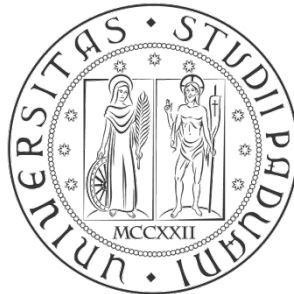


Università degli Studi di Padova
Laurea Magistrale in Biologia Molecolare



**Caratterizzazione funzionale del gene *CG18317* di
Drosophila melanogaster in vivo ed in vitro**

Relatore: Prof. Mauro Agostino Zordan
Dipartimento di Biologia

Correlatore: Dott.ssa Caterina Da Rè
Dipartimento di Biologia
Università di Padova

Laureanda: Marianna Beggio

Anno Accademico 2011/2012

ABSTRACT

Le malattie mitocondriali, note come encefalomiopatie mitocondriali, sono un ampio gruppo di patologie associate a difetti del metabolismo energetico mitocondriale, attribuibili, in particolare, a difetti nella fosforilazione ossidativa (Zeviani e Di Donato, 2004). Tali disordini dipendono da mutazioni che possono intervenire nel genoma mitocondriale e/o in quello nucleare (DiMauro e Shon, 2003). Difetti degli enzimi coinvolti nella replicazione del DNA mitocondriale (mtDNA) e sbilanciamenti nei pool nucleotidici necessari alla sintesi del mtDNA, portano ad errori nella sintesi e nel mantenimento del genoma mitocondriale, che si possono manifestare sotto forma di gravi malattie genetiche (Pontarin *et al.*, 2003; DiMauro e Shon, 2008; Laenza *et al.*, 2008).

Sulla base dell'omologia con il gene *Rim2* di lievito, che codifica per un trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici RIM2 (Replication In Mitochondria 2) (Marrobbio *et al.*, 2006), si è analizzato l'omologo in *Drosophila melanogaster* CG18317. Al fine di caratterizzare e identificare la funzione di questa proteina in *Drosophila*, si sono effettuati esperimenti sia *in vivo*, nell'organismo, sia *in vitro*, utilizzando le linee cellulari S2 ed S2R+.

Questo gene è stato caratterizzato dal punto di vista morfologico (generazione di un ceppo di *Drosophila* knock out per il gene, uso della microscopia elettronica e osservazione di linee cellulari di *Drosophila* in cui è stato silenziato il gene in questione) e biochimico (misurazione del consumo di ossigeno e analisi dei pool nucleotidici totali).

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag.	1
1.1 Le malattie mitocondriali		1
1.1.1 I mitocondri: struttura e funzione		2
1.1.2 Genetica mitocondriale		3
1.1.3 La sintesi del DNA mitocondriale		5
1.1.4 Stabilità e mantenimento del mtDNA		6
1.1.5 Genetica delle mitocondriopatie		7
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> come organismo modello per lo studio di malattie mitocondriali		9
1.2.1 <i>Drosophila melanogaster</i> come organismo modello		9
1.2.2 Il genoma di <i>Drosophila melanogaster</i>		11
1.2.3 L'anatomia della larva		11
1.2.4 L'anatomia dell'adulto		12
1.2.5 Le colture cellulari di <i>Drosophila melanogaster</i>		13
1.2.6 RNAi nelle colture cellulari di <i>Drosophila melanogaster</i>		14
1.3 I trasportatori mitocondriali dei nucleotidi		16
1.3.1 Il trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		16
1.3.2 Il trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici in <i>Homo sapiens</i>		17

1.3.3	L'omologo di <i>Drosophila melanogaster</i> del gene <i>Rim2</i> di lievito	18
2.	SCOPO DELLA TESI	21
3.	MATERIALI E METODI	23
3.1	Individui di <i>Drosophila melanogaster</i>	23
3.1.1	Ceppi di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzati	23
3.1.2	Mantenimento dei ceppi di <i>Drosophila</i> in laboratorio	24
3.1.3	Dissezione larvale	24
3.1.4	Misurazione della respirazione larvale con il Seahorse Bioscience (XF ₂₄ Extracellular Flux Analyzer)	28
3.1.5	Quantificazione dell'espressione genica	32
3.1.6	Inclusione delle larve di <i>Drosophila melanogaster</i> (Microscopia Elettronica)	36
3.2	Cellule di <i>Drosophila melanogaster</i>	38
3.2.1	Linee cellulari di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzate	38
3.2.2	Coltura e mantenimento delle linee cellulari	38
3.2.3	Misurazione della respirazione cellulare con il Seahorse Bioscience (XF ₂₄ Extracellular Flux Analyzer)	39
3.2.4	Quantificazione dell'espressione genica	39
3.2.5	Silenziamento genico mediante RNA interference (RNAi)	40
3.2.6	Estrazione del pool cellulare totale dei nucleotidi	42

3.2.7	Determinazione delle dimensioni dei pool dei dNTPs	42
4.	RISULTATI	45
4.1	Individui di <i>Drosophila melanogaster</i>	45
4.1.1	Osservazione delle larve <i>CG18317Δ/CyO-GFP</i>	45
4.1.2	Quantificazione dell'espressione del gene <i>CG18317</i> mediante qRT-PCR	46
4.1.3	Respirazione mitocondriale larvale	47
4.1.4	Osservazione dei mitocondri per mezzo della microscopia elettronica	49
4.2	Cellule di <i>Drosophila melanogaster</i>	51
4.2.1	Effetti dell'RNAi in cellule S2 ed S2R+	51
4.2.2	Quantificazione dell'espressione del gene <i>CG18317</i> in cellule mediante qRT-PCR	53
4.2.3	Respirazione delle cellule wild-type ed interferate	55
4.2.4	Caratterizzazione del ciclo cellulare delle cellule S2 ed S2R+ wild-type ed interferate	56
4.2.5	Quantificazione dei pool nucleotidici citosolici e mitocondriali	58
5.	DISCUSSIONE	61
6.	CONCLUSIONI	69
7.	APPENDICE 1	71
8.	BIBLIOGRAFIA	73
	RINGRAZIAMENTI	79

1. INTRODUZIONE

1.1 Le malattie mitocondriali

Le malattie mitocondriali sono un ampio gruppo di patologie associate a difetti del metabolismo energetico mitocondriale, riconducibili in particolare ad anomalie nella fosforilazione ossidativa OXPHOS (Oxidative phosphorylation) (Zeviani e Di Donato, 2004). Poiché gli organi maggiormente affetti sono il cervello e i muscoli scheletrici, le patologie sono spesso conosciute come encefalomiopatie mitocondriali (DiMauro e Schon, 2003). Tuttavia, tutti i tessuti ad elevata richiesta energetica quali, oltre a cervello e muscolo, cuore, pancreas endocrino, rene, fegato ed epitelii neurosensoriali risultano particolarmente colpiti. Per questo motivo le sindromi mitocondriali risultano estremamente eterogenee, dal punto di vista clinico (Zeviani e Di Donato, 2004). Le encefalomiopatie mitocondriali coinvolgono sia la genetica mendeliana che quella mitocondriale, in quanto la catena respiratoria è sotto il controllo di due sistemi genetici: il genoma nucleare e il genoma mitocondriale. Queste malattie umane, infatti, dipendono da mutazioni che possono intervenire nel genoma nucleare e/o in quello mitocondriale. Inoltre, le malattie mitocondriali, sono più diffuse di quanto comunemente ritenuto, colpiscono circa 10-15 persone ogni 100.000, al pari delle più note malattie neurologiche: sclerosi laterale amiotrofica e distrofie muscolari (Di Mauro e Schon, 2003). Oltre a ciò, si possono presentare a qualsiasi età: precocemente, in giovane età, nei bambini o in età adulta (Di Mauro e Schon, 2003).

Le manifestazioni cliniche delle malattie mitocondriali sono estremamente eterogenee, in quanto possono coinvolgere tessuti, singole strutture (come nella Neuropatia ottica ereditaria di Leber, LHON, la prima malattia umana che è stata associata ad una mutazione nel DNA mitocondriale), molteplici organi ed apparati (come miopatie, encefalomiopatie e cardiopatie), o causare complesse sindromi multisistemiche (Zeviani e Di Donato, 2004).

1.1.1 I mitocondri: struttura e funzione

I mitocondri sono organelli polimorfi citoplasmatici con una doppia membrana, evolutasi da un evento endosimbiotico tra un batterio aerobio e una cellula eucariotica primordiale. Questo doppio strato lipidico delimita quattro compartimenti ugualmente importanti per il funzionamento del mitocondrio: la membrana esterna, la membrana interna, lo spazio intermembrana e la matrice mitocondriale (la regione all'interno della membrana interna); (DiMauro e Schon, 2003). La membrana interna ospita gli enzimi della catena respiratoria mitocondriale e garantisce una barriera per la diffusione ionica, un fattore cruciale per generare il gradiente protonico necessario a produrre ATP; inoltre forma molte invaginazioni, note come cristae, utili per aumentarne la superficie durante il processo metabolico. La matrice mitocondriale contiene gli enzimi del ciclo degli acidi tricarbossilici e della β -ossidazione, coinvolti rispettivamente nel metabolismo dei carboidrati e dei grassi. La membrana esterna è porosa e permette la diffusione passiva tra citosol e spazio intermembrana di sostanze a basso peso molecolare.

I mitocondri svolgono numerose funzioni, come l'ossidazione del piruvato, il ciclo di Krebs, il metabolismo degli aminoacidi, degli acidi grassi, degli steroidi, ma la più importante rimane la generazione di energia sotto forma di ATP (adenosine triphosphate) per mezzo della catena di trasporto degli elettroni e del sistema di ossidazione fosforilativa (la "catena respiratoria", Figura 1.1); (DiMauro e Schon, 2003). L'ATP, risultante dalla condensazione tra un fosfato inorganico e l'adenosin difosfato (ADP), è una fonte di energia essenziale e prontamente utilizzabile per la cellula, per il suo mantenimento e il suo normale funzionamento. Questo processo dipende da cinque complessi polipeptidici (I – V) costituiti da più subunità che sono localizzati nella membrana mitocondriale interna. Gli elettroni vengono trasferiti da un complesso all'altro della "catena respiratoria mitocondriale" attraverso una serie di reazioni ossido-riduttive, producendo un gradiente elettrochimico attraverso l'estrusione di protoni dalla matrice alla membrana interna dai complessi I, III e IV. L'ATP viene poi generato attraverso la dissipazione di questo gradiente protonico per mezzo del complesso V (ATP sintasi). Questo processo di produzione di ATP è essenziale per il normale funzionamento di tutte le cellule eucariotiche, anche se i mitocondri sono particolarmente numerosi nelle cellule ad elevata richiesta metabolica, come i neuroni e i muscoli scheletrici.

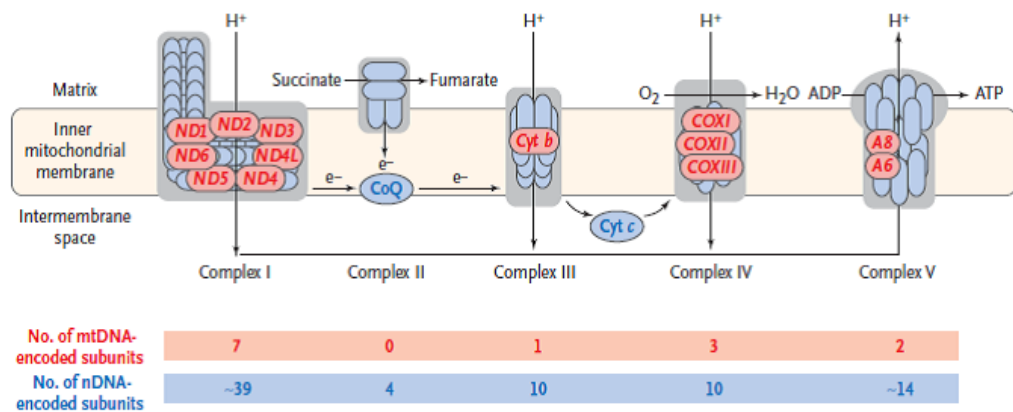


Figura 1.1 – Subunità della catena respiratoria codificate rispettivamente in blu dal DNA nucleare e in rosso dal DNA mitocondriale. Mentre gli elettroni (e^-) scorrono lungo la catena di trasporto degli elettroni, i protoni (H^+) sono pompate dalla matrice allo spazio intermembrana attraverso i complessi I, II e IV e poi tornano nella matrice attraverso il complesso V per produrre ATP. Il coenzima Q (CoQ) e il citocromo c (Cyt c) sono trasportatori di elettroni. (Figura tratta e modificata da DiMauro e Schon, 2003).

Tuttavia, i mitocondri, sono anche coinvolti in molti altri differenti processi, quali le vie di trasduzione del segnale, la differenziazione cellulare, l'apoptosi, il controllo del ciclo cellulare e la crescita delle cellule (DiMauro e Schon, 2003).

1.1.2 Genetica mitocondriale

I mitocondri sono gli unici organelli a possedere un proprio genoma, noto come DNA mitocondriale (mtDNA), ed un proprio macchinario per la sintesi dell'RNA e delle proteine (DiMauro e Schon, 2003).

Il DNA mitocondriale umano (Figura 1.2) è una piccola (16,569 bp) molecola circolare a doppio filamento contenente 37 geni; di questi, 24 sono necessari per la trascrizione del mtDNA (2 RNA ribosomiali e 22 RNA transfer), e 13 codificano le subunità della catena respiratoria: sette subunità del complesso I, una subunità del complesso III, tre subunità del complesso IV (citocromo c ossidasi, COX) e due subunità del complesso V (ATP sintasi) (DiMauro e Schon, 2003). Tutte le altre proteine necessarie al mitocondrio sono importate dal citosol e tradotte dal DNA nucleare, il quale "controlla" anche il mantenimento qualitativo e quantitativo dei mitocondri e quindi del mtDNA.

