1) ed individui appartenenti alla linea w^{1118} (10.8;79.1 X w^{1118} e 13.6;79.1 X w^{1118}). Inoltre, sono state testate larve interferate 79.1 *Act5C*-GAL4 (istogramma blu scuro).

Elettroretinogrammi

L'analisi qualitativa degli elettroretinogrammi ottenuti da individui adulti "rescued" 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70* GAL4, rivela un recupero dei transienti "ON" ed "OFF" che risultano completamente assenti negli individui adulti interferati 79.1 *elav*-GAL4 (figura 12.13) (Zordan *et al.*, 2006).

A titolo esemplificativo, viene riportata in figura 12.14 una risposta ERG di tipo wild-type.

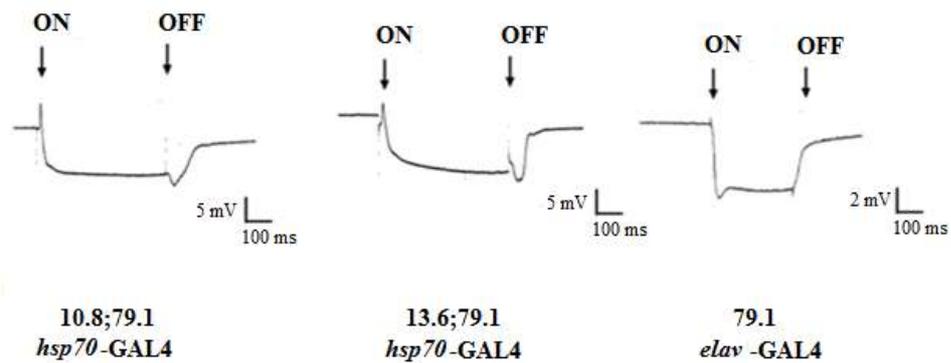


Figura 12.13: Esempi di elettroretinogrammi ottenuti in individui adulti "rescued" 10.8;79.1 *hsp70*-GAL4 e 13.6;79.1 *hsp70* GAL4. Negli individui adulti interferati 79.1 *elav*-GAL4 i transienti ON ed OFF sono completamente assenti.

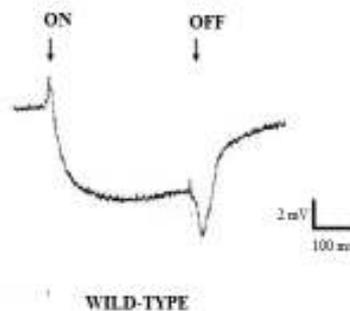


Figura 12.14: Esempio di una risposta ERG di tipo wild-type. Sono visibili i transienti ON ed OFF, registrati all'inizio ed alla fine dello stimolo luminoso.

CAPITOLO 13

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

dEthe1

Nello studio delle malattie mitocondriali umane, risulta prioritaria la definizione e la caratterizzazione di modelli animali nei quali sia possibile riprodurre *in vivo* i complessi meccanismi genetici, biochimici e fisiologici implicati nell'insorgenza di tali patologie.

Un importante contributo viene dato, in questo senso, dall'organismo modello *Drosophila melanogaster*, nel quale è possibile ritrovare numerosi geni ortologhi a geni malattia umani, oltre ad un apparato mitocondriale altamente conservato, con i relativi complessi enzimatici coinvolti nella fosforilazione ossidativa, (Sánchez-Martinez *et al.*, 2006).

Il presente lavoro di tesi, inserendosi in questo ambito di ricerca, nasce dalla necessità di definire un modello di *D. melanogaster* per lo studio della Encefalopatia Etilmalonica, rara malattia mitocondriale causata da mutazioni nel gene umano *Ethe1*. Il gene *Ethe1* codifica per una tioesterasi mitocondriale la cui funzione non è ancora nota.

D. melanogaster possiede un singolo omologo del gene *Ethe1*, il gene CG30022 (*dEthe1*), che si estende per 1462 paia di basi e si localizza all'interno di una sequenza intronica del gene *sprt*. Inoltre, la proteina ETHE1 in *Drosophila* mostra un elevato grado di conservazione rispetto all'omologa proteina umana, con la quale condivide il dominio beta-lattamico, tipico della superfamiglia delle metallo β -lattamasi, e la sequenza segnale di localizzazione mitocondriale.

Allo scopo di ottenere un modello di *D. melanogaster* nel quale l'espressione del gene *dEthe1* risulti compromessa, sono stati adottati molteplici approcci, con il ricorso alle principali tecniche di genetica inversa attualmente disponibili.

Mediante la tecnica denominata "double-stranded RNA interference" (dsRNAi), è possibile indurre un abbattimento post-trascrizionale di uno specifico gene di interesse. L'applicazione dell'RNAi in combinazione con il sistema UAS-GAL4, rende l'inibizione finemente modulabile ed inducibile in qualsiasi momento durante il ciclo vitale. Inoltre, mediante l'utilizzo di promotori tessuto-specifici, è possibile circoscrivere l'inibizione del gene ad una particolare regione corporea o ad una determinata fase del ciclo vitale (Duffy, 2002).

La tecnica dell'RNAi, dunque, è un ottimo strumento nello studio degli effetti del silenziamento genico. Per verificare quali siano le conseguenze dell'inibizione dell'espressione del gene *dEthe1* in *D. melanogaster*, sono state prodotte delle linee transgeniche nelle quali è possibile indurre un silenziamento post-trascrizionale del gene di interesse. La strategia adottata prevede l'impiego di vettori di trasformazione del "sistema GAL4", sviluppato da A. Brand (Brand & Perrimon, 1993). Tale sistema si basa sulla possibilità di generare linee di *Drosophila* transgeniche per il gene codificante GAL4, potente attivatore trascrizionale di lievito che non presenta un gene corrispettivo in *Drosophila*. Agendo come fattore di trascrizione, GAL4 si lega ad una sequenza "enhancer" detta UAS, determinando l'espressione di un qualsiasi gene situato a valle di quest'ultima.

Per indurre silenziamento post-trascrizionale del gene *dEthel* via *double-stranded RNA interference*, sono stati allestiti due differenti costrutti, entrambi contenenti una porzione della sequenza codificante il gene di interesse, clonata in modo da ottenere due ripetizioni invertite e separate da uno spaziatore.

La presenza di tale spaziatore facilita la formazione, in seguito alla trascrizione del gene, di una struttura a forcina nel dsRNA, in grado di attivare il “macchinario” dell’RNA interference (Piccin *et al.*, 2001).

I due costrutti sono stati allestiti a partire da differenti cloni di cDNA che potrebbero rappresentare isoforme alternative del gene *dEthel*.

In particolare, la forma priva dell’introne I è stata utilizzata sulla base della strategia consolidata, in uso presso il nostro laboratorio, che prevede, nella costruzione di costrutti per l’RNAi, l’utilizzo di sequenze di cDNA prive dell’introne (Piccin *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda la forma in cui l’introne I è ritenuto, si è fatto riferimento al lavoro di Kalidas e Smith (2002), nel quale viene dimostrata l’elevata efficienza, in *D. melanogaster*, dei costrutti per l’RNAi contenenti sequenze introniche.

Benché manchi uno studio sistematico volto a confrontare l’efficienza di uno stesso costrutto nel quale siano o meno ritenute sequenze introniche, si ipotizza che l’inclusione, in costrutti per l’RNAi, di molecole di cDNA ottenute a partire da trascritti contenenti introni, determini un processamento del dsRNA altamente efficiente, con la conseguente produzione di una elevata concentrazione citoplasmatica di siRNA (Kalidas & Smith, 2002). Tale ipotesi trova una ulteriore conferma nelle piante in cui si è osservato che la presenza, nel costrutto per l’RNAi, di un introne, tra due ripetizioni invertite, è in grado di potenziare il fenomeno della soppressione (Smith *et al.*, 2000).

Gli effetti di un silenziamento precoce ed ubiquitario del gene *dEthel* sono stati valutati nella progenie ottenuta dall’incrocio di individui transgenici per il costrutto contenente l’introne (UAS-*dEthel*+*introne*-IR), appartenenti alle linee 46.1, 56.1 ed 85.2, con individui appartenenti alla linea *yw; Act5C-GAL4/TM6B*. Allo scopo di ricercare, negli individui interferati, alterazioni fenotipiche correlabili ai gravi sintomi che caratterizzano l’Encefalopatia Etilmalonica nell’uomo, sono state analizzate le percentuali di sopravvivenza nello sviluppo uovo-adulto e la sopravvivenza degli individui adulti.

La sopravvivenza nello sviluppo uovo-adulto è stata valutata anche negli individui interferati UAS-*dEthel*-IR *Act5C-GAL4*, ottenuti incrociando individui transgenici per il costrutto privo dell’introne (UAS-*dEthel*-IR), appartenenti alle linee 1, 2 e 3, con individui appartenenti alla linea *yw; Act5C-GAL4/TM6B*.

Inoltre, considerati i danni al sistema neuromuscolare che possono derivare da una alterazione del metabolismo energetico mitocondriale, sono stati condotti, nelle larve interferate UAS-*dEthel*+*introne*-IR *Act5C-GAL4* (linee 46.1, 56.1 ed 85.2), specifici test motori che consentono di valutare l’efficienza (test di velocità locomotoria), il ritmo (analisi delle contrazioni peristaltiche) e la coordinazione (test “roll-over”) della contrazione muscolare.

In tutte le analisi effettuate, gli individui interferati UAS-*dEthel*+*introne*-IR *Act5C-GAL4* e UAS-*dEthel*-IR *Act5C-GAL4* non presentano differenze rilevanti rispetto agli individui utilizzati come controllo.

Mediante analisi di Real-Time PCR è stata rilevata, negli individui interferati UAS-*dEthel*+*introne*-IR *Act5C-GAL4* (linee 46.1, 56.1 ed 85.2), una riduzione dell’espressione trascrizionale del gene *dEthel* del 40%, rispetto al ceppo

selvatico; inoltre, nei maschi interferati della linea 56.1. è stato rilevato un abbattimento post-trascrizionale del gene *dEthe* del 18%, rispetto al controllo.

Sulla base di questi dati, si può ipotizzare che la sostanziale mancanza di effetti fenotipici indotti dall'abbattimento post-trascrizionale via dsRNAi del gene *dEthe1* potrebbe derivare da un insufficiente abbattimento del messaggero, condizione paragonabile a quanto si verifica negli individui eterozigoti per alleli deleteri in omozigosi, peraltro totalmente asintomatica anche nell'uomo (Tiranti *et al.*, 2006).

In accordo con il quadro fenotipico osservato, gli esperimenti di western blot evidenziano un livello di espressione della proteina dETHE1 negli individui interferati UAS-*dEthe1*+*introne*-IR *Act5C*-GAL4 e UAS-*dEthe1*-IR *Act5C*-GAL4 comparabile con quello rilevato negli individui di controllo.

Attingendo alle banche dati disponibili in rete (<http://www.flybase.org>), è possibile selezionare linee di *Drosophila melanogaster* che presentino elementi trasponibili in uno specifico gene di interesse; si stima che, attualmente, circa due terzi dei geni di *D. melanogaster* contenga un elemento trasponibile (Venken & Bellen, 2005).

In questo modo, sono state selezionate le linee 0017965 e 104009 che presentano, rispettivamente, un elemento *PiggyBac* nella regione regolatrice del gene *dEthe1*, ed un elemento P nell'esone I del gene *dEthe1*.

Considerata la localizzazione di tali elementi trasponibili, sono stati valutati eventuali effetti sull'espressione del gene *dEthe1* a livello sia trascrizionale (linea 0017965) che traduzionale (linee 104009 e 0017965).

L'analisi di Real-Time PCR evidenzia che l'elemento *PiggyBac*, presente negli individui della linea 0017965, determina un decremento del livello di trascrizione del gene *dEthe* del 40%, negli individui eterozigoti, e del 60%, negli individui omozigoti, rispetto al campione di controllo.

Pertanto, negli individui della linea 0017965, la quantità relativa di mRNA del gene *dEthe1* risulta sostanzialmente paragonabile a quella osservata negli individui transgenici interferati, ottenuti mediante *knock-down* via dsRNA interference.

