

Università degli Studi di Padova
Facoltà di Scienze MM. FF. NN.

Laurea di secondo livello in Biologia
Evoluzionistica

**Analisi comportamentale delle funzionalità degli apparati
neuromotorio, visivo ed olfattivo di mutanti
della via metabolica degli sfingolipidi
in *Drosophila melanogaster***

Relatore: Prof. Mauro A. Zordan
Dipartimento di Biologia

Laureando: Elena Garcia Gomez

Anno Accademico 2006-2007

1. PREMESSA E SCOPO DELLA TESI

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

I *raft* lipidici sono microdomini ricchi in sfingolipidi e colesterolo, determinanti nell'orchestrare il ciclo delle vescicole di membrana; ciò è importante soprattutto per quanto riguarda le vescicole sinaptiche: i *raft* neuronali modulano la funzione di molti canali ionici, inclusi i canali del calcio voltaggio-dipendenti, e quindi il passaggio di neurotrasmettitore da un neurone all'altro (Rohrbough and Brodie, 2005).

Nella complessa via metabolica degli sfingolipidi, regolata a vari livelli da diversi enzimi, i ruoli meglio studiati sono quelli di ceramide, sfingosina e sfingosina-1-fosfato (S1P). La ceramide è il precursore degli altri due (e dei restanti sfingolipidi più complessi) ed è sintetizzata nel reticolo endoplasmatico (Futerman and Hannun, 2004).

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

Si intuisce dunque anche il ruolo essenziale degli sfingolipidi nello sviluppo del sistema nervoso; si è dimostrato in topo che il signalling della S1P è critico per la neurogenesi (Mizugishi *et al.*, 2005).

Sono note alcune malattie genetiche umane dovute ad alterazioni del metabolismo sfingolipidico. Tra queste, la neuropatia sensoriale ereditaria di tipo 1 (HSN1) deriva da mutazioni a danno dell'attività dell'enzima serina-palmitoil-CoA transferasi (SPT, catalizza il primo step dell'intera via metabolica).

È una neuropatia che colpisce le terminazioni nervose periferiche degli arti, sino a sfociare in lesioni e denervazione dei muscoli (Bejaoui *et al.*, 2002).

Per studiare questa ed altre malattie sono utili organismi modello quali topo e

Drosophila, di cui sono disponibili diversi ceppi mutanti per il metabolismo sfingolipidico.

In particolare, i mutanti *lace* (per l'enzima SPT), *Sk2* (per l'enzima SK) e *Sply* (per l'enzima S1P-liasi) sono stati oggetto di diversi studi, che spaziano dall'analisi dell'anatomia di sistema nervoso e muscolare a quella del comportamento.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di individuare eventuali alterazioni in certi aspetti comportamentali di alcuni mutanti di *Drosophila* (in particolare *Sply*, e *Sk2* quando è stato possibile). Sono stati pertanto messi a punto ed attuati in laboratorio esperimenti, su larve o moscerini adulti, riguardanti:

- locomozione
- fototassi
- risposta optomotoria
- preferenze olfattive
- apprendimento associativo

Si sono eseguite anche dissezioni di larve, allo scopo di visualizzare, con un approccio immunoistochimico, la struttura del sistema nervoso (ed in particolare delle giunzioni neuromuscolari). Inoltre nel periodo di tirocinio si è valutata la durata media di vita degli adulti nei diversi ceppi mutanti.

2. INTRODUZIONE

2.1. Gli sfingolipidi

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

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

- *ceramidi* - sono gli sfingolipidi più semplici, costituiti da un acido grasso legato alla sfingosina;
- *sfingomieline* - sono ceramidi cui si trova legata una fosforilcolina o una fosfoetanolammina esterificata;
- *glicosfingolipidi* - sono ceramidi legate a uno o più residui di zuccheri, tramite legami β -glicosidici. Si suddividono ulteriormente in *cerebrosidi* e *gangliosidi*: i primi vedono nella loro composizione un singolo glucosio, o un galattosio; i secondi invece possiedono almeno tre zuccheri, fra cui un acido sialico.

Gli sfingolipidi vennero scoperti già nel 1884 e furono sempre considerati importanti componenti strutturali della membrana cellulare, formanti nella pagina esterna del doppio strato lipidico una barriera meccanicamente stabile e chimicamente resistente. Quando si scoprì che alcune patologie, come la malattia di Gaucher nel 1934, erano dovute all'accumulo di glicosfingolipidi, si pose più attenzione sulla via biosintetica e sull'omeostasi di tale molecole (Acharya and Acharya, 2005). Si è così venuti a conoscenza di un ampissimo range di funzioni svolte dagli sfingolipidi, in ambiti cellulari che vanno dall'housekeeping, al signalling intracellulare nello sviluppo, al trasporto di membrana e traffico vescicolare. Tuttavia non si sa ancora con precisione con quali meccanismi agiscano queste molecole (tanto che il loro nome si riferisce alla figura mitologica della sfinge ed ai suoi enigmi).

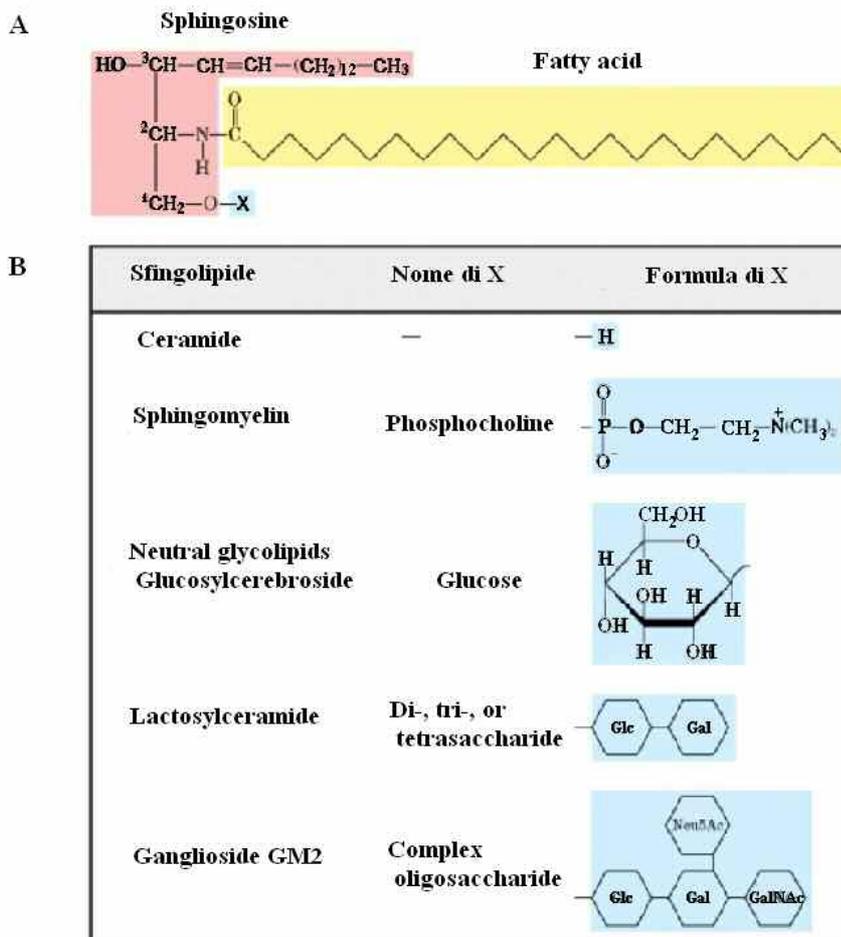


Fig. 1: struttura degli sfingolipidi. (A) Struttura generale di uno sfingolipide. X: gruppo di testa. (B) Gli sfingolipidi si differenziano a seconda del loro gruppo di testa (modificato dal sito <http://courses.cm.utexas.edu>).

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

Il metabolismo degli sfingolipidi è l'area meglio conosciuta della loro biologia; si tratta di una via sintetica intricata, che può essere regolata a molteplici livelli tramite il controllo dell'espressione dei suoi enzimi (Futerman and Hannun, 2004). Nelle cellule la riduzione di certe specie sfingolipidiche comporta un incremento di altre; esiste pertanto un presunto meccanismo di bilanciamento che regola il

flusso dei vari metaboliti attraverso la via sintetica, denominato "reostato degli sfingolipidi". Esso comprende diversi enzimi regolatori che interconvertono fra loro vari metaboliti (come forme fosforilate e forme non fosforilate), che sembrano avere azioni antagoniste.

Il "reostato" è un regolatore delle risposte agli stress che si è conservato lungo l'evoluzione, attraverso le specie e i phyla eucarioti, in quanto se ne è riscontrata evidenza sia in animali, che in piante, che in lievito (Spiegel and Milstien, 2002). Consiste sostanzialmente in un bilanciamento fra ceramide e sfingosina, e il loro derivato sfingosina-1-fosfato (S1P), che sono gli sfingolipidi meglio studiati. Sono metaboliti che intervengono nelle risposte agli stress: ceramide e sfingosina sono associati all'arresto della crescita cellulare e all'induzione dell'apoptosi; al contrario la S1P, agendo nelle risposte adattative, è implicata nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, ed evidentemente ha un'azione protettiva contro l'attività pro-apoptotica della ceramide. Ad esempio, si è sperimentato, in femmine di topo wild-type, che l'aumento di S1P o la riduzione di ceramide può prevenire la perdita di oociti indotta da radiazioni (evento che porta ad una prematura disfunzione ovarica ed infertilità nelle pazienti affette da cancro; Morita *et al.*, 2000). Si ipotizza poi che l'altalena tra sfingosina e S1P sia determinante per la reattività allergica dei mastociti (Prieschl *et al.*, 1999).

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

Ad esempio, è stato riportato che la S1P può essere rilasciata nel mezzo extracellulare, dove può agire da messaggero primario legandosi a recettori di membrana: in neuroni e cellule della Glia l'espressione di questi recettori è regolata durante lo sviluppo, e la loro distribuzione varia nei diversi distretti nervosi, cosa che suggerisce un loro possibile ruolo nei processi fisiologici dello sviluppo (proliferazione cellulare, migrazione, differenziazione, attivazione degli astrociti, mielinizzazione, apoptosi; Toman and Spiegel, 2002).

Oltre alle funzioni legate al destino cellulare, esercitate anche negli altri tessuti, si è stabilito che nel neurone queste molecole sono fondamentali per la trasmissione del segnale, in particolare per la loro presenza nei *raft* lipidici (Rohrbough *et al.*, 2004).

I *raft* sono microdomini di membrana (sia delle cellule che dei loro organelli)

poveri in fosfolipidi, ma ricchi in sfingomieline, ceramidi, glicosfingolipidi, colesterolo e proteine associate. Questi microdomini si formano probabilmente per la capacità degli sfingolipidi di associarsi rapidamente ed impaccarsi nelle membrane (proprietà data forse dalle loro catene sature relativamente lunghe, con alto punto di fusione; Hoekstra *et al.*, 2003). L'elevato impaccamento rende i *raft* insolubili a certi detergenti non ionici, caratteristica che li ha definiti nei saggi biochimici delle membrane (Rohrbough and Broadie, 2005).

Con il colesterolo e i fosfolipidi saturi, i glicosfingolipidi (GSL) formano dunque un'unica fase liquida; il colesterolo è necessario per l'integrità e la funzionalità del *raft*: la sua deplezione infatti causa la dissociazione delle proteine dal microdominio, per cui vengono meno le interazioni proteine-lipidi che lo mantengono stabile (Rohrbough and Broadie, 2005).

I metaboliti sfingolipidici sono coinvolti nella modulazione dell'eccitabilità del neurone, e del rilascio di neurotrasmettitore. Si è infatti osservato che la S1P contribuisce al rilascio, indotto da depolarizzazione, attraverso l'attivazione dei canali Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, che sono invece inibiti dalla sfingosina. Anche la ceramide mostra un'attività in questo senso, influenzando sull'attività di diversi canali ionici (Rohrbough *et al.*, 2004).

Gli effetti degli sfingolipidi sul rilascio di neurotrasmettitore possono quindi essere conseguenza della modulazione esercitata sui canali, e sul flusso di Ca^{2+} nell'area presinaptica; oppure tali effetti sono dovuti a cambiamenti nella conformazione dei *raft*, che portano ad una facilitazione o inibizione della vescicola contenente il neurotrasmettitore a fondersi con la membrana presinaptica. Ceramide, sfingomieline e relativi metaboliti svolgono funzioni essenziali nell'interfaccia plasmalemma-vescicola; il contenuto di steroli del *raft* serve a regolare la fluidità di membrana e la sua curvatura, parametri molto rilevanti per il ciclo delle vescicole sinaptiche (ciclo che va dal rilascio di una vescicola alla completa maturazione di un'altra). La ceramide e gli altri sfingolipidi probabilmente si trovano anche nelle membrane delle vescicole sinaptiche stesse (Rohrbough and Broadie, 2005).

2.2. Sfingolipidi in *Drosophila*

Drosophila è uno degli organismi su cui sono stati condotti studi *in vivo* per

ottenere informazioni sulle funzioni fisiologiche degli sfingolipidi, e degli enzimi della loro via metabolica.

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

Tuttavia ci sono alcune differenze rispetto ai mammiferi nella composizione sfingolipidica: le membrane di *Drosophila*, come in molti altri ditteri, sono prive di sfingomieline, e presentano invece fosfoetanolamina-ceramide. L'organismo contiene comunque gli elementi basilari per la sintesi degli sfingolipidi (Rietveld *et al.*, 1999; Dennis *et al.*, 1985).

Inoltre, nel moscerino della frutta e vari ditteri, le principali basi sfingoidi sono a catene di 14 e 16 Carboni, mentre nei mammiferi predominano quelle a C18. Queste catene più brevi di sfingolipidi (ed anche fosfolipidi) indicano che le membrane di *Drosophila* hanno una temperatura di fusione più bassa, e restano quindi fluide a temperature minori (Acharya *et al.*, 2003).

In uno studio (Renault *et al.*, 2002) sono stati identificati 31 geni del moscerino della frutta, omologhi delle loro controparti di mammifero; si tratta di enzimi del metabolismo della S1P e dell'acido lisofosfatidico.

2.3. Mutanti per il gene *Sply*

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

Studi effettuati su *Dictyostelium discoideum* (Li *et al.*, 2001) e su *Caenorhabditis elegans* (Mendel *et al.*, 2003) indicano l'importanza fondamentale di questo enzima nello sviluppo degli organismi; il suo malfunzionamento provoca un forte accumulo di sfingolipidi fosforilati e non fosforilati, che è deleterio.

Il gene *Sply* di *Drosophila* codifica una SPL funzionale; è posizionato nel braccio destro del cromosoma II, regione 53F8-12, ed ha un alto grado di similarità di sequenza (49% di identità e 68% d'identità) con la SPL umana (Herr *et al.*, 2003).

La sua espressione è regolata con lo sviluppo: se ne osserva un livello temporaneo nelle prime fasi embrionali, dovuto al contributo materno; poi il livello

d'espressione declina, con un picco nel tardo embrione; un secondo picco si è osservato all'inizio della metamorfosi (nella pupa), con il ritorno a livelli basali nell'adulto, indipendentemente dal sesso.

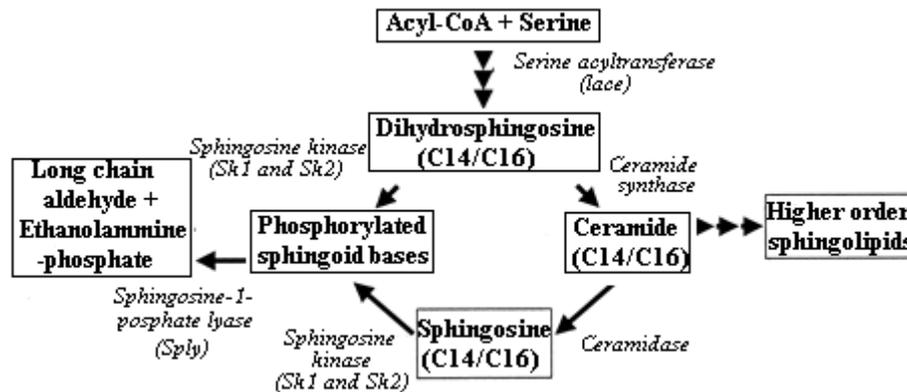


Fig 2: via di sintesi degli sfingolipidi in *Drosophila* (tratto e modificato da Herr *et al.*, 2004).

La mutagenesi tramite elementi-P è un metodo comune di inserire nel genoma di *Drosophila*, in un punto casuale, determinati elementi trasponibili, per interrompere la sequenza di un gene. L'elemento-P può essere exciso, portando alla reversione dell'effetto dato dalla mutazione; se exciso imprecisamente però, può generare la delezione delle sequenze adiacenti, con diverse possibili combinazioni, e si può produrre una serie allelica di mutanti. In particolare il mutante *Sply* di *Drosophila* è il risultato di un'inserzione di un elemento-P che compromette seriamente la funzione del gene: nei mutanti omozigoti per questo allele nullo *Sply*⁰⁵⁰⁹¹ non se ne è rintracciata alcuna espressione, nè tramite ibridazione *in situ* con RNA, nè con Northern blot (Herr *et al.*, 2003). In essi si riscontra un accumulo di basi sfingoidi a lunga catena (C14 e C16), di sfingosina e diidrosfingosina; gli individui mutanti non riescono a catabolizzare metaboliti fosforilati endogeni, al contrario dei moscerini wild-type. I mutanti adulti mostrano un accumulo di basi non fosforilate 8 volte superiore rispetto ai controlli, e 20 volte superiore per quanto riguarda le basi fosforilate. Tuttavia l'accumulo si osserva già alle 12 ore di embriogenesi.

Gli adulti sono in gran parte incapaci di volare (il 91% della popolazione ha ottenuto punteggio 0 in test per la performance di volo). La più evidente anomalia si ha nel pattern dei muscoli dorsali longitudinali (DLM) del volo: nei moscerini

wild-type il torace contiene sempre 6 paia simmetriche di fibre muscolari; i mutanti omozigoti *Sply* invece presentano una generica mancanza di alcune di queste (da analisi quantitative: 4.15 fibre per emitorace), e le restanti sono asimmetriche ed ipertrofiche. Le inserzioni muscolari non appaiono compromesse, così come appare normale la fusione dei mioblasti nell'embrione e l'ultrastruttura muscolare (Herr *et al.*, 2003). Si è quindi ipotizzato che le anomalie compaiano durante la metamorfosi da larva ad adulto.

I mutanti inoltre hanno una fecondità ridotta (il numero di uova deposte è circa 1/3 rispetto ai controlli), vi sono alti livelli di apoptosi nell'embrione, soprattutto nel disco genitale, e negli stadi larvali la mortalità è alta.

I moscerini mutanti eterozigoti per l'allele *Sply*⁰⁵⁰⁹¹ non sono distinguibili dal wild-type.

2.4. Mutanti per il gene *Sk2*

La sfingosin-chinasi (SK) catalizza la sintesi di S1P aggiungendo un gruppo fosfato alla sfingosina. La sua azione riduce i livelli cellulari di ceramide e sfingosina, occupando così una posizione strategica nel regolare il destino cellulare che può contribuire al normale sviluppo di un animale. Come detto, la S1P, messaggero sia intra- che extracellulare, ha effetti proliferativi e anti-apoptotici su molti tipi cellulari, fornisce stimoli direzionali alle cellule migranti; inoltre influisce sull'organizzazione del citoscheletro, sull'omeostasi del Ca²⁺ e sulla sintesi del DNA (Herr *et al.*, 2004). Tale metabolita può essere eliminato con la defosforilazione ad opera della S1P fosfatasi, o con la degradazione irreversibile in un'aldeide a lunga catena ed etanolamina-fosfato, catalizzata dalla S1P liasi (SPL).