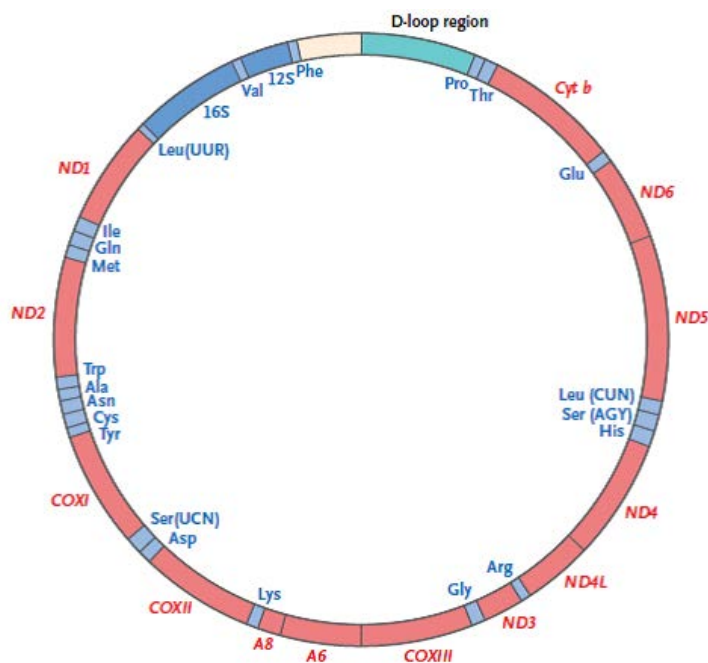


Figura 1.2 – Mappa del genoma mitocondriale umano. In rosso sono rappresentate le regioni dei geni codificanti proteine mitocondriali: sette subunità del complesso I (*ND*), tre subunità della citocromo *c* ossidasi (*COX*), la subunità citocromo *b* del complesso III (*Cyt b*) e due subunità dell'ATP sintasi (*A6* e *A8*). In blu sono rappresentate le regioni dei geni codificanti proteine utili alla sintesi del DNA: gli RNA ribosomiali 12S e 16S e i 22 RNA transfer (Simbolo a tre lettere degli aminoacidi). La regione D-loop controlla l'inizio della replicazione e della trascrizione del mtDNA. (Figura tratta da DiMauro e Schon, 2003).

La genetica mitocondriale differisce dalla genetica mendeliana fondamentalmente in tre aspetti: l'eredità materna, l'eteroplasmia e la segregazione mitotica.

- **Eredità materna:** tutti i mitocondri, di conseguenza tutti i genomi mitocondriali, nello zigote derivano dalla cellula uovo. Di conseguenza una madre portatrice di una mutazione nel mtDNA la trasmetterà a tutti i suoi figli, ma solo le figlie la potranno trasmettere poi alla propria progenie (DiMauro e Schon, 2003).
- **Eteroplasmia:** il genoma mitocondriale è poliploide con molte copie di mtDNA nello stesso mitocondrio. Quando tutte le copie di mtDNA sono identiche si parla di omoplasmia; nel caso in cui coesistano due o più genotipi mitocondriali (a causa di mutazioni) nella stessa cellula, tessuto o organismo si parla di eteroplasmia. Esiste un valore soglia minimo di mutazioni del mtDNA prima che le funzioni tissutali siano compromesse e venga evidenziato un fenotipo clinico (DiMauro e Schon, 2003).
- **Segregazione mitotica:** la ridistribuzione casuale degli organelli durante la divisione cellulare può cambiare la proporzione di mtDNA mutato ricevuto dalle cellule figlie (DiMauro e Schon, 2003).

1.1.3 La sintesi del DNA mitocondriale

La replicazione del DNA mitocondriale avviene in un compartimento e in un tempo diverso rispetto alla sintesi del DNA nucleare: mentre quella del DNA nucleare avviene esclusivamente durante la fase S, quando la disponibilità di dNTPs (deossiribonucleosidi trifosfato) è maggiore, il mtDNA viene replicato durante tutto il ciclo cellulare (Rampazzo *et al.*, 2004; Pontarin *et al.*, 2003). Entrambi, però, richiedono un apporto bilanciato di dNTPs. Durante la fase S del ciclo cellulare, i dNTPs per il genoma nucleare sono sintetizzati sia attraverso la via *de novo*, cioè per mezzo dei ribonucleotidi, sia attraverso la via di recupero della timidina dal citosol. I mitocondri contengono specifiche chinasi per il recupero dei deossiribonucleosidi potendo in questo modo sintetizzare i dNTPs all'interno dell'organello stesso (Pontarin *et al.*, 2003).

I mitocondri dispongono di due "pathway" distinti per fornire al genoma in replicazione i deossitimidina-trifosfato (dTTPs): (1) attraverso i trasportatori deossinucleotidici di membrana che introducono nucleotidi dal citosol al mitocondrio (Dolce *et al.*, 2001); (2) attraverso la timidina chinasi 2 (TK2) che nella matrice fosforila la timidina a deossitimidina-monofosfato (dTMP) (Berk e Clayton, 1973; Bogenhagen e Clayton, 1976; Johansson e Karlsson, 1997). Questa viene successivamente fosforilata a deossitimidina-trifosfato (dTTP) dalle chinasi nucleotidiche (Pontarin *et al.*, 2003). Il primo pathway dipende principalmente dalla sintesi *de novo* dei deossiribonucleosidi, i quali vengono defosforilati nel citosol dall'enzima ribonucleotide reductasi (Jordan e Reichard, 1998), mentre dipende in misura minore dall'attività della timidina chinasi citosolica 1 (TK1) (Bradshaw e Deininger, 1984). Entrambi gli enzimi sono attivi solo durante la fase S del ciclo cellulare (Chabes e Thelander, 2000), pertanto questo pathway non è presente nelle cellule differenziate (Pontarin *et al.*, 2003). Il secondo pathway, invece, utilizza la timidina importata dall'ambiente extracellulare e poiché la TK2 non è regolata dal ciclo cellulare è attivo anche al di fuori della fase S (Pontarin *et al.*, 2003) (Figura 1.3).

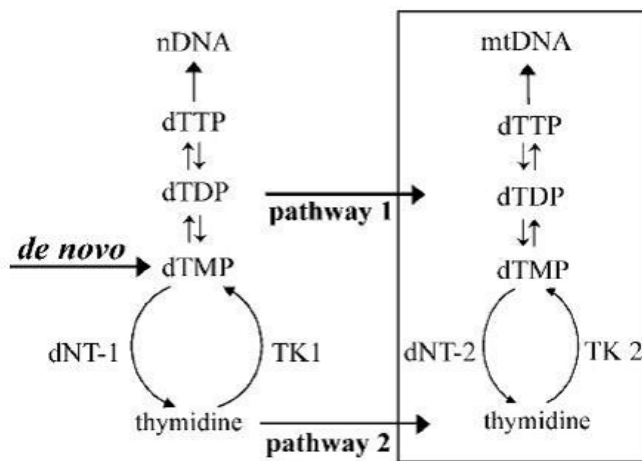


Figura 1.3 – Due pathways per i dTTPs. 1. Importo dal citosol dei nucleotidi sintetizzati nel citosol. La timidina prima entra nel pool mitocondriale di dTTPs. Gli enzimi della membrana mitocondriale catalizzano il rapido movimento dei timidina fosfati (e probabilmente di altri nucleotidi) dentro e fuori i mitocondri. 2. All'importo della timidina segue la sua fosforilazione intra-mitocondriale. I Substrates cycles tra timidina chinasi (TKs) e deossinucleotidasi (dNTs) partecipano alla regolazione di entrambi i pathways. (Figura tratta da Pontarin *et al.*, 2003).

1.1.4 Stabilità e mantenimento del mtDNA

La sintesi del DNA mitocondriale richiede un apporto bilanciato dei quattro dNTPs; per questo motivo i precursori del genoma mitocondriale sono formati e regolati da una rete di enzimi anabolici e catabolici localizzati sia all'interno dei mitocondri che nel citosol. Uno sbilanciamento nel pool nucleotidico può provocare danni a livello dell'mtDNA, dovuti ad errori di replicazione o mutazioni (Pontarin *et al.*, 2003; Leanza *et al.*, 2008).

Un malfunzionamento degli enzimi coinvolti nella sintesi del mtDNA o eventuali sbilanciamenti nei pool nucleotidici, necessari alla sintesi, possono indurre un malfunzionamento nella replicazione e nel mantenimento del DNA e provocare, quindi, delle gravi malattie genetiche (Leanza *et al.*, 2008; Pontarin *et al.*, 2003; DiMauro e Schon, 2008).

Poiché tutti i fattori responsabili del mantenimento e della replicazione del mtDNA sono codificati da geni nucleari, mutazioni che avvengono in uno qualsiasi di questi geni si trasmettono seguendo le regole della genetica mendeliana e possono inficiare l'integrità del mtDNA, causando lesioni molecolari sia qualitative (modifiche strutturali quali per esempio delezioni multiple) che quantitative (deplezione, ovvero diminuzione della quantità totale di mtDNA) (Spinazzola e Zeviani, 2005).

In particolare, una classe di malattie mitocondriali, le sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (MDS) sono caratterizzate da una diminuzione del numero di copie del mtDNA, causando in questo modo una sintesi insufficiente delle subunità dei complessi mitocondriali della catena respiratoria e quindi uno scompenso metabolico energetico. Esse sono ereditate come tratti autosomici recessivi e causate da mutazioni in geni coinvolti nel metabolismo dei dNTPs e nella sintesi del mtDNA (Spinazzola e Zeviani, 2005).

1.1.5 Genetica delle mitocondriopatie

Un gran numero di differenti mutazioni, possono localizzarsi sia a livello del genoma nucleare sia a livello di quello mitocondriale. Le alterazioni del mtDNA possono colpire direttamente le proteine strutturali della catena respiratoria, oppure interferire con i meccanismi della sintesi proteica mitocondriale coinvolgendo i tRNA o gli rRNA. Le mutazioni del nDNA si possono classificare in base alle strutture codificate dai geni coinvolti: componenti strutturali, fattori di assemblaggio delle subunità della catena respiratoria, fattori che garantiscono la stabilità mitocondriale e fattori coinvolti nella biogenesi dei mitocondri (Di Mauro e Schon, 2003).

- **Malattie causate da mutazioni nel DNA mitocondriale**

Come già accennato nel paragrafo 1.1.2, la genetica mitocondriale differisce dalla genetica mendeliana in tre aspetti principali: eredità materna, eteroplasmia e segregazione mitotica. Pertanto, molte delle patologie associate a questo tipo di mutazioni mostrano eredità materna e sono caratterizzate da una condizione di eteroplasmia, nella quale copie mutate e copie selvatiche del genoma coesistono nella stessa cellula (DiMauro e Schon, 2003).

Le mutazioni del mtDNA possono essere divise in riarrangiamenti su larga scala (ad esempio delezioni o duplicazioni parziali) e mutazioni puntiformi (Zeviani e Di Donato, 2004).

- Riarrangiamenti su larga scala del mtDNA

I riarrangiamenti su larga scala in genere sono sporadici ed eteroplasmici (Zeviani e Di Donato, 2004).

Il primo caso di malattie mitocondriali associate a questo tipo di mutazioni è la oftalmoplegia esterna sporadica progressiva (progressive external ophthalmoplegia, PEO) tipicamente dovuta a singole delezioni del mtDNA (Spinazzola e Zeviani, 2005). Altri

esempi di sindromi mitocondriali associati a tali mutazioni sono la sindrome di Kearns-Sayr e (KSS) e la sindrome di Pearson (Zeviani e Di Donato, 2004).

- Mutazioni puntiformi del mtDNA (eredità materna)

Diversamente dai riarrangiamenti su larga scala, le mutazioni puntiformi del mtDNA sono generalmente ereditate per via materna, possono essere eteroplasmiche o omoplasmiche ed inoltre, possono interessare geni strutturali o geni coinvolti nella sintesi delle proteine mitocondriali (tRNA e rRNA; Zeviani e Di Donato, 2004).

Le mutazioni eteroplasmiche comprendono varie patologie quali, l'encefalomiopatia mitocondriale con acidosi lattica ed episodi di ictus (Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes, MELAS), l'epilessia mioclonica con fibre "red ragged" (Myoclonic epilepsy with ragged red fibres, MERRF) e la NARP (Neurogenic weakness, ataxia and retinitis pigmentosa); mentre, la LHON è determinata da mutazioni omoplasmiche (Zeviani e Di Donato, 2004).

▪ **Malattie causate da mutazioni nel DNA nucleare**

Le alterazioni del mtDNA di alcune sindromi sono spesso il risultato di alterazioni presenti nel genoma nucleare che controlla la replicazione, il mantenimento e la traduzione del mtDNA. Le conseguenti patologie sono caratterizzate da alterazioni quantitative o qualitative del mtDNA, o da difetti nella traduzione dei componenti della catena respiratoria codificati dal mtDNA. La maggior parte di questi disturbi sono causati da alterazioni nel pool di nucleotidi necessari alla sintesi del mtDNA, o in enzimi associati alla replicazione del mtDNA (DiMauro e Schon, 2008).

Un esempio di queste sindromi è rappresentato dalla Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, MDS; tale patologia, descritta per la prima volta nel 1991 (Moraes *et al.*, 1991), differisce dalle altre malattie mitocondriali in quanto è un difetto quantitativo piuttosto che qualitativo: la ridotta quantità di mtDNA, probabilmente comporta un'insufficiente sintesi dei complessi della catena respiratoria codificati dal mtDNA (I, III, IV, V) (Spinazzola e Zeviani, 2005).

Altre patologie, invece, possono essere il risultato di alterazioni di geni codificanti per componenti strutturali o fattori di assemblaggio

dei complessi della catena respiratoria. È il caso, ad esempio, della sindrome di Leigh, quale è caratterizzata da decremento di attività della COX a livello del complesso IV della catena respiratoria (DiMauro e Schon, 2003).

Anche mutazioni in geni codificanti per componenti non proteiche della catena respiratoria, ma che sono necessarie per sintetizzare e dirigere il corretto assemblaggio delle diverse subunità della catena respiratoria, possono essere causa di diverse patologie. Ne sono un esempio le patologie causate da deficit del coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀ deficiency); il CoQ₁₀ agisce come trasportatore di elettroni nella catena respiratoria: trasferisce elettroni dal complesso I e II al complesso III (DiMauro e Schon, 2008).

Un altro esempio di malattie mitocondriali possono interessare mutazioni in geni coinvolti indirettamente nella fosforilazione ossidativa, ad esempio l'ataxia di Friedreich (FA) causata da ridotti livelli di fratassina, una proteina legante il ferro mitocondriale coinvolta nella biosintesi del gruppo Fe-S (DiMauro e Schon, 2008).

Nel tentativo di delineare un quadro completo della fisiopatologia di queste malattie, lo sviluppo di modelli animali, ha portato alla riproduzione, grazie a diverse tecniche, della varietà di sintomi legati alle stesse, rendendo così più facile e accurata la loro comprensione. *Drosophila melanogaster*, per la sua grande trattabilità a diversi livelli (genetico, biochimico, molecolare e fisiologico) e per la sua presenza di molti ortologhi di geni umani, è l'organismo modello più impiegato in questo genere di studi (Sánchez-Martínez *et al.*, 2006).

1.2 *Drosophila melanogaster* come organismo modello per lo studio di malattie mitocondriali

1.2.1 *Drosophila melanogaster* come organismo modello

Drosophila melanogaster, comunemente chiamata “moscerino della frutta”, è un insetto appartenente all'ordine dei ditteri.