Le analisi di western blot indicano una parziale diminuzione del livello di proteina dETHE1 negli individui appartenenti alla linea 0017965, rispetto ai wild-type, compatibile con un possibile effetto sull'espressione genica derivante dall'inserzione del *PiggyBac* nella regione 5'UTR del gene *dEthe1*.

Poiché la condizione di eterozigosi è asintomatica e tenuto conto che la presenza di un elemento trasponibile nel gene *dEthe1* determina un abbattimento massimo della proteina dETHE1 del 25% (nei maschi omozigoti per l'inserzione), non si è proceduto nella caratterizzazione fenotipica degli individui appartenenti alla linea 0017965.

Negli individui della linea 104009, il livello di espressione della proteina dETHE1 è comparabile a quello rilevato negli individui "wild-type". Sulla base di questo dato, compatibile con la localizzazione dell'elemento P in una regione esonica non tradotta del gene *dEthe1*, gli individui della linea 104009 non sono stati sottoposti ad ulteriori indagini.

Alla luce dei risultati ottenuti, si è ritenuto opportuno valutare gli effetti di un abbattimento completo dell'espressione del gene *dEthel*.

Tra le diverse strategie disponibili per ottenere knockout in *Drosophila melanogaster*, basate sull'utilizzo sia di elementi P (Gloor *et al.*, 1991) che di RNA catalitici (Zhao & Pick, 1993), il sistema di *gene targeting* rappresenta il metodo che, ad oggi, risulta maggiormente efficace ed applicabile a geni target differenti.

Tale strategia, messa a punto da Rong e Golic (2000) ed utilizzata con successo per ottenere knockout di almeno 15 geni di *Drosophila melanogaster*, si basa sui sistemi endogeni di ricombinazione omologa; in particolare, grazie all'azione concertata dell'enzima FLIPPASI e della endonucleasi sito-specifica I-SceI, viene generata *in vivo* una molecola ricombinogena in grado di integrarsi nel locus target mediante ricombinazione omologa.

Nel presente lavoro di tesi, si è adottato il sistema denominato “*two-step ends-in targeting*” che consente di ottenere, mediante due eventi di ricombinazione omologa indotti in due “step” successivi, il knockout di uno specifico gene di interesse (Xie e Golic, 2004).

Questo metodo è stato adottato in quanto è applicabile a geni di piccole dimensioni, come il gene *dEthel*. Inoltre, l’“*ends-in targeting*” consente una delezione precisa del locus target, condizione essenziale vista la localizzazione del gene *dEthel* nella sequenza intronica del gene *sprt*.

In accordo con quanto descritto da Xie e Golic (2004), è stato allestito un costrutto donatore contenente siti di riconoscimento per gli enzimi Flippasi ed I-SceI, il gene marker (w^{hs}), necessario per individuare gli eventi di targeting e regioni di DNA localizzate a monte (C: 7.2 Kb) e a valle (A: 4.2 Kb) del gene *dEthel*.

La ricombinogenicità della molecola donatrice è data dalla presenza del taglio a doppio filamento prodotto da I-SceI. Poiché tale strategia prevede, nel primo passaggio, l'induzione di ricombinazione omologa a livello della regione A, il sito di riconoscimento per I-SceI è stato introdotto all'interno di tale regione.

In particolare, il primo passaggio comporta la formazione di un locus target in cui si verifica una sorta di duplicazione delle regioni A e C, con il gene marker w^{hs} fiancheggiato, a monte, dalle regioni A e C e, a valle, dall'allele selvatico.

Il secondo passaggio prevede l'induzione di un secondo evento di ricombinazione omologa. In questo caso, viene generato, nella molecola donatrice, un taglio a doppio filamento in seguito alla espressione dell'enzima I-CreI, il cui sito di riconoscimento è localizzato a monte del gene marker w^{hs} .

Nel caso in cui la ricombinazione avvenga a livello della regione C, il gene target viene deletato.

Gli eventi di targeting sono estremamente rari e, in media, si verificano, nelle linee germinali femminili, con una frequenza pari ad un evento ogni 500-30.000 gameti (Rong *et al.*, 2002). Perciò, è necessario effettuare, dopo l'induzione della ricombinazione omologa in ciascuno degli step, degli *screening* su larga scala allo scopo di identificare gli individui portatori di potenziali eventi di targeting.

Questi individui, devono essere in seguito sottoposti ad una analisi molecolare per verificare che, nel gene target, sia avvenuta la modificazione genica attesa; infatti, esistono almeno quattro differenti classi di eventi di targeting in grado di determinare una differente organizzazione molecolare del locus target (Rong & Golic, 2000).

Nel presente lavoro, è stato condotto lo screening relativo allo step 1, a partire da individui omozigoti per il costrutto ricombinogeno pTV2(A+C) appartenenti alle linee transgeniche 6, 44.1 e 62.1.

Nello screening della linea 6, è stato selezionato un individuo che rappresentava un potenziale evento di targeting; tuttavia, non è stato possibile sottoporre questo individuo ad ulteriori indagini a causa della sua sterilità.

La frequenza di targeting osservata per il costrutto pTV2(A+C) (1 evento di targeting per 10000 gameti screenati) è in accordo con quanto riportato in letteratura. Allo scopo di individuare altri potenziali eventi di targeting è essenziale incrementare il numero dei gameti screenati; inoltre, poiché l'efficienza del targeting può dipendere dalla posizione del costrutto donatore, sarebbe utile effettuare lo *screening* a partire da individui omozigoti per il costrutto ricombinogeno pTV2(A+C) appartenenti anche alle altre linee transgeniche disponibili.

In parallelo, si sono ricercate possibili mutazioni deleterie nel gene *dEthel* mediante la tecnica del *Tilling*.

Il *Tilling* è una tecnica di genetica inversa che consiste in una tradizionale mutagenesi chimica seguita da uno *screening* su larga scala per l'individuazione di mutazioni in una regione di interesse (Till *et al.*, 2003).

Mediante tale strategia, sono state selezionate sette linee mutanti di *Drosophila melanogaster* portatrici di mutazioni a localizzazione esonica, di tipo missense o frameshift, che potrebbero causare effetti deleteri sulla funzionalità della proteina dETHE1.

In figura 13.1, è riportata la localizzazione di tali mutazioni nella struttura primaria della proteina dETHE1; inoltre, vi sono indicate le mutazioni nel gene *Ethel* di tipo missense e frameshift descritte in pazienti affetti da Encefalopatia Etilmalonica (Tiranti *et al.*, 2006).

Per poter valutare le possibili implicazioni funzionali di una mutazione, è necessario disporre di un adeguato modello di struttura tridimensionale della proteina in questione.

Nel lavoro di Tiranti *et al.* (2006), è stata analizzata, sulla base del modello di struttura tridimensionale prevista per la proteina umana ETHE1, la localizzazione spaziale dei cambiamenti aminoacidici prodotti da specifiche mutazioni missense responsabili dell'insorgenza della Encefalopatia Etilmalonica.

In questo modo, è stato possibile distinguere tra mutazioni di natura "strutturale" e "catalitica" che causano, rispettivamente, una alterazione dell'attività catalitica o dell'integrità strutturale della proteina ETHE1.

Ad esempio, le mutazioni umane R163Q e R163W, responsabili dell'insorgenza della Encefalopatia Etilmalonica, possono essere considerate mutazioni di natura "catalitica". A sostegno di questa ipotesi, la proteina ETHE1 non funzionale è comunque presente negli estratti proteici di linee cellulari derivanti da pazienti portatori di tali mutazioni. Il residuo R163, che si localizza vicino al sito di legame per gli ioni zinco, potrebbe essere importante per il mantenimento dell'attività catalitica della proteina ETHE1.

Gli effetti di tipo strutturale della mutazione D67N potrebbero essere confermati mediante analisi di western blot, a partire da estratti proteici di individui appartenenti alla linea 2952. Nel caso si trattasse di una mutazione in grado di alterare la stabilità proteica, la proteina dETHE1 dovrebbe essere assente o rilevabile in quantità ridotte.

La mutazione P157S (linea 2788) si localizza in prossimità del sito attivo della proteina dETHE1 alterandone, presumibilmente, l'attività catalitica. In particolare, la sostituzione della Prolina con un aminoacido polare, potrebbe modificare l'affinità per il substrato, se pur indirettamente, in quanto la mutazione non coinvolge residui specifici per il legame. La mutazione P157S potrebbe avere implicazioni anche di tipo "strutturali" in quanto la sostituzione aminoacidica che ne deriva comporta repulsioni elettrostatiche con i residui vicini.

Le mutazioni a livello della regione C-terminale, come le mutazioni missense P237S (linea 0242), G262S (linea 0493) e le mutazioni frameshift a carico dei residui D264 (linea 3976) e K275 (linea 2770), potrebbero modificare l'attività catalitica della proteina dETHE1. Infatti, il corretto posizionamento della regione C-terminale rispetto al resto della proteina è importante per mantenere l'accessibilità al sito attivo.

In tutte le linee ottenute mediante *Tilling*, si rileva una deplezione nello sviluppo uovo-adulto, rispetto agli individui di controllo. Inoltre, nelle linee 2770, 0242, 2952 e 0493 gli individui omozigoti per il gene *dEthel* mutato non sono vitali.

La valutazione fenotipica delle linee ottenute mediante *Tilling* risulta complessa poichè il cromosoma II mutagenizzato è, presumibilmente, portatore di ulteriori mutazioni, rispetto a quelle rilevate nel gene *dEthel*.

Quindi, prima di affermare l'esistenza di una relazione tra le mutazioni presenti nel gene *dEthel* ed eventuali alterazioni fenotipiche delle corrispondenti linee mutanti, è prioritario appurare che la mutazione deleteria sia effettivamente localizzata nel gene target e non in altre regioni del cromosoma II mutagenizzato.

Gli individui delle linee 2770, 0242, 2952 e 0493, nelle quali il cromosoma mutagenizzato causa, in omozigosi, letalità, sono stati inizialmente sottoposti ad incroci reciproci per verificare la possibile complementazione tra le diverse mutazioni.

L'analisi della progenie di tali incroci indica che tutte le mutazioni in esame complementano tra loro. La presenza di complementazione non consente tuttavia di affermare che la letalità osservata negli individui omozigoti delle linee 2770, 0242, 2952 e 0493 sia dovuta a mutazioni diverse da quelle presenti nel gene *dEthel*. La proteina ETHE1 funziona infatti come un omodimero. Non si può escludere che la funzionalità di un complesso omodimerico possa essere ristabilito se le due subunità mutate sono in grado di compensarsi a vicenda (Hawley & Gilliland, 2006).

Il metodo più attendibile per valutare se le mutazioni presenti nel gene *dEthel* siano responsabili della letalità osservata negli individui omozigoti delle linee in questione, consiste nell'allestire incroci con individui appartenenti a linee portatrici di delezioni associate a perdita dell'intero gene *dEthel*.

Quando individui appartenenti alle linee mutanti 2952, 0493 e 0242 vengono incrociati con individui della linea 190, portatori di una delezione di circa 600 Kb, nella progenie viene rispettato il rapporto atteso tra eterozigoti ed emizigoti. Questo dato indica che la letalità degli individui omozigoti appartenenti alle linee

2952, 0493 e 0242 è probabilmente causata da mutazioni deleterie situate in una regione cromosomica non interessata dalla delezione presente nella linea 190.

Nella progenie ottenuta dall'incrocio tra individui appartenenti alla linea mutante 2770 ed individui appartenenti alla linea 190, il numero di emizigoti risulta inferiore rispetto all'atteso suggerendo che, in questo caso, la letalità degli individui omozigoti potrebbe essere, almeno in parte, attribuibile alla mutazione presente nel gene *dEthel*.

Quando individui appartenenti alle linee mutanti 2952, 0493 2770 e 0242 vengono incrociati con individui appartenenti alle linee 9344 e 8910, caratterizzate, rispettivamente, da una delezione di circa 500 e 470 Kb, nella progenie ottenuta non viene rispettato il rapporto atteso tra eterozigoti per la delezione, eterozigoti per il gene *dEthel* mutato ed emizigoti.