La SK è un enzima altamente conservato nei phyla eucariotici: membri della famiglia SK sono stati identificati in piante, topo, ratto e uomo; ognuno ha un dominio catalitico conservato, che contiene il sito di legame con l'ATP. L'attività dell'enzima è indotta da vari tipi di stress (ad esempio, regola la risposta a stress da calore in lievito, e la chiusura degli stomi in *Arabidopsis thaliana*; Spiegel and Milstien, 2002).

I relativi geni di mammifero *Sphk1* e *Sphk2* sono stati confrontati con tutte le sequenze conosciute di *Drosophila*, e sono così stati individuati due *loci* con

spiccata similarità a *Sphk1*: *Sk1* si trova nel cromosoma X, regione 10B13, e codifica una proteina di 641 aa e di 71 kDa.

Sk2 si trova invece nel cromosoma II, regione 63A3-5, e contiene un singolo introne; codifica una proteina di 661 aa, di 47 kDa.

I due geni in *Drosophila* sono espressi ubiquitariamente, con livelli più alti nelle fasi embrionale e pupale (e maggiormente nei maschi); *Sk2* risulta essere molto più espresso di *Sk1* (Acharya and Acharya, 2005).

Harris e Saba per primi caratterizzarono moscerini mutanti per il gene *Sk2*: questi mutanti *Sk2*^{KG05894} possiedono un elemento-P inserito presso l'estremità 5' del gene *Sk2*, 54 bp a monte del codone start. Per ciò, a causa dell'inattività della SK, presentano un alto livello basale di metaboliti sfingolipidici liberi (soprattutto non fosforilati), in tutti gli stadi del ciclo vitale.

I moscerini mutanti *Sk2* sono vitali, senza gravi difetti nella morfologia esterna, ed anche la longevità dell'adulto è normale; tuttavia presentano performance di volo ridotta, ma non si sono riscontrate anomalie strutturali nei muscoli del volo toracici; non si sa spiegare dunque questo fenotipo, che si sa essere comunque dovuto all'elemento-P (se exciso precisamente, è perfettamente recuperato). Inoltre i mutanti omozigoti hanno difetti riproduttivi: il numero di uova deposte dalle femmine è solo il 43% di quelle deposte da moscerini wild-type; la dissezione (Herr et al., 2004) ha rivelato che gli ovari sono circondati da abbondante massa adiposa, e sono più grandi: questo per il fenomeno di ritenzione delle uova mature. Il fenotipo è esibito dal 68% delle femmine *Sk2* contro l'8%



delle wild-type. Le femmine stesse inoltre appaiono più grosse del normale.

Fig. 3: femmina di mutante *Sk2*.

2.5. Mutanti per il gene *lace*

L'enzima serina-palmitoil-CoA transferasi (SPT) catalizza il primo step della via metabolica degli sfingolipidi, ovvero la condensazione di un acil-CoA con una serina, a dare 3-ketodiidrosfingosina. Da esso sembra dipendere il tasso della sintesi *de novo* degli sfingolipidi nella cellula.

La SPT è un etero oligomero formato dalle subunità LCB1 e LCB2 (che

costituiscono entrambi l'apoenzima), collocato nel plasmalemma. La sua prima evidenza genetica si ebbe in *Saccharomyces cerevisiae*, quando venne isolato un mutante incapace di sintetizzare gli sfingolipidi complessi, se non con apporto esogeno di fitosfingosina (Wells and Lester, 1983).

In *Drosophila* il gene *lace*, annotato come CG4162, codifica per la subunità LCB2 della SPT. Consiste di 4 esoni, e si trova nel braccio sinistro del cromosoma II, nella regione 35D1-4. Il suo prodotto è una proteina di 597 aa, con alto grado di similarità con l'omologo di topo (57% d'identità). L'espressione del gene *lace* è stata riscontrata in gran parte dei tessuti di *Drosophila* (Adachi-Yamada *et al.*, 1999).

Il mutante *lace*^{l(2)k05305} di *Drosophila* contiene una singola copia di *P-lacW*, un derivato dell'elemento-P, inserito 8-10 bp a monte del punto d'inizio della trascrizione della LCB2. L'inserzione dell'elemento interferisce con la trascrizione del gene, risultando in un mutante ipomorfo; alleli nulli, generati dall'excisione imprecisa di *P-lacW*, sono letali allo stadio embrionale o nel primo stadio larvale (a indicare l'importanza del gene nello sviluppo dell'organismo), e le larve presentano scarsa motilità e scarsa capacità di nutrirsi.

Determinate combinazioni etero-alleleliche di linee di excisione indipendenti riescono a raggiungere lo stadio adulto, e sono considerate combinazioni alleleliche ipomorfiche. Tali adulti sviluppano anomalie in diversi organi esterni: l'ala presenta il margine inciso, e possiede una vena trasversale ectopica; nell'occhio composto, la disposizione esagonale degli ommatidi è alterata, specialmente sul piano equatoriale dell'occhio; nel notum le microchete sono apigmentate o assenti, mentre il numero delle macrochete varia; raramente, si è osservata la biforcazione della porzione distale di zampe e antenne (Adachi-Yamada *et al.*, 1999). Quindi *lace* è richiesto per il corretto sviluppo di diversi dischi immaginali; l'enzima regola la concentrazione intracellulare di ceramide, che induce la morte cellulare, e i fenotipi aberranti dei mutanti *lace* sono dovute alla mancata regolazione del



processo apoptotico (i dischi immaginali delle larve mutanti presentano un alto numero di cellule morte).

Fig. 4: mutante *lace*.

2.6. La neuropatia sensoriale ereditaria di tipo 1

Il recente sequenziamento del genoma di *Drosophila melanogaster* fornisce la possibilità di rilevare se in esso è presente una controparte genetica di alcune malattie genetiche ereditarie umane; ed in effetti si è trovato che almeno il 62% dei geni umani causanti diverse patologie, sembra essere conservato nel moscerino (Fortini *et al.*, 2000).

La neuropatia sensoriale ereditaria di tipo 1 (HSN1) è una malattia degenerativa umana determinata da alterazioni del metabolismo sfingolipidico (Bejaoui *et al.*, 2002). Si tratta di una neuropatia che colpisce prevalentemente gli arti, a cominciare dalle loro estremità: i primi sintomi sono la perdita di sensibilità a temperatura e dolore ed una progressiva formazione di ulcere; si giunge a lesioni cancrenose delle dita, che spesso devono essere amputate. Si ha poi anche la degenerazione dei motoneuroni, e la denervazione dei muscoli distali degli arti, che porta ad un'atrofia secondaria.

La HSN1 è una malattia autosomica dominante, e ne sono state trovate tre varianti genetiche; una di queste presenta una mutazione missenso nel gene SPTLC1, che codifica la subunità LCB1 della serina-palmitoil-CoA transferasi (l'enzima chiave della sintesi degli sfingolipidi). In uno studio recente (Bejaoui *et al.*, 2002) si è riscontrato che nei pazienti affetti da HSN1 l'attività specifica della SPT è ridotta del 50% circa, e nei loro linfoblasti, posti in coltura, si ha una ridotta sintesi di sfingolipidi. Tuttavia non è ancora stabilito precisamente quali (e quanti) aspetti del metabolismo sfingolipidico siano coinvolti nella determinazione di questa grave e dolorosa malattia; si ipotizza che vi sia una relazione, ancora da chiarire, tra varie mutazioni enzimatiche della via sintetica e gli effetti sul sistema nervoso. L'utilizzo di organismi modello come topo o *Drosophila* può rivelarsi utile in questo senso: sarebbe ad esempio possibile condurre esperimenti di vario tipo sui ceppi mutanti di *Drosophila* disponibili (fra cui i tre descritti in precedenza); tali esperimenti si potrebbero focalizzare sullo sviluppo e la funzione del sistema nervoso, sia mediante test comportamentali (che forniscono informazioni sulla funzionalità di recettori sensoriali, dei circuiti di elaborazione centrali, eccetera), sia mediante analisi morfologiche (ad esempio del sistema nervoso centrale e delle giunzioni neuromuscolari).

2.7. *Drosophila* come organismo modello

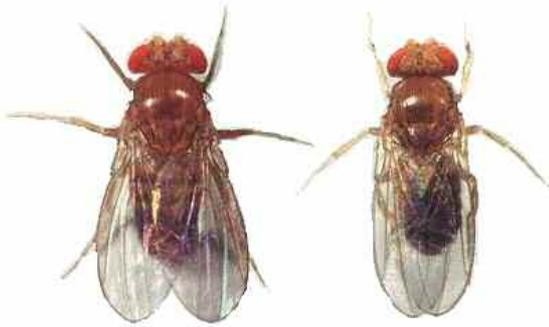


Fig. 5: *Drosophila melanogaster*. A sinistra una femmina, a destra un maschio (tratto e modificato da *Flymove*).

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

Grazie alla sua versatilità è stato utilizzato sin dai primi anni del '900 come organismo sperimentale in numerosi e diversi studi, genetici e non solo (Rubin, 1988). Il moscerino della frutta è comunemente reperibile e relativamente semplice da allevare; le piccole dimensioni permettono di manipolarlo facilmente, e di mantenerlo senza eccessive spese. Il ciclo vitale di *Drosophila* è breve e la sua fecondità elevata, caratteristiche che rendono possibile ottenerne un gran numero di individui, e di diverse generazioni, in poco tempo. Inoltre il suo genoma, composto da 4 cromosomi, è circa 1/20 di quello di mammifero: ciò ha facilitato l'analisi genetica, l'isolamento di svariati ceppi mutanti ed il sequenziamento dell'intero genoma. Tutto ciò rende il moscerino della frutta particolarmente idoneo ad approcci sperimentali multidisciplinari: mentre alcuni problemi posti dalle indagini sulla biologia delle cellule eucariotiche sono meglio affrontati adoperando il lievito (organismo unicellulare) o colture cellulari tratte da animali più complessi, altri aspetti possono essere capiti solo studiando un organismo *in vivo*: ad esempio, il processo sotto studio può coinvolgere un comportamento, non comprensibile guardando alle proprietà di singole cellule.

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

nel corteggiamento e nell'apprendimento; Schwärzel, 2003).

Le risposte fornite dai diversi esperimenti su *Drosophila* possono essere rilevanti per mammiferi come *Homo*: l'alto grado di omologia, trovato per un vasto range di molecole fondamentali, si estende in molti casi anche ad un'omologia funzionale. Ciò suggerisce che i meccanismi basilari per lo sviluppo e la sopravvivenza degli organismi pluricellulari si instaurarono ben prima della divergenza evolutiva tra i progenitori del moscerino e quelli dell'uomo, 500 milioni di anni fa (Rubin, 1998).

2.8. Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*

Il ciclo vitale del moscerino della frutta, dalla schiusa dell'uovo all'emersione dell'*imago*, dura circa 192 ore, se lo si considera ad una temperatura costante di 25°C (Bodenstein, 1950).

Le uova fertilizzate in genere sono deposte subito dopo l'accoppiamento (in casi molto rari cominciano a svilupparsi "*in utero*"; Ashburner, 1989). Le larve schiudono 22-24 ore dopo, ed iniziano immediatamente a nutrirsi. I tre stadi larvali (*L1*, *L2* e *L3*) durano rispettivamente 24, 24 e 48 ore; ad ogni muta (due in tutto) la cuticola, l'armatura boccale e gli spiracoli sono ricostruiti, e si formano le strutture tipiche dello stadio successivo. Gli organi interni puramente larvali, come le ghiandole salivari, si accrescono per aumento di dimensioni delle singole cellule, mentre i dischi immaginali, da cui deriveranno le strutture dell'adulto, si accrescono per moltiplicazione cellulare (Bodenstein, 1950).

Nello stadio *L1* la larva si muove sulla superficie del mezzo nutritivo, e solo nello stadio *L2* si affossa nel cibo. Qui resta per la gran parte del secondo e terzo stadio, lasciando sporgere all'aria soltanto gli spiracoli posteriori. Man mano che le larve si sviluppano, il mezzo nutritivo va incontro a notevoli cambiamenti di pH e della microflora (Ashburner, 1989). La larva *L3* passa poi dalla fase *feeding* alla fase *wandering*, in cui lascia il mezzo nutritivo in cerca di un luogo adeguato per formare il pupario; ciò avviene circa a 120 ore dalla deposizione dell'uovo.

La *Drosophila* selvatica di solito si impupa quando è buio: il corpo si accorcia, si ha l'eversione degli spiracoli anteriori e l'indurimento della cuticola larvale. Appena formato, il pupario è soffice e bianco (in questo periodo infatti la sua formazione è potenzialmente reversibile, qualora la larva dovesse fuggire).

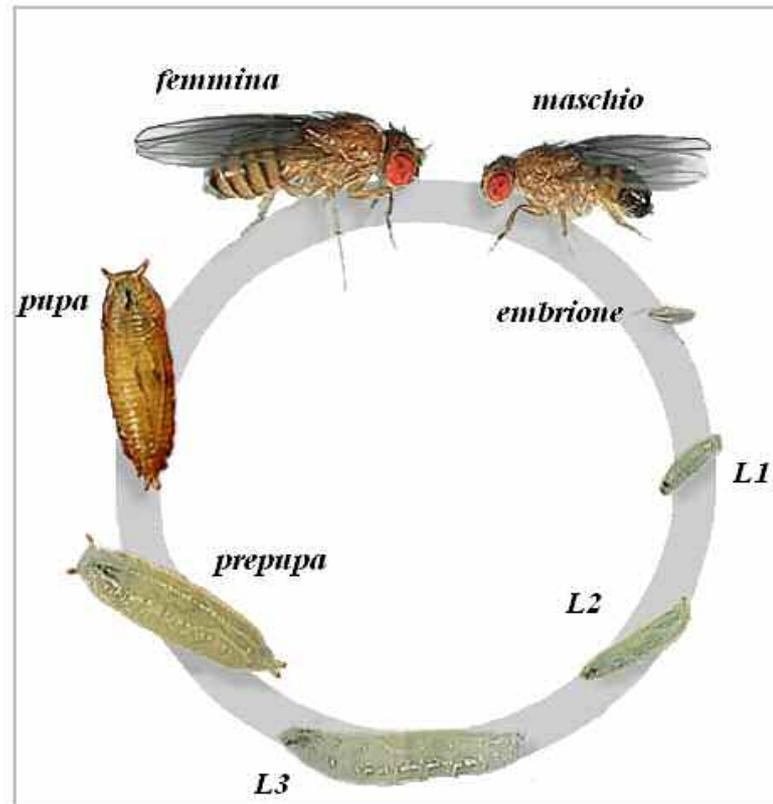


Fig. 6: ciclo vitale di *D. melanogaster*. *L1*, *L2*, *L3*: primo, secondo e terzo stadio larvale (tratto e modificato da *Flymove*).

Dopo 4-6 ore avviene l'apolisi, cioè la retrazione dell'epidermide dalla cuticola dello stadio precedente. Tra la formazione del pupario e l'apolisi l'animale è definito *prepupa*. La pupa vera e propria dura solo 24 ore, fino alla sua schiusa. Le ali dell'*imago* appena sfarfallata sono scure e piegate, il corpo è di colore chiaro, e di forma assottigliata. L'aspetto definitivo si ha circa un'ora dopo. Le femmine divengono sessualmente ricettive solo dopo 12-14 ore, e la loro fecondità è aumentata in presenza di maschi (Ashburner, 1989).

2.9. Sistema nervoso centrale della larva

Come in altri insetti, il sistema nervoso dei Ditteri origina da neuroblasti che si differenziano dall'ectoderma nell'embrione precoce (Bodenstein, 1950).

Il sistema nervoso centrale (CNS) della larva di *D. melanogaster* è formato da due emisferi cerebrali, connessi ventralmente, e da un complesso ganglio ventrale. Il tutto si trova nel terzo segmento toracico, e si prolunga fino alla fine del primo segmento addominale. Il punto di connessione degli emisferi è attraversato

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

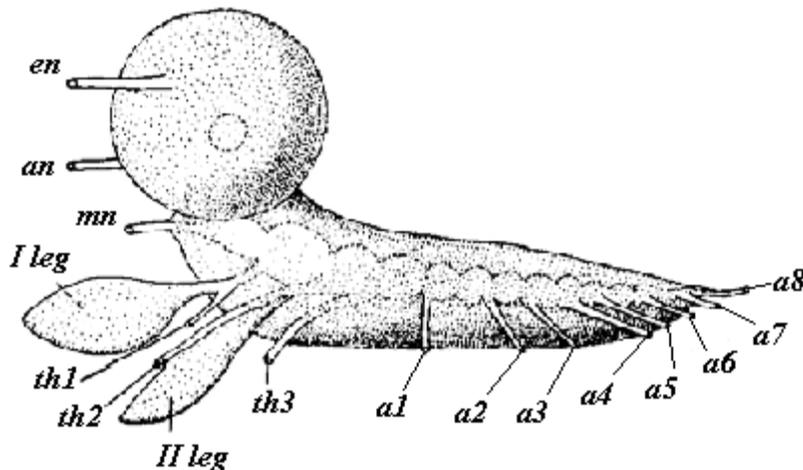


Fig. 7: sistema nervoso centrale della larva. *en*: eye nerve; *an*: antenna nerve; *mn*: maxillary nerve; *th1*, *th2*, *th3*: thoracic nerve 1, 2, 3; *a1-a8*: abdominal nerve 1-8 (modificato da BodenstEIN, 1950).

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

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

presente nell'adulto. I tre gangli toracici rimarranno separati, mentre quelli addominali si uniranno in un'unica massa nervosa.

2.10. Organi di senso della larva

La cuticola esterna della larva presenta un gran numero di piccolissimi organi di senso, che possono assumere la forma di peli e setole di varia foggia. Questi sensilla sono organizzati in filari lungo i fianchi dell'animale, e sembrano fungere da organi tattili o da chemiorecettori. Nel segmento cefalico si trova invece il complesso antenno-massillare, i cui organi assolvono alla funzione gustativa; i nervi antennali e massillari che lo raggiungono formano dei gangli proprio sotto di esso (Bodenstein, 1950). Gli organi appartenenti al complesso sono il dorsale (DO), il terminale (TO) ed il ventrale (VO).

Il DO, che assolve anche alla funzione olfattiva, consiste di una cupola con migliaia di pori ove alloggiato i dendriti di 21 paia di neuroni recettori olfattivi (ORN). La cupola è circondata da 6 piccoli sensilla aggiuntivi, dei “peli” in grado di recepire le molecole odorose ambientali.

I 35-40 neuroni dell'intero DO afferiscono al sottostante ganglio comune (che comprende anche gli ORN e le circa 80 paia di neuroni gustativi; Scherer *et al.*, 2003).

Il sistema visivo della larva venne originariamente descritto in *Musca domestica* da Bolwig (1946). Nella larva di *Drosophila*, similmente, il sistema si compone di due gruppi bilaterali di 12 cellule fotorecetrici, localizzate anteriormente e giustapposte rispetto agli uncini boccali. Gli assoni delle cellule fotorecetrici formano il nervo ottico, che raggiunge l'area del primordio del lobo ottico negli emisferi cerebrali (Busto *et al.*, 1999).