Fin dai primi del '900 (precisamente dal 1909 da Thomas Hunt Morgan) *D. melanogaster* è uno degli organismi più utilizzati nella ricerca biologica, in particolar modo nella genetica e nella biologia dello sviluppo. Utilizzando

Drosophila come organismo sperimentale si possono applicare tecniche di genetica classica, citogenetica, genetica molecolare, biochimica, elettrofisiologia e biologia cellulare, infatti, grazie alla sua estrema versatilità e al suo approccio multidisciplinare è stata utilizzata nei laboratori come organismo modello (Rubin, 1988). Molteplici sono i motivi che rendono questo moscerino un buon organismo modello. E' piccolo, facile da allevare in laboratorio, genera un gran numero di progenie in tempi relativamente veloci, si può mantenere in grandi numeri con costi contenuti. Il suo ciclo vitale è breve (circa due settimane da uovo ad adulto a temperatura ambiente) consentendo così di svolgere studi di diverse generazioni in un ridotto intervallo di tempo. Infine, *Drosophila* possiede solo quattro cromosomi, quindi un piccolo genoma di 165 milioni di basi (1/20 del genoma umano) completamente sequenziato nel 2000 (Adams *et al.*, 2000) contenente molti geni ortologhi a geni umani.

Drosophila è un insetto olometabolo, va quindi incontro ad una metamorfosi completa nel corso dello sviluppo da uovo ad insetto adulto. Il suo ciclo vitale comprende quattro fasi successive: uovo, larve (la fase di larva comprende tre stadi), pupa (la fase di pupa comprende due stadi) e adulto (Figura 1.4).

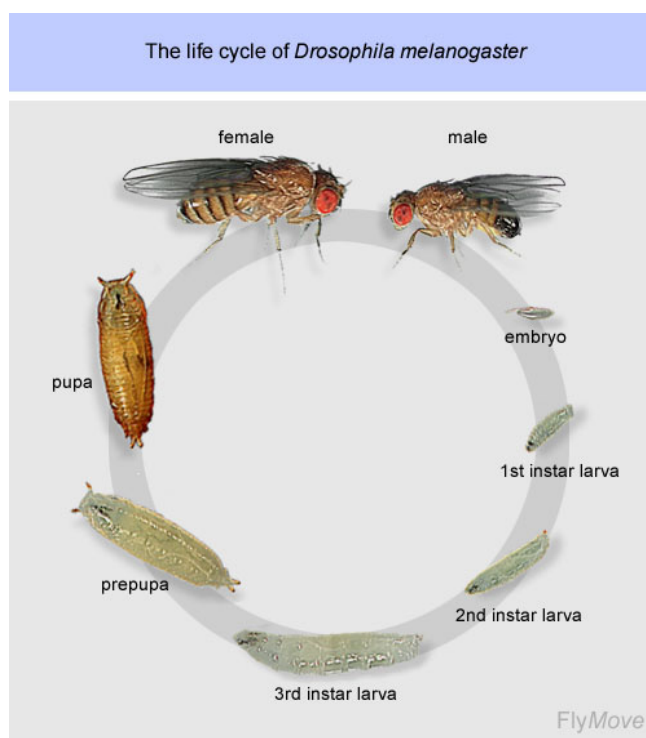


Figura 1.4 – Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*. L'embrione si forma entro 24 ore dalla fecondazione e dopo altre 24 ore l'embrione si è trasformato in una larva primo stadio. Dopo 24 ore si trasforma in una larva di secondo stadio e dopo altre 24 ore in una larva di terzo stadio. Dopo due – tre giorni si passa allo stadio di pupa dal quale si schiuderà un individuo adulto dopo altri tre – quattro giorni. (Figura tratta da <http://flymove.uni-muenster.de/>).

Circa il 75% dei geni conosciuti per malattie umane hanno una sequenza omologa nel genoma del moscerino (Reiter *et al.*, 2001) e il 50% delle sequenze proteiche di *Drosophila* hanno un omologo nei mammiferi.

D. melanogaster viene utilizzata come organismo modello per molte malattie umane come i disturbi neurodegenerativi, per esempio il Parkinson, la corea di Huntington, la malattia di Alzheimer e l'ataxia spino-cerebellare. Il moscerino è impiegato anche per studiare i meccanismi alla base dell'invecchiamento, dello stress ossidativo, dell'immunità, del diabete, del cancro e dell'abuso di farmaci.

1.2.2 Il genoma di *Drosophila melanogaster*

Il genoma di *Drosophila melanogaster*, il quale viene curato presso il database FlyBase (<http://flybase.org>), contiene quattro paia di cromosomi: un paio di cromosomi sessuali X/Y e tre paia di autosomi chiamati 2, 3 e 4. Il quarto cromosoma è talmente piccolo che spesso non viene considerato, tranne che per il suo gene *eyeless* importante per lo sviluppo dell'occhio. Il genoma del moscerino della frutta è costituito da 165 milioni di paia di basi e contiene circa 13.767 geni. Più del 60% del genoma risulta essere DNA non codificante funzionale al controllo dell'espressione genica.

La determinazione del sesso in *Drosophila* è data dal rapporto cromosomi X con gli autosomi e non dalla presenza del cromosoma Y, come invece avviene nell'uomo. Sebbene il cromosoma Y sia interamente eterocromatico, vi sono stati individuati 16 geni, molti dei quali si ritiene abbiano funzioni prettamente maschili (Carvalho, 2002).

1.2.3 L'anatomia della larva

La larva di *Drosophila melanogaster* ha 12 segmenti: un segmento cefalico, tre toracici e otto addominali. L'apertura buccale è situata ventralmente nel segmento cefalico e al suo interno sono situate delle strutture cheratinose dette "uncini buccali" che servono a raccogliere il cibo. La parete del corpo è flessibile e sottile ed è formata da una cuticola esterna e da una epidermide interna. Oltre agli organi e alle strutture necessarie alla crescita della larva, essa contiene anche speciali strutture denominate "dischi imaginali" che costituiscono i primordi delle strutture dell'adulto (Figura 1.5).

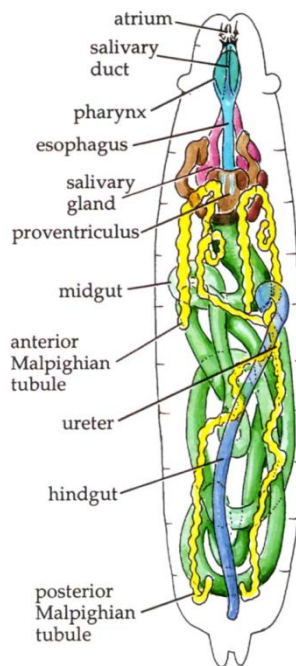


Figura 1.5 – Larva terzo stadio di *Drosophila melanogaster*. Schema del corpo di una larva terzo stadio di *Drosophila* con gli organi principali. (Figura tratta e modificata da <http://www.docstoc.com/docs/89461663/ANATOMY-AND-DEVELOPMENT-OF-DROSOPHILA-LARVA>).

1.2.4 L'anatomia dell'adulto

Il moscerino adulto presenta un corpo suddiviso in tre parti:

- Capo con un paio di antenne, occhi composti, ocelli e apparato buccale;
- Tronco con un solo paio d'ali e tre paia di arti formati da cinque segmenti;
- Addome segmentato che porta l'altro paio d'ali trasformato in bilancieri che servono all'insetto come elemento di stabilità e di direzione.

La femmina è generalmente più grande, come mostrato in figura 1.6, ha un addome appuntito che si ingrossa quando deve deporre le uova e che diviene concavo dopo la deposizione. La parte distale dell'addome del maschio è più arrotondata e scura.

I genitali nei due sessi sono molto differenti, nel maschio sono presenti degli uncini copulatori. Il tarso delle zampe anteriori del maschio porta i pettini sessuali (http://www.lngs.infn.it/calendario/doc_2009/)



Figura 1.6 – Adulti di *Drosophila melanogaster*. A sinistra una femmina, a destra un maschio. (Figura tratta da <http://flymove.uni-muenster.de/>).

1.2.5 Le colture cellulari di *Drosophila melanogaster*

Lo studio di determinati processi *in vivo* a volte risulta ostacolato da molteplici vincoli tecnici. Per questo motivo spesso si conducono esperimenti su cellule isolate da un dato organismo. Le cellule rimosse dai tessuti animali possono essere mantenute in laboratorio in condizioni che ne permettono la crescita e la sopravvivenza: questa tecnica viene indicata come coltura cellulare. Molti sono i vantaggi delle colture cellulari, quali la crescita di un solo tipo cellulare, un miglior controllo delle condizioni sperimentali (ambiente fisicochimico e fisiologico) e la proliferazione di una colonia di cellule identiche (clone) a partire da una singola cellula. Le colture cellulari sono uno dei maggiori metodi usati in biologia poiché forniscono un eccellente sistema modello per studiare la fisiologia e la biochimica delle cellule, gli effetti di farmaci e componenti tossiche sulle cellule, la mutagenesi e la carcinogenesi (<http://www.invitrogen.com/cellculturebasics>).

Fin dai primi anni '60 sono state create numerose linee cellulari di *Drosophila*, rappresentanti differenti tipi cellulari (Schneider, 1972). Poiché molte vie di traduzione del segnale e le funzioni di proteine conservate sono state mantenute dalla *Drosophila* ai mammiferi, il silenziamento dell'espressione proteica in queste linee cellulare ha reso possibile lo studio dei processi biochimici in un ambiente relativamente semplice da analizzare. Inoltre i risultati ottenuti dallo studio in coltura possono essere confermati da esperimenti condotti sull'intero organismo. Un metodo molto semplice, altamente riproducibile ed efficiente nelle colture cellulari di *Drosophila*, utile per indagare la funzione genica, è l'RNA interference (RNAi).

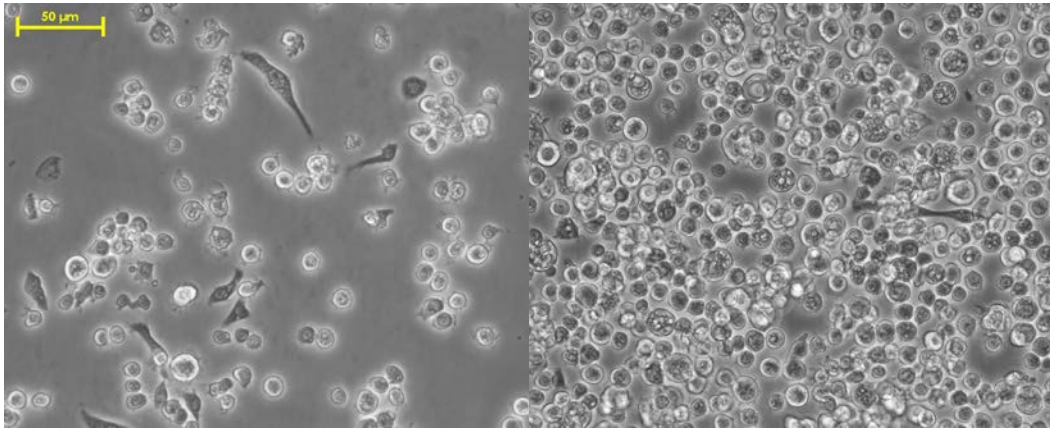


Figura 1.7 – Colture cellulari di *Drosophila melanogaster*. A sinistra si nota una coltura cellulare più rada rispetto alla figura di destra. Le cellule più scure sono indicative di maggiore adesione al substrato. (Figure tratte da <https://dgrc.cgb.indiana.edu/cells/store/catalog.html>).

1.2.6 RNAi nelle colture cellulari di *Drosophila melanogaster*

Il silenziamento dell'espressione genica (RNAi) mediante la formazione di un RNA a doppio filamento (dsRNA) è diventato un metodo comune per ridurre o abbattere la sintesi di specifiche proteine in una varietà di sistemi, dall'intero animale (*C. elegans* e *D. melanogaster*) alle colture cellulari di insetto e mammifero. La scoperta di questo fenomeno è avvenuta attraverso esperimenti di RNA antisenso: se specifici filamenti complementari di RNA venivano combinati tra loro, formando un dsRNA, si produceva il silenziamento ("interferenza") dell'espressione proteica. Il meccanismo di RNAi prevede il riconoscimento della molecola di dsRNA dall'enzima dicer, una nucleasi RNAsiIII. Questa taglia il dsRNA in pezzi di circa 22 bp che vengono successivamente legati dal complesso multiproteico RISC (RNA-induced silencing complex). Il complesso RISC attraverso una attività di elicasi apre il breve doppio filamento (siRNA) e con attività nucleasica degrada il filamento senso; solo il filamento antisenso rimane legato al complesso RISC che viene così attivato. Gli mRNAs presenti nel citosol che hanno sequenze complementari all'RNA antisenso legato a RISC vengono in questo modo degradati (Figura 1.8).

La tecnica dell'RNAi fu inizialmente utilizzata per perfezionare gli studi di genetica inversa in *C. elegans*; tuttavia questa tecnica fu presto adottata per gli studi in *Drosophila* e, con qualche modifica, in mammifero. La pubblicazione del genoma di *Drosophila* (Adams *et al.*, 2000), che ha fornito una risorsa senza precedenti per gli studi di genomica funzionale, in combinazione con la tecnica di RNAi, hanno facilitato la scoperta di geni coinvolti in numerosi processi biologici e cellulari (Bai *et al.*, 2009); in

particolare l'uso di RNAi può essere fondamentale per scoprire la struttura della rete di segnali cellulari (Mathey-Prevot e Perrimon, 2006), come per esempio la funzione dei trasportatori mitocondriali dei nucleotidi.