Gli individui eterozigoti per il gene *dEthel* mutato, presentano, in tutti gli esperimenti, una letalità maggiore rispetto agli individui eterozigoti per la delezione. Il cromosoma II mutagenizzato, presente negli individui delle linee 2952, 0493, 2770 e 0242, ha, dunque, in eterozigosi, effetti deleteri più gravi rispetto a quelli causati dalla presenza, in eterozigosi, della delezione che caratterizza gli individui delle linee 9344 ed 8910. Poiché tali delezioni comportano perdita dell'intero gene *dEthel*, la letalità degli individui omozigoti appartenenti alle linee 2952, 0493, 2770 e 0242 non è imputabile alla mutazione presente nel gene *dEthel*.

Tuttavia, non si può escludere che la letalità degli individui omozigoti appartenenti alle linee 2952, 0493, 2770 e 0242 possa essere, almeno in parte, causata da mutazioni nella regione cromosomica che risulta deleta negli individui appartenenti alla linea 9344 ed 8910. Infatti, gli individui emizigoti sono presenti, nella progenie di tutti gli incroci, secondo una proporzione inferiore rispetto all'atteso.

Alla luce di tali risultati, potrebbe essere utile ricercare possibili alterazioni fenotipiche, correlabili a deficit del metabolismo energetico mitocondriale, negli individui delle linee 2788, 3976 e 6043, in cui gli omozigoti per il gene *dEthel* mutato sono vitali.

Il ruolo del gene *dEthel* mutato nella insorgenza di tali fenotipi dovrà comunque essere valutato mediante opportuni esperimenti di complementazione con le linee portatrici di delezione associata a perdita del gene *dEthel*.

dSurf1

Recentemente, sono state caratterizzate tre linee transgeniche indipendenti di *Drosophila melanogaster* (23.4; 79.1 e 79.10) nelle quali è possibile indurre, mediante *double-stranded RNA interference*, un silenziamento post-trascrizionale del gene CG9943 (Zordan *et al.*, 2006).

Il gene CG9943 è l'omologo, in *D. melanogaster*, del gene umano *Surf1*, le cui mutazioni sono la causa prevalente dell'insorgenza della sindrome di Leigh, grave encefalopatia mitocondriale caratterizzata da lesioni focali simmetriche a carico del sistema nervoso centrale.

L'abbattimento dell'espressione post-trascrizionale del gene *dSurfl* via dsRNAi determina, negli individui interferati, alterazioni fenotipiche in parte riconducibili ai gravi sintomi che caratterizzano la sindrome di Leigh.

In particolare, quando viene utilizzato il driver *Act5C-GAL4*, che permette di indurre un abbattimento precoce ed ubiquitario del gene *dSurfl*, si osserva, negli individui interferati delle tre linee analizzate, ritardo nello sviluppo e letalità allo stadio larvale. Le larve *knockdown* appaiono rallentate nei movimenti e di dimensione più piccola rispetto ai controlli; inoltre, il sistema nervoso centrale risulta fortemente sottosviluppato, soprattutto a livello dei lobi ottici. La caratterizzazione delle larve interferate ha evidenziato gravi alterazioni motorie che risultano imputabili a difetti nel metabolismo energetico mitocondriale. Infatti, le fibre muscolari delle larve *Act5C-GAL4 dSurfl* sono normali per struttura ed organizzazione ma presentano mitocondri morfologicamente alterati. Quando viene utilizzato il driver *elav-GAL4*, che permette di attivare l'RNAi nel sistema nervoso centrale, gli individui interferati sopravvivono fino allo stadio adulto. La caratterizzazione di tali individui ha evidenziato ridotte capacità locomotorie e fotocomportamentali, imputabili ad una alterazione della trasmissione sinaptica del segnale visivo.

La specificità del silenziamento post-trascrizionale mediato da molecole di dsRNA rappresenta una questione cruciale nell'applicazione dell'RNAi (Du *et al.*, 2005).

Si è ipotizzato che, in *Drosophila melanogaster*, il problema della specificità del silenziamento via dsRNAi, non sia rilevante, tenendo conto dell'elevato numero di siRNA che si generano in seguito al processamento del dsRNA ad opera di Dicer. In tale condizione, infatti, la possibilità di formazione di molecole in grado di attivare una risposta aspecifica sarebbe estremamente ridotta (Echeverri & Perrimon, 2006).

Questa ipotesi, benché non sostenuta da prove sperimentali, è stata messa in discussione solo recentemente, in seguito a quanto emerso in *screening* di RNAi condotti *in silico* (Ma *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006).

In tali studi si è evidenziata la necessità di verificare, negli esperimenti di silenziamento genico via dsRNAi condotti in *Drosophila melanogaster*, la presenza di eventuali effetti "off-target".

Come riportato da un recente editoriale in *Nature Cell Biology* (2003), "il controllo definitivo per gli esperimenti di RNAi è rappresentato dalla complementazione attraverso l'espressione del gene target in una forma refrattaria al silenziamento".

Il sistema basato sulla transcomplementazione attraverso un gene sintetico, recentemente messo a punto in piante di tabacco (Kumar *et al.*, 2006), consente di analizzare direttamente il fenotipo indotto dall'RNAi. Tale sistema è quindi indipendente dai meccanismi con cui possono essere silenziati eventuali geni "off-target"; esso risulta vantaggioso, ad esempio, quando le molecole di siRNA funzionano come microRNA. In questo caso, infatti, il silenziamento aspecifico non è rilevabile mediante analisi dei profili trascrizionali (microarray) in quanto l'espressione dei geni "off-target" è alterata solo a livello proteico.

Inoltre, il metodo della transcomplementazione attraverso un gene sintetico, consente di valutare in che misura gli effetti "off-target" contribuiscano al

fenotipo *knockdown*, qualora il gene sintetico ristabilisca solo in parte il fenotipo selvatico (Kumar *et al.*, 2006).

Allo scopo di verificare se i cambiamenti fenotipici osservati negli individui in cui era stato indotto il silenziamento mediante dsRNAi di *dSurfl* fossero dovuti ad un silenziamento specifico del gene *dSurfl*, è stato adottato un sistema di “rescue” basato sulla espressione di un gene sintetico (*dSurfl*-sinonimo). Il gene *dSurfl*-sinonimo deve essere in grado di esprimere la proteina dSURF1 attraverso un trascritto resistente al macchinario dell’RNA interference.

Avvalendosi dei codoni di tipo sinonimo, è stata progettata una sequenza sintetica che differisce del 29.1% rispetto a quella presente nel gene *dSurfl* nativo.

Nella progettazione di un gene sintetico, è necessario massimizzare le differenze tra le due sequenze nucleotidiche. Attraverso l’inserimento di una sostituzione di tipo sinonimo ogni tripletta, è possibile ottenere una differenza massima pari al 33%.

Tuttavia, le sostituzioni nucleotidiche devono essere effettuate tenendo conto dei differenti parametri che possono incidere sulla espressione genica.

In particolare, vista la relazione tra *codon bias* e livello di espressione genica, la scelta dei codoni di tipo sinonimo è stata fatta sulla base dei dati relativi al *codon usage* in *D. melanogaster* (Sharp *et al.*, 1988).

Inoltre, nel gene *dSurfl* sinonimo, sono state mantenute inalterate eventuali sequenze importanti per il processo di traduzione (Gustafsson *et al.*, 2004). In particolare, non è stata modificata una regione simmetrica, localizzata a valle del primo codone di inizio, che, presumibilmente, forma una regione a forcina implicata nel rallentamento del ribosoma e nel riconoscimento del codone di inizio (Kozak, 1990). Tale regione non è comunque compresa nella sequenza target per l’RNAi.

Il grado di differenza tra la sequenza nucleotidica nativa e quella sintetica è stato ulteriormente ridotto per la necessità di evitare l’introduzione o la rimozione di possibili siti di splicing accettori e/o donatori. Inoltre, nella progettazione del gene sintetico, sono stati eliminati siti di restrizione che avrebbero reso difficoltoso il successivo clonaggio.

A monte del codone di stop del gene sintetico, è stato aggiunto il *tag* HA che consente di distinguere, nelle successive indagini molecolari, tra la proteina dSURF1 endogena e la proteina dSURF1-HA, codificata dal gene *dSurfl* sintetico.

Per valutare l’eventuale reversione del fenotipo *knockdown* in seguito ad espressione del gene *dSurfl* sinonimo, sono state caratterizzate le linee transgeniche doppie omozigoti 1.1-79.1, 10.8-79.1 e 13.6-79.1, contenenti sia il costrutto pP[UAST] *dSurfl*-s, in grado di esprimere la proteina SURF1-HA, sia il costrutto pUAST *dSurfl*-IR, in grado di indurre il silenziamento del gene nativo *dSurfl*.

Tali linee sono state prodotte, mediante opportuni incroci, a partire da individui delle linee transgeniche 1.1, 10.8 e 13.6, contenenti il costrutto pP[UAST] *dSurfl* sinonimo, e da individui della linea transgenica 79.1, contenente il costrutto pUAST *dSurfl*-IR (Zordan *et al.*, 2006).

Inducendo, negli individui doppi omozigoti 10.8-79.1 e 13.6-79.1, l’attivazione dell’RNAi e la contemporanea espressione del gene *dSurfl* sinonimo mediante il

driver ubiquitario *Act5C-GAL4*, non si osserva reversione del fenotipo *knockdown*.

L'analisi di Real-Time PCR evidenzia, negli individui 10.8;79.1 *Act5C-GAL4*, una riduzione del livello di trascrizione del gene *dSurfl* sinonimo pari al 10%, rispetto al controllo. In questo caso, il controllo è costituito da individui 10.8 *Act5C-GAL4* nei quali il gene sintetico è espresso in maniera precoce ed ubiquitaria, senza attivazione dell'RNA interference.

La riduzione del livello di espressione trascrizionale del gene *dSurfl* sinonimo in seguito ad attivazione dell'RNA interference suggerisce che il trascritto del gene *dSurfl* sinonimo potrebbe essere parzialmente riconosciuto dal macchinario dell'RNAi. Questa ipotesi risulta plausibile visto che nel gene sintetico, all'interno della regione target per l'RNAi, sono presenti dei frammenti nucleotidici che presentano identità di sequenza rispetto al gene nativo, con una lunghezza massima di 11 pb.

Inoltre, la mancanza di rescue negli individui 10.8;79.1 e 13.6;79.1 *Act5C-GAL4* potrebbe essere imputata all'assenza della proteina SURF1-HA nello stadio larvale, come rilevato mediante analisi di western blot, in individui 1.1, 10.8 e 13.6 *Actina5C-GAL4*. La presenza, in questi individui, della proteina SURF1-HA solo a livello pupale costituisce un dato di dubbia interpretazione, considerato che l'espressione del gene sintetico verrebbe indotta in maniera precoce ed ubiquitaria.

Quando si induce, mediante il driver *Act5C-GAL4*, l'attivazione dell'RNAi e la contemporanea espressione del gene *dSurfl*-sinonimo, negli individui doppi omozigoti 1.1-79.1 *Act5C-GAL4*, non si ottiene attivazione del macchinario dell'RNA interference.

Questa condizione, rilevata mediante analisi di Real Time PCR, potrebbe essere causata dall'inserzione del costrutto pP[UAST] *dSurfl*-sinonimo in una regione cromosomica contenente componenti essenziali per il corretto funzionamento dell'RNA interference.

Si noti che, negli individui 1.1;79.1 *Act5C-GAL4*, il livello di espressione del trascritto relativo al gene *dSurfl*-sinonimo è pari a circa il 50% rispetto a quanto rilevato nel campione di controllo. In questo caso, il campione di controllo è costituito da individui 1.1 *Act5C-GAL4*, nei quali il gene sintetico è espresso in assenza di attivazione dell'RNA interference.

Il costrutto per l'RNA interference ed il gene sintetico sono entrambi controllati mediante il sistema UAS-GAL4. La medesima quantità di proteina GAL4 che, negli individui di controllo, attiva un singolo costrutto target, si ripartisce, negli individui 1.1;79.1 *Act5C-GAL4*, tra due differenti costrutti target. Per questo motivo, negli individui 1.1;79.1 *Act5C-GAL4*, il livello di espressione del trascritto relativo al gene *dSurfl*-sinonimo risulta dimezzato rispetto a quanto rilevato nel campione di controllo.