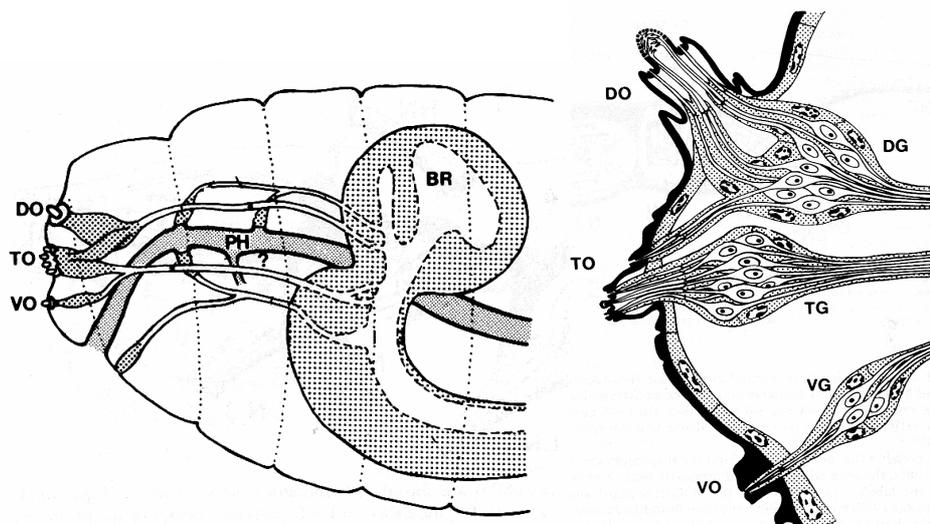


Fig. 8: organi chemiosensoriali della larva. DO: dorsal organ; DG: dorsal ganglion; TO: terminal organ; TG: terminal ganglion; VO: ventral organ; VG: ventral ganglion; BR: brain (modificato da Stocker, 1994).

2.11. Sistema nervoso centrale dell'*imago*

Il CNS degli insetti consiste tipicamente di una massa nervosa cefalica (la cui porzione sopraesofagea è il "cervello"), connessa ad una serie di gangli mediani arrangiati metamericamente, costituenti un cordone nervoso ventrale. In *Drosophila* tale cordone è consolidato in due masse gangliari collocate unicamente in testa e torace. Il cervello risiede all'interno della testa, tra i 2 occhi composti; include il *protocerebro* mediano; il *deutocerebro*, evidenziato da due sporgenze anteriori da cui emergono i nervi delle antenne; ed il *tritocerebro* vestigiale, non visibile esternamente. Ai due lati del protocerebro si espandono i lobi ottici, che lo connettono quindi direttamente agli occhi composti.

All'interno del protocerebro, ai lati della sua parte mediana, sono riconoscibili due corpi fungiformi (MBs, *mushroom bodies*); si tratta di densi gruppi di fibre e glomeruli, derivanti soprattutto da neuroni associativi della corteccia cerebrale, che presentano un "calice" terminale espanso ed un lungo peduncolo (Miller, 1950).

2.12. Organi di senso dell'*imago*

Gli epiteli olfattivi della *Drosophila* adulta si localizzano principalmente in due

paia di appendici cefaliche: il terzo segmento delle antenne (*funiculus*) ed i palpi massillari (Stocker, 1994); queste regioni chemiosensoriali sono raggiunte dai dendriti di più di 1300 ORN (e da circa 650 paia di neuroni gustativi; Scherer *et al.*, 2003). Gli stimoli olfattivi sono captati da 60 proteine recettrici degli odori (OR) espresse in queste appendici; le OR trasducono poi il segnale tramite l'attivazione di proteine-G, esattamente come avviene per i mammiferi, nei rispettivi epitelii olfattivi (Matsunami and Amrein, 2003).

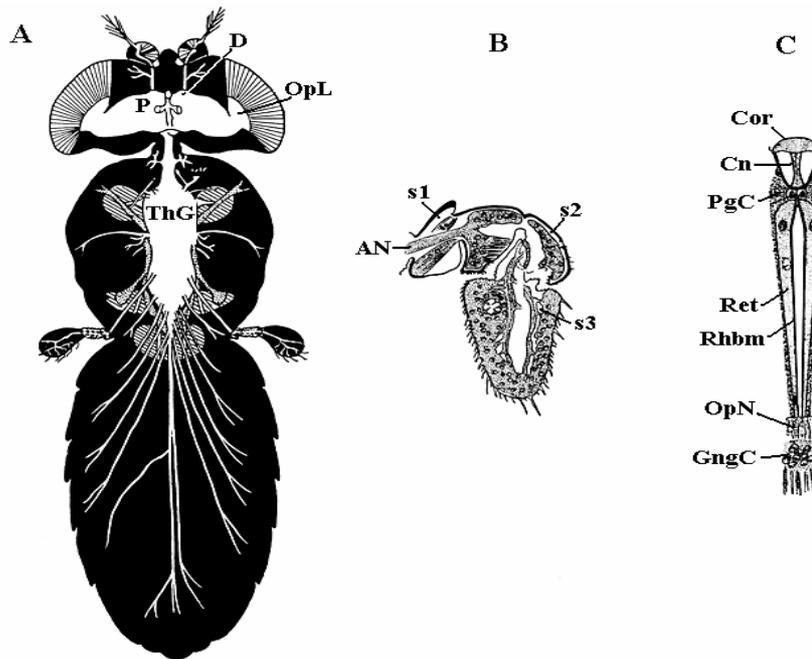


Fig. 9: (A) Sistema nervoso centrale dell'*imago*. D: *deutocerebrum*; P: *protocerebrum*; OpL: optic lobe; ThG: thoracic ganglion. (B) Antenna. s1, s2, s3: segment 1, segment 2, segment 3; AN: antennal nerve. (C) Ommatidio dell'occhio composto. Cor: corneal lens; Cn: crystalline cone; PgC: pigment cell; Ret: retinular cell; Rhbm: rhabdomere; OpN: optical nerve fiber; GngC: ganglion cell (modificato da Miller, 1950).

L'informazione giunge dunque al corpo cellulare degli ORN, ed attraverso gli assoni è inviata ai lobi antennali del cervello; nei mammiferi però tutti gli assoni degli ORN convergono allo stesso glomerulo nel bulbo olfattivo, mentre in *Drosophila* gli ORN si dividono in gruppi distinti, a seconda del tipo di recettore olfattivo espresso, che convergono in diversi subset di glomeruli nel lobo antennale (Schwärzel, 2003).

Nel moscerino adulto i sistemi olfattivo e gustativo sono molto più distinti che

nella larva; il secondo è distribuito un po' in tutto il corpo dell'insetto (nei palpi labiali, nella faringe, nelle zampe, nel margine dell'ala e nei genitali della femmina; Stocker, 1994).

Gli occhi composti contengono 650-700 ommatidi ciascuno, e sono fra i più complessi di tutti gli insetti. Ogni ommatidio dal lobo ottico cerebrale arriva alla superficie della cuticola, e consiste di una cornea distale, una retina con 8 cellule fotorecetriche che circonda il raddomero assiale, delle cellule pigmentate (che nei moscerini selvatici sono rossastre), un cono cristallino, ed alcune cellule di supporto. La membrana alla base dell'ommatidio è perforata dalle fibre nervose ottiche (Miller, 1950).

Come nella visione dei Vertebrati, anche nel moscerino la trasduzione visiva avviene tramite un percorso di proteine-G accoppiate (di tipo diverso rispetto ai Vertebrati). La rodopsina, contenuta nel raddomero, è la proteina che assorbe la luce; quando cattura un fotone, diviene metarodopsina (la forma attiva) ed attiva la proteina-G. Entrano quindi in funzione la calmodulina e la protein-chinasi C (PKC), ed altre molecole specifiche per la visione.

2.13. Apprendimento e memoria

L'apprendimento e la memoria sono forse le proprietà più complesse e sofisticate del comportamento. La plasticità comportamentale dimostrata da un animale è governata dalla sua life-history: le esperienze vissute portano l'individuo a modificare il proprio comportamento; la memoria può considerarsi come l'immagazzinamento ed il richiamo di tali esperienze. L'apprendimento è classicamente suddiviso in associativo e non-associativo. Il secondo tipo si può presentare in due forme: l'*abituazione* è la riduzione di una risposta riflessa a uno stimolo che si presenta ripetutamente; la *sensibilizzazione* è invece la perdita dell'abituazione, quando all'individuo è presentato uno stimolo molto forte: a stimolazioni successive la risposta sarà più accentuata.

L'*apprendimento associativo* fu studiato da Ivan Pavlov negli anni '20, con il famoso esperimento condotto sui suoi cani. Essi alla vista del cibo mostravano una forte risposta comportamentale, la salivazione. Viceversa, sembravano indifferenti al trillo di un campanello. Pavlov, presentando ai cani per diverse volte il cibo contemporaneamente al suono del campanello, riuscì in seguito ad

osservare la loro salivazione anche solo con la comparsa di quest'ultimo: i cani avevano associato il cibo ("*stimolo incondizionato*") al suono ("*stimolo condizionato*").

Anche gli adulti e le larve di *Drosophila* sembrano in grado di apprendimento associativo, per di più mostrando una memoria notevole (Connolly and Tully, 1998): gli adulti sarebbero in grado di formarsi una memoria per la vita, e le larve, in seguito ad un adeguato addestramento, possono mantenere un ricordo che persiste anche dopo la metamorfosi.

2.14. Comparsa e fasi della memoria

Nei diversi esperimenti condotti su *Drosophila*, immediatamente dopo un addestramento le risposte dei moscerini riflettono sia gli effetti dell'apprendimento che della memoria a breve termine (STM).

La memoria si può misurare testando gli animali a intervalli di tempo sempre più lunghi dopo l'addestramento, e sembra dipendere dalla modalità dello stesso (quanti cicli di training, se spazati o meno da intervalli...; Connolly and Tully, 1998). I moscerini selvatici, dopo un solo ciclo di addestramento, mostrano un caratteristico decremento dell'indice di performance: in genere dopo 3 ore questo è dimezzato, e dopo un giorno non se ne ha più traccia, dopo 10 cicli serrati di training, la memoria persiste più a lungo (decade dopo 3- 4 giorni). Quando i cicli d'addestramento sono spazati da intervalli di riposo, la memoria prodotta sembra durare più a lungo: dopo 24 ore l'indice di performance è quasi dimezzato, ma è ancora osservabile dopo una settimana (Connolly and Tully, 1998).

Si sono ricercati, utilizzando diversi approcci, i determinanti della curva di decadimento della memoria in *Drosophila*; si è scoperto che, nonostante la curva appaia relativamente monotona, sarebbe in realtà suddivisa in fasi temporalmente distinte, che contribuirebbero al suo andamento (Schwärzel, 2003).

La memoria a breve termine (STM) appare immediatamente dopo l'acquisizione, e perdura per circa un'ora; nell'ordine di minuti, compare la memoria a medio termine (MTM), che persiste per circa 3 ore; la memoria anestesia-resistente (ARM) è evidente dopo mezz'ora dall'addestramento, serrato o intervallato, e può durare anche fino a 4 giorni dopo; infine, la memoria a lungo termine (LTM) è indotta entro ore di training intervallato, e sembra perdurare indefinitamente

(Connolly and Tully, 1998).

Tale suddivisione della memoria è comunemente accettata, ed è condivisa sia da sistemi di Vertebrati che di Invertebrati.

Nei mammiferi, la comunicazione tra diverse regioni del cervello (*anello limbico*) permette di consolidare un evento appena vissuto in forme di ricordo stabili, ognuna in diverse strutture anatomiche (Schwärzel, 2003).

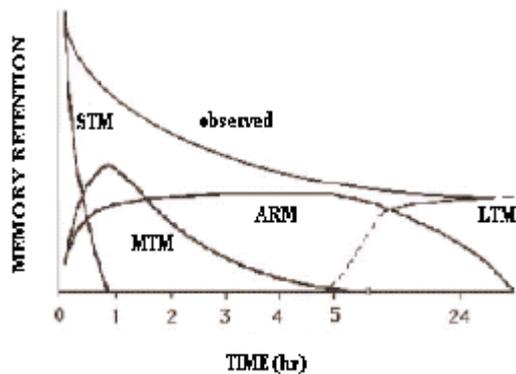


Fig. 10: curva di decadimento della memoria, con le sue diverse fasi. STM: memoria a breve termine; MTM: memoria a medio termine; ARM: memoria anestesia-resistente; LTM: memoria a lungo termine (Tratto e modificato da Dubnau *et al.*, 2003).

2.15. Apprendimento olfattivo

Il sistema olfattivo e la capacità di apprendere sono caratteristiche universali fra gli organismi animali (Hendel *et al.*, 2005). Il primo ha evoluto la capacità di riconoscere e di discriminare un numero variabile di odori chimicamente distinti; essi possono segnalare la presenza di cibo, la vicinanza di predatori e partner sociali per l'accoppiamento (Larsson *et al.*, 2004); l'apprendimento associativo è cruciale per un organismo, poichè gli permette di prevedere questi eventi o altri cambiamenti nelle condizioni ambientali. Tali predizioni consentono quindi all'animale di avere una reazione anticipata di importanza vitale, per la riproduzione o la propria stessa sopravvivenza (Scherer *et al.*, 2003).

Si può definire l'apprendimento come il cambiamento comportamentale di un animale in seguito a date esperienze, e la memoria come il permanere nel tempo di tale cambiamento. A questa plasticità del comportamento è sottesa la plasticità delle sinapsi nervose ("dogma centrale della memoria"; Schwärzel, 2003). Si crede cioè che alla memoria olfattiva corrisponda una modifica a livello dei singoli neuroni. All'arrivo di uno stimolo olfattivo si innesca un meccanismo molecolare che è stato ben caratterizzato anche per *Drosophila melanogaster*; nel CNS di vertebrati ed invertebrati intervengono importanti monoammine neuroattive, coinvolte nell'elaborazione degli stimoli sensoriali. Esse possono

agire da neurotrasmettitori, neuromodulatori o neuroormoni. Negli insetti, monoammine quali la dopamina (DA) e ottopamina (OA) agiscono legandosi a specifici recettori di membrana accoppiati a proteine-G; alla loro attivazione segue un cambiamento nella concentrazione intracellulare di secondo messaggero (in genere cAMP o Ca^{2+}). Se è attivata una proteina-Gs, la sua subunità α interagirà con l'adenilato ciclasi (AC), portando ad un incremento di produzione di cAMP dall'ATP, e alla conseguente attivazione della PKA (proteinchinasi cAMP-dipendente). Questa chinasi agisce su diverse proteine substrato (canali ionici voltaggio- o ligando-dipendenti, fattori di trascrizione...), e il risultato di tutto il meccanismo sarà un potenziamento della trasmissione sinaptica. Al contrario, se il recettore di partenza interagisce con una proteina-Gi, l'attività della AC sarà inibita (così come la trasmissione sinaptica). I mutanti di moscerino *dunce* e *rutagaba* presentano la via di segnale del cAMP alterata: il primo è difettoso in una cAMP fosfodiesterasi, il secondo mutante manca dell'adenilato ciclasi (la ciclasi *rut* è omologa a quella di tipo 1 di mammifero).

Essendo *rutagaba* un mutante per la memoria, si stabilì che la ciclasi *rut* fosse la molecola coinvolta nell'associazione tra lo stimolo condizionato (CS, in questo caso l'odore) e quello incondizionato (US) durante l'apprendimento associativo.

I geni *dunce* e *rutagaba* in *Drosophila* sono particolarmente espressi in un set di cellule intrinseche dei corpi fungiformi (MBs), le Kenyon cells. Ve ne sono circa 2500 per ogni MB, e mandano i loro assoni alla parte anteriore del cervello; esse ricevono l'informazione olfattiva attraverso il calice dei MBs, e rappresentano il punto anatomico di ricezione della coincidenza tra CS e US.

La plasticità sinaptica nell'output delle Kenyon cells è sufficiente per la formazione di una memoria olfattiva (Schwärzel, 2003).

Si è scoperto che nel moscerino intervengono monoammine diverse a seconda dello stimolo ricevuto: se questo è positivo (ad esempio un gusto dolce), la sua capacità rinforzante è dovuta all'azione della octopamina (OA); se lo stimolo è negativo (come uno shock elettrico) interviene la dopamina (DA; anche in *Apis mellifera*, la OA ha dimostrato di innescare il riflesso dell'estensione della proboscide in presenza di zucchero. Al contrario, nella scimmia, i neuroni cerebrali dopaminergici sono selettivi più per stimoli positivi che per quelli negativi, durante il condizionamento).

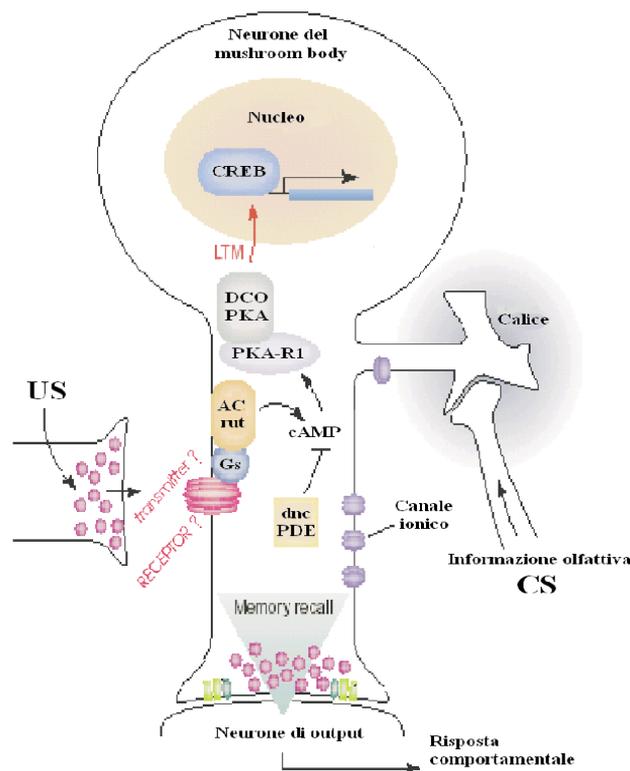


Fig. 11: meccanismo molecolare dell'apprendimento associativo. All'arrivo dello stimolo incondizionato (US) e con l'attivazione della proteina-Gs si attiva l'adenilato ciclasi *rut* (AC *rut*); aumenta il livello di cAMP nel neurone, e si attiva la proteinchinasi PKA. Dnc PDE: cAMP fosfodiesterasi codificata da *dunce*; DCO PKA: subunità catalitica della PKA; PKA-R1: subunità regolativa della PKA; CREB: fattore di trascrizione nucleare; LTM: long term memory; CS: stimolo condizionato (modificato da Waddell and Quinn, 2001).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Mantenimento delle *drosophile* in laboratorio

Tutte le linee di *Drosophila melanogaster* utilizzate in laboratorio sono mantenute in tubi di coltura, dei cilindri di plastica trasparente alti 8,5 cm con una base di 3,5 cm di diametro. I tubi sono riempiti per circa un quarto di terreno di coltura, che è composto dai seguenti ingredienti (quantità riferite alla preparazione di 2 litri di *medium*):

- 88 g di zucchero
- 88 g di lievito inattivato
- 24 g di agar

- 2 litri di acqua

Una volta messe a bollire in autoclave queste componenti, vengono poi lasciate a raffreddare finché non raggiungono una temperatura di circa 40°C; a questo punto sono aggiunti 40 g di nipagina, un antimicotico, sciolti in 40 ml di etanolo 95%. La nipagina è necessaria per evitare, quanto possibile, eventuali infezioni da parte di funghi ai tubi di coltura. Ogni tubo è chiuso con un tappo di gommaspugna, che lascia passare l'aria e limita l'infiltrazione di acari (commensali o parassiti delle *drosophile*) nel contenitore.