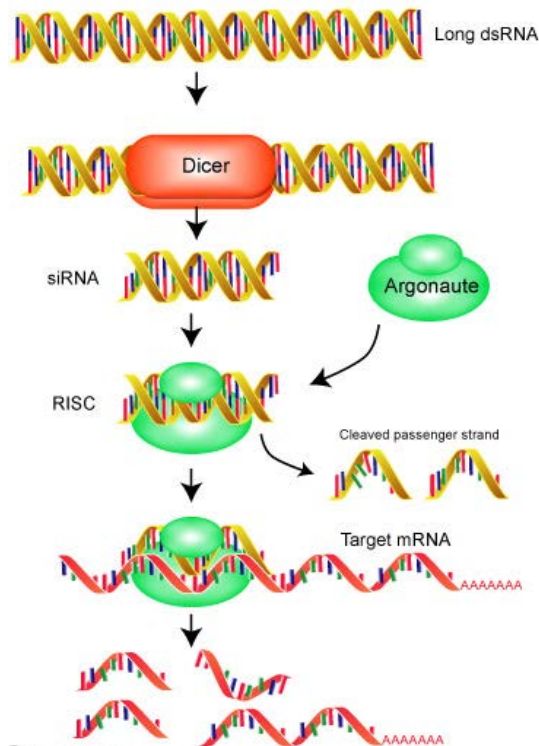


Figura 1.8 – Meccanismo dell'RNA interference. I lunghi trascritti di dsRNA agiscono come innesco del processo di RNAi. Essi vengono prima elaborati dall'enzima RNasiIII Dicer in una reazione ATP-dipendente. Dicer processa i dsRNA in siRNA lunghi circa 21-23 nt. I siRNA possono anche essere sintetizzati all'esterno della cellula e quindi essere introdotti attraverso trasfezione o elettroporazione. I siRNA vengono incorporati nel complesso RISC che consiste di una proteina Argonauta (Ago) come uno dei suoi componenti principali. Ago tagliando ed eliminando il filamento senso del siRNA, attiva il complesso RISC. Il filamento antisense del siRNA serve come filamento guida e conduce RISC al suo omologo mRNA, causando la scissione endonucleolitica dell'mRNA bersaglio. (Figura tratta e modificata da http://www.rnaiweb.com/RNAi/What_is_RNAi/).

1.3 I trasportatori mitocondriali dei nucleotidi

Per molto tempo si è pensato che i mitocondri sintetizzassero i nucleotidi per il mtDNA in maniera indipendente rispetto a quelli del nDNA (Bogenhagen e Clayton 1976, Rampazzo *et al.*, 2004). L'opinione, generalmente accettata, di una compartimentalizzazione tra i pool di dNTPs è supportata dall'esistenza di due chinasi deossinucleotidiche mitocondriali, la TK2 mitocondriale (Berk e Clayton 1973) e la dGK (Arnér e Eriksson, 1995) che possiedono una specificità tale da poter fosforilare tutti e quattro i deossiribonucleosidi (Piskur *et al.*, 2004). Questo modello è stato cambiato dalla dimostrazione che i deossinucleosidi vengono trasportati dal citosol attraverso la membrana mitocondriale interna e viceversa e che l'influsso di precursori sintetizzati all'esterno del mitocondrio rappresentano la maggior fonte di dNTPs per la replicazione del genoma mitocondriale. In questo modo nella membrana mitocondriale interna esistono molti trasportatori che catalizzano lo scambio di desossinucleotidi tra i due compartimenti. In questo lavoro prenderemo in considerazione il trasportatore di nucleotidi pirimidinici di lievito, RIM2 (Replication In Mitochondria 2), fondamentale per il mantenimento e l'integrità del mtDNA (Van Dyck *et al.*, 1995). Sulla base dell'omologia con il gene *Rim2* (Marobbio *et al.*, 2006) di lievito, sono stati identificati due geni nell'uomo (Floyd *et al.*, 2007) e uno in *Drosophila melanogaster* che potrebbero codificare per trasportatori deossinucleotidici.

1.3.1 Il trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici in *Saccharomyces cerevisiae*

I deossinucleosidi pirimidinici sono richiesti nei mitocondri per la sintesi del DNA e dei vari RNA presenti in questi organelli. In *Saccharomyces cerevisiae* questi nucleotidi sono sintetizzati all'esterno del mitocondrio e devono essere trasportati attraverso la membrana mitocondriale interna. Il trasportatore mitocondriale per i nucleotidi pirimidinici identificato nel lievito è la proteina RIM2 (Marobbio *et al.*, 2006). RIM2 (Replication In Mitochondria 2) è un membro della famiglia dei trasportatori mitocondriali; esso trasporta i (deossi) nucleosidi pirimidinici tri- e difosfato e in maniera minore i (deossi) nucleosidi pirimidinici monofosfato, attraverso un meccanismo di contro scambio. Il maggior ruolo fisiologico di questa proteina è il trasporto di (deossi) nucleosidi pirimidinici trifosfato all'interno del mitocondrio portando nel citosol (deossi) nucleosidi pirimidinici monofosfato (Marobbio *et al.*, 2006).

1.3.2 Il trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici in *Homo sapiens*

Nell'uomo esistono due proteine che sono tradotte da altrettanti geni ortologhi al gene *Rim2* di lievito: *SLC25A33* e *SLC25A36*. Uno dei due ortologhi umani al gene *Rim2* di lievito è stato recentemente caratterizzato e chiamato *PNC-1* (Pyrimidine Nucleotide Carrier-1) (Floyd *et al.*, 2007). *PNC-1* è un trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici che mostra una significativa identità al trasportatore di lievito *RIM2*.

A differenza di *RIM2* di lievito che trasporta UTP, CTP e principalmente TTP (Marobbio *et al.*, 2006), *PNC-1* è principalmente un trasportatore di UTP, suggerendo una maggiore specializzazione funzionale nelle cellule di mammifero rispetto a quelle di lievito (Floyd *et al.*, 2007). La sua espressione risulta essere controllata dalla via dell'insulina e dall'insulin-like growth factor (IGF-I) attraverso la chinasi PI3, l'Akt e mTOR importanti fattori della crescita e della proliferazione cellulare (Floyd *et al.*, 2007). Inoltre la presenza di *PNC-1* è importante per l'attività mitocondriale nella regolazione della crescita cellulare e nella proliferazione (Floyd *et al.*, 2007). A supporto di questo, recenti studi hanno dimostrato che *PNC-1* controlla la replicazione e la trascrizione del mtDNA, la produzione di prodotti ROS (Reactive Oxygen Species), il metabolismo bioenergetico e il potenziale invasivo delle cellule trasformate. *PNC-1*, attraverso il trasporto di UTP, risulta essere essenziale per il mantenimento della sintesi e della trascrizione del mtDNA, per un giusto rapporto dei componenti della catena respiratoria mitocondriale codificati dal nucleo e dal mitocondrio (una imperfezione porta ad un difetto nella produzione di ATP mitocondriale e nel consumo di ossigeno; questo induce il mitocondrio alla produzione di ROS che aumentano la biogenesi mitocondriale e alterano il programma di differenziamento cellulare –EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition–) e per le funzioni mitocondriali (Figura 1.9) (Favre *et al.*, 2010).

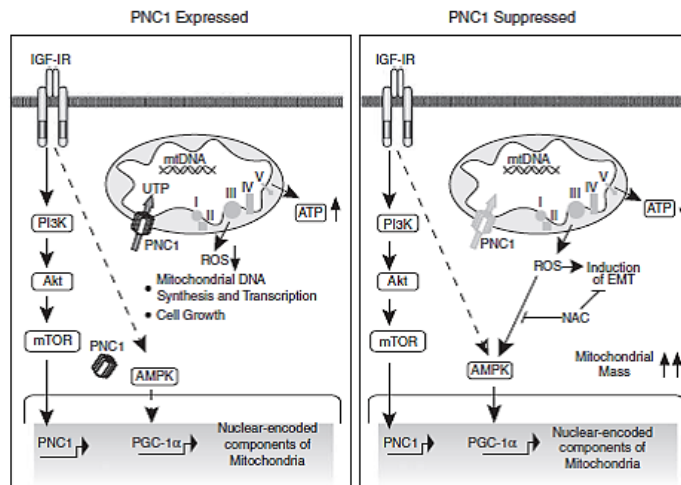


Figura 1.9 – Funzione di PNC-1 come proteina che risponde a stimoli IGF-I nel mantenimento delle funzioni mitocondriali. IGF-I induce l'espressione di IGF-1. Quando PNC-1 è espresso la sintesi e la trascrizione del mtDNA producono dei componenti della catena di trasporto degli elettroni che insieme ai componenti tradotti dal nucleo sono essenziali per il mantenimento della respirazione mitocondriale e per prevenire la produzione di ROS. Quando PNC-1 viene soppresso, la sintesi e la trascrizione del DNA vengono compromessi; c'è uno sbilanciamento nei componenti della catena respiratoria codificati dal mitocondrio rispetto a quelli codificati dal nucleo, con successivo danno alla respirazione mitocondriale e produzione di ROS. Questo porta all'inattivazione del pathway AMPK dipendente che attiva la biogenesi mitocondriale e l'espressione di geni che cambiano il fenotipo cellulare EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition). IGF-I attiva anche AMPK, indicato dalla linea tratteggiata. (Figura tratta da Favre *et al.*, 2010).

La necessità di PNC-1 per il mantenimento del mtDNA è conservata nell'evoluzione: infatti anche la proteina RIM2 di lievito è essenziale per l'integrità del mtDNA (Van Dyck *et al.*, 1995).

1.3.3 L'omologo di *Drosophila melanogaster* del gene *Rim2* di lievito

In *Drosophila melanogaster* un solo gene mostra una significativa similarità al gene *Rim2* di lievito, suggerendo che in questo modello animale tutti i dNTPs condividono lo stesso trasportatore mitocondriale. Per questo motivo *Drosophila* può rappresentare un sistema modello ideale per studiare le funzioni fisiologiche dei trasportatori mitocondriali di nucleotidi perché non pone problemi di ridondanza funzionale tra i differenti prodotti genici.

Il gene *CG18317* di *Drosophila melanogaster* (Figura 1.10) è il gene ortologo al gene *Rim2* di lievito (Marobbio *et al.*, 2006) e ai due geni umani *SLC25A33* ed *SLC25A36* (Floyd *et al.*, 2007). Il gene mappa sul cromosoma 2 (posizione 22B1) e si estende per 7503 bp. La sequenza

codificante, lunga 1776 bp e costituita da 6 esoni, codifica per un polipeptide di 365 aminoacidi (14,5 kDa).

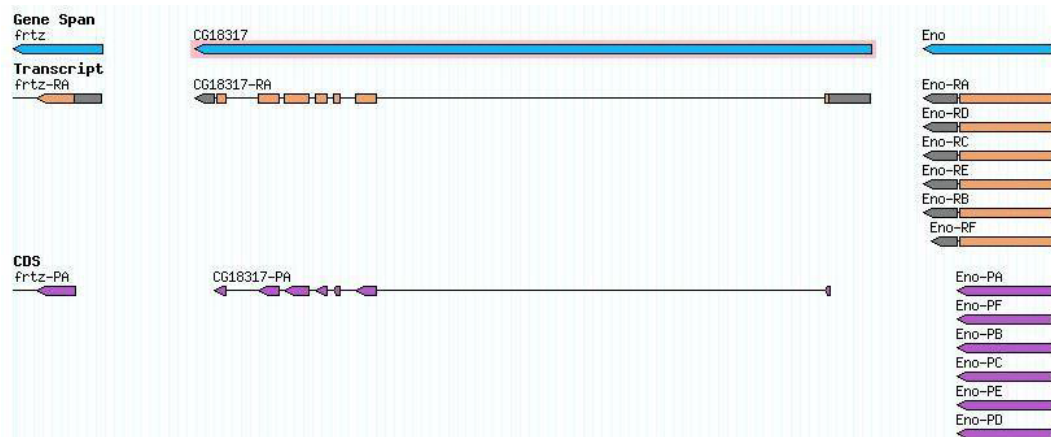


Figura 1.10 – Il gene CG18317 di *Drosophila*. Il gene CG18317 (FBgn0031359) è l'omologo in *Drosophila* del gene *Rim2* di lievito. Sulla base della similarità di sequenza, è stata predetta la sua funzione molecolare: trasportatore transmembrana. La posizione della sua sequenza genica è: 2L:1716888..1724391. (Tratto e modificato da <http://flybase.org>).

Al fine di determinare sperimentalmente se il gene *CG18317* svolge un ruolo nello scambio di desossinucleotidi tra mitocondri e citoplasma, è stato generato un ceppo di *Drosophila CG18317Δ* mancante del presunto trasportatore di desossinucleotidi RIM2.

Nello specifico il ceppo knock out (KO) per il gene in questione è stato generato mediante un meccanismo di ricombinazione tra linee di moscerini contenenti elementi inserzionali localizzati alle estremità del gene da eliminare. In dettaglio il meccanismo descritto da Parks *et al.* (2004) sfrutta la ricombinazione specifica tra siti FRT, localizzati all'interno dell'elemento trasponibile, in presenza di flippasi (FLP) che catalizza l'excisione del gene d'interesse.

2. SCOPO DELLA TESI

La proteina RIM2 è stata recentemente caratterizzata come un trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici in *Saccharomyces cerevisiae* (Marobbio *et al.*, 2006). Sulla base dell'omologia con il gene *Rim2* di lievito sono stati identificati due geni nell'uomo, *SLC25A33* ed *SLC25A36*, (Floyd *et al.*, 2007) ed uno in *Drosophila*, *CG18317*, ortologhi del gene *Rim2*.

Nel merito di questo lavoro di tesi ci si è concentrati nell'analizzare il ruolo funzionale del gene *CG18317*, indagando eventuali similarità con la funzione da esso svolta in lievito. A tale scopo si è generato un mutante knock out di *D. melanogaster* privo del gene d'interesse. Tale modello è stato quindi caratterizzato dal punto di vista morfologico, biochimico, molecolare e funzionale. Inoltre, l'analisi del gene è stata condotta anche in un modello cellulare, estendendo il tal modo il campo di ricerca. In particolare in colture cellulari di *Drosophila* S2, si sono effettuati esperimenti di RNA interference per silenziare il gene d'interesse e studiare, in tale modello *in vitro*, eventuali variazioni quantitative nei pool nucleotidici citosolici e mitocondriali.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Individui di *Drosophila melanogaster*

3.1.1 Ceppi di *Drosophila melanogaster* utilizzati

- **White 1118**

Il ceppo porta una mutazione recessiva del gene *white* (cromosoma X). La proteina WHITE, assieme alle proteine BROWN e SCARLET, è responsabile del trasporto all'interno degli ommatidi dell'occhio dei pigmenti scarlatto e marrone che danno il tipico colore rosso mattone dell'occhio di *Drosophila*. I mutanti w^{1118} di conseguenza hanno gli occhi bianchi.

- **CG18317 Δ /CyO-GFP**

Il ceppo knock out CG18317 Δ è stato generato tramite il metodo descritto da Parks *et al.* (2004). In breve, per ottenere la linea KO sono state incrociate, in presenza di Flippasi, enzima che catalizza l'excisione del gene desiderato, due linee transgeniche provenienti dal Bloomington *Drosophila* stock center. Gli elementi inserzionali, presenti nei ceppi utilizzati per produrre il KO, sono collocati agli estremi del gene da eliminare. Nello specifico, la linea PBac [RB] CG18317^{e01575} (FBti0047179) reca un elemento PiggyBac a monte del gene d'interesse, e la linea inserzionale PBac [RB] CG18317^{e00041} (FBti0046412) contiene un elemento PiggyBac a valle dello stesso. La linea KO omozigote non è vitale, per cui la delezione è stata mantenuta in condizione di eterozigosi grazie alla presenza del ceppo bilanciatore CyO-GFP.