Alla luce di questi risultati, si è ritenuto opportuno testare il driver *hsp70-GAL4* che consente una induzione ubiquitaria, attivabile, mediante shock termico, allo stadio di sviluppo desiderato.

Inizialmente, si è verificata la presenza della proteina dSURF1-HA negli individui adulti 10.8 *hsp70-GAL4*, 1.1 *hsp70-GAL4* e 13.6 *hsp70-GAL4*, sottoposti a shock termico nelle prime fasi dello sviluppo. In seguito, si è proceduto, mediante il driver *hsp70-GAL4*, all'induzione del gene *dSurfl*-sinonimo ed alla

contemporanea attivazione dell'RNAi, in individui appartenenti alle linee doppie omozigoti 10.8;79.1 e 13.6;79.1.

Nel caso del driver *hsp70-GAL4*, è stata messa a punto la condizione sperimentale in grado di determinare

- completa attivazione della RNAi;
- espressione del gene sintetico sufficiente ad indurre reversione del fenotipo *knockdown*.

In particolare, è stato possibile valutare il grado di attivazione dell'RNA interference analizzando la progenie ottenuta dall'incrocio tra individui appartenenti alla linea transgenica 79.1 pP[UAST] *dSurf1-IR* ed individui appartenenti alla linea *w;hsp70-GAL4/CyO*.

Nel caso in cui l'RNA interference sia completa, nessun individuo interferato 79.1 *hsp70-GAL4* raggiunge lo stadio adulto.

In questo modo, si è dimostrato che, sottoponendo individui doppi omozigoti 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* a shock termico (60 minuti; 37°C) nelle prime fasi dello sviluppo (72 ore dopo la deposizione), si ottengono:

- una completa attivazione dell'RNA interference;
- la sopravvivenza di individui “*rescued*”, anche se in una percentuale inferiore rispetto all'atteso (21,16 %, negli individui 10.8;79.1 *hsp70-GAL4*; 18,99 %, negli individui 13.6;79.1 *hsp70-GAL4*).

La condizione di “*rescue*” incompleta è, almeno in parte, imputabile alla tossicità indotta dall'espressione delle proteine GAL4 e dSURF1-HA, come dimostra la ridotta sopravvivenza degli individui 10.8 *hsp70-GAL4* (sopravvivenza media: 81,65 %) e 13.6 *hsp70-GAL4* (sopravvivenza media: 64,22 %).

Le analisi di western blot confermano la presenza di proteina dSURF1-HA negli individui adulti “*rescued*”; ciò dimostra che l'induzione, mediante shock termico, nelle prime fasi dello sviluppo, determina la produzione di proteina sintetica rilevabile anche nello stadio adulto.

Negli individui “*rescued*” 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* sono state valutate le caratteristiche comportamentali e fisiologiche che risultano profondamente alterate negli individui interferati in cui sia stato indotto un abbattimento post-trascrizionale del gene *dSurf1* via dsRNAi.

Gli individui “*rescued*” 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* mostrano un recupero nella velocità di locomozione larvale comparabile a quella osservata nei controlli e significativamente differente rispetto quella delle larve interferate 79.1 *Act5C-GAL4* (Test t: 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* vs. 79.1 *Act5C-GAL4*: P=0,0000081) (Test t: 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* vs. 79.1 *Act5C-GAL4*: P=0.000051).

L'analisi delle risposta fotocomportamentale, valutata attraverso il “*checker test*”, rivela che le larve “*rescued*”, di entrambe le linee analizzate, non presentano la grave alterazione nella risposta alla luce che caratterizza le larve interferate 79.1 *Act5C-GAL4* (Test t: 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* vs. 79.1 *Act5C-GAL4*: P=0,0000004) (Test t: 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* vs. 79.1 *Act5C-GAL4*: P=0.000005).

Le analisi comportamentali sono state condotte utilizzando, come controllo, individui appartenenti alle linee parentali da cui sono state ottenute le linee transgeniche “doppie omozigoti”.

Gli individui utilizzati come controllo sono stati valutati sia in assenza che in presenza di shock termico poiché, durante l’analisi della risposta ottico-motoria, si è rilevato che tale trattamento può alterare l’abilità di coordinare il movimento in risposta a stimoli visivi.

Inoltre, è stata valutata la risposta alla luce del *pathway* neuronale della retina, misurabile mediante elettroretinogrammi. I transienti ON ed OFF, dovuti alla attivazione sinaptica del secondo ordine di neuroni nel *pathway* visivo, che erano totalmente assenti negli individui interferati 79.1 *elav-GAL4*, risultano ripristinati negli individui “*rescued*” di entrambe le linee analizzate.

Nel complesso, gli individui “*rescued*” 10.8;79.1 *hsp70-GAL4* e 13.6;79.1 *hsp70-GAL4* mostrano un recupero del fenotipo *wild-type*.

Tuttavia, è necessario confermare l’effettivo abbattimento dell’espressione del gene *dSurfl* endogeno sia a livello proteico, mediante analisi di western blot, che a livello trascrizionale, mediante analisi di real-time PCR.

La presenza di una reversione parziale del fenotipo *knockdown* è imputabile alle caratteristiche intrinseche del gene sintetico progettato. In particolare, è plausibile che il gene *dSurfl*-sinonimo non sia completamente refrattario all’abbattimento post-trascrizionale indotto dall’RNAi.

Un aspetto cruciale è il livello di espressione proteica della proteina SURF1-HA, rispetto alla proteina SURF1 endogena. Infatti, per valutare la specificità del fenotipo *knockdown*, è essenziale che la proteina SURF1-HA venga prodotta in quantità comparabili con quelle della proteina endogena. Una analisi utile, in questo senso, potrebbe essere rappresentata da un confronto diretto, mediante analisi di western blot, del livello proteico delle proteine in questione.

Alla luce di quanto emerge dalle indagini finora condotte, si può affermare che non è possibile trarre conclusioni definitive riguardo alla specificità del fenotipo *knockdown* indotto dall’abbattimento post-trascrizionale del gene *dSurfl*.

Il sistema di rescue basato sulla trans-complementazione di un gene sintetico, potrebbe risultare più efficace utilizzando, per il gene sintetico *dSurfl*-sinonimo, un sistema di attivazione diverso da quello impiegato per l’induzione dell’RNA interference.

BIBLIOGRAFIA

AGOSTINO A., INVERNIZZI F., TIVERON C., FAGIOLARI G., PRELLE A., LAMANTEA E., GIAVAZZI A., BATTAGLIA G., TATANGELO L., TIRANTI V., ZEVIANI M. (2003) - Constitutive knockout of *Surf1* is associated with high embryonic lethality, mitochondrial disease and cytochrome c oxidase deficiency in mice. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 1-15.

ALDER M. N., DAMES S., GAUDET J., MANGO S. E. (2003) - Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference. *RNA*, 9: 25-32.

ANDERSON P. R., KIRBY K., HILLIKER A. J., PHILLIPS J. P. (2005) - RNAi-mediated suppression of the mitochondrial iron chaperone, *frataxin*, in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.*, 14: 3397-3405.

ANTONICKA H., MATTMAN A., CARLSON C. G., GLERUM D. M., HOFFBUHR K. C., LEARY S. C., KENNAWAY N. G., SHOUBRIDGE E. A. (2003) - Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 72: 101-114.

ARZIMAN Z., HORN T., BOUTROS M. (2005) - E-RNAi: a web approach to design optimized RNAi constructs. *Nucleic Acids Research*, 33: 582-588.

ASHBURNER M., MISRA S., ROOTE J., LEWIS S.E., BLAZEJ R., DAVIS T., DOYLE C., GALLE R., GEORGE R., HARRIS N., HARTZELL G., HARVEY D., HONG L., HUSTON K., HOSKINS R., JOHNSON G., MARTIN C., MOSHREFI A., PALAZZOLO M., REESE M.G., SPRADLING A., TSANG G., WAN K., WHITELAW K., KIMMEL B., CELNIKER S., RUBIN G.M. (1999) - An exploration of the sequence of a 2.9-Mb region of the genome of *Drosophila melanogaster*: the *Adh* region. *Genetics*, 153: 179-219.

BALL E., BALL S. P., SPARROW J. C. (1985) - A mutation affecting larval muscle development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.*, 6 (2): 77-92.

BARETZ B. H., LOLLO C. P., TANAKA K. (1979) - Metabolism in rats *in vivo* of RS-2-Methylbutyrate and *n*-Butyrate labeled with stable isotopes at various position. Mechanism of biosynthesis and degradation of ethylmalonyl semialdehyde and ethylmalonic acid. *J. Biol. Chem.*, 254: 3468-3478.

BARSHAK A. G., FERREIRA G. C., ANDRE K. R., SCHUCK P. F., VIEGAS C. M., TONIN A., FILHO C. S., WYSE A. T., WANNMACHER C. M., VARGAS C. R., WAJNER M. (2006) - Inhibition of the Electron Transport Chain and Creatine Kinase Activity by Ethylmalonic Acid in Human Skeletal Muscle. *Metab. Brain Dis.*, 21 (1): 11-19.

BENIT P., SLAMA A., CARTAULT F., GIURGEA I., CHRETIEN D., LEBON S., MARSAC C., MUNNICH A., ROTIG A., RUSTIN P. (2004) - Mutant NDUFS3 subunit of mitochondrial complex I causes *Leigh syndrome*. *J. Med. Genet.*, 41: 14-17.

BENTLEY A., MACLENNAN B., CALVO J. DEAROLF C. R. (2000) - Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics*, 156 (3): 1169-1173.

BI X., RONG Y. S. (2003) - Genome manipulation by homologous recombination in *Drosophila*. *Brief Funct. Genomic Proteomic*, 2 (2): 142-146.

BIRMINGHAM A., ANDERSON E, SULLIVAN K., REYNOLDS A., BOESE Q, LEAKE D., KARPILOW J, KHVOROVA A. (2007) - A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nat. Protoc.*, 2 (9): 2068-2078.

- BOHM M., PRONICKA E., KARCZMAREWICZ E., PRONICKI M., PIEKUTOWSKA-ABRAMCZUK D., SYKUT-CEGIELSKA J., MIERZEWSKA H., HANSIKOVA H., VESELA K., TESAROVA M., HOUSTKOVA H., HOUSTEK J., ZEMAN J. (2006) - Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome c oxidase deficiency. *Pediat. Res.*, 59: 21-26.
- BOHMERT K., CAMUS I., BELLINI C., BOUCHEZ D., CABOCHE M., BENNING C. (1998) - AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *EMBO J.*, 17 (1):170-180.
- BOURGERON T., RUSTIN P., CHRETIEN D., BIRCH-MACHIN M., BOURGEOIS M., VIEGAS-PEQUIGNOT E., MUNNICH A., ROTIG A. (1995) - Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genet.*, 11: 144-149.
- BRAND A. H., PERRIMON N. (1993) - Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118: 401-415.
- BRIDGES C. B. (1935) - Salivary chromosome maps with a key to the banding of chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Hered.*, 26: 60-64.
- BURLINA A., ZACCHELLO F., DIONISI-VICI C., BERTINI E., SABETTA G., BENNETT M. J., HALE D. E., SCHMIDT-SOMMERFELD E., RINALDO P. (1991) - New clinical phenotype of branched-chain acyl-CoA oxidation defect. *Lancet*, 338: 1522-1523.
- BURNET, B., BECK J., (1968) - Phenogenetic studies on visual acuity in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, 14: 855-860.
- CAMERON A. D., RIDDERSTROM M., OLIN B., MANNERVIK B. (1999) - Crystal structure of human glyoxalase II and its complex with a glutathione thiolester substrate analog. *Structure*, 7: 1067-1078.
- CASARI G., DE FUSCO M., CIARMATORI S. (1998) - Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell*, 93: 973-983.
- CAUDY A. A., KETTING R. F., HAMMOND S. C., DENLI A. M., BATHOORN A., TOPS B. B. J., SILVA J. M., MYERS M. M., HANNON G. J., PLASTERK R. H. A. (2003) - A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature*, 425: 411-414.
- CAUDY A., MYERS M., HANNON G. J., HAMMOND S. M. (2002) - Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.*, 16: 2491-2496.
- CELOTTO A. M., FRANK A. C., MCGRATH S. W., FERGESTAD T., VAN VOORHIES W. A., BUTTLE K. F., MANNELLA C. A., PALLADINO M. J. (2006) - Mitochondrial encephalomyopathy in *Drosophila*. *J. Neurosci.*, 26: 810-820.
- CERUTTI H. (2003) - RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet.*, 19 (1): 39-46.
- COENEN M. J. H., VAN DEN HEUVEL L. P., UGALDE C., TEN BRINKE M., NIJTMANS L. G. J., TRIJBELS F. J. M., BEBLO S., MAIER E. M., MUNTAU A. C., SMEITINK J. A. M. (2004) - Cytochrome c oxidase biogenesis in a patient with a mutation in COX10 gene. *Ann. Neurol.*, 56: 560-564.
- COGONI C., MACINO G. (1997) - Isolation of quelling-defective (qde) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10233-10238.