Tutte le linee vengono mantenute in laboratorio, ad una temperatura che si aggira sui 23-25°C, in modo che ricevano luce di giorno e restino al buio di notte.

Perché il medium nutritivo non divenga troppo vecchio e gli animali non si trovino in condizioni di sovraffollamento all'interno dei tubi (e maggiormente esposti alle contaminazioni), vengono periodicamente trasferiti in contenitori nuovi, ogni 15 giorni circa. Qualora un tubo presentasse un'infezione batterica, gli individui possono essere spostati su tubo con terreno nuovo a cui sono stati aggiunti 50 µl di antibiotico (ampicillina e cloramfenicolo, entrambi 7 mg/ml in etanolo 50%).

Per ogni linea genetica di moscerini, vengono conservate delle colture “di scorta” in una cella a 18°C, dove il ciclo vitale dell'insetto è rallentato. I tubi a 18°C sono tenuti in vassoi sul cui fondo è posta della carta assorbente imbevuta di olio minerale (ulteriore difesa dagli acari), e sono cambiati una volta al mese.

3.2. Ceppi di *D. melanogaster* utilizzati

- **Canton-S: Canton Special**

Il ceppo deriva da una popolazione selvatica originaria di Canton, Ohio, i cui moscerini furono selezionati da Bridges (Lindsley and Grell, 1968).

- **SK2**

Il mutante *Sk2* è stato per la prima volta caratterizzato da Harris e Saba nel 2003. Manca dell'enzima sfingosin-chinasi a causa dell'elemento-P inserito presso l'estremità 5' del gene.

- **Sply**

Come *Sk2*, anche questo mutante è stato caratterizzato dallo stesso gruppo di ricerca, nel 2003. È un mutante-nullo, sempre originato dall'inserzione di un elemento-P. Se ne è studiata la muscolatura dell'adulto, la

riproduzione e la vitalità larvale.

Tutti e tre gli stock utilizzati sono stati gentilmente forniti dal Prof. Greg Harris della San Diego State University.

3.3. Studio dell'attività locomotoria larvale

Deficit nell'attività locomotoria possono essere causati da una debilitazione generale, da una malattia, da difetti nel sistema muscolare o dal danneggiamento del sistema nervoso (Connolly and Tully, 1999).

I movimenti ritmici, come le contrazioni peristaltiche, sono dovuti alla funzionalità dei circuiti nervosi del CPG (central pattern generator), nel CNS. Tali circuiti provocano la locomozione dell'animale anche in assenza di informazioni sensoriali esterne; tuttavia il CPG produce movimenti più diretti e rilevanti dal punto di vista "decisionale" quando riceve informazioni dal sistema nervoso periferico. In assenza di queste, le contrazioni saranno scoordinate.

I circuiti del CPG di *Drosophila* si formano e si attivano nella tarda embriogenesi, e persistono lungo tutti gli stadi larvali (Caldwell *et al.*, 2003).

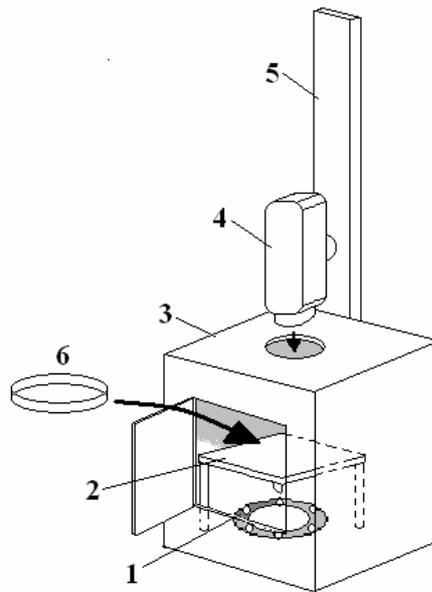
In questo esperimento si è voluto filmare l'attività locomotoria delle larve di *Drosophila*, per poi poterla quantificare. Allo scopo, si fanno muovere larve sopra uno strato di Agarosio 1% (SIGMA[®]), in piastre petri di polistirolo cristallo, del diametro di 94 mm.

Per effettuare le riprese si sono utilizzati:

- Una scatola di cartone alta 32 cm, con base 22x25, che funge da camera di ripresa; vi si è praticato un foro circolare sulla parete superiore, e uno sportellino su una parete laterale;
- Un supporto di plexiglass (15x15 cm) posto dentro la camera, su cui viene appoggiata la petri;
- 6 led bianchi ad alta intensità, che sviluppano molto poco calore, disposti a cerchio sotto il supporto, in modo da illuminare dal basso la piastra; i led vengono coperti da tre fogli di carta velina, per ottenere una luce omogeneamente diffusa;

- Una telecamera digitale Canon MVX3i, sorretta da uno stativo, collocata sopra la camera di ripresa, in modo da poter filmare attraverso il foro circolare.

Fig. 12: schema dell'apparato di ripresa. 1: led luminosi; 2: supporto di plexiglass; 3: camera di ripresa; 4: telecamera; 5: stativo; 6: piastra petri con larva.



Procedimento

A cinque giorni dalla deposizione delle uova, le larve presentano un'intensa attività locomotoria; sono prelevate con un pennello a setole morbide e depositate temporaneamente in una petri contenente qualche goccia d'acqua distillata, dove vengono delicatamente ripulite dai residui di terreno nutritivo. Ciascuna larva viene depositata al centro di una piastra petri; questa viene velocemente introdotta nella camera attraverso lo sportellino, e collocata sul supporto di plexiglass, controllando dallo schermo della videocamera che sia al centro dell'inquadratura. Si richiude lo sportellino ripristinando le condizioni di buio nella camera, e si comincia a filmare.

Ogni singola ripresa dura 2 minuti, o meno se la larva raggiunge il bordo della petri entro questo intervallo di tempo. Ad ogni cambio di larva la piastra deve essere sostituita, in modo che la successiva non sia condizionata dalla traccia lasciata dalla precedente. Per ciascun esperimento sono state effettuate le riprese di 20 larve.

I filmati ottenuti sono esportati in formato Quick-time, e poi analizzati con il software Spotlight-8. Per una buona riuscita del tracking il filmato di base viene inizialmente processato con i filtri '*threshold*', che aumenta il contrasto, e '*arithmetic*', per la sottrazione dello sfondo (ossia rimane soltanto l'immagine della larva) da ciascun fotogramma. Scegliendo quindi l'opzione '*center tracking*' e posizionando il riquadro d'interesse sulla larva, si ottengono le coordinate della sua posizione ogni 0.2 secondi. Dalle coordinate di posizione per ogni raggruppamento di frame, importate in un foglio elettronico Excel, sono state

calcolate:

- velocità media totale (considerando tutto il tempo di campionamento);
- velocità media del moto (considerando solo i momenti in cui la larva si muove);
- percentuale del tempo in cui la larva cambia direzione;
- percentuale del tempo di sosta sul tempo totale.

I dati sono analizzati con test t , eccetto quelli inerenti la lunghezza delle soste e i cambiamenti di direzione, che sono espressi in percentuale. Questi ultimi sono quindi stati confrontati con il test non parametrico di Wilcoxon; a questo scopo è stato utilizzato il software R (<http://www.r-project.org/>).

Per avere una rappresentazione grafica del percorso di una larva, si è poi scelto un filmato, e utilizzando Spotlight-8, si è proceduto di nuovo alla sottrazione dello sfondo. Con il comando '*morphological*' è stato delineato il contorno della larva, e si è effettuato un tracking che ne ha fornito la posizione ogni secondo, in una serie di immagini. Queste poi, con ImageJ, sono state riunite in uno stack, e sovrapposte fra loro.

3.4. Esperimenti di fototassi larvale

Le larve di *Drosophila*, contrariamente agli adulti, sono negativamente fototattiche, e vengono respinte dalla luce (Connolly and Tully, 1998).

Per verificare la fototassi dei diversi ceppi, sono stati eseguiti in laboratorio vari esperimenti, utilizzando la camera oscura con i 6 led bianchi descritta in precedenza.

In un primo tentativo, sopra il supporto di plexiglass è stato posto un riquadro 15x15 di carta da lucido, suddiviso secondo le due diagonali in quattro quadranti: due neri e due lasciati trasparenti.

Ponendo quindi sopra tale disegno una capsula petri con Agarosio 1%, essa vista da sopra apparirà divisa in due zone scure e due illuminate, tra loro opposte (Connolly and Tully, 1998).

Si sono estratte da un tubo di coltura delle larve al terzo stadio, nella fase *feeding*; dopo averle lavate brevemente in acqua distillata, si sono poste al centro di una petri con Agarosio 1%, collocata velocemente sul supporto in plexyglass, in

corrispondenza del disegno a quadranti.

Dopo 5 minuti vengono conteggiate il numero di larve che si trovano sopra le aree nere (e che in teoria sono quindi fuggite dalla luce) e quelle sulle aree illuminate.

L'indice di risposta (RI) è calcolato come:

$$RI = \frac{\text{numero di larve al buio} - \text{numero di larve alla luce}}{\text{numero totale di larve}}$$

Un altro tipo di esperimento è il “Darth Vader assay” (Caldwell *et al.*, 2003). Il principio è uguale a quello dell'esperimento precedente, solo che in questo caso ogni larva è testata individualmente. Non viene più utilizzato il disegno a quadranti, bensì sul fondo della piastra petri è applicato un pezzo di carta stagnola, in modo da farla risultare divisa in una metà chiara (illuminata quando posta sopra i led) ed una metà oscura. Dopo 90 secondi si annota in quale delle due metà si trova la larva. La valutazione del RI è la medesima.

3.5. Esperimento per misurare la fototassi degli adulti

I moscerini sono molto sensibili agli stimoli visivi, quando compresi in una λ tra 350 nm circa (ultravioletto) e 650 nm (rosso lontano).

Un buon metodo per sperimentare l'attrazione che la luce esercita sulle *drosophile* adulte, è quello del labirinto (Connolly and Tully, 1998).

È costituito da una serie di tubi a “T” e a “Y” di 0,32 cm di diametro (i moscerini ovviamente devono essere in grado di passarvi), interconnessi da pezzetti (lunghi circa 1,5 cm) di tubo Tygon; il braccio di ogni tubo a “Y” è lungo 1 cm, e le dimensioni totali del labirinto risultano di 25x25 cm circa.

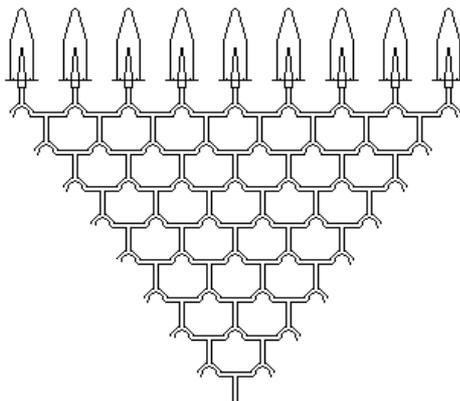


Fig. 13: schema del labirinto utilizzato per la fototassi.

Il labirinto è assemblato in modo da avere un singolo punto d'entrata, e 9 punti d'uscita; una volta che l'adulto vi è introdotto, si troverà di fronte a 8 bivi sequenziali, nei quali dovrà scegliere se andare a destra o a sinistra; alla fine imboccherà una delle 9 uscite. In corrispondenza di ciascuna è infilato un puntale da micropipetta da 200 µl, mozzato per averne l'estremità sottile larga circa 4 mm; il puntale è inserito a sua volta in una eppendorf da 1.5 ml (a cui è stato forato il coperchio). Così una *drosophila* che ha compiuto un percorso, una volta entrata nella provetta non può più tornare nel labirinto.

L'apparato è posto orizzontalmente sul fondo di una scatola scura ; presso la fine del labirinto, sul lato sinistro, è stato collocato un led luminoso: una volta messo il coperchio alla scatola, sarà l'unica fonte di luce che le *drosophile* avranno.

Per ciascun esperimento sono utilizzati 20 moscerini, tutti dello stesso sesso e della stessa età (circa una settimana). Vengono prelevati dal tubo di coltura, addormentandoli con la CO₂, e messi in una eppendorf collegata con tubo Tygon all'entrata del labirinto. Sono sufficienti 10 min perché gli animali si riprendano, ed a questo punto sono introdotti nell'apparato; la scatola viene chiusa ed il led acceso.

Le *drosophile* sono lasciate nel labirinto per 2,5 ore (anche se un'ora sarebbe loro più che sufficiente per attraversarlo tutto; Connolly and Tully, 1998).

Trascorso questo tempo, ad ogni animale viene assegnato un punteggio, a seconda della provetta nella quale è uscito; i moscerini nella provetta all'estremità destra avranno punteggio 0 (ciò indica che ad ogni bivio hanno imboccato la direzione opposta a quella da cui proveniva la luce), mentre quelli nella eppendorf all'estrema sinistra (la più vicina alla luce) ricevono il punteggio 8.

Per un dato genotipo, un punteggio di fototassi è calcolato dal numero di *drosophile* in ogni provetta (Connolly and Tully, 1998).

$$\text{punteggio} = \frac{\sum (\text{n}^\circ \text{ moscerini nella provetta} \times \text{punteggio provetta})}{\text{n}^\circ \text{ totale moscerini arrivati}}$$

Una buona rappresentazione grafica dell'esperimento si ha invece ponendo nell'asse x i punteggi delle 9 uscite, e nell'asse y l'indice di fototassi calcolato per ogni provetta.

Il labirinto viene lavato ed asciugato alla fine di ogni esperimento, per evitare che nella successiva prova i moscerini avvertano le tracce dei moscerini già testati.

3.6. La risposta optomotoria

Nella maggior parte degli animali il sistema visivo ha un ruolo centrale nella guida della locomozione. Il naturale flusso ottico (flusso delle immagini ricevute) risulta sia dalla rotazione e traslazione dell'animale, sia dai movimenti degli oggetti che si trovano nel suo campo visivo. I moscerini sono stati utilizzati come modello per studiare i meccanismi con cui il sistema visivo utilizza il flusso ottico per stabilire un punto di riferimento da fissare; si ebbe evidenza del *riflesso optomotorio* in *Drosophila* quando si vide che degli individui, posti al centro di un pattern a bande verticali che ruotava intorno ad essi, tendevano a girarsi nella direzione in cui si muoveva il disegno. Probabilmente tale risposta interviene per diminuire il flusso ottico attraverso la retina (Tammero *et al.*, 2004).

Esperimento sulla risposta optomotoria

Per questo esperimento è stato adottato lo stesso tipo di labirinto utilizzato per la fototassi. La struttura è adagiata su di una lastra di vetro, che a sua volta si trova sopra il monitor di un computer (posto orizzontale), separata da esso di circa 1.5

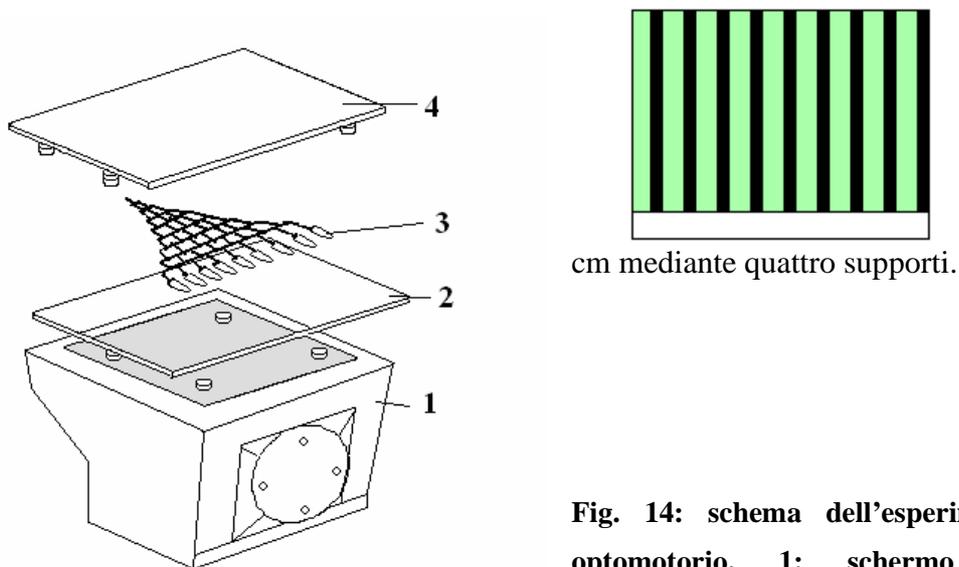


Fig. 14: schema dell'esperimento optomotorio. 1: schermo del computer; 2: lastra di vetro, sopra quattro supporti; 3: labirinto; 4: specchio, rivolto verso il labirinto e leggermente rialzato rispetto ad esso. In alto, schema del pattern.

Lo schermo trasmette un pattern in movimento (da destra a sinistra o viceversa) di bande alternate verdi e nere (Van Swinderen and Flores, 2006). Il pattern comprende anche una fascia trasversale bianca, luminosa, posta giusto sotto alle provette di raccolta: questa fascia dovrebbe fungere da stimolo di fototassi, per indurre i moscerini a raggiungere la fine del labirinto.

Le bande del pattern sono state generate con Corel-RAVE (programma usato per animazioni) ed esportate in formato *.mov*. Con ImageJ si è stabilito il numero di frame/secondo, e quindi la velocità che avrà lo scorrimento. Per visualizzare il pattern in movimento è stato utilizzato Quick-time.

Sopra il labirinto, separato di circa 2 cm, è stato posto uno specchio, in modo che lo stimolo visivo sia riprodotto anche sopra la testa degli animali. Il tutto è coperto da un panno nero. Si prevede che le *drosophile*, una volta immesse nel labirinto, lo percorrano imboccando ad ogni bivio il braccio di sinistra (o di destra), verso la direzione in cui scorrono le bande.

Si sono eseguiti molteplici tentativi, variando le caratteristiche del pattern (velocità di scorrimento, larghezza delle bande), la distanza del labirinto dallo schermo, ed il tipo di monitor.

Ogni gruppo di *drosophile* è lasciato nel labirinto per 30 minuti.

Valutazione

Le nove provette d'uscita corrispondono a valori che vanno, da sinistra a destra, da + 4 a - 4. Come per la fototassi, ogni moscerino alla fine del labirinto riceve un punteggio a seconda della provetta in cui è uscito; si calcola la somma totale dei punteggi (sia negativi che positivi) e la si divide per il numero dei moscerini.

Buoni risultati sono stati ottenuti su di un monitor CRT (a tubo catodico) SONY multiscan 210 ES, con una risoluzione di 1024x768. 85 Hz, un contrasto del 95% e luminosità del 90%. Il pattern scelto è costituito da bande nere larghe 1.15 cm (viste dal monitor) e bande nere larghe 2.2 cm, circa il doppio. Il disegno scorre ad una velocità di 2.2 Hz.

3.7. Esperimenti di preferenza e memoria olfattiva

La capacità di apprendere è una caratteristica universale nel regno animale; si presume quindi che anche le larve di *Drosophila*, sottoposte ad un certo addestramento, siano capaci di un apprendimento associativo. Negli esperimenti di memoria olfattiva, si cerca di far loro associare un odore (lo *stimolo condizionato*, secondo il modello sviluppato da Pavlov negli anni '20) ad un sapore (lo *stimolo incondizionato*).