I cosiddetti "ceppi bilanciatori" sono linee di *Drosophila* che portano uno o più cromosomi bilanciatori, i quali contengono sequenze geniche ripetute ed invertite, che impediscono la ricombinazione durante la meiosi; essi sono quindi cromosomi soppressori del crossing-over. All'interno del cromosoma bilanciatore è inoltre presente una mutazione dominante (quindi visibile in eterozigosi) e letale in omozigosi, la quale rende sempre visibile la presenza/assenza di quel determinato cromosoma nel moscerino.

In particolare, CyO-GFP (BL5194), il cui genotipo è il seguente [L₂Pin1/CyO, Kr-GAL4, UAS-GFP], è un bilanciatore del secondo cromosoma che porta la mutazione dominante *Curly of Oster* del gene *curly*. Tale mutazione si traduce, fenotipicamente, in

un'anomala curvatura delle ali che le rende "ricce". Tale mutazione è letale in omozigosi ed il fenotipo è temperatura sensibile, infatti si manifesta in maniera meno marcata negli individui allevati a temperature inferiori ai 20°C.

È stato scelto di mantenere il ceppo KO in eterozigoti con tale marcatore fluorescente in modo da poter discriminare tra larve omozigoti $CG18317\Delta/CG18317\Delta$ ($CG18317^-$), non GFP-fluorescenti ed eterozigoti $CG18317\Delta/CyO-GFP$ ($CG18317^{+/+}$), GFP-fluorescenti.

3.1.2 Mantenimento dei ceppi di *Drosophila* in laboratorio

Tutte le linee di *Drosophila melanogaster* utilizzate in laboratorio sono mantenute in tubi di coltura, contenitori monouso in 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 4 litri di *medium*):

- 34 g di agar di tipo II (type II)
- 200 g di lievito
- 288 g di farina di mais
- 54 ml di Tegosept (100 g in 500 ml di etanolo) o Nipagina
- 12 ml di Acido Propionico
- 4 litri di acqua

Dopo aver messo a bollire acqua, farina di mais, lievito e agar, vengono lasciate a raffreddare finché non raggiungono una temperatura di circa 50-60°C e a questo punto sono aggiunti Nipagina e Acido Propionico. La Nipagina è un antimicotico, necessario per evitare, quanto possibile, eventuali infezioni da parte di funginee.

Tutte le linee vengono mantenute in una cella termostata a 18°C, al fine di rallentare il ciclo vitale dell'insetto, con un periodo luce-buio di 12 ore. I moscerini vengono trasferiti in tubi nuovi contenenti cibo fresco all'incirca una volta al mese.

3.1.3 Dissezione larvale

Prima di descrivere nel dettaglio le procedure di dissezione, è necessario precisare che, per quanto riguarda le larve mutanti omozigoti $CG18317^-$, occorre porre particolare attenzione durante le fasi di dissezione; i tessuti larvali sono, infatti, molto fragili e tendono a rompersi con più facilità rispetto alle larve *wild type*. In aggiunta, prima di poter effettuare la

dissezione larvale degli individui mutanti, è necessaria la discriminazione e successiva separazione delle larve omozigoti (non GFP-fluorescenti) da quelle eterozigoti (GFP-fluorescenti). Quest'ultima è stata eseguita allo stereomicroscopio a fluorescenza (Leica MZ16F con camera Leica BFC480), sfruttando la fluorescenza emessa dalle larve eterozigoti esprimenti la GFP e le ridotte dimensioni larvali delle omozigoti.

▪ **Preparazione del “body wall” larvale: metodica 1**

Materiale occorrente:

- microscopio ottico binoculare
- due micropinzette
- piastra Petri per colture cellulari (35x10mm) con il fondo ricoperto di silicone (Sylgard 184, Dow Corning USA)
- forbicine da microdissezione
- spilli da entomologia
- pipetta Pasteur

Soluzioni:

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

- 2 g $MgCl_2$
- 0,19 g KCl
- 2,04 g NaCl
- 19.67 g Saccarosio
- 500 ml Acqua MilliQ

Procedura:

Una larva terzo stadio viene prelevata dalla parete del tubo di coltura e posizionata sul silicone di una piastra Petri col dorso rivolto verso l'alto; viene poi idratata con circa 300 μ l di HL3A.

La larva viene immobilizzata fermandola con due aghi, uno infilato tra gli uncini buccali e l'altro fra i due spiracoli posteriori. Gli aghi sono maneggiati con le micropinzette. Vengono aggiunti ancora alcune centinaia di microlitri di HL3A in modo da ricoprire completamente la larva. Con le forbicine da microdissezione si pratica un taglio longitudinale sulla cuticola dorsale posteriore della larva, partendo dagli spiracoli posteriori fino alla metà del corpo. I lembi della cuticola tagliata vengono aperti, tirati con le pinzette ed infine fissati al silicone con 2 aghi (Figura 3.1-A). Si prosegue con il taglio fino all'altezza degli uncini buccali, e, sempre aiutandosi con le micropinzette, si eseguono gli stessi passaggi nella parte

anteriore, aprendo così completamente la larva (Figura 3.1-B). A questo punto, è necessario ripulire la larva dagli organi interni, per mantenere la struttura muscolare perfettamente intatta (Figura 3.1-C). Infine, si riempie la piastra Petri di HL3A per non far disidratare e degradare i tessuti.

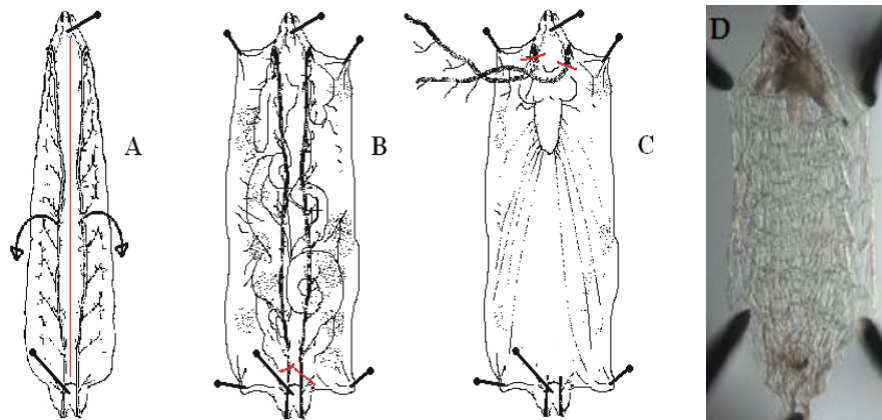


Figura 3.1 – Body wall di larva di *Drosophila*. In figura sono riportate le diverse fasi della dissezione. In particolare, in figura A è rappresentata la fase in cui la cuticola della larva viene tagliata lungo l'asse antero-posteriore. In figura B, è disegnata una larva completamente aperta e fissata ai lati mediante spilli da entomologia. Si notano l'apparato digerente e le tracheole. In figura C la fase finale, nella quale vengono completamente eliminate le interiora e le tracheole. In figura D è fotografato un *Body wall*.

▪ Preparazione del “body wall” larvale: metodica 2

Questo metodo viene utilizzato per la misurazione della respirazione larvale.

Materiale occorrente:

- microscopio ottico binoculare
- due micropinzette
- piastra Petri per colture cellulari (35×10mm)
- forbicine da microdissezione
- pipetta Pasteur

Soluzioni:

- HL3A

Procedura:

Una larva terzo stadio viene prelevata dalla parete del tubo di coltura e posizionata su una piastra Petri col dorso rivolto verso l'alto; viene poi idratata con circa 300 μ l di HL3A. Il capo della larva

viene immobilizzato, fermandolo con una micropinzetta a livello degli uncini buccali (Figura 3.2-A). Con le forbicine da microdissezione si pratica un taglio trasversale sulla parte posteriore della larva, a livello degli spiracoli posteriori (Figura 3.2-B). A questo punto, è necessario ripulire la larva dagli organi interni, per mantenere la struttura muscolare perfettamente intatta (Figura 3.2-C). Si procede poi rivoltando la larva come segue: la punta di una micropinzetta viene inserita tra gli uncini buccali e con l'ausilio di un'altra micropinzetta viene fatto scorrere il *body wall*, rovesciandolo, lungo la micropinzetta precedente (Figure 3.2-D e 3.2-E). I tessuti così preparati vengono mantenuti idratati in HL3A.

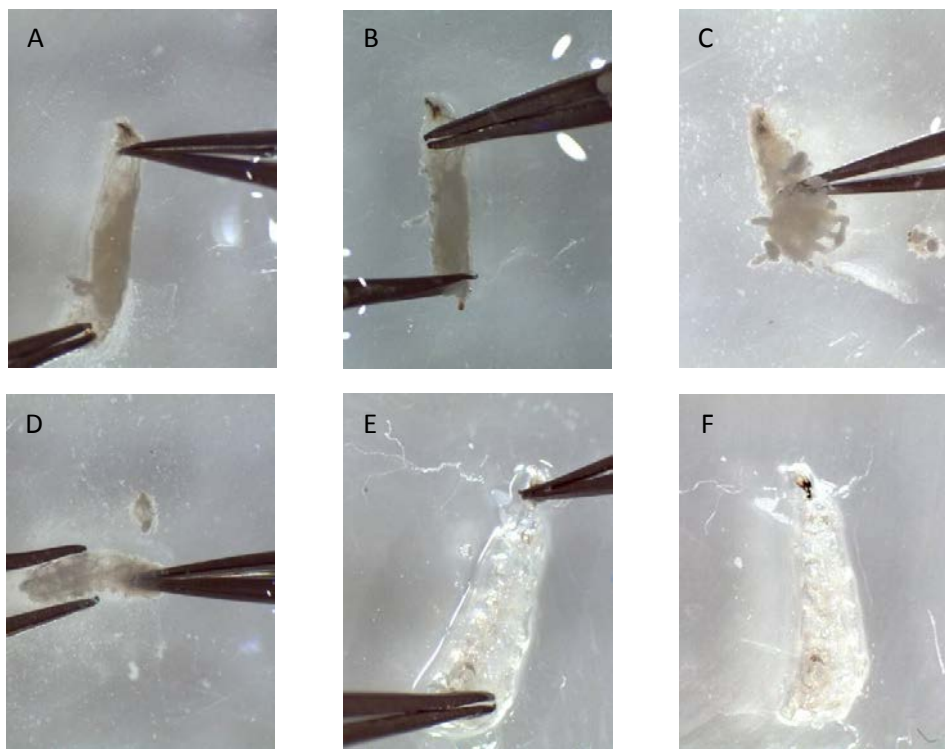


Figura 3.2 – *Body wall* di larva di *Drosophila*. Nelle foto sono riportate le diverse fasi della dissezione. In particolare, nella foto A è rappresentata la fase in cui la larva viene immobilizzata con le micropinzette. Nella foto B viene mostrato il taglio trasversale a livello degli spiracoli posteriori. Nella foto C la larva viene ripulita degli organi interni. Nelle foto D ed E vengono mostrate le fasi di rivoltamento della larva. Nella foto F viene mostrato il *Body wall* larvale con i tessuti muscolari rivolti verso l'esterno.

3.1.4 Misurazione della respirazione larvale con il Seahorse Bioscience (XF₂₄ Extracellular Flux Analyzer)

Il macchinario Seahorse Bioscience XF₂₄, illustrato in Figura 3.3, è in grado di registrare il consumo di ossigeno sia in cellule che in tessuti.



Figura 3.3 – Seahorse Bioscience XF₂₄ Extracellular Flux Analyzer.

Lo strumento, attraverso l'utilizzo di specifici sensori, misura innanzitutto la variazione di ossigeno nel mezzo di coltura, determinata dal consumo o dalla produzione di O₂ da parte delle cellule o del tessuto oggetto di studio. Inoltre la macchina, qualora lo si desideri, può monitorare anche la variazione di pH, al fine di determinare l'apporto glicolitico della reazione mitocondriale.

I dati sono ottenuti attraverso una serie di cicli di misura, ciascuno dei quali ha una durata di circa 2-5 minuti. Ad ogni ciclo, il mezzo di coltura viene mescolato, lasciato riposare, per poi essere sottoposto alle debite misurazioni.

Innanzitutto, il macchinario compie 4-5 cicli di misurazioni finalizzati a stabilizzare la respirazione basale, per circa 20-25 minuti.

Dopo aver monitorato la respirazione basale ed essersi assicurati che abbia un andamento costante, ogni singolo campione viene trattato con diverse sostanze stimolanti o inibenti la respirazione mitocondriale.

In dettaglio, utilizzando tale strumento, si è misurata la respirazione mitocondriale in larve di *Drosophila melanogaster*.

Per quanto riguarda le larve, si è proceduto allestendo un preparato muscolare di larva (procedura descritta nel Paragrafo 3.1.3-seconda metodica). Ogni singola larva, con la parte muscolare rivolta verso l'esterno, è stata posizionata all'interno della piastra Petri (XF₂₄ Cell

Culture Plate) e fissata tramite una sorta di “retina” posizionata sopra. La piastra “XF₂₄ Cell Culture” è costituita da 24 pozzetti, suddivisi in 4 righe (A-D) e 6 colonne (1-6) (vedi Figura 3.4).



Figura 3.4 – XF₂₄ Cell Culture Plate. Tale piastra è costituita da 24 pozzetti, suddivisi in 4 righe (A-D) e 6 colonne (1-6).

Tali piastre sono state create appositamente per misurare il metabolismo cellulare delle isole pancreatiche utilizzando l'XF₂₄ Analyzer. Le retine utilizzate insieme alla piastra sono dette “Islet Capture Microplate” ed oltre a fissare il tessuto da analizzare lo mantengono ad una giusta distanza dai sensori “XF” di O₂ e pH.

I sensori XF costituiscono la “XF₂₄ Sensor Cartridge”. Tale piastra possiede, per ogni singolo pozzetto, due sensori: uno misura il consumo di ossigeno e l'altro l'acidificazione del mezzo extracellulare. Ogni pozzetto possiede quattro porte denominate: Porta A, Porta B, Porta C, Porta D, dalle quali entrano i reagenti stimolanti e inibenti la respirazione mitocondriale (vedi Figura 3.5 sottostante).