- COLLINS R. E, CHENG X. (2005) - Structural domains in RNAi. *FEBS Lett.*, 579: 5841-5849.
- COLOMBO P., YON J., GARSON K., FRIED M. (1992) - Conservation of the organization of five tightly clustered genes over 600 million years of divergent evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6358-6362.
- COX D. N., CHAO A., BAKER J., CHANG L., QIAO D., LIN H. (1998) - A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.*, 12: 3715-3727.
- DAHL H. H. (1998) - Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing *Leigh syndrome*. *Am. J. Hum. Genet.*, 63: 1594-1597.
- DE LONLAY P., VALNOT I., BARRIENTOS A., GORBATYUK M., TZAGOLOFF A., TAANMAN J.-W., BENAYOUN E., CHRETIEN D., KADHOM N., LOMBES A., OGIER DE BAULNY H., NIAUDET P., MUNNICH A., RUSTIN P., ROTIG A. (2001) - A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nature Genet.*, 29: 57-60.
- DE VRIES D. D., VAN ENGELEN B. G. M., GABREELS F. J. M., RUITENBEEK W., VAN OOST B. A. (1993) - A second missense mutation in the mitochondrial ATPase 6 gene in *Leigh's syndrome*. *Ann. Neurol.*, 34: 410-412.
- DELL'AGNELLO C., LEO S., AGOSYINO A., SZABADKAI G, TIVERON C., ZULIAN A., PRELLE A., ROUBERTOUX P., RIZZUTO R., ZEVIANI M. (2007) - Increased longevity and refractoriness to Ca²⁺-dependent neurodegeneration in *Surfl* knockout mice. *Hum. Mol. Genet.*, 16: 431-444.
- DI MAURO S., HIRANO M. (2005) - Mitochondrial encephalomyopathies: an update. *Neuromuscular Disorders*, 15: 276-286.
- DI MAURO S., SCHON E. A. (2003) - Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.*, 348: 2656-68.
- DOLEZAL T., GAZI M., ZUROVEC M., BRYANT P. J. (2003) - Genetic analysis of the *ADGF* multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics*, 165: 653-666.
- DRYSDALE R. A., CROSBY M. A., THE FLYBASE CONSORTIUM (2005) - *FlyBase*: genes and gene models. *Nucleic Acids Research*, 33: 390-395.
- DU Q., THONBERG H., WANG J. WAHLESTEDT C., LIANG Z. (2005) - A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res.*, 33 (5): 1671-1677.
- DUFFY JB. (2002) - GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*, 34 (1-2): 1-15.
- DUHIG T., RUHRBERG C., MOR O., FRIED M. (1998) - The human *surfeit* locus. *Genomics*, 52: 72-78.
- DURAN M., DORLAND L., VAN DER BERG I. (1997) - The ethylmalonic acid syndrome is associated with deranged sulfur aminoacid metabolism leading to urinary excretion of thiosulfate and sulfothiocysteine. In: Program and abstracts of the VII International Congress on Inborn Errors of Metabolism, Vienna, Austria. Abstract 48.
- E. J. GILCHRIST, G.W. HAUGHN (2005) - TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 211-215.

- ECHEVERRI C. J., PERRIMON N. (2006) - High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nature Rev. Genet.*, 7: 373-384.
- ELMORE T., IGNELL R., CARLSON J. R., SMITH D. P. (2003) - Targeted mutation of a *Drosophila* odor receptor defines receptor requirement in a novel class of sensillum. *J. Neurosci.*, 23: 9906-9912.
- FELICIELLO I., CHINALI G.(1993) - A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.*, 212 (2): 394-401.
- FILOSTO M., MANCUSO M., (2007) - Mitochondrial diseases: a nosological update. *Acta Neurol. Scand.*, 115: 211-221.
- FIRE A., XU S., MONTGOMERY M. K., KOSTAS S. A., DRIVER S. E., MELLO C. C. (1998) - Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-811.
- FROLOV M. V., BENEVOLENSKAYA E. V., BIRCHLER J. A. (2000) - The oxen gene of *Drosophila* encodes a homolog of subunit 9 of yeast ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex: evidence for modulation of gene expression in response to mitochondrial activity. *Genetics*, 156: 1727-1736.
- GARCÍA-SILVA M. T., RIBES A., CAMPOS Y., GARAVAGLIA B., ARENAS J. (1997) - Syndrome of encephalopathy, petechiae, and ethylmalonic aciduria. *Pediatr. Neurol.*, 17 (2): 165-170.
- GARSON K., DUHIG T., ARMES N., COLOMBO P., FRIED M. (1995) - *Surf5*: A gene in the tightly clustered mouse surfeit locus is highly conserved and transcribed divergently from the rpl7A (*Surf3*) gene. *Genomics*, 30: 163-170.
- GILCHRIST E. J., O'NEIL N. J., ROSE A. M., ZETKA M. C., HAUGHN G. W. (2006) - TILLING is an effective reverse genetics technique for *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomes*, 7 (1): 262.
- GLOOR G. B., NASSIF N. A., JOHNSON-SCHLITZ D. M., PRESTON C. R., ENGELS W. R. (1991) - Targeted gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. *Science*, 253 (5024): 1110-1117.
- GONG W. J., GOLIC K. G. (2003) - Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. USA*, 100 (5): 2556-2561.
- GONG W. J., GOLIC K. G. (2004) - Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster hsp70* genes. *Genetics*, 168: 1467-1476.
- GRAFAKOU O., OEXLE K., VAN DEN HEUVEL L., SMEETS R., TRIJBELS F., GOEBEL H. H., BOSSHARD N., SUPERTI-FURGA A., STEINMANN B., SMEITINK J. (2003) - *Leigh syndrome* due to compound heterozygosity of dihydrolipoamide dehydrogenase gene mutations: description of the first E3 splice site mutation. *Europ. J. Pediatr.*, 162: 714-718.
- GREENE J. C., WHITWORTH A., KUO I., ANDREWS L. A., FEANY M. B., PALLANK L. J. (2003) - Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (7): 4078-4083.

- GREGERSEN N, WINTER V. S., CORYDON M. J., CORYDON T. J., RINALDO P., RIBES A., MARTINEZ G., BENNETT M. J., VIANEY-SABAN C., BHALA A., HALE D. E., LEHNERT W., KMOCH S., ROIG M., RIUDOR E., EIBERG H., ANDRESEN B. S., BROSS P., BOLUND L. A., KOLVRAA S. (1998) - Identification of four new mutations in the short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) gene in two patients: one of the variant alleles, 511CRT, is present at an unexpectedly high frequency in the general population, as was the case for 625GRA, together conferring susceptibility to ethylmalonic aciduria. *Hum. Mol. Genet.*, 7: 619-627.
- GRISHOK A., PASQUINELLI A. E., CONTE D., LI N., PARRISH S., HA I., BAILLIE D. L., FIRE A., RUVKUN G., MELLO C. C. (2001) - Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing *Cell*, 106: 23-34.
- GROSSO S., MOSTARDINI R., FARNETANI M. A., MOLINELLI M., BERARDI R., DIONISIVICI C., RIZZO C., MORGESE G., BALESTRI P. (2002) - Ethylmalonic encephalopathy: further clinical and neuroradiological characterization. *J. Neurol.*, 249 (10): 1446-1450.
- GUSTAFSSON C., GOVINDARAJAN S., MINSHULL J. (2004) - Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.*, 22 (7): 346-353.
- HAGAN C. E., WARREN G. J. (1983) - Viability of palindromic DNA is restored by deletions occurring at low but variable frequency in plasmid of *Escherichia coli*. *Gene*, 24: 317-326.
- HANNON G. J. (2002) - RNA interference. *Nature*, 418 (6894): 244-251.
- HASSAN J., BUSTO M., IYENGAR B., CAMPOS A. R. (2000) - Behavioral characterization and genetic analysis of the *Drosophila melanogaster* larval response to light as revealed by a novel individual assay. *Behav. Genet.*, 30 (1): 59-69.
- HAWLEY R. S., GILLILAND W. D. (2006) - Sometimes the result is not the answer: the truths and the lies that come from using the complementation test. *Genetics*, 174 (1): 5-15.
- HAYWARD D. C., DELANEY S. J., CAMPBELL H. D., GHYSEN A., BENZER S. (1993) - The sluggish-A gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrial enzyme involved in glutamate biogenesis. *Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2979-2983.
- HEISENBERG M. (1971) - Separation of receptor and lamina potentials in the electroretinogram of normal and mutant *Drosophila*. *J. Exp. Biol.*, 55: 85-100.
- HIGASHITSUJI H., NAGAO T., NONOGUCHI K., FUJII S., ITOH K., FUJITA J. (2002) - A novel protein overexpressed in hepatoma accelerates export of NF- κ B from the nucleus and inhibits p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 2 (4): 335-346.
- HOMMES F. A., POLMAN H. A., REERINK J. D. (1968) - *Leigh's encephalomyelopathy*: an inborn error of gluconeogenesis. *Arch. Dis. Child.*, 43: 423-426.
- HOTTA, Y., BENZER S. (1969) - Abnormal electroretinograms in visual mutants of *Drosophila*. *Nature*, 222: 354-356.
- HUNTSMAN R. J., SINCLAIR D. B., BHARGAVA R., CHAN A. (2005) - Atypical presentation of *Leigh syndrome*: a case series and review. *Pediatr. Neurol.*, 32 (5): 334-340.
- HUXLEY C., FRIED M. (1990) - The mouse *surfeit* locus contains a cluster of six genes associated with four CpG-rich islands in 32 kilobases of genomic DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 605-614.