È dimostrato che le larve trovano appetibili dei substrati dolci, e vengono invece respinte da sostanze salate o amare (s'è visto che, in presenza di queste, smettono di mangiare; Hendel *et al.*, 2005).

In questo tipo di esperimenti sono state utilizzate 4 sostanze diverse: 2 stimoli condizionati associati a 2 stimoli incondizionati, l'uno positivo e l'altro negativo per la larva.

- Amilacetato (AM), diluito in olio di paraffina
- 1-ottanolo (OCT), usato puro
- Fruttosio (FRU), rinforzante positivo
- Chinino emiosolfato (QUI), rinforzante negativo.

Preparazione delle piastre petri

È stato innanzitutto preparato un certo numero di piastre petri in polistirolo cristallo, del diametro di 94 mm. Sulla base di ognuna sono stati incollati 2 pozzetti (dei coperchi di provette eppendorf da 0.5 mm), a 5 mm dal bordo della piastra e diametralmente opposti. Per ogni esperimento:

- 18 di queste piastre sono riempite con Agarosio 1%: si sciolgono 5 g di Agarosio in 500 ml di acqua distillata, e si porta ad ebollizione. Poi si versano 25 ml per piastra, in modo che il terreno arrivi all'altezza dei pozzetti, e si lascia raffreddare il tutto.
- 1 piastra è riempita di Agarosio 1% con FRU alla concentrazione 2M, che fungerà da rinforzante positivo: 9 g di fruttosio in 25 ml di Agarosio 1%.
- 1 piastra è stata utilizzata per contenere il terreno con il rinforzante negativo, il QUI, alla concentrazione 0,2%: 0.05 g di QUI in 25 ml di Agarosio 1%.

Prima di procedere con il test di apprendimento, si sono eseguite delle prove di preferenza olfattiva delle larve.

A 4 giorni dalla deposizione delle uova, le larve si trovano nella prima fase del terzo stadio (*feeding larva*), e la loro pressoché unica occupazione è quella di alimentarsi, muovendosi all'interno del mezzo nutritivo; per questo, in tale fase, stimoli odorosi e soprattutto gustativi hanno una rilevanza fondamentale.

20 larve sono state prelevate dalla pappa, e lavate delicatamente in acqua distillata con l'aiuto di un pennellino a setole morbide. Ogni larva è stata posta al centro di una piastra con solo Agarosio, con i pozzetti riempiti l'uno di 5 µl di OCT, e l'altro di 5 µl di AM, diluito 1:50 in olio di paraffina. Per permettere l'aerazione della piastra, in modo che l'animale senta entrambi gli odori, sul centro del coperchio sono stati praticati 15 fori da 1 mm, compresi in una regione di 1 cm di diametro.

Posizionata la larva, le vengono lasciati 5 min per scegliere verso quale odore dirigersi; il tutto avviene all'interno di una scatola scura chiusa, affinché l'animale non venga influenzato dalla luce.

Viene utilizzata una piastra nuova per ogni larva, evitando così che la successiva segua le tracce della precedente.

Valutazione della risposta larvale

La posizione di ogni larva, scaduti i 5 min di scelta, è riportata in un unico foglio su cui si è disegnato il contorno della piastra petri e dei pozzetti. Le larve che vengono trovate sulla parete della piastra, sul coperchio, o all'interno di un pozzetto, non vengono considerate.

Ad una prima osservazione, le larve mostrano un'evidente preferenza l'AM diluito 1:50 in olio di paraffina, piuttosto che per l'OCT (che comunque non le respinge). Si è misurata la distanza (in cm) di ogni larva dal pozzetto con l'AM; l'area di preferenza per questa sostanza è stata stabilita come quella compresa in un raggio pari a metà della distanza fra i due pozzetti, intorno all'AM. Il resto della piastra è considerato area neutra (o comunque non positiva).

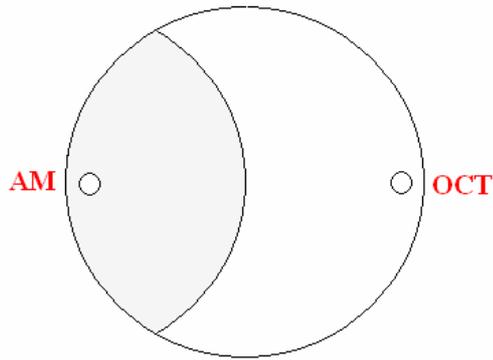


Fig. 15: area di preferenza nella piastra.

L'indice di preferenza è calcolato come:

$$\text{PREF} = \frac{\text{numero larve (area di preferenza AM)} - \text{numero larve (area neutra)}}{\text{numero totale di larve}}$$

Quindi il valore 1 indica la preferenza per l'AM di tutte le larve, 0 significa che non vi è nessuna preferenza, -1 indica la preferenza netta per l'OCT.

Provando a diluire l'AM 1:100, la preferenza per esso diventa meno netta (guardando il disegno, le larve si distribuiscono più equamente). L'indice di preferenza si è calcolato nello stesso modo.

Per le due diluizioni, il numero di larve nell'area di preferenza è riportato in un foglio di lavoro Excel, da cui si è poi costruito un istogramma che rappresenta la percentuale di larve nell'area AM accanto a quella delle larve nell'area OCT (area non positiva).

Per i successivi test di memoria si è preferito adottare la diluizione 1:100 dell'AM, per evitare che la scelta sia dovuta semplicemente alla preferenza olfattiva, e non ad un apprendimento.

Per l'esperimento di apprendimento olfattivo vengono utilizzate 6 larve a 4 giorni dalla deposizione delle uova. L'esperimento in una giornata sarà ripetuto 3 volte (per un totale di 18 larve di un singolo ceppo).

Tutte e 6 insieme sono sottoposte all'addestramento, che consiste in:

- min in una piastra con FRU, con i pozzetti contenenti 5 µl di OCT ciascuno;

- min in una piastra con solo Agarosio, senza odori; 1
- min in una piastra con QUI e i pozzetti riempiti con 5µl di AM (1:100). 1

Questo ciclo è ripetuto per 8 volte; ogni passaggio è svolto al buio, all'interno di una scatola.

Terminato l'addestramento, ogni larva è posta al centro di una piastra con solo Agarosio 1%, con i pozzetti contenenti l'uno OCT e l'altro AM; la piastra viene collocata nella scatola di ripresa preparata per i test sulla locomozione: ogni 20 secondi, per un totale di 4 min di tempo, si effettua uno scatto fotografico per avere la posizione della larva, e misurarne la distanza dal pozzetto "atteso" (quello con OCT) nel tempo.

Ad una prima osservazione non sembra che la luce, proveniente dai led bianchi sotto la piastra petri, disturbi la scelta delle larve: esse sembrano comunque dirigersi decisamente verso la fonte odorosa, il loro moto appare molto più spedito che non nel test di locomozione, effettuato con lo stesso identico apparato.

Si è scelto di associare il QUI all'AM, vista la lieve preferenza delle larve per quest'odore; in caso di un esito positivo dell'addestramento (larve che si dirigono verso l'OCT, associato nei vari cicli al rinforzante positivo) potremmo così essere più sicuri dell'effettivo apprendimento associativo acquisito dalle larve.

Con larve Canton-S si è anche effettuato un addestramento inverso, associando il FRU all'AM e il QUI all'OCT.

Valutazione della risposta

L'intento è quello di registrare la distanza di ogni larva dal pozzetto con l'ottanolo ogni 20 secondi, in un tempo di 4 minuti (quindi 12 registrazioni per larva), per poter costruire un grafico spazio-tempo che rappresenti l'andamento dell'animale nella scelta. Da ogni filmato, esportato in formato Quick-time, si sono estratti i fotogrammi (immagini JPEG) presenti ogni 20 secondi, che vengono quindi compresi in uno stack.

Lo stack è poi elaborato con il programma ImageJ: con l'opzione '*straight line selection*', per ogni fotogramma dello stack, si è tirata dal centro del pozzetto

“atteso” (quello con la sostanza associata al FRU) alla larva una linea, la cui lunghezza è annotata in pixel. Tali dati (lunghezze della linea e tempi corrispondenti) in formato Word sono stati riportati in un foglio Excel da cui si è costruito un grafico che abbia in ascissa il tempo, scandito di 20 secondi in 20 secondi, e in ordinata la distanza della larva dal pozzetto (lunghezza in pixel della linea). Si ha così una rappresentazione grafica del percorso compiuto dall'animale rispetto al pozzetto “atteso”.

Si è provato poi ad ottenere un grafico complessivo di un intero esperimento (18 larve testate), ponendo nell'asse y le medie delle 18 distanze ogni 20 secondi.

Inoltre si è calcolato (Neuser *et al.*, 2005), sempre ogni 20 secondi, l'indice di preferenza delle larve Canton-S e *Sply* per l'OCT, negli esperimenti in cui era associato al rinforzante positivo, o delle Canton-S per l'AM (nell'esperimento "inverso").

3.8. Analisi morfologica delle giunzioni neuromuscolari delle larve

Eventuali alterazioni di comportamenti quali l'attività locomotoria, potrebbero essere ricondotte ad anomalie morfologiche visibili. Nel caso dei mutanti per gli sfingolipidi, i *raft* che compongono le membrane neuronali (sinapsi, vescicole sinaptiche, eccetera) possono essere alterati vista la mancanza o l'eccesso di determinati metaboliti sfingolipidici che fanno parte della loro normale composizione.

Si è utilizzato un approccio immunostochimico per evidenziare le giunzioni neuromuscolari (NMJ) della larve allo stadio *L3*, in fase *wandering*; si procede prima alla dissezione della larva, per ottenerne il *body wall*, in modo da lasciare esposti i muscoli e le giunzioni nervose.

La larva *L3* presenta 8 segmenti corporei, in ognuno dei quali vi è uno schema ripetuto di numerosi fasci muscolari. Ognuno riceve input dai motoneuroni che emergono dal CNS.

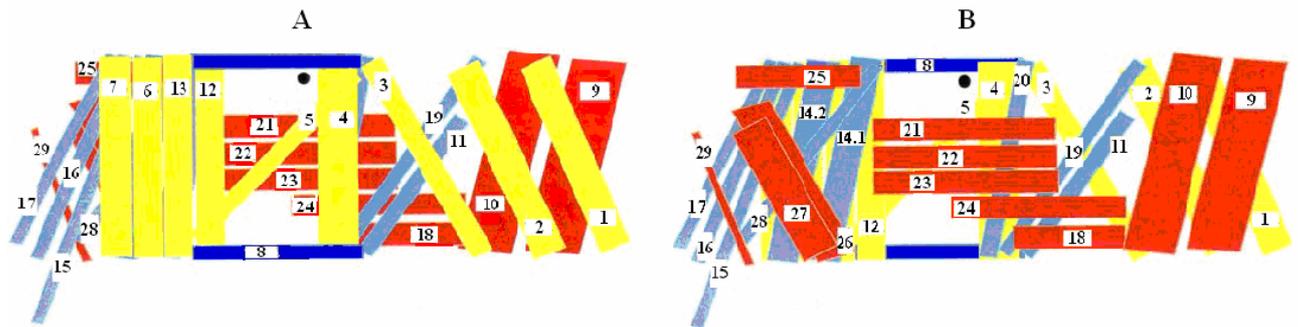


Fig. 16: schema della muscolatura dei segmenti larvali di *Drosophila* dal secondo al settimo. A) veduta dall'interno di un emisegmento; B) veduta dall'esterno. I colori indicano la posizione dei muscoli, dall'interno all'esterno: rossi (più esterni), azzurri, gialli, blu (più interni; tratto e modificato da Bate, 1993).

Dissezione della larva

La larva, prelevata dalla parete del tubo di coltura, è posizionata col dorso rivolto all'osservatore su di un supporto di sylgard (elastomero siliconico), in una goccia di HL3 (*haemolymph-like saline-3*): si tratta di una soluzione salina che mima l'emolinfa della larva ; è necessaria durante la dissezione per mantenere più a lungo i tessuti freschi. Si compone di (Budnik *et al.*, 2006):

- MgCl₂, 20 mM
- KCl, 5 mM
- NaCl, 70 mM
- NaHCO₃, 10 mM
- HEPES, 5 mM
- Saccarosio, 115 mM
- Trealosio-2H₂O, 5 mM.

Sotto lo stereomicroscopio, la larva viene immobilizzata con due aghi da entomologia, uno infilato dietro gli uncini boccali e l'altro fra i due spiracoli posteriori. Gli aghetti sono maneggiati con micropinzette. Si aggiunge quindi altro HL3. Con forbicine da microdissezione si pratica un taglio longitudinale sulla cuticola dorsale dell'animale, fra le due tracheole che sono ben evidenti. I lembi della cuticola tagliata vengono tirati con le pinzette verso l'esterno e fissati con 4 aghi in tutto (2 nella parte anteriore, 2 nella posteriore) al supporto, per avere la larva completamente aperta. Le tracheole sono sezionate dal basso ed asportate,

tagliando una ad una le loro diramazioni principali; in questo modo anche gli organi interni vengono tolti. Alla fine resta il *body wall* larvale ed il cervello, da cui dipartono i nervi che raggiungono i vari muscoli.

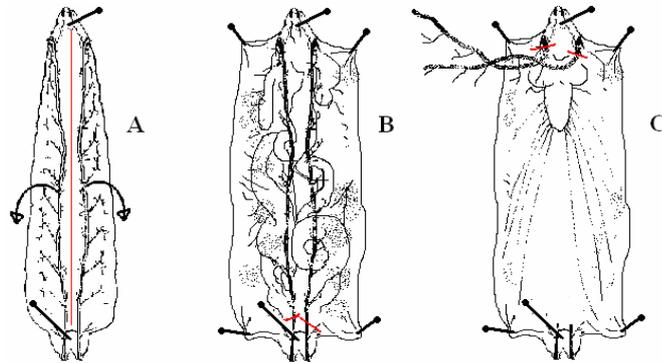


Fig. 17: dissezione della larva al terzo stadio. A: larva fissata con gli spilli, la linea rossa indica il successivo taglio longitudinale (vista dorsale). B: larva aperta con cuticola stesa e fissata, viscere esposte. C: tracheole sezionate e organi interni asportati, resta il *body-wall* con il CNS ed i nervi che raggiungono i vari muscoli.

Fissaggio e colorazione con l'anticorpo

Il *body wall* così ottenuto, ancora fissato al sylgard, è trattato nel seguente modo:

- lavaggio rapido con PBS 1x;
- fissaggio in paraformaldeide 4% pH: 7,3 (PFA) per 3 ore almeno;
- estrazione degli aghi da entomologia dal preparato fissato; questo viene sottoposto a 3 lavaggi di 15 min in una eppendorf con PBST 0,05% (PBS+Triton) in cella a 4°C;
- permeabilizzazione del tessuto con PBST 0,3% per 30 min a 4°C;
- blocco dei siti di legami aspecifici con BSA 1% per 1 ora a 4°C;
- trasferimento della larva in una eppendorf con PBSTA 0,1% (BSA+PBS+Triton) e anticorpo primario in concentrazione 1:100; l'anticorpo è l'anti-HRP (*antiserum against horseradish peroxidase*), che è già stato utilizzato per studiare lo sviluppo neuronale degli insetti (Snow *et al.*, 1987). Il cy3 anti-HRP evidenzia la superficie dei neuroni di *Drosophila* (e quindi nervi e bottoni sinaptici), riconoscendo un gruppo funzionale carboidrato specifico dei neuroni. È coniugato ad una cianina 3 (cy3), che assorbe a una λ di 550 nm ed emette alla λ di 570 nm (nel rosso). Il preparato vi è lasciato in incubazione per tutta la notte, a 4°C, mantenuto al buio (il cy3 anti-HRP è fotolabile).

- Il giorno seguente, eliminata la soluzione d'incubazione, si effettuano 4 lavaggi di 15 min in PBST 0,05% a 4°C.

I vetrini vengono quindi montati con metil-cellulosa, e quando sono ben asciutti sono pronti per essere osservati al microscopio confocale. Sono state scelte le NMJ dei muscoli 6 e 7, e vi è stata effettuata la proiezione lungo l'asse Z (si producono varie immagini della giunzione corrispondenti ai suoi diversi piani sovrapposti). Tutte le immagini sono state acquisite con obiettivo 40x.

In seguito, per l'analisi morfologica, utilizzando ImageJ si è misurato il numero dei bottoni sinaptici, la loro area e diametro, e l'area coperta dall'intera giunzione. Si è anche analizzato il livello di ramificazione delle NMJ, assegnando ad ogni ramo un ordine: il principale è definito "assone", quelli successivi emergenti dall'assone sono definiti come "primari", quelli emergenti dai primari come "secondari", e così via.

È stata quindi calcolata la lunghezza dei vari rami.

Per tutti i dati è stato fatto un test *t* a due code.

3.9. Test di vitalità

Il fine del test è avere una misura della durata di vita media di un moscerino adulto, nelle condizioni di laboratorio.

Per ogni ceppo analizzato, sono state prelevate da un tubo di coltura una trentina di pupe, scegliendo quelle visibilmente più avanzate nello sviluppo. Ognuna viene trasferita con un pennellino imbevuto d'acqua in una singola provetta di polistirolo cristallo (1 cm di diametro x 7,5 cm di altezza) contenente del terreno nutritivo. Ad ogni pupa è stato assegnato un numero.

Ogni giorno quindi si sono controllate le provette, annotando in un foglio di Excel la data di sfarfallamento del moscerino, il suo sesso e la data di morte.

Dopo l'emersione dell'*imago*, il mezzo di coltura viene sostituito ogni due settimane, o prima, qualora ve ne fosse bisogno (ad esempio, se la pappa si secca).

Alla fine del test, si calcola quanti giorni è vissuto ogni adulto, e si ottiene la media di ciascun ceppo. È stato effettuato un test *t* per determinare se c'è una differenza significativa nella vitalità dei mutanti rispetto ai Canton-S; lo stesso è stato fatto considerando separatamente femmine e maschi.

Sono state messe poi a confronto tutte le femmine dei 3 ceppi in un grafico, che ha in ascissa i giorni ed in ordinata la percentuale di adulti sopravvissuti. Un grafico analogo si è costruito per i maschi.

4. RISULTATI

4.1. Test di locomozione

Sono state testate 20 larve per ognuno dei 3 ceppi.

Il tracking della locomozione mostra che le larve *Sply* di 5 giorni sono significativamente più lente delle Canton-S coetanee (velocità media complessiva), mentre sono simili alle larve *Sk2*. Anche escludendo i tempi di pausa degli animali, la differenza con le Canton-S rimane, a conferma del fatto che larve *Sply* e *Sk2* si muovono più lentamente.

La percentuale di tempo di pausa non mostra differenze statisticamente significative tra *Sply* e Canton-S, mentre è significativamente diversa la frequenza con cui le larve cambiano direzione: questo comportamento risulta essere meno presente nelle *Sply* rispetto alle Canton-S ed *Sk2*.