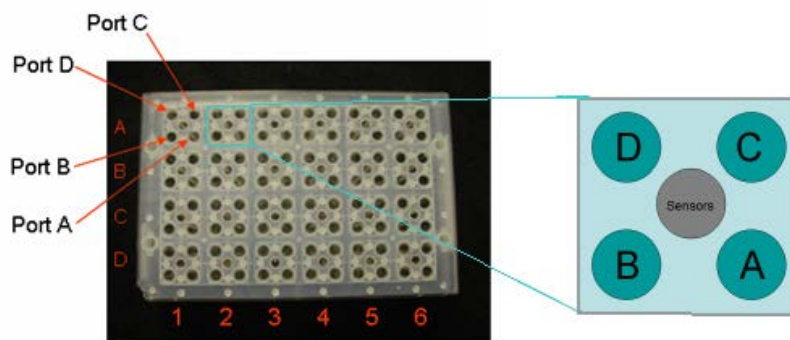


Figura 3.5 – XF₂₄ Sensor Cartridge. In figura sono evidenziate le quattro porte di ciascun pozzetto, denominate: Porta A, Porta B, Porta C, Porta D.

Dalla Porta A viene rilasciato il primo reagente: Glucosio. Questo zucchero è uno stimolatore della respirazione mitocondriale.

Dalla Porta B viene rilasciata Oligomicina. Questa sostanza è un inibitore della fosforilazione ossidativa. Nello specifico, va ad agire sulla subunità deputata alla sintesi di ATP, la cosiddetta ATPasi. Si lega ad un polipeptide di 23kDa (OSCP) della subunità F_0 e blocca la sintesi dell'ATPi (e degradazione) dalla F_0/F_1 ATPasi. Quindi, abolisce la respirazione stimolata dall'ADP nei mitocondri intatti e in tutte le funzioni alimentate dall'ATP nelle particelle sub-mitocondriali. L'aggiunta di Oligomicina tende a ridurre a zero l'ammontare di respirazione mitocondriale, poiché non si genera più l'energia necessaria ad alimentare la catena respiratoria.

La Porta C contiene carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP). L'FCCP è un protonoforo e un disaccoppiante della fosforilazione ossidativa mitocondriale. Pertanto abolisce il collegamento obbligatorio fra la catena respiratoria e il sistema di fosforilazione che si osserva nei mitocondri intatti, attivando correnti ioniche e depolarizzando il potenziale della membrana plasmatica con un meccanismo dose-dipendente.

Infine, la Porta D libera una soluzione di inibitori della respirazione quali Rotenone ed Antimicina. Il Rotenone deprime la respirazione cellulare, inibendo il trasferimento degli elettroni nella catena di trasporto degli elettroni; in particolare inibisce il complesso I (NADH deidrogenasi). L'Antimicina blocca la catena respiratoria al complesso III, fra il citocromo b ed il citocromo c1, impedendo l'ossidazione sia del NADH che del succinato.

La tabella 3.1 riassume i reagenti che vengono rilasciati dalle diverse porte e le loro concentrazioni finali.

	Reagenti	N° catalogo SIGMA	Concentrazione finale
Porta A	Glucosio	G7528	40 mM
Porta B	Oligomicina	O4876	5 μ M
Porta C	FCCP	C2920	1 μ M
Porta D	Rotenone/Antimicina	R8875/M5765	5 μ M

Tabella 3.1 – Reagenti e loro rispettive concentrazioni di rilascio dalle porte dell'XF₂₄ Sensor Cartridge.

Antimicina e Oligomicina sono conservate in soluzioni madre di etanolo (100%), mentre l'FCCP è sciolto in DMSO. Va sottolineato il fatto che la concentrazione finale di etanolo non deve superare l'1% del totale.

Le sostanze vengono poi portate alle concentrazioni iniziali desiderate in HL3A (20 mM MgCl₂, 5mM KCl, 115 mM saccarosio), una soluzione che mima la linfa larvale e mantiene i tessuti larvali nelle idonee condizioni per poter essere analizzati. Inoltre, è lo stesso mezzo in cui vengono mantenuti idratati i tessuti larvali di *Drosophila* dopo la dissezione.

Il protocollo del Seahorse Bioscience XF₂₄ Extracellular Flux Analyzer prevede questi passaggi:

- Idratare con l'apposito "XF Calibration Buffer" la piastra "XF₂₄ Sensor Cartridge" contenente i fluorofori per almeno 12 ore, aggiungendo 1 ml nella piastra di idratazione.
- Accendere lo strumento e settare la temperatura a 25°C almeno due ore prima dell'esperimento, meglio la notte prima. Questo passaggio è importante perché lo strumento è stato progettato per l'analisi di cellule, la cui temperatura ottimale è di 37°C (temperatura massima che il macchinario può raggiungere). Per le larve, invece, la temperatura ottimale è di 25°C e, poiché la macchina non è dotata di un sistema di raffreddamento, è necessario settarla manualmente, diverse ore prima del suo utilizzo.
- Caricare 70 µl della sostanza voluta nelle diverse Porte (A-D), di tutti i pozzetti, anche quelli che corrispondono al controllo della temperatura.
- Inserire la piastra "XF₂₄ Sensor Cartridge" con la piastra di idratazione "XF₂₄ Cell Culture Plate" nel macchinario almeno 20 minuti prima dell'inizio dell'esperimento per permettere la calibrazione dello strumento. Durante questa fase, viene valutata la funzionalità di tutti i sensori, sia quelli dell'O₂ che quelli del pH.
- Nel frattempo si iniziano a dissezionare (rivoltare) le larve ed a disporle all'interno di ciascun pozzetto della piastra "XF₂₄ Cell Culture Plate" (una singola larva per pozzetto). Dopo aver posizionato la larva al centro del pozzetto questa va fissata con una retina, utilizzando uno specifico martelletto, raffigurato in Figura 3.6. La larva viene in seguito idratata con 640 µl di HL3A. È importante che il volume finale all'interno di ogni singolo pozzetto non superi i 700 µl.

Terminata la calibrazione, la piastra d'idratazione va sostituita con l'altra "XF₂₄ Cell Culture Plate" contenente i tessuti larvali da analizzare. I pozzetti A1, B3, C4, D6 vanno mantenuti vuoti, ovvero senza tessuti larvali e retina, solo col buffer HL3A, in modo da

mantenere sotto controllo la temperatura lungo tutta la superficie della piastra.

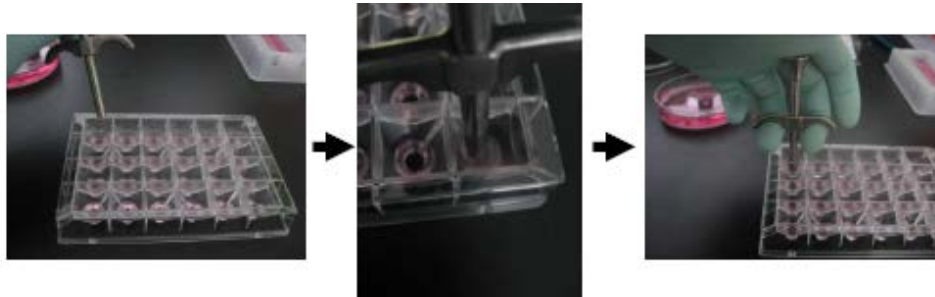


Figura 3.6 – Posizionamento dei tessuti larvali. I tessuti larvali sono fissati con le apposite retine nella piastra “XF₂₄ Cell Culture Plate” tramite l’utilizzo del martelletto.

Al termine del processo di misurazione della respirazione mitocondriale, l’elaborazione e l’analisi dei dati è eseguita dal programma associato al software in dotazione con lo strumento, basato su MS Windows. A seguire è riportata l’interfaccia grafica del software (Figura 3.7).



Figura 3.7 – Interfaccia grafica utente fornita dal software XF.

3.1.5 Quantificazione dell’espressione genica

Al fine di quantificare l’espressione del gene *CG18317* in moscerini wild-type e mutanti per questo gene, si è eseguita una Real-time PCR o PCR quantitativa (qRT-PCR). Utilizzando questa specifica tecnica si possono amplificare specifiche sequenze di acidi nucleici e contemporaneamente misurarne la loro concentrazione per mezzo di uno specifico termociclatore, nel nostro caso un 7500 Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) che individua la fluorescenza emessa dagli ampliconi. Come

in ogni reazione di PCR, l'amplificazione è caratterizzata da una fase esponenziale, durante la quale è possibile determinare un valore soglia corrispondente al momento in cui la fluorescenza del campione ha un segnale di intensità 10 volte superiore al rumore di fondo. Il numero di cicli di amplificazione necessario a raggiungere il valore soglia è definito *Cycle threshold* (Ct), valore che risulta quindi indirettamente proporzionale alla quantità iniziale (numero di copie) del trascritto da testare. La qRT-PCR permette di ottenere sia una quantificazione relativa al template, confrontando i Ct di uno o più campioni con un controllo endogeno (un gene che si presuppone venga espresso in maniera costante in tutti i campioni), sia una quantificazione assoluta mediante la realizzazione di una curva standard ottenuta con diluizioni seriali di un template a concentrazione nota. Una delle metodologie maggiormente utilizzate si basa sull'impiego del *SYBR green*, una molecola fluorescente che si intercala tra le basi del DNA a doppia elica: quando si lega al dsDNA la sua fluorescenza aumenta fino a 1000 volte. Quindi il segnale di fluorescenza è proporzionale alla quantità di template (cDNA) presente all'inizio della reazione. Per questo motivo è necessario innanzitutto estrarre i campioni di RNA dagli individui da testare e, in seguito, procedere con la retrotrascrizione dell'mRNA, ottenendo in tal modo cDNA.

- **Protocollo di estrazione dell'RNA da larve**

All'incirca 10 larve terzo stadio vengono pestellate con un omogenizzatore elettrico in un volume finale pari ad 1 ml di Trizol (*Invitrogen*). Dopo una breve incubazione a temperatura ambiente, si aggiungono 200 μ l di cloroformio per ml di Trizol e si agita vigorosamente per 15 secondi. Centrifugando a 4° C per 15 minuti a 16000 g la soluzione si separa in tre fasi e l'RNA viene raccolto prelevando la sola fase acquosa sovrastante. Si aggiungono quindi 500 μ l di isopropanolo e si centrifuga nuovamente a 16000 g per 10 minuti per far precipitare l'RNA. Il pellet dopo essere stato lavato con etanolo 75% e sedimentato per centrifugazione viene risospeso in acqua sterile GIBCO e quantificato con il Nanodrop, strumento che permette, allo stesso tempo, la determinazione del livello di contaminazione da carboidrati presente nel campione (A_{260}/A_{230}).

Dal momento che i campioni di RNA estratto da larve risultavano avere quantità di carboidrati tali da poter inficiare la buona riuscita della reazione di retrotrascrizione, si è proceduto con l'effettuare una precipitazione con Litio Cloruro, in modo da pulire gli RNA dai carboidrati.

▪ **Protocollo di precipitazione dell'RNA con LiCl**

- Al pellet (RNA estratto) aggiungere 50 µl di acqua GIBCO
- Agitare a 40°C per 5 minuti nel termoblocco
- Centrifugare per 15 minuti a 4°C alla massima velocità
- Trasferire il surnatante in una nuova eppendorf da 1,5 ml RNasi free
- Aggiungere 15 µl di LiCl
- Lasciare nel ghiaccio a 4°C over-night
- Centrifugare per 20 minuti a 4°C alla massima velocità
- Con una Pasteur con la punta allungata togliere il surnatante
- Aggiungere 200 µl di Etanolo 75% freddo
- Centrifugare per 20 minuti a 4°C alla massima velocità
- Togliere il surnatante con la Pasteur
- Aggiungere 200 µl di Etanolo 75% freddo
- Centrifugare per 10 minuti a 4°C alla massima velocità
- Togliere il surnatante con la Pasteur
- Lasciare asciugare il pellet
- Risospendere il pellet in 10 µl di acqua GIBCO

A questo punto, dopo aver quantificato l'RNA totale estratto, si può procedere alla retrotrascrizione dello stesso, per ottenere un cDNA, utile per eseguire poi la Real-time PCR.

▪ **Protocollo di retrotrascrizione (RT) dell'RNA totale**

Di seguito è riportato il protocollo di retrotrascrizione dell'RNA totale utilizzando il *kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Life Technologies)*.

RNA	1 µg
Acqua GIBCO	Portare a volume
Oligo(dT) [1µg/µl]	0,5 µl
Volume finale	5 µl

Tabella 3.2 – Volumi dei reagenti necessari alla denaturazione dell'RNA.

- In una Eppendorf da 1,5 ml siliconata, inserire i reagenti della Tabella 3.2 e spinnare
- Denaturare i campioni a 65°C per 6 minuti nel termoblocco e poi trasferirli immediatamente in ghiaccio

Mix RT	1x (µl)
5x first strand	2,0
DTT [0,1 M]	1,0
dNTPs [10 mM]	0,5
RNasi OUT [400 U/µl]	0,5
Volume finale	4,0

Tabella 3.3 – Volumi dei reagenti necessari alla retrotrascrizione dell'RNA.

- Aggiungere 4µl di mix (Tabella 3.3) per ogni campione
- Aggiungere 0,5 µl di Superscript II [200 U/µl] (*Life Technologies*) e incubare per 1 ora a 42°C nel termoblocco
- Aggiungere 0,5 µl di Superscript II [200 U/µl] (*Life Technologies*) e incubare per 1 ora a 42°C nel termoblocco
- Inattivare l'enzima a 65°C per 10 minuti

▪ **Protocollo di quantificazione genica con Real-time PCR**

- Diluire i cDNA [100 ng/µl] ad una concentrazione di [25 ng/µl] per un volume finale di 10 µl
- Preparare le mix per la Real-time PCR: una mix conterrà i primer di un gene housekeeping (che serve per normalizzare i dati; nel nostro caso il gene sarà *RP49*), mentre le altre avranno i primer per i geni di nostro interesse (per la sequenza dei primer osservare la Tabella 3.5). Il kit utilizzato è il *GoTaq® qPCR Master Mix* della *Promega*.

Mix Real-Time PCR	1x (µl)
Acqua GIBCO	3,6
Master Mix	5,0
Primer forward	0,2
Primer reverse	0,2
Volume finale	9,0

Tabella 3.4 – Volumi dei reagenti necessari per eseguire la qRT-PCR.

Primer F <i>RP49</i>	ATCGGTTACGGATCGAACAA
Primer R <i>RP49</i>	GACAATCTCCTTG CGCTTCT
Primer F <i>CG18317</i>	ACAACCTCCTTCTGGCAGACC
Primer R <i>CG18317</i>	CGTGGCCAAGCCTCTGTA

Tabella 3.5 – Sequenze dei primer della qRT-PCR. Vedi appendice 1 (pag. 71-72).