- IYENGAR B., LUO N., FARR C. L., KAGUNI L. S., CAMPOS A. R. (2002) - The accessory subunit of DNA polymerase is essential for mitochondrial DNA maintenance and development in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 (7): 4483-4488.
- JACKSON A. L., BARTZ S. R., SCHELTER J., KOBAYASHI S. V., BURCHARD J., MAO M., LI B., CAVET G., LINSLEY P. S. (2003) - Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.*, 21: 635-637.
- JACOBS H. T., FERNANDEZ-AYALA J., MANJIRY S., KEMPPAINENE E., TOIVONEN J. M., O'DELL K. M. (2004) - Mitochondrial disease in flies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1659: 190-196.
- JAKSCH M., PARET C., STUCKA R., HORN N., MULLER-HOCKER J., HORVATH R., TREPESCH N., STECKER G., FREISINGER P., THIRION C., MULLER J., LUNKWITZ R., RODEL G., SHOUBRIDGE E. A., LOCHMULLER H. (2001) - Cytochrome c oxidase deficiency due to mutations in *SCO2*, encoding a mitochondrial copper-binding protein, is rescued by copper in human myoblasts. *Hum. Molec. Genet.*, 10: 3025-3035.
- JENUTH J. P., PETERSON A. C., SHOUBRIDGE E. A. (1997) - Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat. Genet.*, 16: 93-95.
- KALIDAS S., SMITH D. P. (2002) - Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron*, 33 (2): 177-184.
- KALIMO H., LUNDBERG P. O., OLSSON Y. (1979) - Familial subacute necrotizing encephalomyelopathy of the adult form (adult *Leigh syndrome*). *Ann. Neurol.*, 6: 200-206.
- KATAOKA Y., TAKEICHI M., UEMURA T. (2001) - Developmental roles and molecular characterization of a *Drosophila* homologue of *Arabidopsis* Argonaute1, the founder of a novel gene superfamily. *Genes Cells*, 6: 313-325.
- KAVI H. H., FERNANDEZ H. R., XIE W., BIRCHLER J. A. (2005) - RNA silencing in *Drosophila*. *FESB Lett.*, 579: 5940-5949.
- KETTING R. F., FISCHER S. E., BERNSTEIN E., SIJEN T., HANNON G. J., PLASTERK R. H. (2001) - Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.*, 15: 2654-2659.
- KITTLER R., PELLETIER L., MA C., POSER I., FISCHER S., HYMAN A. A., BUCHHOLZ F. (2005) - RNA interference rescue by bacterial artificial chromosome transgenesis in mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 2396-2401.
- KNIGHT S. W., BASS B. L. (2001) - A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 293: 2269-2271.
- KOUNDAKJIAN E. J., COWAN D. M., HARDY R. W., BECKER A. H. (2004) - The Zuker collection: a resource for the analysis of autosomal gene function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167 (1): 203-206.
- KOZAK M. (1990) - Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (21): 8301-8305.
- KULKARNI M. M., BOOKER M., SILVER S. J., FRIEDMAN A., HONG P., PERRIMON N., MATHEY-PREVOT B. (2006) - Evidence of off-target effects associated with the use of long dsRNAs in *Drosophila* cell-based assays. *Nature Methods*, 3: 833-838.
- KUMAR D., GUSTAFSSON C., KLESSIG D. F. (2006) - Validation of RNAi silencing specificity using synthetic genes: salicylic acid-binding protein 2 is required for innate immunity in plants. *The Plant Journal*, 45: 863-868.

- LAM G., THUMMEL C. S. (2000) - Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 10 (16): 957-963.
- LANKENAU S., BARNICKEL T., MARHOLD J., LYKO F., MECHLER B. M., LANKENAU D. H. (2003) - Knockout targeting of the *Drosophila Nap1* gene and examination of DNA repair tracts in the recombination products. *Genetics*, 163: 611-623.
- LEBON S., RODRIGUEZ D., BRIDOUX D., ZERRAD A., ROTIG A., MUNNICH A., LEGRAND A., SLAMA A. (2007) - A novel mutation in the human complex I NDUFS7 subunit associated with Leigh syndrome. *Molec. Genet. Metab.*, 90: 379-382.
- LEE Y. S., NAKAHARA K., PHAM J. W., KIM K., HE Z., SONTHEIMER E. J., CARTHEW R. W. (2004) - Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*, 117 (1): 69-81.
- LEFEVRE J. JR. (1976) - A photographic representation and interpretation of polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* salivary glands. In *The Genetics and the Biology of Drosophila*, M. Ashburner and E. Novitzki (eds.) vol.1a, pp. 31-66. *Acad. Press*, London and New York.
- LENNARD A., GASTON K., FRIED M. (1994) - The *Surf-1* and *Surf-2* genes and their essential bidirectional promoter elements are conserved between mouse and human. *DNA Cell. Biol.*, 13: 1117-1126.
- LIU H., KUBLI E. (2003) - Sex-peptide is the molecular basis of the sperm effect in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 9929-9933.
- LIU J., CARMELL M. A., RIVAS F. V., MARSDEN C. G., THOMSON J. M., SONG J. J., HAMMOND S. M., JOSHUA-TOR L., HANNON G. J. (2004) - Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305 (5689): 1437-1441.
- LOEFFEN J., SMEITINK J., TRIPELS R., SMEETS R., SCHUELKE M., SENGERS R., TRIJBELS F., HAMEL B., MULLAART R., VAN DEN HEUVEL L. (1998) - The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with *Leigh syndrome*. *Am. J. Hum. Genet.*, 63: 1598-1608.
- MA Y., CREANGA A., LUM L., BEACHY P. (2006) - Prevalence of off-target effects in *Drosophila* RNA interference screens. *Nature*, 443 (7109): 359-363.
- MAIER D., FARR C. L., POECK B., ALAHARI A., VOGEL M. (2001) - Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell*, 12: 821-830.
- MARTIN M. A., BLAZQUEZ A., GUTIERREZ-SOLANA L. G., FERNANDEZ-MOREIRA D., BRIONES P., ANDREU A. L., GARESSE R., CAMPOS Y.; ARENAS, J. (2005) - *Leigh syndrome* associated with mitochondrial complex I deficiency due to a novel mutation in the NDUFS1 gene. *Arch. Neurol.*, 62: 659-666.
- MATTHEWS P. M., MARCHINGTON D. R., SQUIER M., LAND J., BROWN R. M., BROWN G. K. (1993) - Molecular genetic characterization of an X-linked form of *Leigh's syndrome*. *Ann. Neurol.*, 33: 652-655.
- MCCALLUM C. M., COMAI L., GREENE E. A., HENIKOFF S. (2000) - Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.*, 18: 455-457.
- MCCOY J. G., BINGMAN A., BITTO E., HOLDORF M. M., MAKAROFF C. A., PHILIPS G. N. (2006) - Structure of an ETHE1-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Cryst.*, D62: 964-970.

MCFARLAND R., CLARK K. M., MORRIS A. A. M., TAYLOR R. W., MACPHAIL S., LIGHTOWLERS R. N., TURNBULL D. M. (2002) - Multiple neonatal deaths due to a homoplasmic mitochondrial DNA mutation. *Nature Genet.*, 30: 145-146.

MCFARLAND R., KIRBY D. M., FOWLER K. J., OHTAKE A., RYAN M. T., AMOR D. J., FLETCHER J. M., DIXON J. W., COLLINS F. A., TURNBULL D. M., TAYLOR R. W., THORBURN D. R. (2004) - De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. *Ann. Neurol.*, 55: 58-64.

MCGOWAN K. A., NYHAN W. L., BARSHOP B. A., NAVIAUX R. K., YU A., HAAS R. H., TOWNSEND J. J. (2004) - The role of methionine in ethylmalonic encephalopathy with petechiae. *Arch. Neurol.*, 61 (4): 570-574.

MIDDENDORF L. R., BRUCE J. C., BRUCE R. C., ECKLES R. D., GRONE D. L., ROEMER S. C., SLONIKER G. D., STEFFENS D. L., SUTTER S. L., BRUMBAUGH J. A. (1992) - Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus. *Electrophoresis*, 13: 487-494.

MISQUITTA L., PATERSON B. M. (1999) - Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (4): 1451-1456.

MOORE D. J., DAWSON V. L., DAWSON T. M. (2006) - Lessons from *Drosophila* models of DJ-1 deficiency. *Sci. Aging. Knowl. Environ. Issue*, 2.

MOSLEMI A.-R., TULINIUS M., DARIN N., AMAN P., HOLME E., OLDFORS A. (2003) - SURF1 gene mutations in three cases with *Leigh syndrome* and cytochrome c oxidase deficiency. *Neurology*, 61: 991-993.

MUNARO M., TIRANTI V., SANDONA D., LAMANTEA E., UZIEL G., BISSON R., ZEVIANI M. (1997) - A single cell complementation class is common to several cases of cytochrome c oxidase-defective *Leigh's syndrome*. *Hum. Molec. Genet.*, 6: 221-228.

NAPOLI C., LEMIEUX C., JORGENSEN R. (1990) - Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 2: 279-289.

NIJTMANS L. G., ARTAL SANZ M., BUCKO M., FARHOUD M. H., FEENSTRA M., HAKKAART G. A., ZEVIANI M., GRIVELL L. A. (2001) - Shy1p occurs in a high molecular weight complex and is required for efficient assembly of cytochrome c oxidase in yeast. *FEBS Lett.*, 498: 46-51.

NOWACZYK M. J. M., BLASER S. I., CLARKE J. T. (1998a) - Central nervous system malformations in ethylmalonic encephalopathy. *Am. J. Med. Genet.*, 75 (3): 292-296.

NOWACZYK M.J.M., LEHOTAY D.C., PLATT B.A., FISHER L., TAN R., PHILLIPS H., CLARKE J.T.R. (1998b) - Ethylmalonic and Methylsuccinic aciduria in Ethylmalonic Encephalopathy arise from abnormal Isoleucine metabolism. *Metabolism*, 47: 836-839.

OQUENDO C. E., ANTONICKA H., SHOUBRIDGE E. A., REARDON W., BROWN G. K. (2004) - Functional and genetic studies demonstrate that mutation in the COX15 gene can cause *Leigh syndrome*. *J. Med. Genet.*, 41: 540-544.

OZAND P. T., RASHED M., MILLINGTON D. S., SAKATI N., HAZZAA S., RAHBEENI Z., AL ODAIB A., YOUSSEF N., MAZROU A., GASCON G. G., BRISMAR J. (1994) - Ethylmalonic aciduria: an organic acidemia with CNS involvement and vasculopathy. *Brain Dev.*, 16: 12-22.

- PAK W. L., GROSSFIELD J., WHITE N. V. (1969) - Nonphototactic mutants in a study of vision of *Drosophila*. *Nature*, 222: 351-354.
- PAL-BHADRA M., BHADRA U., BIRCHLER J. A. (2002) - RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell.*, 9 (2): 315-327.
- PEQUIGNOT M. O., DEY R., ZEVIANI M., TIRANTI V., GODINOT C., POYAU A., SUE C., DI MAURO S., ABITBOL M., MARSAC C. (2001) - Mutations in the SURF1 gene associated with *Leigh syndrome* and cytochrome c oxidase deficiency. *Human Mutat.*, 17: 374-381.
- PETRUZZELLA V., VERGARI R., PUZZIFERRI I., BOFFOLI D., LAMANTEA E., ZEVIANI M., PAPA S. (2001) - A nonsense mutation in the NDUFS4 gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Hum. Molec. Genet.*, 10: 529-535.
- PFÄFFL M. W. (2001) - A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29 (9): 45.
- PICCIN A., SALAMEH A., BENNA C., SANDRELLI F., MAZZOTTA G., ZORDAN M., ROSATO E., KYRIACOU C. P., COSTA R. (2001) - Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4 driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res.*, 29 (12): E55-5.
- PLASTERK R. H. (2002) - RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 296: 1263-1265.
- PLECKO B. (2007) - Lessons to learn from rare inborn errors of metabolism. *Neuropediatrics*, 38: 59-60.
- POYAU A., BUCHET K., BOUZIDI M. F., ZABOT M. T., ECHENNE B., YAO J., SHOUBRIDGE E. A., GODINOT C. (2000) - Missense mutations in SURF1 associated with deficient cytochrome c oxidase assembly in Leigh syndrome patients. *Hum. Genet.*, 106 (2): 194-205.
- POYAU, A., BUCHET K., GODINOT C. (1999) - Sequence conservation from human to prokaryotes of Surf1, a protein involved in cytochrome c oxidase assembly. *FEBS Lett.*, 462: 416-420.
- RAHMAN S., BLOK R. B., DAHL H.-H. M., DANKS D. M., KIRBY D. M., CHOW C. W., CHRISTODOULOU J., THORBURN D. R. (1996) - *Leigh syndrome*: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.*, 39: 343-351.
- REYNOLDS A., ANDERSON E. M., VERMEULEN A., FEDOROV Y., ROBINSON K., LEAKE D., KARPILOW J., MARSHALL W. S., KHVOROVA A. (2006) - Induction of the interferon response by siRNA is cell type and duplex length-dependent. *RNA*, 12. 988-993.
- RIDDERSTROM M., JEMTH P., CAMERON A. D., MANNERVIK B. (2000) - The active site residue Tyr-175 in human glyoxalase II contributes to binding of glutathione derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, 1481: 344-348.
- RIKHY R., RAMASWAMI M., KRISHNAN K. S. (2003) - A Temperature-Sensitive Allele of *Drosophila sesB* Reveals Acute Functions for the Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase in Synaptic Transmission and Dynamin Regulation. *Genetics*, 165: 1243-1253.
- RONG Y. S., GOLIC K. G. (2000) - Gene targeting by Homologous Recombination in *Drosophila*. *Science*, 288 (5473): 2013-2018.