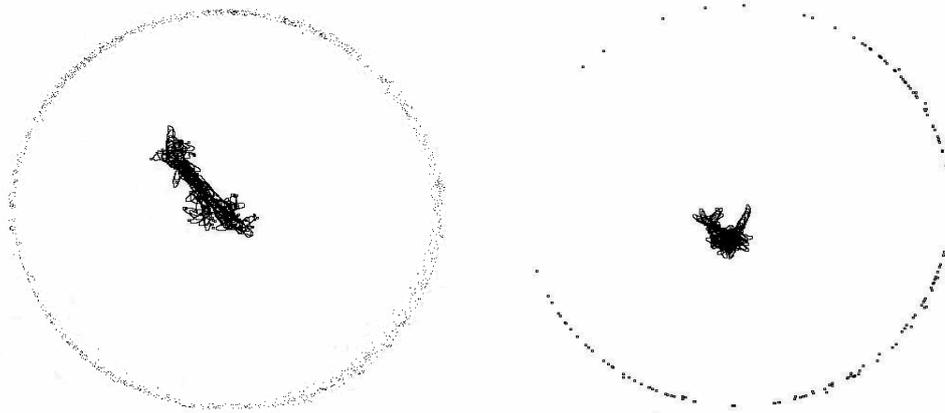


Fig. 18: rappresentazione grafica del percorso compiuto da una larva Canton-S (a sinistra) e da una larva *Sply* (a destra) durante la prova locomotoria.

4.2. Fototassi larvale

Sono state eseguite, inizialmente, 10 prove del primo esperimento (piastra divisa in 2 quadranti scuri e 2 illuminati) con un totale di circa 200 larve Canton-S, ancora immerse nel terreno di coltura.

L'indice di risposta (RI) è stato in media 0.21 (tra le 10 prove il minimo ottenuto è stato 0, ed il massimo 0.38; dev. standard: 0.16).

Il test Darth Vader, provato successivamente 3 volte su *Sk2* (20, 10 e 10 larve) e 6 volte su Canton-S (10 per prova), ha dato risultati molto variabili fra i campioni: sono risultati RI che vanno da -0.4, in entrambi i ceppi, a 0.4 in Canton-S.

I valori medi sono stati:

- 0.17 per le larve Canton-S
- -0.07 per le larve *Sk2*.

A maggio-giugno il Darth Vader è stato ripetuto per larve Canton-S e larve *Sply*.

Gli RI medi risultano più elevati rispetto a quelli delle prove condotte in precedenza:

- 0.32 per le Canton-S
- 0.45 per le *Sply*.

In seguito però non è stato possibile sottoporre al Darth Vader - né ad altri esperimenti - gli individui *Sk2*, dato che il ceppo ha cominciato ad ammalarsi (infezioni batteriche diffuse nei vari tubi di coltura) e ad esaurirsi.

4.3. Fototassi degli adulti

Si è notato dopo varie prove preliminari che i test con il labirinto di fototassi riescono in modo soddisfacente solo se effettuati la mattina; infatti nel primo pomeriggio (11 prove, per un totale di circa 140 animali) le *drosophile* risultavano distribuite casualmente nelle 9 provette, e talora una buona parte non giungeva neppure alla fine del labirinto; questo soprattutto nel caso delle femmine che inoltre, essendo più grosse, spesso restano bloccate nei tubini. Si è pertanto in seguito preferito utilizzare solo individui maschi.

Il test eseguito la mattina offre risultati migliori. Dopo 5 prove preliminari, se ne sono eseguite 2 definitive per ceppo, ognuna con 20 maschi di circa una settimana di età. Applicando la formula (vedi Materiali e Metodi), il punteggio di fototassi complessivo realizzato è:

- 6.88 per Canton-S
- 7.01 per *Sk2*
- 6.75 per *Sply*

(valori medi; le differenze tra le coppie di repliche sono rispettivamente di circa 12%, 7% e 17%).

Il grafico costruito in base agli indici delle singole provette fornisce un'idea più precisa della risposta dei moscerini..

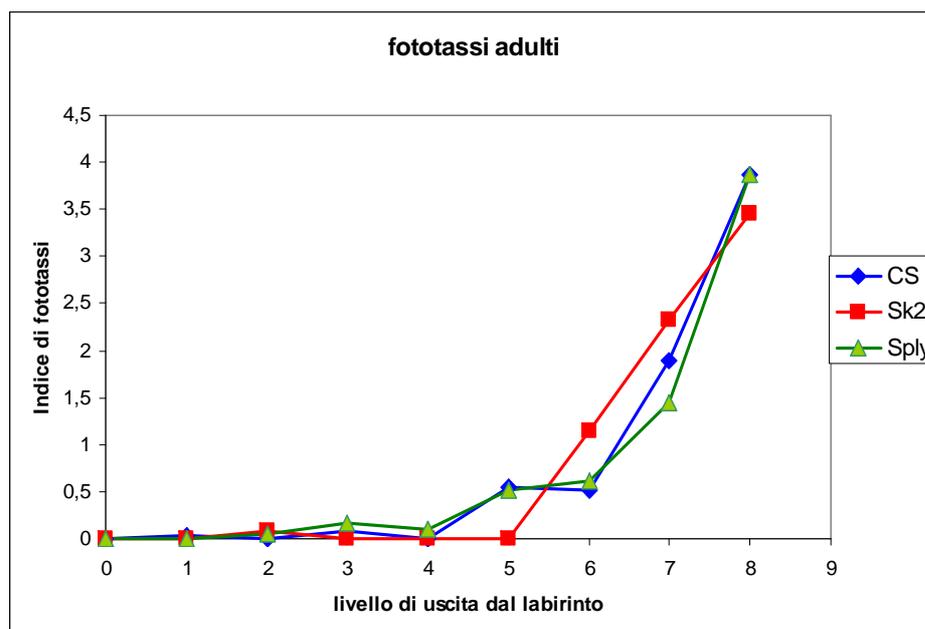


Fig. 19: grafico che mostra gli andamenti dei tre ceppi nel labirinto, considerando l'indice di fototassi per ogni provetta d'uscita. Per ciascun ceppo sono indicati gli indici risultanti dalla media fra le due repliche effettuate. La differenza fra le repliche è intorno al 4% per le provette dalla 0 alla 7, e sale ad un massimo del 33% (caso delle *Sply*) per la provetta 8. Esperimenti effettuati di mattina e solo con individui maschi.

4.4. La risposta optomotoria

Sono state eseguite numerose prove preliminari utilizzando un ceppo di *Drosophila* eterozigoti *Sply/Cyo* (*Sply* con bilanciatore *curly* per le ali arricciate), che dunque in teoria non presentano il fenotipo ptologico delle *Sply* omozigoti. È stato utilizzato questo ceppo per evitare di esaurire il ceppo Canton-S.

I risultati di OI (*optomotor index*), con il pattern descritto nella sezione 3.6., sono stati:

- 1.27 con 37 animali;
- 1.39 con 28 animali;
- 1.0829 con 41 animali, *ma senza specchio*;
- 0.784, ottenuto usando un pattern con le *bande larghe circa il doppio*.

Nelle prove con *Sply* omozigoti:

- 0.594 con 32 animali
- 1.024 con 41
- 1.92 con 30
- 1.14 con 48

Si sono eseguite anche 2 prove con circa 30 Oregon-R, un ceppo selvatico originario dell'Oregon (USA).

Gli OI risultanti sono stati 1.6 e 1.4.

Le prove effettuate con adulti Canton-S hanno invece dato OI molto inferiori (considerando solo quelle in cui gli animali sono arrivati alla fine del labirinto): -0.24 e -2.75.

Come per la fototassi, si è costruito poi un grafico con l'OI calcolato per ogni singola provetta (dalla -4 alla 4).

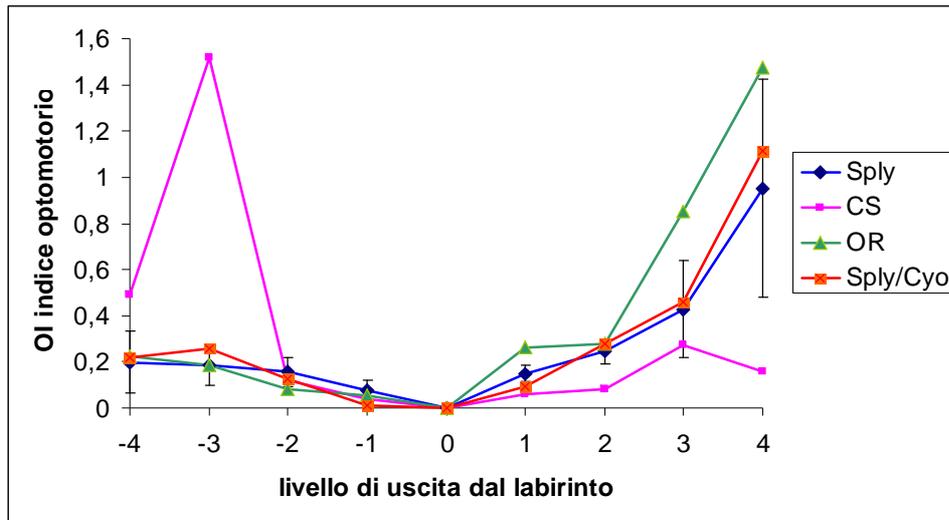


Fig. 20: andamenti dei ceppi testati per la risposta optomotoria. Risulta subito evidente come gran parte dei moscerini Canton-S siano stati rinvenuti nelle provette con valore negativo, dalla parte opposta rispetto alla direzione di scorrimento del pattern (valori medi; nel caso delle *Sply* è riportata la deviazione standard).

4.5. Preferenza olfattiva delle larve

Si sono eseguiti in tutto 9 test (2 per Canton-S e *Sply*, con entrambe le diluizioni dell'AM, e 1 per le *Sk2*, con la diluizione 1:50), con 20 larve ciascuno (da cui sono poi escluse quelle ritrovate in un pozzetto, sulle pareti o sul coperchio della piastra). L'Indice di Preferenza è stato:

- 0.33 (medio) per le larve Canton-S con AM diluito 1: 50
- 0.5 per le larve *Sk2* con AM diluito 1:50
- 0.42 (medio) per le *Sply* con AM 1:50
- 0.115 (medio) per le larve Canton-S con AM diluito 1:100
- 0.225 (medio) per le larve *Sply* con AM diluito 1:100.

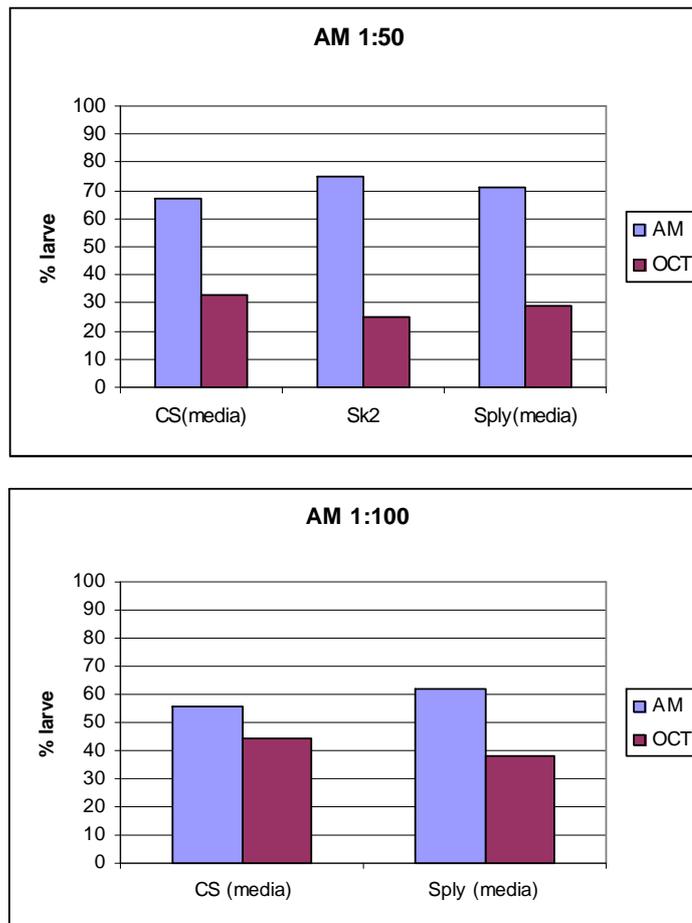


Fig. 21: istogrammi sulla preferenza olfattiva delle larve dei 3 ceppi. La differenza tra le 2 repliche delle Canton-S con AM 1:50, è stata del 19%, quella delle *Sply* del 34%; con le *Sk2* è stato possibile eseguire una sola prova. Le differenze tra le repliche con AM 1:100 sono state del 11.5% per le Canton-S, e del 1.4% per le *Sply* (le *Sk2* non erano più disponibili).

4.6. Test di apprendimento

Si sono potuti testare solo i ceppi Canton-S e *Sply* (18 larve per esperimento).

I grafici costruiti in base agli indici di preferenza, calcolati per ogni intervallo di 20 secondi sulle 18 larve (Neuser *et al.*, 2005) indicano che non è avvenuto alcun apprendimento; le 18 larve Canton-S in particolare preferiscono da subito l'AM invece che l'OCT. Paradossalmente le Canton-S condizionate in senso inverso mostrano di preferire inizialmente l'OCT, anche se successivamente ritornano verso l'AM.

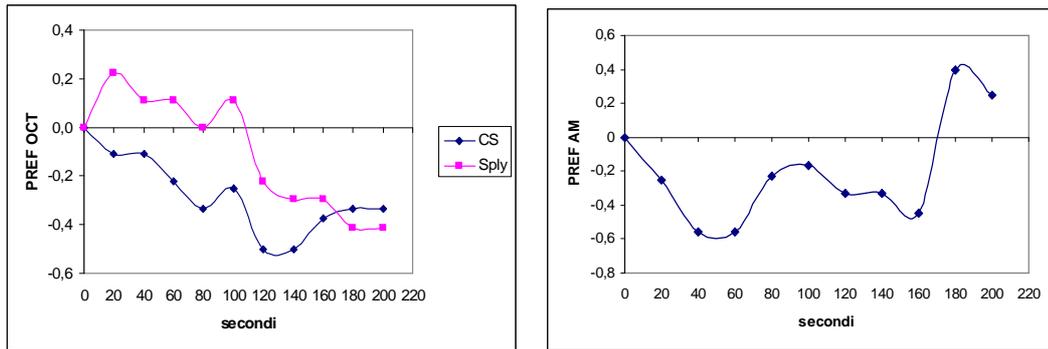


Fig. 22: grafici con gli indici di preferenza per l'OCT (CS e *Sply*) e per l'AM (CS dopo condizionamento inverso), ogni 20 sec. Gli andamenti non sembrano indicare alcun apprendimento, soprattutto per quanto riguarda le Canton-S.

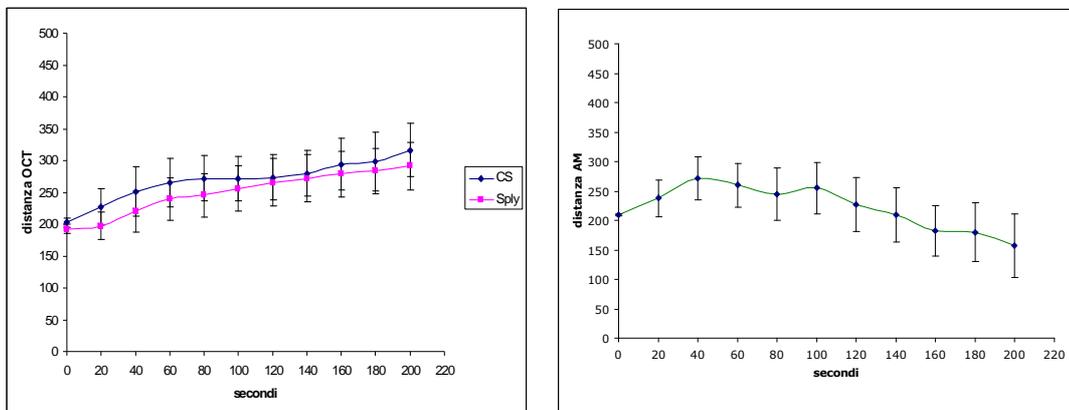


Fig. 23: grafici della prova di apprendimento olfattivo. A sinistra: grafico con le distanze medie delle larve CS e *Sply* dall'OCT, dopo l'addestramento, calcolate ogni 20 sec. A destra, grafico delle Canton-S sottoposte al condizionamento inverso, con la loro distanza media dall'AM. Non sembra avvenuto alcun apprendimento, le larve in media non operano una scelta (ampia variabilità di risposta fra i campioni; le barre indicano l'errore standard).

Una rappresentazione forse più dettagliata della situazione si ha però calcolando la distanza dal pozzetto "atteso".

Costruiti i grafici distanza-tempo per ogni singola larva, si è poi calcolata la distanza media dal pozzetto delle 18 larve in ogni intervallo di 20 secondi, e si è costruito il "grafico medio" del ceppo (Fig. 23). Il risultato non è però significativo, poichè fra i diversi campioni c'è un'elevata deviazione standard: le larve si sono comportate in modo molto variabile all'interno dello stesso esperimento. Questo vale anche per le larve Canton-S addestrate inversamente (distanza dall'AM).

4.7. Morfologia delle giunzioni neuromuscolari

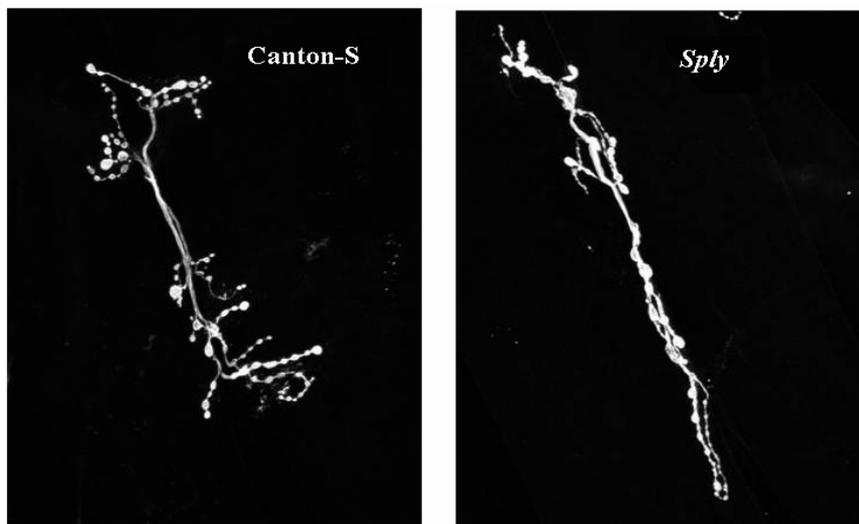


Fig. 24: NMJ di larva Canton-S e *Sply* (muscoli 6-7) evidenziate con cy3 anti-HRP. Si nota come nella prima i bottoni sinaptici sono più piccoli e numerosi, e la diversità della ramificazione.

Dalle analisi delle NMJ dei muscoli 6-7 di larve *L3* Canton-S e larve *Sply*, emerge che il numero di bottoni sinaptici di una singola giunzione è significativamente più elevato in Canton-S (Fig. 25).

La dimensione (area in μm^2) dei singoli bottoni è però maggiore in *Sply* (Fig. 26).

In totale, le intere NMJ dei 2 ceppi occupano un'area molto simile (non vi è una differenza significativa fra i campioni; Fig. 27).

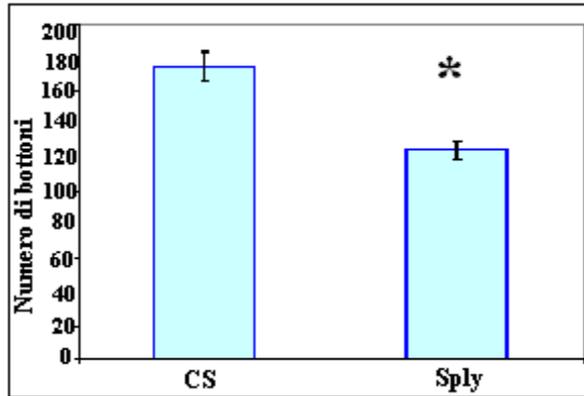


Fig. 25: grafico sul numero medio di bottoni nelle NMJ (muscoli 6 e 7) di larve Canton-S e Sply al terzo stadio. Gli asterischi indicano che c'è differenza significativa.