- Per ogni pozzetto della piastra della Real-time PCR (costituita da 96 pozzetti) aggiungere 9 μ l di Mix e 15 μ g di cDNA [25 ng/ μ l]
- Caricare la piastra nel termociclatore con il seguente programma: 95°C per 2 minuti (prima fase di denaturazione), 95°C per 25 secondi (denaturazione) e 60°C per 1 minuto (appaiamento e allungamento) per 39 cicli, 72°C per 3 minuti, 4°C all'infinito.
- Il termociclatore è dotato di un sistema ottico in grado di rilevare l'intensità di fluorescenza di ogni singolo pozzetto. La sorgente luminosa è una lampada alogena che convoglia la luce ad una lente posta sopra ciascun pozzetto attraverso un sistema di fibre ottiche. La fluorescenza emessa viene convogliata e trasportata dalle medesime lenti e fibre ottiche ad una CCD camera che converte il segnale luminoso in digitale. I dati ottenuti vengono salvati tramite 7500 System Software. Dopo aver analizzato le curve di amplificazione e aver fissato la soglia di fluorescenza nell'intervallo di linearità, si costruisce un grafico ponendo il Log della quantità di cDNA usata in relazione ai Ct (ciclo threshold, soglia) ottenuti. Per ciascun campione si ottiene una retta il cui coefficiente angolare (m) viene impiegato per calcolare l'efficienza della reazione di PCR ($E = 10^{-1/m} - 1$) che sarà tanto migliore quanto più prossima a 2. Applicando il modello matematico di Pfaffl il livello residuo di mRNA di ciascun gene di interesse nelle larve mutate viene calcolato in relazione a quello osservato nelle larve wild-type (Pfaffl, 2001).

3.1.6 Inclusione delle larve di *Drosophila melanogaster* (Microscopia Elettronica)

La procedura di inclusione delle larve di *Drosophila melanogaster* per il loro uso nella microscopia elettronica prevede quanto segue.

Dopo aver dissezionato la larva, come precedentemente descritto, questa viene subito trattata coi fissativi: paraformaldeide 2% e glutaraldeide 3%

dissolti in sodio Cacodilato pH 7.25 per circa due ore. La fissazione ha il compito di mantenere inalterate, per quanto possibile, le caratteristiche strutturali del campione. Seguono tre lavaggi di 5 minuti con Cacodilato 0,1% pH 7,25 e saccarosio 4%. La Glutaraldeide fissa bene le strutture proteiche ma per preservare le strutture lipidiche ed in particolare le membrane è necessario effettuare una seconda fissazione, o post-fissazione, usando il tetrossido di osmio, un colorante lipidico altamente tossico che penetra molto più lentamente rispetto alla glutaraldeide. Il post-fissaggio in tetrossido di osmio 1% Cacodilato 0,1% pH 7,25 dura circa 40 minuti. A questo punto si ripetono i tre lavaggi (3 per 5 minuti) con Cacodilato 0,1% pH 7,25.

Il campione viene ora disidratato mediante lavaggi seriali con soluzioni di etanolo presente in concentrazioni via via crescenti (EtOH 50% 2 lavaggi di 10 minuti, EtOH 75% 2 lavaggi di 10 minuti, EtOH 90% 2 lavaggi di 10 minuti, EtOH 100% overnight). Completata la disidratazione l'acqua contenuta nel campione è stata totalmente eliminata e sostituita dal solvente. Successivamente, durante la fase di infiltrazione, il solvente di disidratazione viene sostituito da acetone, un solvente delle resine. L'acetone viene lasciato agire per circa mezzora (3 lavaggi di 10 minuti), successivamente il campione viene prima trasferito in una soluzione 1:1 acetone-resina per un'ora ed infine posto in resina pura. Generalmente si utilizzano resine epossidiche che polimerizzano a 60°C, la composizione della resina è la seguente: 14 ml EPOXY, 7 ml DDSA, 9 ml MNA, 2% DMP30.

Il campione viene quindi prelevato dalla resina e posto all'interno di apposite formelle poste in stufetta a 48°C e lasciate a indurire per due giorni. Una volta ottenuto il campione incluso in resina, con una lama di vetro affilata si procede con l'eliminare la resina in eccesso per creare una piramide più adatta al taglio all'ultramicrotomo.

Il processamento dei campioni, a partire dalla fase di taglio all'ultramicrotomo sino all'osservazione al microscopio elettronico è stata condotta al centro DIMES di Microscopia Elettronica dell'Università di Genova, in collaborazione col Prof. Tacchetti.

3.2 Cellule di *Drosophila melanogaster*

3.2.1 Linee cellulari di *Drosophila melanogaster* utilizzate

- **Cellule S2**

La linea cellulare S2 (Schneider linea 2) deriva da una coltura primaria di cellule embrionali a stadio tardivo (20-24 ore). Tali cellule presentano morfologia rotondeggiante con un diametro che varia dai 5 agli 11 μm . Esse formano un ampio aderente monostrato, tuttavia in coltura sono presenti due popolazioni di cellule: la popolazione che cresce in adesione e quella costituita da cellule che rimangono in sospensione. La temperatura ottimale di crescita per questa linea cellulare è pari a 25°C (Schneider, 1972).

- **Cellule S2R+**

La linea cellulare S2R+ (S2 Receptor plus) deriva dalla linea cellulare S2 e presenta quindi le stesse caratteristiche morfologiche. Questa linea cellulare risulta avere però molte cellule in sospensione, oltre a formare un monostrato omogeneo. Dal punto di vista funzionale queste cellule presentano, a differenza delle cellule S2, due recettori (Dfz2 e Dfz1; *Drosophila* frizzled 2 and 1) che rispondono ai segnali della proteina WINGLESS aumentando i livelli della proteina ARMADILLO (Yanagawa *et al.*, 1998).

3.2.2 Coltura e mantenimento delle linee cellulari

Per eseguire gli esperimenti sono state impiegate entrambe le linee cellulari di *Drosophila*, manipolate in sterilità e controllate periodicamente per l'assenza di contaminazioni da micoplasmi. Le cellule crescono sia in monostrato che in sospensione, su piastre Petri o fiasche sterili, all'interno di incubatori a 25° C umidificati e in presenza del 5% di CO₂ nell'atmosfera. E' stato impiegato terreno Schneider's *Drosophila* Medium, contenente siero bovino fetale (FBS) al 10%.

Quando la coltura cellulare raggiunge la confluenza le cellule vengono trapiantate lavandole con una soluzione di Versene, substrato contenente EDTA che agisce da agente chelante e, staccandole mediante tripsina. Le cellule vengono quindi risospese nel terreno di coltura, il cui siero neutralizza la tripsina, e contaminate per mezzo di una cameretta Burkler (Beckman coulter).

3.2.3 Misurazione della respirazione cellulare con il Seahorse Bioscience (XF₂₄ Extracellular Flux Analyzer)

Per la misurazione della respirazione delle cellule si è seguito il medesimo protocollo del paragrafo 3.1.4, con l'unica differenza che sono state utilizzate delle piastre per cellule con 16 pozzetti, dove le cellule sono lasciate crescere per 48 ore ad una concentrazione di circa 50.000-60.000 cellule in 100 µl di terreno. Dopo 2 giorni viene sostituito il mezzo di coltura con altri 100 µl di terreno fresco privo di siero. Anche i reagenti vengono diluiti in nel medesimo medium cellulare.

3.2.4 Quantificazione dell'espressione genica

Come per la quantificazione dell'espressione del gene *CG18317* nelle larve, gli stessi protocolli vengono eseguiti per le cellule, tranne qualche differenza nella procedura di estrazione dell'RNA da cellule.

- **Protocollo di estrazione dell'RNA da cellule**

Per estrarre l'RNA viene rimosso il terreno di coltura e le cellule vengono lisate con Trizol (*Invitrogen*). Dopo una breve incubazione a temperatura ambiente, si aggiungono 200 µl di cloroformio per ml di Trizol e si agita vigorosamente per 15 secondi. Centrifugando a 4° C per 15 minuti a 16000 g la soluzione si separa in tre fasi e l'RNA viene raccolto in un'Eppendorf siliconata prelevando la sola fase acquosa sovrastante. Si aggiungono quindi 500 µl di isopropanolo, si agita vigorosamente per 15 secondi e si lasciano i campioni a -20°C per 30 minuti. Si centrifuga nuovamente a 16000 g per 20 minuti per far precipitare l'RNA. Il pellet dopo essere stato lavato con etanolo 75% e sedimentato per centrifugazione, viene risospeso in acqua sterile GIBCO (~10-20 µl) e conservato a -80°C.

- **Protocollo di retrotrascrizione (RT) dell'RNA totale**

Dopo aver quantificato l'RNA con il Nanodrop, e aver constatato che il rapporto A_{260}/A_{230} è tale da considerare i campioni non contaminati da carboidrati, si procede alla sintesi del cDNA senza precipitazione dell'RNA con il LiCl. La retrotrascrizione viene effettuata sempre impiegando 1 µg di RNA, come nella procedura descritta nel paragrafo 3.1.5 - Protocollo di retrotrascrizione (RT) dell'RNA totale -.

- **Protocollo di quantificazione genica con Real-time PCR**

Il contenuto di mRNA viene valutato mediante qRT-PCR utilizzando come stampo il cDNA preparato in precedenza. Il protocollo utilizzato è il medesimo descritto nel paragrafo 3.1.5 - Protocollo di quantificazione genica con Real-time PCR -, utilizzando come gene housekeeping sempre *RP49*, poiché mantiene lo stesso livello di espressione sia in cellule proliferanti che non. I primer utilizzati sono gli stessi di quelli riportati in Tabella 3.5.

3.2.5 Silenziamento genico mediante RNA interference (RNAi)

Al fine di silenziare il nostro gene di interesse, *CG18317*, in cellule di *Drosophila melanogaster*, abbiamo utilizzato la tecnica dell'RNAi, come descritto nel paragrafo 1.2.6. Di seguito vengono riportati i protocolli per la sintesi dei dsRNA e la trasfezione delle cellule.

- **Protocollo di sintesi dei dsRNA**

I dsRNA utilizzati per indurre il silenziamento post-trascrizionale del gene *CG18317* sono stati sintetizzati secondo il seguente protocollo. Larve *white*¹¹¹⁸ sono state impiegate per ricavarne l'RNA sufficiente che è stato successivamente retro-trascritto (come descritto nel paragrafo 3.1.5) ed amplificato tramite PCR usando i primer *CG18317* T7 forward e reverse le cui sequenze sono riportate in Tabella 3.6. Questi primer possiedono una sequenza iniziale che funge da innesco per l'enzima T7 polimerasi, che catalizza la reazione di trascrizione da cDNA a dsRNA.

Primer F <i>CG18317</i> T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGATGTATGCG TTTTGCCAAAGTTAAA
Primer R <i>CG18317</i> T7	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGTACA CCCTCTCGATGCACTG

Tabella 3.6 – Sequenze dei primer della PCR. In giallo viene indicata la sequenza riconosciuta dall'enzima T7, in azzurro la sequenza dello spaziatore, i restanti nucleotidi costituiscono i primer disegnati sulla sequenza del gene *CG18317*, vedi appendice 1 (pag. 71-72).

I reagenti utilizzati (*Promega*®), con i loro rispettivi volumi, sono riportati in Tabella 3.7.

Mix PCR	1x (µl)
cDNA	50 ng
Buffer 5x	4,0
dNTPs [10 mM]	0,5
Primer forward	0,5
Primer reverse	0,5
Taq (Go Taq)	0,1
Acqua	Portare a volume
Volume finale	20,0

Tabella 3.7 - Volumi dei reagenti necessari per eseguire la PCR

I campioni vengono posti in un termociclatore con il seguente programma: 95°C per 2 minuti (denaturazione iniziale); per 35 cicli si esegue 95°C per 30 secondi (denaturazione), 61°C per 30 secondi (appaiamento), 72°C per 1 minuto (estensione); infine 72°C per 5 minuti (estensione finale) e 4°C all'infinito.

A questo punto i prodotti della PCR vengono purificati attraverso il Kit *ExoSAP-IT*[®], il quale protocollo prevede l'aggiunta di 2 µl di prodotto ogni 5 µl del prodotto di reazione post-PCR, l'incubazione in un termociclatore a 37°C per 15 minuti (degradazione dei primer e dei nucleotidi inutilizzati) e a 80°C per 15 minuti (inattivazione del prodotto). In questa maniera ottengo il solo prodotto di reazione della PCR, un DNA a doppio filamento.

Con l'amplificato del gene *CG18317* si può procedere ora alla sintesi del dsRNA tramite l'utilizzo del kit *MEGAscript*[®] *RNAi* (*Ambion*). Si prepara una mix contenente il DNA templato, ottenuto precedentemente tramite reazione di PCR, i nucleotidi e l'enzima T7 che catalizza la reazione di trascrizione del DNA in RNA. Dopo aver incubato a 37°C per 3 ore (per far agire l'enzima) e a 75° per 5 minuti (per inattivare l'enzima), si lascia raffreddare lentamente a temperatura ambiente il campione (per produrre dsRNA dall'RNA). Si procede poi con la digestione del DNA e dell'RNA a singolo filamento mediante incubazione a 37°C per un'ora con le Nucleasi e alla purificazione del dsRNA da proteine, nucleotidi e acidi nucleici rimasti con una serie di lavaggi e centrifugazioni. L'RNA a doppio filamento viene mantenuto a temperatura ambiente.

- **Protocollo di trasfezione delle cellule con i dsRNA**

In piastre da 12 pozzetti piastrare 3 milioni di cellule in terreno privo di siero. Aggiungere il dsRNA a varie concentrazioni nei pozzetti (da 10 µg a 50 µg), ricordandosi di tenere dei pozzetti di controllo (quindi senza aggiungere dsRNA). Incubare il tutto per un'ora. Aggiungere infine terreno contenente il 20% di siero, per una concentrazione finale di 1,5 milioni di cellule al ml, e lasciare incubare per tre giorni, avendo cura di controllare ogni giorno lo stato delle cellule interferate e non.

3.2.6 Estrazione del pool cellulare totale dei nucleotidi

L'estrazione del pool cellulare totale dei nucleotidi viene effettuato in una stanza a 4° C in cellule S2 ed S2R+ di controllo non trattate con i dsRNA ed in cellule dove è avvenuto il silenziamento dopo 72 ore dal trattamento con i dsRNA. Dopo aver raccolto tutte le cellule di due pozzetti in una Falcon da 15 ml, aggiungere 5 ml di PBS freddo e centrifugare per 10 minuti a 400g. Dopo aver tolto il surnatante, le cellule vengono risospese in 1 ml di metanolo al 60% e lasciate per tutta la notte a -20°C; durante questo tempo il pool totale viene rilasciato in soluzione. Il metanolo viene quindi raccolto in eppendorf da 2 ml e centrifugato a 19000g. Il pellet viene lasciato seccare e le membrane e le macromolecole vengono sciolte con 1 ml di NaOH 0,3 M per tutta la notte; il surnatante contenente il metanolo viene invece trasferito e bollito per 3 minuti prima di essere evaporato e sciolto in acqua. Il pool così estratto viene conservato a -80° C.