- RONG Y. S., GOLIC K. G. (2001) - A targeted gene knockout in *Drosophila*. *Genetics*, 157: 1307-1312.
- RONG Y. S., TITEN S. W., XIE H. B., GOLIC M. M., BASTIANI M. (2002) - Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev.*, 16: 1568-1581.
- RUBIN G. M., SPRADLING A. C. (1982) - Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218: 348-353.
- RUTLEDGE J. C., HAAS J. E., MONNAT R. (1981) - Hypertrophic cardiomyopathy is a feature of subacute necrotizing encephalomyelopathy. *Am. J. Hum. Genet.*, 33: 89A.
- SALVIATI L., FREEHAUF C., SACCONI S., DIMAURO S., THOMA J., TSAI A. C.-H. (2004) - Novel SURF1 mutation in a child with subacute encephalopathy and without the radiological features of *Leigh syndrome*. *Am. J. Med. Genet.*, 128A: 195-198.
- SÁNCHEZ-MARTÍNEZ A., LUO N., CLEMENTE P., ADÁN C., HERNÁNDEZ-SIERRA R., OCHOA P., FERNÁNDEZ-MORENO M. A., KAGUNI L. S., GARESSE R. (2006) - Modeling human mitochondrial diseases in flies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1757: 1190-1198.
- SANDRELLI F., CAMPESAN S., ROSSETTO M., BENNA C., ZIEGER E., MEGIGHIAN A., COUCHMAN M., KYRIACOU C., COSTA R. (2001) - Molecular dissection of the 59 region of no-on-transientA of *Drosophila melanogaster* reveals cis-regulation by adjacent dGpi1 sequences. *Genetics*, 157: 765-775.
- SANTORELLI F. M., TANJI K., SANO M., SHANSKE S., EL-SHAHAWI M., KRANZ-EBLE P., DIMAURO S., DE VIVO D. C. (1997) - Maternally inherited encephalopathy associated with a single-base insertion in the mitochondrial tRNATrp gene. *Ann. Neurol.*, 42: 256-260.
- SAUNDERS L.R., BARBER G.N. (2003) - The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J.*, 17 (9): 961-983.
- SAXENA S., JONSSON Z.O., DUTTA A. (2003) - Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 44312-44319.
- SCACHERI P. C., ROZENBLATT-ROSEN O., CAPLEN N. J., WOLFSBERG T. G., UMayAM L., LEE J. C., HUGHES C. M., SHANMUGAM K. S., BHATTACHARJEE A., MEYERSON M., COLLINS F. S. (2004) - Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 1892-1897.
- SCHUELKE M., SMEITINK J., MARIMAN E., LOEFFEN J., PLECKO B., TRIJBELS F., STOCKLER-IPSIROGLU S., VAN DEN HEUVEL L. (1999) - Mutant NDUFV1 subunit of mitochondrial complex I causes leukodystrophy and myoclonic epilepsy. *Nature Genet.*, 21: 260-261.
- SHARP P. M., COWE E., HIGGINS D. G., SHIELDS D. C., WOLFE K. H., WRIGHT F. (1998) - Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res*, 16 (17): 8207-8211.
- SHIELDS D. C., SHARP P. M., HIGGINS D. G., WRIGHT F. (1998) - "Silent" sites in *Drosophila* genes are not neutral: evidence of selection among synonymous codons. *Mol. Biol. Evol.*, 5 (6): 704-716.
- SHOFFNER J. M., FERNHOFF P. M., KRAWIECKI N. S., CAPLAN D. B., HOLT P. J., KOONTZ D. A., TAKEI Y., NEWMAN N. J., ORTIZ R. G., POLAK M., BALLINGER S. W., LOTT M. T., WALLACE D. C. (1992) - Subacute necrotizing encephalopathy: oxidative phosphorylation defects and the ATPase 6 point mutation. *Neurology*, 42: 2168-2174.

- SINGH K., SINGH R. N. (1999) - Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) during pupation. *J. Biosci.*, 24: 345-360.
- SMEITINK J., VAN DEN HEUVEL L. (1999) - Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 64: 1505-1510.
- SMITH N. A., SINGH S. P., WANG M. B., STOUTJESDIJK P. A., GREEN A. G., WATERHOUSE P. M. (2000) - Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 407: 319-320.
- SMITS B. M., MUDDE J., CUPPEN E., PLASTERK R. H. (2004) - Target-selected mutagenesis of the rat. *Genomics*, 83: 332-334.
- SUDO A., HONZAWA S., NONAKA I., GOTO Y. (2004) - *Leigh syndrome* caused by mitochondrial DNA G13513A mutation: frequency and clinical features in Japan. *J. Hum. Genet.*, 49: 92-96.
- SUE C. M., BRUNO C., ANDREU A. L., CARGAN A., MENDELL J. R., TSAO C.-Y., LUQUETTE M., PAOLICCHI J., SHANSKE S., DIMAURO S., DE VIVO D. C. (1999) - Infantile encephalopathy associated with the *MELAS* A3243G mutation. *J. Pediatr.*, 134: 696-700.
- SZUPLEWSKI S., TERRACOL R. (2001) - The cyclope gene of *Drosophila* encodes a cytochrome c oxidase subunit VIc homolog. *Genetics*, 158: 1629-1643.
- TALAMILLO A., CHISHOLM A. A., GARESSE R., JACOBS H. T. (1998) - Expression of the nuclear gene encoding mitochondrial ATP synthase subunit alpha in early development of *Drosophila* and sea urchin. *Mol. Biol. Rep.*, 25: 87-94.
- TATUCH Y., CHRISTODOULOU J., FEIGENBAUM A., CLARKE J. T. R., WHERRET J., SMITH C., RUDD N., PETROVA-BENEDICT R., ROBINSON B. H. (1992) - Heteroplasmic mtDNA mutation (T-to-G) at 8993 can cause *Leigh disease* when the percentage of abnormal mtDNA is high. *Am. J. Hum. Genet.*, 50: 852-858.
- TAVERNARAKIS N., WANG S. L., DOROVKOV M., RYAZANOV A., DRISCOLL M. (2000) - Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. *Nature Genet.*, 24: 180-183.
- TERAOKA M., YOKOYAMA Y., NINOMIYA S., INOUE C., YAMASHITA S., SEINO Y. (1999) - Two novel mutations of SURF1 in *Leigh syndrome* with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Genet.*, 105: 560-563.
- THORNALLEY P. J. (1990) - The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J*, 269:1-11.
- TILL B. J., COLBERT T., TOMPA R., ENNS L. C., CODOMO C. A., JOHNSON J. E., REYNOLDS S. H., HENIKOFF J. G., GREENE E. A., STEINE M. N., COMAI L., HENIKOFF S. (2003) - High-throughput TILLING for functional genomics. *Methods Mol. Biol.*, 236, 205-220.
- THIBAUT S. T., SINGER M. A., MIYAZAKI W. Y., MILASH B., DOMPE N. A., SINGH C. M., BUCHHOLZ R., DEMSKY M., FAWCETT R., FRANCIS-LANG H. L., RYNER L., CHEUNG L. M., CHONG A., ERICKSON C., FISHER W. W., GREER K., HARTOUNI S. R., HOWIE E., JAKKULA L., JOO D., KILLPACK K., LAUFER A., MAZZOTTA J., SMITH R. D., STEVENS L. M., STUBER C., TAN L. R., VENTURA R., WOO A., ZAKRAJSEK I., ZHAO L., CHEN F., SWIMMER C., KOPCZYNSKI C., DUYK G., WINBERG M. L., MARGOLIS J. (2004) - A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyback. *Nature Genetics*, 36 (3): 283-287.

TIRANTI V., BRIEM E., FERRARI G., LAMANTEA E., PAPALEO E., DE GIOIA L., RINALDO P., DICKSON P., ABU-LIBDEH B., HEBERLE L., OWALDHA M., JACK R. M., CHRISTENSEN E., ZEVIANI M. (2006) - *Ethel* mutations are a prevalent cause of Ethylmalonic Encephalopathy. *J. Med. Genet.*, 43: 340-346.

TIRANTI V., CORONA P., GRECO M., TAANMAN J.-W., CARRARA F., LAMANTEA E., NIJTMANS L., UZIE, G., ZEVIANI M. (2000) - A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by *Leigh-like syndrome*. *Hum. Molec. Genet.*, 9: 2733-2742.

TIRANTI V., D'ADAMO P., BRIEM E., FERRARI G., MINERI R., LAMANTEA E., MANDEL H., BALESTRI P., GARCIA-SILVA M. T., VOLLMER B., RINALDO P., HAHN S.H., LEONARD J., RAHMAN S., DIONISI-VICI C., GARAVAGLIA B., GASPARINI P., ZEVIANI M. (2004) - Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in *Ethel*, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 239-252.

TIRANTI V., HOERTNAGEL K., CARROZZO R., GALIMBERTI C., MUNARO M., GRANTIERO M., ZELANTE L., GASPARINI P., MARZELLA R., ROCCHI M., BAYONA-BAFALUY M. P., ENRIQUEZ J.-A., UZIEL G., BERTINI E., DIONISI-VICI C., FRANCO B., MEITINGER T., ZEVIANI M. (1998) - Mutations of SURF-1 in *Leigh disease* associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 63: 1609-1621.

TIRANTI V., JAKSCH M., HOFMANN S., GALIMBERTI C., HOERTNAGEL K., LULLI L., FREISINGER P., BINDOFF L., GERBITZ K. D., COMI G.-P., UZIEL G., ZEVIANI M., MEITINGER T. (1999) - Loss-of-function mutations of SURF-1 are specifically associated with *Leigh syndrome* with cytochrome c oxidase deficiency. *Ann. Neurol.*, 46: 161-166.

TOIVONEN J. M., O'DELL K. M., PETIT N., IRVINE S. C., KNIGHT G. K., LEHTONEN M., LONGMUIR M., LUOTO K., TOURAILLE S., WANG Z., ALZIARI S., SHAH Z. H., JACOBS H. T. (2001) - Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness. *Genetics*, 159: 241-254.

TULINIUS M., MOSLEMI A.-R., DARIN N., WESTERBERG B., WIKLUND L.-M., HOLME E., OLDFORS A. (2003) - *Leigh syndrome* with cytochrome-c oxidase deficiency and a single T insertion nt 5537 in the mitochondrial tRNA(Trp) gene. *Neuropediatrics*, 34: 87-91.

UGALDE C., TRIPELS R. H., COENEN M. J. H., VAN DEN HEUVEL L. P., SMEETS R., UUSIMAA J., BRIONES P., CAMPISTOL J., MAJAMAA K., SMEITINK J. A. M., NIJTMANS L. G. J. (2003) - Impaired complex I assembly in a *Leigh syndrome* patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Ann. Neurol.*, 54: 665-669.

VENKEN K. J., BELLEN H. J. (2005) - Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.*, 6 (3):167-78.

W.R. ENGELS (2000) - Reversal of fortune for *Drosophila* geneticists?

Whither RNAi? (2003) -*Nature Cell Biology*, 5 (6): 489-490.

WIENHOLDS E., VAN EEDEN F., KOSTERS M., MUDDE J., PLASTERK R. H., CUPPEN E. (2003) - Efficient target-selected mutagenesis in *zebrafish*. *Genome Res.*, 13: 2700-2707.

WINKLER S., SCHWABEDISSEN A., BACKASCH D., BOKEL C., SEIDEL C., BONISCH S., FURTHAUER M., KUHR S., COBREROS L., BRAND M., GONZÁLEZ-GAITÁN M. (2005) - Target-selected mutant screen by TILLING in *Drosophila*. *Genome Res.*, 15: 718-723.

XIE H. B., GOLIC K. G. (2004) - Gene deletions by ends-in targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 168: 1477-1489.