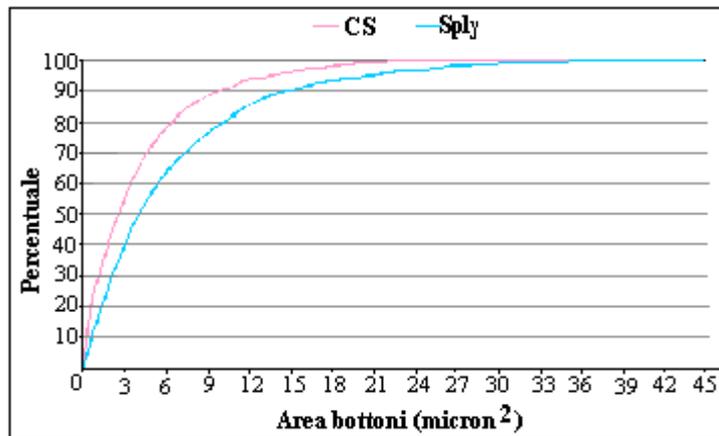
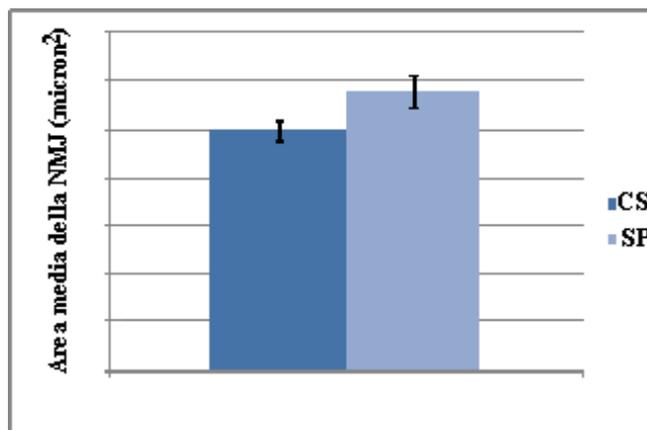


Fig. 26: grafico che rappresenta come i bottoni sinaptici delle larve Sply hanno dimensioni maggiori di quelli di Canton-S.

Fig. 27: istogramma sull'area occupata dalle giunzioni di Canton-S e Sply. Non vi è



differenza significativa.

Per quanto riguarda il livello di ramificazione, le larve Canton-S mostrano delle giunzioni neuromuscolari più articolate di quelle di Sply: nelle prime infatti si giunge fino a rami del 5° ordine, che sono del tutto assenti nei campioni Sply.

Nelle larve mutanti prevalgono i rami primari (emergenti dall'assone principale), in percentuale più numerosi che nelle Canton-S; per gli ordini successivi il numero di rami è invece inferiore (Fig. 28).

Guardando ogni ordine di ramificazione, le NMJ delle larve *Sply* mostrano che i singoli rami hanno una lunghezza superiore a quelli delle Canton-S (lunghezza in μm ; Fig. 29).

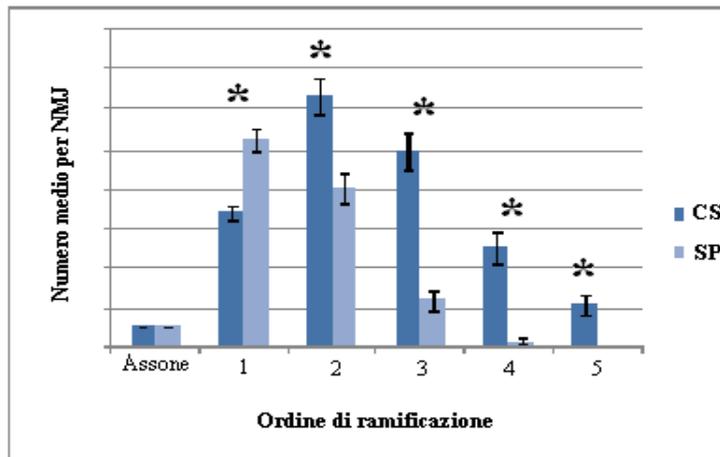


Fig. 28: grafico sul livello di ramificazione delle NMJ di Canton-S e *Sply*.

Le prime mostrano un ordine di ramificazione in più (il 5°), ed ogni ordine, tranne il primario, comprende più elementi che nelle *Sply*.

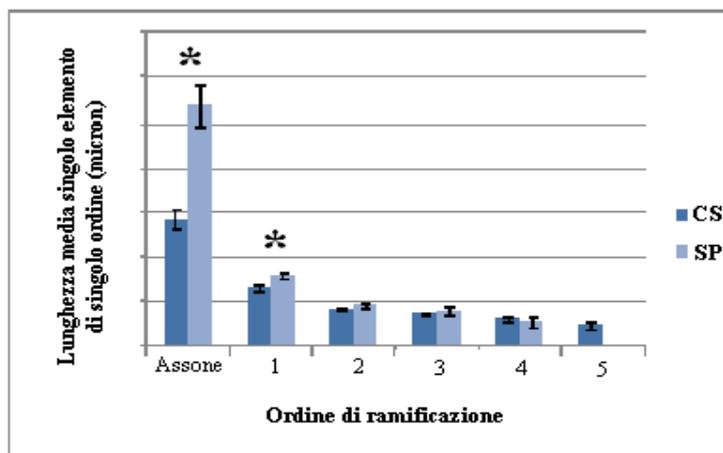


Fig. 29: nei campioni *Sply* ogni singolo ramo, di ogni ordine, è mediamente più lungo che nelle Canton-S.

4.8. Test di vitalità

La durata di vita media degli adulti dei 3 ceppi risulta essere:

- 49.61 giorni per Canton-S (dev. standard: 25.36). Le femmine vivono mediamente 57.87 giorni, i maschi 40.08.

- 29.83 giorni per *Sk2* (dev. standard: 19.13); 22.29 giorni per le femmine, 35.5 per i maschi.
- 46.63 per *Sply* (dev. standard: 17.05); 41.31 giorni per le femmine, 54.36 per i maschi.

Quindi nei due ceppi mutanti le femmine vivono mediamente meno dei maschi, ed in particolare le femmine *Sk2* hanno una vitalità significativamente inferiore alle femmine Canton-S.

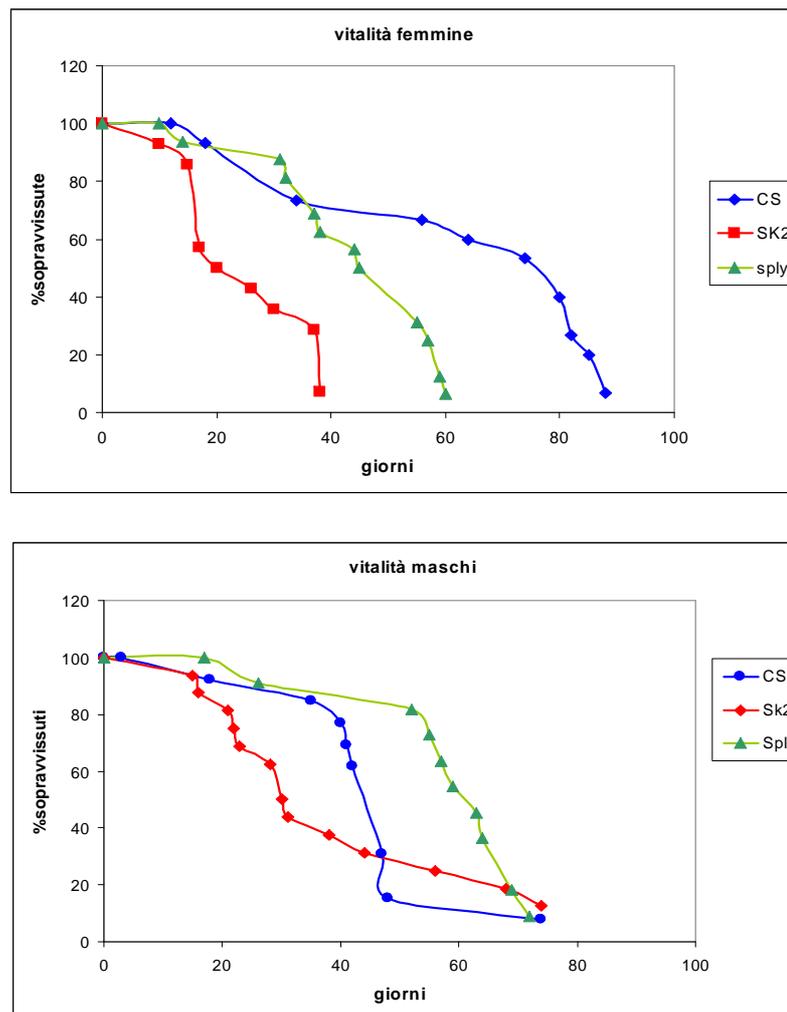


Fig. 30: grafici che mettono a confronto la percentuale di sopravvissuti nel tempo delle femmine dei tre ceppi testati (grafico in alto), e dei maschi (grafico in basso). Guardando alla vitalità dei ceppi nel loro complesso, rispetto a Canton-S i moscerini *Sk2* vivono significativamente di meno; ciò non vale per *Sply*.

5. DISCUSSIONE

5.1. Sistema nervoso ed esperimenti comportamentali

I diversi esperimenti comportamentali condotti su *Drosophila* contribuiscono ad indagare sulla funzionalità di diversi aspetti del sistema nervoso: sensoriale, neuromuscolare ed associativo.

Insetti e Vertebrati condividono molti aspetti funzionali di questo apparato: nonostante la lunga evoluzione a cui è andato incontro, fino alla sua massima complessità nei mammiferi, dal punto di vista della fisiologia cellulare sono avvenute decisamente poche modificazioni.

Anche per le diverse vie sensoriali si possono facilmente trovare dei parallelismi fra i diversi animali. Ad esempio, per quanto riguarda la via olfattiva (Davis, 2004), i neuroni olfattivi (ORN) delle antenne di *Drosophila* assolvono alla stessa funzione di quella degli epitelii olfattivi di vertebrato; i neuroni del secondo livello, nei lobi antennali, equivalgono a quelli dei bulbi olfattivi. Le cellule del terzo livello in *Drosophila* sono quelle dei corpi fungiformi (MBs), dove peraltro avviene l'associazione tra odori e altri tipi di stimoli, del corno laterale (struttura del MB), e del protocerebro laterale. Esse sono in qualche modo affini a quelle dell'amigdala (organo implicato in diversi tipi di condizionamento), della corteccia piriforme e della peririnale dei mammiferi. Nei mammiferi l'informazione è infine portata all'ippocampo, necessario per l'immagazzinamento della memoria, mentre in *Drosophila* raggiunge diverse altre aree del protocerebro.

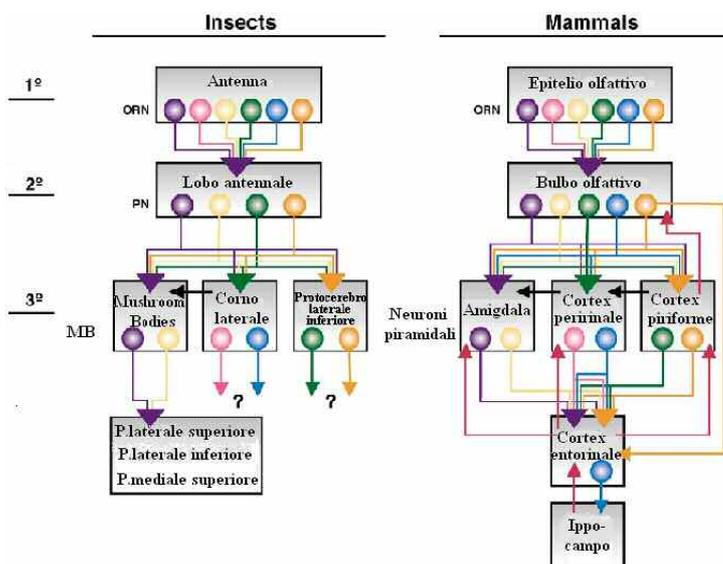


Fig. 31: gerarchia del sistema nervoso olfattivo in insetti e mammiferi (modificato da Davis, 2004).

Per quanto riguarda l'aspetto visivo, Vertebrati e *Drosophila* presentano molte similarità anche nella fototrasduzione che avviene nella retina, anche se intervengono meccanismi molecolari diversi. Innanzitutto vi è una forte omologia del pigmento, la rodopsina, che in presenza di luce si separa nei suoi 2 componenti (opsina e retinale); si attiva quindi in entrambi i casi una cascata di segnale con proteine-G accoppiate (di tipo diverso in *Drosophila* e mammiferi). Ma l'attivazione dei fotorecettori nei Vertebrati porta alla stimolazione di una fosfodiesterasi, e in *Drosophila* di una fosfolipasi: nel primo caso si ha un effetto di iperpolarizzazione, e i canali ionici che permettono di convertire l'energia luminosa in impulso nervoso nei Vertebrati si aprono quando è buio. In *Drosophila* invece il processo attivato dalla luce provoca l'apertura dei canali, l'entrata nella cellula di ioni Na^+ e Ca^{2+} e quindi la depolarizzazione (Zuker, 1996).

Esperimenti comportamentali simili a quelli qui descritti d'altronde sono diffusamente condotti anche su altri organismi, da diverse specie di insetti (scarafaggio, ape domestica) al topo. In alcuni esperimenti di locomozione sono stati ad esempio registrati i movimenti liberi di un topo posto su una superficie liscia; oppure con il *runway apparatus* (D'Hooge *et al.*, 1999) le orme lasciate dall'animale in un percorso diritto fino ad una scatola chiusa sono state esaminate per determinare diversi tipi di andatura (legati a diverse condizioni patologiche).

Anche il riflesso optomotorio è stato misurato in topo (Prusky *et al.*, 2004).

L'animale viene posto su una piattaforma che si trova fra quattro monitor disposti a quadrato, dai quali è simulato un cilindro rotante con bande, chiare e scure, dai bordi sfumati, che scorrono in una determinata direzione. L'animale si gira sempre con la testa e la parte anteriore del corpo verso la direzione in cui scorrono le bande.

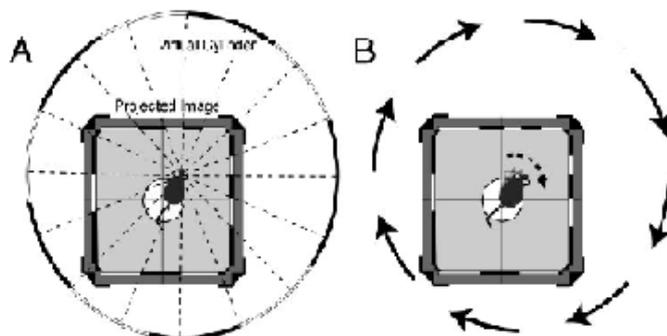


Fig. 32: esperimento optomotorio su topo (Prusky *et al.*, 2004).

Per i mammiferi in effetti è

più corretto parlare di riflesso optocinetico (Biral, 1996), cioè il movimento degli occhi stimolato dallo spostarsi del mondo circostante nel suo insieme. Il movimento oculare è compensatorio, in direzione contraria a quella della testa, per mantenere fissa la linea dello sguardo.

Nei mammiferi inoltre la situazione è ad un livello evolutivo più complesso: esistono due classi di movimento oculare lento, l'inseguimento lento (IL) ed il nistagmo ottico cinetico (NOC). Anche l'IL è sostanzialmente un riflesso, ma a differenza del NOC permette di selezionare in un contesto di oggetti fermi o in movimento un bersaglio anche molto piccolo, e di seguirlo: è quindi un movimento oculare teso a mantenere fissa nella fovea (area della retina capace della massima analisi del dettaglio) l'immagine dell'oggetto di interesse. Nei Primati e in *Homo* l'IL ha un ruolo gerarchico superiore rispetto al NOC. Quest'ultimo invece è un riflesso primitivo, di base, presente anche negli Invertebrati; assicura il cambiamento automatico della posizione degli occhi nello spazio ad ogni tentativo di modificarla (dunque un riflesso posturale).

Nell'uomo come in *Drosophila* quindi il riflesso optomotorio del NOC serve a garantire l'equilibrio dell'individuo rispetto all'ambiente.

Negli esperimenti di comportamento animale, anche se effettuati in laboratorio, è difficile poter controllare le molte variabili ambientali (luce, temperatura...) che possono influenzare gli esiti dei test. I moscerini della frutta sembrano risentire dell'ora del giorno, del periodo dell'anno e della temperatura (che non è mai costante in laboratorio); variano quindi a seconda di questi e forse altri parametri il livello di attività degli individui, e la salute dei ceppi. Gli animali impiegati negli esperimenti devono essere preferibilmente in ottime condizioni di salute e di nutrimento. Inoltre piccole variazioni alle procedure dei test possono essere determinanti, e spesso sono necessari molti tentativi prima di mettere a punto un esperimento.

5.2. Discussione dei risultati

A) Prova locomotoria. Le larve *Sply* ed *Sk2*, come visto, mostrano di muoversi ad una velocità minore rispetto alle *Canton-S*, senza differenza sostanziale nella frequenza delle pause. Le larve *Canton-S* inoltre cambiano più spesso direzione. Tuttavia, come mostrano i tracciati dei percorsi, tutte le larve testate hanno

mostrato di non avere una direzione precisa del moto, ed il loro percorso era molto contorto, e nessuna, salvo 2 eccezioni nelle Canton-S, ha raggiunto il bordo della piastra petri nei 2 minuti di tempo. Bisogna considerare che la luce, emessa dai led e necessaria per poter effettuare le riprese, può influire sulla locomozione delle larve. Si è dimostrato infatti (Busto *et al.*, 1999) che in presenza di luce l'animale tende a muovere a destra e sinistra l'estremità cefalica, cambiando la direzione del suo percorso. Il fatto che i mutanti *Sply* cambino meno direzione potrebbe essere quindi spiegato in 3 modi: i) un deficit neuromuscolare impedisce loro di compiere tanti movimenti quanti ne compiono le larve Canton-S; ii) i mutanti hanno una minore tendenza ad esplorare l'ambiente (deficit "decisionale"); iii) i mutanti risentono meno dell'influenza della luce.

B) Fototassi larvale. Durante le varie prove preliminari, i risultati non erano soddisfacenti: soprattutto nel saggio Darth Vader, nemmeno le larve Canton-S mostravano un buon indice di fototassi.

Si è tentato di apportare varie modifiche all'apparato sperimentale: per avere una maggiore luminosità nella camera (e quindi un maggiore contrasto tra la metà chiara e quella scura delle piastre) la si è rivestita internamente di carta bianca lucida; si è poi provato a togliere i fogli di carta velina da sopra i led, focalizzandoli meglio sotto la metà da illuminare. Visto che i risultati non variavano (nell'ultimo caso anzi si è avuto un RI negativo) si è anche provato a puntare un led direttamente di fronte alla larva (Canton-S) che si muoveva sullo strato di agarosio: non si aveva una risposta evidente.

Quando si è riprovato il test (con l'apparato normale) in un momento successivo, i risultati sono stati più confortanti.

Non sembrano esserci anomalie nelle larve mutanti di 4 giorni rispetto alle Canton-S.

C) Fototassi degli adulti. Gli adulti di *Sk2* e *Sply* non sembrano avere problemi nel percepire la luce e nel dirigersi verso di essa. In tutti i ceppi la risposta è migliore nella mattinata, quando il grado generale di attività degli individui è più elevato (lo si può osservare anche guardando i tubi di coltura durante la giornata: andando verso sera i moscerini sono sempre meno in movimento).

D) Risposta optomotoria. Il fatto che in questo test quasi tutte le *drosophile* di un gruppo percorrano il labirinto in meno di mezz'ora (a volte, la mattina, bastano davvero pochi minuti) fa sembrare che lo stimolo optomotorio sia più deciso di quello fototattico.

Curiosamente, durante le numerose prove preliminari con Canton-S, quando venivano provati diversi pattern scorrevoli, alcune volte si è ottenuta una risposta nettamente negativa: la maggior parte delle *drosophile* cioè si ritrovava nelle provette del lato opposto a quello atteso. Non si è riusciti ancora a spiegare a cosa sia dovuta tale risposta; si è esclusa la possibilità che sia dovuta alla forma cilindrica dei passaggi (per verificarlo si era costruito un labirinto più ridotto, incollando dei tasselli di legno a una superficie trasparente: si aveva comunque la risposta negativa) o alle dimensioni dei pixel del monitor usato.

Gli adulti Canton-S, sottoposti alle condizioni sperimentali che sono risultate idonee per gli altri ceppi (*Sply/Cyo* e *Sply*), hanno inaspettatamente manifestato un comportamento del tutto anomalo: le *drosophile* si distribuivano casualmente fra le provette d'uscita, o non riuscivano a raggiungerle; in più di una prova la risposta è stata di nuovo nettamente negativa.

Per verifica si sono eseguite 2 prove con dei moscerini Oregon-R, altro ceppo wild-type proveniente dall'Oregon, USA. In questo caso si è avuto un esito positivo. La risposta di Canton-S è dunque in qualche modo “invertita”.

Questo fa sorgere seri dubbi sulla validità come controllo dello stock utilizzato: sarebbe interessante indagare su quali siano le cause di questo fenomeno, se dipendenti dal pattern adoperato (cosa improbabile, viste le numerose varianti provate e gli esiti positivi ottenuti con le linee di mutanti sfingolipidici) o da una caratteristica intrinseca del ceppo.

E) Preferenza olfattiva larvale. Dai dati sembra che le larve *Sply* abbiano una preferenza per l'AM più spiccata delle Canton-S, anche quando diluito 1:100. La percezione degli odori in sé quindi non sembra alterata in questi mutanti.

F) Apprendimento olfattivo. Visto che in entrambi i ceppi testati non pare

avvenuto alcun apprendimento, si possono ipotizzare diverse spiegazioni : i) la diluizione dell'AM (1:100) non è ancora sufficientemente alta per permettere un condizionamento valido; ii) il rinforzante gustativo andrebbe fornito ancor più concentrato. Pare comunque che il fattore determinante nel condizionamento delle larve (Scherer *et al*, 2003; Hendel *et al.*, 2005) sia il rinforzante positivo, mentre il negativo non incide particolarmente sulla memoria dell'animale. iii) La luce, necessaria alle riprese, ha influito troppo sulle larve e le ha disorientate nella scelta; una soluzione potrebbe essere quella di utilizzare dei led rossi, che le larve non dovrebbero percepire. iv) Le larve testate hanno in effetti una scarsa capacità di apprendimento.

G) Morfologia delle NMJ. Fondamentalmente sembra che le larve *Sply* del terzo stadio conservino le caratteristiche generali della NMJ (lunghezza totale e area della giunzione); ma questa situazione è ottenuta con compensazioni a livello della ramificazione della struttura e dei bottoni sinaptici. Infatti, mentre la NMJ delle *Sply* tende ad essere meno ramificata (mancano ad esempio elementi del 5° ordine), i singoli rami sono più lunghi, così alla fine si ha un rapporto lunghezza/area comparabile a quello delle NMJ delle Canton-S.

Un discorso simile si può fare per i bottoni sinaptici: mediamente quelli di *Sply* sono significativamente più grandi (come area del singolo bottone), ma significativamente meno numerosi che nelle larve Canton-S.

L'aspetto dei bottoni di *Sply* suggerisce che essi potrebbero derivare dalla fusione di bottoni più piccoli adiacenti, o da un'alterazione nella loro "gemmazione" durante lo sviluppo della NMJ.

Da notare che già nella dissezione la cuticola larvale dei mutanti *Sply* appare più flaccida e fragile.

H) Test di vitalità. A gennaio, dopo che 30 pupe *Sk2* sono state prelevate e messe nelle provette, ben 15 di queste, poi sostituite, sono morte ancora prima della schiusa, in fase di avanzata metamorfosi. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che il gene per la sfingosin-chinasi, negli individui selvatici, mostra un picco di espressione nella pupa (Acharya *et al.*, 2004): la mancanza di SK, nei mutanti *Sk2*, sarebbe dunque particolarmente critica proprio in questo stadio.

Tuttavia, secondo questa logica, anche i mutanti *Sply* avrebbero dovuto presentare lo stesso problema (visto che pure il picco di SPL si ha in fase pupale; Herr *et al.*, 2003), mentre invece solo 3 pupe sono morte prima della schiusa.

Inoltre anche le *drosophile* sfarfallate, nel caso di *Sk2*, sono vissute mediamente molto meno (20 giorni circa!) delle Canton-S, mentre le *Sply* differiscono da queste ultime solo di 3 giorni. Probabilmente gli individui *Sk2* ed il ceppo in generale stava già iniziando ad avere un declino (dopo un mese infatti non erano sopravvissuti abbastanza tubi di coltura per poter effettuare qualsiasi esperimento), mentre il ceppo *Sply*, quando si è iniziata la misurazione della vitalità a marzo, si era appena ripreso da un grave tracollo invernale. Anche per queste oscillazioni "stagionali" dei mutanti, non ancora chiarite, è difficile poter effettuare un confronto.

5.3. Conclusioni

Gli sfingolipidi sono molecole presenti in moltissimi phyla eucarioti, e gli effetti di metaboliti come la S1P e simili sono stati osservati in organismi diversi come lievito e *Homo*. Anche in animali più semplici di *Drosophila* la mancanza di alcuni enzimi della via metabolica provoca diverse anomalie. Come nei moscerini *Sply*, anche in *Caenorhabditis elegans* l'inibizione della SPL causa l'accumulo di basi a lunga catena fosforilate e non fosforilate (Mendel *et al.*, 2003). In questi esemplari si ha crescita ritardata, scarsa capacità di nutrirsi e alterazioni nella riproduzione. Curiosamente, in condizioni normali la SPL nel nematode risulta molto espressa nelle cellule intestinali, come si è osservato anche in *Drosophila* (Herr *et al.*, 2003). Al contrario, in topo e uomo l'espressione del gene avviene in molti tessuti diversi. Forse un pattern d'espressione così specifico potrebbe essere un fenomeno diffuso negli Invertebrati (Mendel *et al.*, 2003). Resta associato comunque che *Sply* è un gene essenziale, e che la via degradativa degli sfingolipidi ha un ruolo conservato nel regolare lo sviluppo degli animali.

Per quanto riguarda l'enzima SK, è stato ottenuto un doppio mutante di topo mancante della funzione dei geni *Sphk1* e *Sphk2*. Tali embrioni mostrano quindi una grave deficienza di S1P, e come conseguenza le loro angiogenesi e neurogenesi sono fortemente disturbate (Mizugishi *et al.*, 2005.): presentano marcate emorragie e la chiusura incompleta del tubo neurale, a causa di un

drammatico aumento dell'apoptosi e di un calo delle mitosi (tale è il potente effetto della S1P su vita e morte cellulare).

Non meno importanti sono i metaboliti più complessi, come i glicosfingolipidi (GSL). Il core di queste molecole (Glc β 1-ceramide) è conservato in nematodi, insetti e Vertebrati, tanto che un mutante per la sintesi di GSL di *Drosophila* (*egghead*) può essere recuperato introducendo il gene per l'enzima omologo di mammifero (ma non viceversa; Wandall *et al.*, 2005).

Oltre alle basi sfingoidi (ceramide e S1P) sono più recentemente emersi quindi altri sfingolipidi bioattivi, come la sfingosilfosforilcolina, la lactosilceramide e cerebroside (Hannun and Obeid, 2002).

In questo lavoro, nonostante non sempre tutti gli esperimenti siano riusciti, sembra emerso il fatto che, nelle larve di *Drosophila*, le alterazioni metaboliche a livello degli sfingolipidi abbiano delle ripercussioni sulla funzionalità dell'apparato neuromotorio.

Viene spontaneo pensare ad un collegamento con la morfologia alterata delle giunzioni neuromuscolari presentata dai mutanti *Sply*: è ipotizzabile che lo sbilanciamento nel contenuto di metaboliti sfingolipidici porti ad una formazione scorretta delle giunzioni, e ad un successivo deficit nell'efficienza della trasmissione sinaptica tra neuroni e muscoli locomotori.

A livello del sistema nervoso centrale, e quindi per quanto riguarda la percezione degli stimoli luminosi e odorosi, i mutanti *Sply* e *Sk2* non sembrerebbero mostrare invece differenze apprezzabili rispetto al fenotipo Canton-S.

A conferma di queste ipotesi sarebbe necessario ottenere ulteriori dati sperimentali, provare altre tipologie di test ed effettuare analisi a livello cellulare (già sono in corso, ad esempio, approcci elettrofisiologici volti a studiare le dinamiche della trasmissione sinaptica nei mutanti *Sply*).

Il metabolismo e la funzione degli sfingolipidi è un campo di ricerca in rapido sviluppo. Essendo molecole fortemente conservate negli esseri viventi sarà possibile in futuro, partendo da studi condotti su semplici organismi modello come *Drosophila*, raggiungere importanti traguardi sulla loro conoscenza, ed ottenere risultati forse applicabili anche in campo medico.

6. Bibliografia

Acharya U. and Acharya J.K. “Enzymes of sphingolipid metabolism in *Drosophila melanogaster*” *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 128-142 (2005)

Acharya U., Patel S., Koundakjian E., Nagashima K., Han X. and Acharya J.K. “Modulating sphingolipid biosynthetic pathway rescues photoreceptor degeneration” *Science* **299**, 1740-1743 (2003)

Adachi-Yamada T., Gotoh T., Sugimura I., Tateno M., Nishida Y., Onuki T. and Date H. “De novo synthesis of sphingolipids is required for cell survival by down-regulating c-jun N-terminal kinase in *Drosophila* imaginal discs” *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7276-7286 (1999)

Ashburner M. “*Drosophila* a laboratory handbook” Editore CSH Press (1989)

Bate M. “The mesoderm and its derivatives” da *The development of Drosophila melanogaster* (Vol. II) Editori M. Bate e A.M. Arias, CSHL Press 1013-1090 (1993)

Bejaoui K., Uchida Y., Yasuda S., Ho M., Nishijima M., Brown R.H., Holleran W.M. and Hanada K. “Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis” *J. Clin. Invest.* **110**, 1301-1308 (2002)

Biral G. “Il riflesso otticocinetico” da *Le interazioni visuo-vestibolari* Pàtron Editore Bologna (1996)

Bodenstein D. “The postembryonic development of *Drosophila*” da *Biology of Drosophila*, Editore M. Demerec, CSHL Press (1950)

Budnik V., Gorczyca M. and Prokop A. “Selected methods for the anatomical study of *Drosophila* embryonic and larval neuromuscular junctions” da *The fly*

neuromuscular junction: structure and function (2^a edizione) Editori Budnik V. e Ruiz-Cañada C., 323-365 (2006)

Busto M., Iyengar B. and Campos A.M. “Genetic dissection of behaviour: modulation of locomotion by light in the *Drosophila melanogaster* larva requires genetically distinct visual system function” *J. Neurosci.* **19**, 3337-3344 (1999)

Caldwell J.C., Miller M.M., Wing S., Soll D.R. and Eberl D.F. “Dynamic analysis of larval locomotion in *Drosophila* chordotonal organ mutants” *PNAS* **26**, 16053-16058 (2003)

Connolly J.B. and Tully T. “Behaviour, learning and memory” da *Drosophila: a practical approach*; Editore D.B. Roberts (2^a edizione) Oxford University Press 265-317 (1998)

Davis R.L. “Olfactory learning”, review, *Neuron* **44**, 31-48 (2004)

Dennis R.D., Geyer R., Egge H., Menges H., Stirm S. and Wiegandt H. “Glycosphingolipids in insects. Chemical structures of ceramide monosaccharide, disaccharide and trisaccharide from pupae of *Calliphora vicina* (Insecta: Diptera)” *Eur. J. Biochem.* **146**, 51-58 (1985)

D’Hooge R., Hartmann D., Mandil J., Colin F., Gieselmann V., and De Deyn P.P. “Neuromotor alterations and cerebellar deficits in aged arylsulfataseA-deficient transgenic mice” *Neuroscience Letters* **273**, 93-96 (1999)

Dubnau J., Chiang A.S. and Tully T. “Neural substrates of memory: from synapse to system” *J. Neurobiol.* **54**, 238-53 (2003)

Fortini M.E., Skupski M.P., Boguski M.S. and Hariharan I.K. “A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome” *J. Cell. Biol.* **150**, 23-30 (2000)

Futerman A.H. and Hannun Y.A. “The complex life of simple sphingolipids”

EMBO reports **8**, 777-782 (2004)

Hannun Y. A. and Obeid L.M. “The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind” *J. Biol. Chem.* **29**, 25847-25850 (2002)

Hendel T., Michels B., Neuser K., Schipanski A., Kaun K., Sokolowski M.B., Marohn F., Michel R., Heisenberg M. and Gerber B. “The carrot, not the stick: appetitive rather than aversive gustatory stimuli support associative olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae” *J. Comp. Physiol.* **191**, 265-279 (2005)

Herr D.R., Fyrst H., Phan V., Heinecke K., Georges R., Harris G.L. and Saba J.D. “*Sply* regulation of sphingolipid signalling molecules is essential for *Drosophila* development” *Development* **130**, 2443-2453 (2003)

Herr D.R., Fyrst H., Creason M.B., Phan V.H., Saba J. and Harris G. “Characterisation of the *Drosophila* sphingosine kinases and requirement for *Sk2* in normal reproductive function” *J. Biol. Chem.* **13**, 12685-12694 (2004)

Hoekstra D., Maier O., Van der Wouden J.M., Slimane T.A. and Van Ijzendoorn S.C.D. “Membrane dynamics and cell polarity: the role of sphingolipids” *J. Lipid Res.* **44**, 869-876 (2003)

Larsson M.C., Domingos A.I., Jones W.D., Chiappe M.E., Amrein H. and Vosshall L.B. “Or83 encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction” *Neuron* **43**, 703-714 (2004)

Li G., Foote C., Alexander S. and Alexander H. “Sphingosine-1-phosphate lyase has a central role in the development of *Dictyostelium discoideum*” *Development* **128**, 3473-3483 (2001)

Lindsley D.L and Grell E.H “Genetic variations of *Drosophila melanogaster*”

Editore I. L. Norton (1968)

Matsunami H. and Amrein H. “Taste and pheromone perception in mammals and flies” Review, *Gen. Biol.* **4**, 220 (2003)

Mendel J., Heinecke K., Fyrst H. and Saba J. D. “Sphingosine phosphate lyase expression is essential for normal development in *Caenorhabditis elegans*” *J. Biol. Chem.* **278**, 22341-22349 (2003)

Miller A. “The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*” da *Biology of Drosophila*, Editore M. Demerec, CSHL Press (1950)

Mizugushi K., Yamashita T., Olivera A., Miller G.F., Spiegel S. and Proia R.L. “Essential role of sphingosine kinases in neural and vascular development” *Mol. Cell. Biol.* **24**, 11113-11121 (2005)

Morita Y., Perez G.I., Paris F., Mirando S.R., Ehleiter D., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Xie Z., Reed J.C., Schuchman E.H., Kolesnick R.N. and Tilly J.L. “Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy” *Nat. Med.* **6**, 1109-1114 (2000)

Neuser K., Husse J., Stock P. and Gerber B. “Appetitive olfactory learning in *Drosophila* larvae: effects of repetition, reward strenght, age, gender, assay type and memory span” *Animal Behaviour* **69**, 891-898 (2005)

Prieschl E.E., Csonga R., Novotny V., Kikuchi G.E. and Baumruker T. “The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after FC epsilon receptor I triggering” *J. Exp. Med.* **190**, 1-8 (1999)

Prusky G.T., Alam N.M., Beckman S. and Douglas R.M. “Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system”

Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **45**, 4611-4616 (2004)

Renault A.D., Starz-Gaiano M. and Lehmann R. “Metabolism of sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid: a genome wide analysis of gene expression in *Drosophila*” *Mech. Dev.* **119**, 5293-5301 (1980)

Rietveld A., Neutz S., Simons K. and Eaton S. “Association of sterol- and glycoylphosphatidylinositol-linked proteins with *Drosophila* raft lipid microdomains” *J. Biol. Chem.* **274**, 12049-12054 (1999)

Rohrbough J. and Broadie K. “Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle” *Nature reviews, Neurosci.* **6**, 139-150 (2005)

Rohrbough J., Rushton E., Palanker L., Woodruff E., Matthies H.J., Acharya U., Acharya J.K. and Broadie K. “Ceramidase regulates synaptic vesicle exocytosis and trafficking” *J. Neurosci.* **24**, 7789-7803 (2004)

Rubin G.M. “*Drosophila melanogaster* as an experimental organism” *Science* **240**, 1453-1459 (1988)

Scherer S., Stocker R. and Gerber B. “Olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae” *Learn. Mem.* **10**, 217-225 (2003)

Schwärzel M. “Locating engrams of olfactory memories in *Drosophila*” Tesi di dottorato; Università Julius-Maximilian di Bayer (2003)

Snow P.M., Patel N.H., Harrelson A.L. and Goodman C.S. “Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos” *J. Neurosci.* **7**(12), 4137-4144 (1987)

Spiegel S. and Milstien S. “Sphingosine-1-phosphate, a key cell signalling molecule” *J. Biol. Chem.* **29**, 25851-15854 (2002)

Stocker R.F. “The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review” *Cell Tissue Res.* **275**, 3-26 (1994)

Tammero L.F., Frye M.A. and Dickinson M.H. “Spatial organisation of visuomotor reflex in *Drosophila*” *J. Exp. Biol.* **207**, 113-122 (2004)

Toman R.E. and Spiegel S. “Lysophospholipid receptors in nervous system” *Neurochem. Res.* **27**, 619-627 (2002)

Van Swinderen B. and Flores K.A. “Attention-like process underlying optomotor performance in a *Drosophila* choice maze” *J. Neurobiol.* (2006)

Waddell S. and Quinn W.G. “What can we teach to *Drosophila*? What can they teach us?” *Trends Genet.* **17**, 716-726 (2001)

Wandall H.H., Pizette S., Pedersen J.W., Eichert H., Levery S.B., Mandell U., Cohen S.M. and Clausen H. “Egghead and Brainiac are essential for glycosphingolipid biosynthesis *in vivo*” *J. Biol. Chem.* **11**, 4858-4863 (2005)

Wells G.B. and Lester R.L. “The isolation and characterisation of a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that requires a long chain base for growth and for synthesis of phosphosphingolipids” *J. Biol. Chem.* **258**, 10200-10203 (1983)

Zuker C.S. “The biology of vision in *Drosophila*” *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 571-576 (1996)