- XU Y., CONDELL M., PLESKEN H., EDELMAN-NOVEMSKY I., MA J., REN M., SCHLAME M. (2006) - A *Drosophila* model of Barth syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 (31):11584-11588.
- YANG Y., GEHRKE S., HAQUE M. E., IMAI Y., KOSEK J., YANG L., BEAL M. F., NISHIMURA I., WAKAMATSU K., ITO S. TAKAHASHI R., LU B. (2005) - Inactivation of *Drosophila DJ-1* leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 13670-13675.
- YAO J., SHOUBRIDGE E. A. (1999) - Expression and functional analysis of SURF1 in Leigh syndrome patients with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.*, 8 (13): 2541-9.
- YOON H. R., HAHN S. H., AHN Y. M., JANG S. H., SHIN Y. J., LEE E. H., RYU K. H., EUN B. L., RINALDO P., YAMAGUCHI S. (2001) - Therapeutic trial in the first three Asian cases of ethylmalonic encephalopathy: response to riboflavin. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 24 (8): 870-873.
- ZEVIANI M., CARELLI V. (2003) - Mitochondrial disorders. *Curr. Opin. Neurol.*, 16: 585-594.
- ZEVIANI M., CARELLI V. (2007) - Mitochondrial disorders. *Curr. Opin. Neurol.*, 20: 564-571.
- ZEVIANI M., CORONA P., NIJTMANS L., TIRANTI V. (1999) - Nuclear gene defects in mitochondrial disorders. *Ital. J. Neurol. Sci.*, 20 (6): 401-408.
- ZEVIANI M., DI DONATO S. (2004) - Mitochondrial disorders. *Brain*, 127: 2153-2172.
- ZHAO J. J., PICK L. (1993) - Generating loss-of-function phenotypes of the fushi tarazu gene with a targeted ribozyme in *Drosophila*. *Nature*, 365 (6445): 448-451.
- ZHU Z., YAO J., JOHNS T., FU K., DE BIE I., MACMILLAN C., CUTHBERT A. P., NEWBOLD R. F., WANG J., CHEVRETTE M., BROWN G. K., BROWN R. M., SHOUBRIDGE E. A. (1998) - SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in *Leigh syndrome*. *Nature Genet.*, 20: 337-343.
- ZORDAN M. A., CISOTTO P., BENNA C., AGOSTINO A., RIZZO G., PICCIN A., PEGORARO M., SANDRELLI F., PERINI G., TOGNON G., DE CARO R., PERON S., TE KRONNIE' T., MEGIGHIAN A., REGGIANI C., ZEVIANI M., COSTA R. (2006) - Post-transcriptional Silencing and Functional Characterization of the *Drosophila melanogaster* Homolog of Human *Surfl*. *Genetics*, 172: 229-241.

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	5
CAPITOLO 1: Aspetti generali	7
Le malattie mitocondriali	9
<i>Drosophila melanogaster</i> come modello per lo studio delle malattie mitocondriali umane .	12
CAPITOLO 2: La Encefalopatia Etilmalonica	9
Encefalopatia Etilmalonica	17
Il gene umano <i>Ethel</i>	21
La proteina ETHE1: struttura e possibile funzione	22
L'omologo del gene umano <i>Ethel</i> in <i>Drosophila melanogaster</i>	24
CAPITOLO 3: La sindrome di Leigh	17
La sindrome di Leigh	27
Il gene <i>Surfl</i> umano	29
La proteina SURF1: struttura e possibile funzione	30
L'omologo del gene umano <i>Surfl</i> in <i>Drosophila melanogaster</i>	31
Modelli animali per lo studio della sindrome di Leigh	31
Modelli murini per la sindrome di Leigh.....	32
Modello di <i>Drosophila melanogaster</i> per la sindrome di Leigh.....	33
CAPITOLO 4: Tecniche di genetica inversa in <i>Drosophila melanogaster</i>	37
RNA interference	39
Il macchinario dell'RNA interference in <i>Drosophila melanogaster</i>	39
RNA interference stabile ed ereditabile in <i>Drosophila</i>	42
Off-target effects	43
Gene targeting	45
Ends-in targeting	47
Ends-out targeting	51
Efficienza del targeting.....	52
Tilling.....	53
CAPITOLO 5: Scopo della tesi	33
Scopo della tesi	57
PARTE I d <i>Ethel</i>	59
CAPITOLO 6: Materiali e metodi	61
Clonaggio direzionato	63
Protocolli generali	63
Ceppi, soluzioni e materiali utilizzati.....	63
Elettroforesi su gel di agarosio	64
Estrazione del DNA da gel di agarosio.....	64
Reazione di ligazione	65
Preparazione delle cellule per elettroporazione.....	65
Trasformazione batterica per elettroporazione	65
Trasformazione batterica mediante <i>heat-shock</i>	66
Miniprep di DNA plasmidico (<i>speedprep</i>).....	66
Maxiprep di DNA plasmidico	66
Screening dei cloni mediante restrizione enzimatica.....	67

Sequenziamento.....	67
Allestimento del costrutto pP[UAST] 5'-d <i>Ethel</i> -3'/GFP/3'-d <i>Ethel</i> -5'.....	69
Trasferimento del frammento 5'-d <i>Ethel</i> -3' nel vettore pBC® SK.....	71
Unione dei segmenti ripetuti con il linker spaziatore	72
Trasferimento di 5'-d <i>Ethel</i> -3'/GFP/3'- d <i>Ethel</i> -5' nel vettore di iniezione pP[UAST].....	73
Allestimento del costrutto ricombinogeno pTV2(A+C).....	73
Amplificazione e clonaggio dei frammenti A1, A2, A3, A4, C1 e C2	74
Unione dei frammenti A1 ed A2 nel vettore pBC® SK	77
Unione dei frammenti A3 ed A4 nel vettore pCR®II-TOPO®.....	77
Unione dei frammenti C1 e C2 nel vettore pCR®II-TOPO®	78
Subclonaggio dei frammenti A3+A4 nel vettore pBS® SK A1+A2	78
Subclonaggio dei frammenti A1+A2+A3+A4 nel vettore pBC® SK	79
Subclonaggio dei frammenti C1+C2 nel vettore pBC® SK A1+A2+A3+A4	79
Subclonaggio del frammento A+C in pTV2.....	80
Microiniezione.....	80
Preparazione del DNA per la microiniezione	81
Linee di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzate.....	81
Medium nutritivo per il mantenimento delle linee di <i>Drosophila melanogaster</i>	82
Medium per la stimolazione della deposizione delle uova	82
Componenti principali del microiniettore e loro funzionamento	82
Deposizione delle uova.....	83
Decorionazione manuale degli embrioni	83
Stadi embrionali ottimali per la microiniezione.....	84
Microiniezione.....	85
Allestimento di incroci per l'identificazione di individui trasformati.....	85
Caratterizzazione delle linee trasformate.....	85
Incroci per la localizzazione cromosomica e per il bilanciamento dell'inserto	85
Inserzione nei cromosomi sessuali	85
Inserzione negli autosomi	86
Caratterizzazione delle linee transgeniche mediante ibridazione <i>in situ</i>	90
Soluzioni e materiali utilizzati	90
Preparazione del DNA utilizzato come sonda negli esperimenti di ibridazione <i>in situ</i>	91
Ibridazione <i>in situ</i>	92
Mappatura degli inserti.....	93
Allestimento degli incroci	95
Linee di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzate.....	95
dsRNA interference	97
Gene targeting.....	98
Tilling.....	100
Real time PCR.....	103
Estrazione dell'RNA totale.....	103
Quantificazione dell'RNA estratto	104
Retrotrascrizione	104
Reazione di amplificazione	104
Metodi matematici per la quantificazione relativa dei dati.....	105
Western blot	106
Soluzioni e materiali utilizzati.....	106
Estrazione e quantificazione delle proteine	106
Elettroforesi in gel di poliacrilammide	107
Trasferimento su membrana di nitrocellulosa	107
Immunosaggio	107
Rivelazione dei segnali di immunolocalizzazione.....	108
Immunosaggio e rivelazione della proteina di controllo HSP70	108
Valutazione semiquantitativa dei segnali di immunolocalizzazione	108
Valutazione dello sviluppo e della vitalità	108
Valutazione della vitalità di <i>Drosophila melanogaster</i>	108
Vitalità degli individui adulti.....	109
Analisi della motilità	109
Velocità di locomozione larvale.....	109

Test “roll-over”	110
Tilling	110
Scelta della regione da sottoporre a Tilling	110
Analisi bioinformatica	110
Analisi della struttura primaria	111
Analisi della struttura secondaria e terziaria	111
CAPITOLO 7: RISULTATI dsRNA INTERFERENCE.....	63
Preparazione dei costrutti pP[UAST] 5'-d <i>Ethel</i> -3'/GFP/3'-d <i>Ethel</i> -5'.....	115
Trasformazione di embrioni <i>w</i> ¹¹¹⁸ mediante microiniezione dei costrutti UAS- d <i>Ethel</i> + <i>introne</i> -IR e UAS-d <i>Ethel</i> -IR	117
Caratterizzazione delle linee trasformate e bilanciamento degli inserti	118
Mappatura dell'inserto mediante ibridazione <i>in situ</i>	119
Valutazione dello sviluppo e della vitalità	122
Sviluppo da uovo ad adulto	122
Vitalità degli individui adulti	124
Analisi della motilità	125
Test di locomozione della larva III stadio	125
Test “roll-over”	126
Real-time PCR	127
Western blot	128
CAPITOLO 8: Risultati caratterizzazione linee 0017965 e 104009.....	133
Linee 0017965 e 104009.....	135
Real-time PCR	135
Western blot	136
CAPITOLO 9: Risultati gene targeting	141
Allestimento del costrutto ricombinogeno	143
Trasformazione di embrioni <i>w</i> ¹¹¹⁸ mediante microiniezione del costrutto pTV2 (A+C)	144
Caratterizzazione delle linee trasformate e bilanciamento degli inserti	145
Allestimento di incroci per indurre ricombinazione omologa.....	146
CAPITOLO 10: Risultati Tilling	151
Tilling	153
Valutazione dello sviluppo uovo-adulto	155
Esperimenti di complementazione	158
Incroci con linee portatrici di delezioni	159
Analisi bioinformatica della proteina dTHE1	162
Struttura tridimensionale	162
Analisi delle mutazioni.....	163
PARTE II d <i>Surfl</i>	169
CAPITOLO 11: Materiali e metodi	171
Gene sintetico d <i>Surfl</i> -sinonimo	173
Progettazione e sintesi	173
Subclonaggio del gene d <i>Surfl</i> -sinonimo nel vettore pUAST.....	173
Microiniezione e caratterizzazione delle linee trasformate	174
Allestimento degli incroci	174
Linee di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzate	174
Selezione degli individui omozigoti per l'inserto.....	175
Incrocio per l'espressione del costrutto pP[UAST] d <i>Surfl</i> -s	175
Allestimento di linee doppie omozigoti	175
Attivazione simultanea dei costrutti pP[UAST] d <i>Surfl</i> -s e pP[UAST] d <i>Surfl</i> -IR.....	177
Western blot	179
Immunosaggio	179
Real time PCR.....	179
Condizioni di amplificazione	179

Caratterizzazione degli individui “rescued”	180
Test ottico-motorio	180
Checker test	181
Velocità di locomozione larvale	182
Elettroretinogrammi	182
CAPITOLO 12: Risultati <i>dSurfl</i>	183
Progettazione del gene sintetico <i>dSurfl</i> sinonimo	185
Allestimento del costrutto pP[UAST] <i>dSurfl-s</i>	187
Trasformazione di embrioni <i>w¹¹¹⁸</i> mediante microiniezione del costrutto pP[UAST] <i>dSurfl-s</i>	187
Caratterizzazione delle linee trasformate e bilanciamento degli inserti	188
Creazione di linee “doppie omozigoti”	189
Caratterizzazione del driver <i>Act5C-GAL4</i>	190
Caratterizzazione del driver <i>Hsp70-GAL4</i>	193
Caratterizzazione degli individui “rescued”	201
Analisi di western blot	201
Test ottico-motorio	203
Velocità di locomozione larvale	206
Checker test	206
Elettroretinogrammi	206
CAPITOLO 13: Discussione e conclusioni	209
<i>dEthel</i>	211
<i>dSurfl</i>	218
BIBLIOGRAFIA	225