3.2.7 Determinazione delle dimensioni dei pool dei dNTPs

Per determinare le dimensioni dei pool dei quattro dNTPs viene effettuato un saggio enzimatico modificato sul modello descritto da Sherman e Fyfe (Ferraro *et al.*, 2010). Questo sistema consente di valutare la quantità di un dNTP presente in un estratto cellulare usando oligonucleotidi sintetici e diverse polimerasi a seconda del nucleotide che si vuole quantificare: il frammento di Klenow della DNA polimerasi I (*Invitrogen*) per i dTTP e i dATP e la Taq DNA polimerasi I (*GE Healthcare*) per i dCTP e i dGTP. Ciascun oligonucleotide è costituito da una sequenza definita di soli due nucleotidi e viene utilizzato dalla polimerasi come stampo per sintetizzare un frammento di DNA impiegando un dNTP marcato isotopicamente, fornito in eccesso e il dNTP che si desidera quantificare all'interno del campione. La quantificazione viene effettuata in base ad una curva

standard ottenuta aggiungendo alla reazione quantità note del dNTP che si desidera misurare (da 0 a 12 pmol). In base alle sequenze degli oligonucleotidi il rapporto (dNTP marcato : dNTP non marcato) è pari a 2 per il dTTP e pari a 3 per dCTP, dATP e dGTP. Il dNTP marcato è ^{32}P -dATP (*GE Healthcare*) per la quantificazione di dTTP, dCTP e dGTP e ^3H -dTTP (*GE Healthcare*) per quella del dATP. La reazione avviene in tubi di vetro dove a 20 μl di campione, contenenti una certa quantità di ciascun pool, vengono aggiunti 80 μl di soluzione di reazione, ottenendo un volume totale di 100 μl (40 mM Tris HCl pH 7.4, 10 mM MgCl_2 , 5 mM DTT, 0.25 μM oligonucleotide, 0.2U Klenow, 2U Taq DNA polimerasi I, 0.25 μM ^{32}P -dATP o ^3H -dTTP, acqua e campione). I tubini vengono incubati a 37° C per 60 minuti utilizzando il frammento di Klenow, a 48°C per 60 minuti utilizzando la Taq polimerasi I; trascorsi i 60 minuti i campioni vengono trasferiti in ghiaccio. Quindi 85 μl del volume totale vengono depositati su filtrini a scambio ionico DE81 (*Whatmann*) in grado di legare i fosfati dei dNTP trattenendo i polimeri. I filtrini vengono seccati e poi lavati 3 volte per 10 minuti con una soluzione acquosa 5% NaHPO_4 , una volta con acqua distillata e un'ultima volta con etanolo assoluto. Gli isotopi intrappolati nei filtrini vengono quindi contati allo scintillatore. La radioattività del ^{32}P (^3H per la quantificazione del dATP) permetterà di valutare le dimensioni dei pool dei dNTP espressa in $\text{pmol}/10^6$ cellule.

4. RISULTATI

4.1 Individui di *Drosophila melanogaster*

4.1.1 Osservazione delle larve *CG18317* Δ /CyO-GFP

Per lo studio del trasportatore mitocondriale di nucleotidi pirimidinici di lievito RIM2 in *Drosophila*, è stata generata una linea KO per il gene *CG18317*, per mezzo di un meccanismo di ricombinazione tra linee di moscerini contenenti elementi inserzionali posti alle estremità del gene da eliminare (Parks *et al.*, 2004).

Dalla caratterizzazione della linea KO è emerso che gli individui omozigoti per la delezione sopravvivono fino agli stadi larvali, solo alcuni raggiungono lo stadio pupale e nessuno lo stadio adulto. Poiché questo ceppo non è vitale, la linea KO deve essere mantenuta in eterozigosi. Si è scelto di bilanciare la delezione di *CG18317* con un marcatore del secondo cromosoma legato alla GFP [CyO-GFP] (vedi paragrafo 3.1.1). Come mostrato in figura 4.1 le larve omozigoti *CG18317*^{-/-} risultano essere molto più piccole rispetto alle eterozigoti *CG18317*^{+/-}; inoltre le larve omozigoti, come mostrato in figura 4.2 A-B, non sono fluorescenti, a differenza di quelle eterozigoti per la delezione che esprimono la GFP.



Figura 4.1 – Larve *CG18317* KO. Le larve omozigoti per la delezione del gene *CG18317*^{-/-} (a sinistra) risultano essere più piccole rispetto alle larve eterozigoti *CG18317*^{+/-} (a destra).

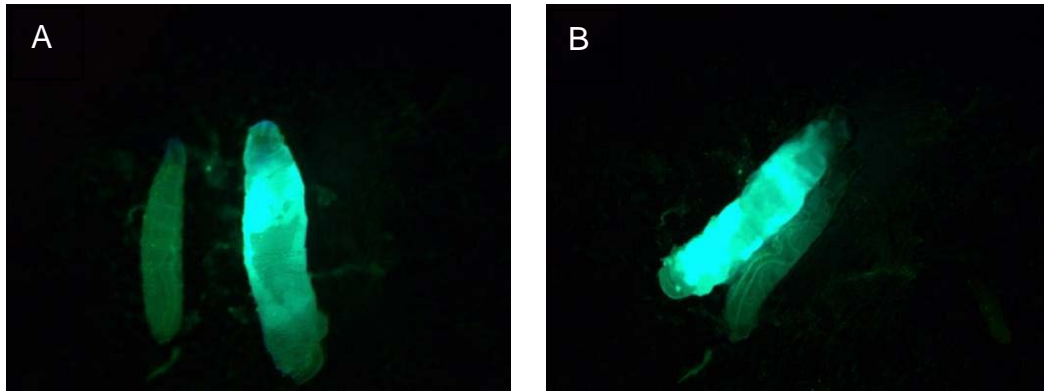


Figura 4.2 – Larve *CG18317* KO. Le larve eterozigoti *CG18317*⁺ sono facilmente identificabili in quanto esprimono la GFP (nella figura A sulla destra, nella figura B sulla sinistra), mentre le larve omozigoti *CG18317* knock-out non sono fluorescenti (nella figura A sulla sinistra, nella figura B sulla destra).

4.1.2 Quantificazione dell'espressione del gene *CG18317* mediante qRT-PCR

I moscerini omozigoti, nei quali il gene *CG18317* è totalmente assente dovrebbero presentare, dal punto di vista molecolare, un totale abbattimento dell'espressione genica. Gli individui eterozigoti dovrebbero esprimere il detto gene in modo parziale. Al fine di validare l'effettiva riduzione di espressione del gene *CG18317* negli individui eterozigoti ed omozigoti, abbiamo eseguito una RT-PCR quantitativa.

Come mostrato in Figura 4.3 sottostante, abbiamo potuto constatare che il livello di abbattimento genico nelle larve omozigoti per la delezione è pari al 99,4%, mentre in quelle eterozigoti per la delezione al 65%.

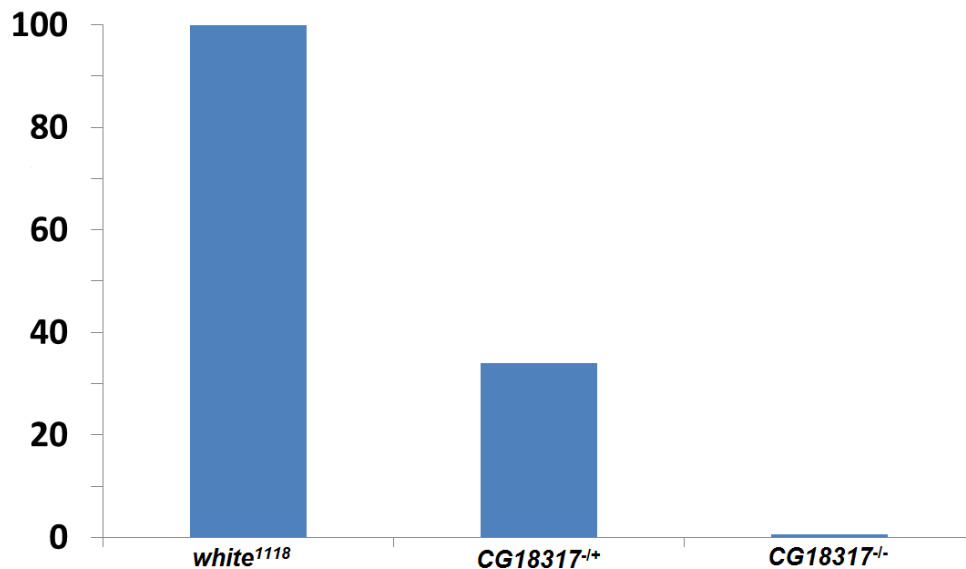


Figura 4.3 – Grafico, espresso in percentuale, relativo ai livelli di espressione del trascritto del gene *CG18317*, ottenuti tramite qRT-PCR, in due diverse linee di larve mutanti (eterozigoti *CG18317*^{+/+} ed omozigoti *CG18317*^{-/-}) ed in controlli *white*¹¹¹⁸.

4.1.3 Respirazione mitocondriale larvale

Si ritiene che la proteina codificata dal gene *CG18317* sia coinvolta nello scambio di deossinucleotidi tra mitocondrio e citoplasma, pertanto, difetti nella sua funzione potrebbero provocare danni all'integrità del genoma mitocondriale e di conseguenza alle proteine coinvolte nella catena di trasporto degli elettroni. Poiché si è precedentemente dimostrato che le larve omozigoti *CG18317* KO non manifestano alcun difetto nell'attività dei complessi della catena respiratoria mitocondriale, si è deciso di misurare il consumo di ossigeno utilizzando il macchinario "Seahorse Bioscience" (Analizzatore Extracellulare XF₂₄).

L'analizzatore Seahorse XF₂₄ Bioscience effettua la misurazione della respirazione mitocondriale in relazione al tasso di consumo di ossigeno (OCR), espresso in unità di pmol per minuto.

In dettaglio, sono stati condotti 3 esperimenti indipendenti di misurazione della respirazione mitocondriale, mettendo poi i dati in relazione tra loro.

L'esperimento comincia con la registrazione della respirazione basale, che deve avere un andamento costante. In seguito ogni singolo campione viene trattato con diverse sostanze stimolanti o inibenti la respirazione mitocondriale. I dati ottenuti da ciascun esperimento sono stati poi associati tra loro. In figura 4.4 viene riportata la rappresentazione grafica dei valori di respirazione mitocondriale di larve di controllo *white*¹¹¹⁸, larve

eterozigoti per la delezione $CG18317^{+/+}$ e larve omozigoti per la delezione $CG18317^{-/-}$.

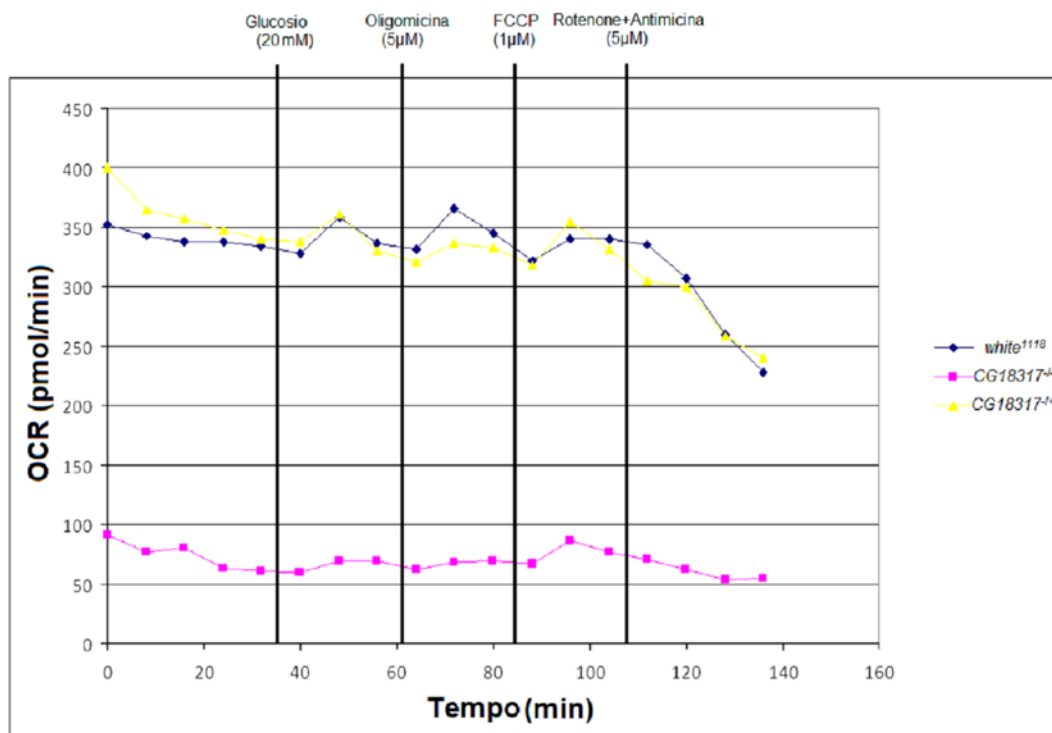


Figura 4.4 – Rappresentazione grafica dei valori di respirazione mitocondriale relativa alle larve di controllo $white^{1118}$ e alle larve mutanti $CG18317^{+/+}$ e $CG18317^{-/-}$. La respirazione mitocondriale è calcolata come misura del tasso di consumo di ossigeno (OCR) nel tempo ed espresso in unità di pmoli per minuto.

Dal grafico in Figura 4.4 emerge che, per quanto riguarda le larve di controllo $white^{1118}$, durante le prime misurazioni basali la respirazione è normale e costante. In seguito al rilascio del primo reagente, il glucosio, il livello di consumo di ossigeno aumenta leggermente, indice di un aumento della respirazione.

Al rilascio dell'Oligomicina non si osserva nessuna risposta significativa. Questa sostanza dovrebbe ridurre a zero la respirazione mitocondriale poiché è un inibitore della fosforilazione ossidativa, che va ad agire sull'ATPasi deputata alla sintesi di ATP.

Con l'iniezione di FCCP, la respirazione aumenta leggermente; infatti l'FCCP è un protonoforo e un disaccoppiante della fosforilazione ossidativa mitocondriale e abolisce il collegamento fra la catena respiratoria e sistema di fosforilazione che si osserva nei mitocondri intatti, attivando correnti ioniche e depolarizzando il potenziale di membrana plasmatica con un meccanismo dose-dipendente.

Infine vengono rilasciati Rotenone e Antimicina. Queste sostanze sono inibitori della respirazione mitocondriale: il Rotenone deprime la

respirazione cellulare inibendo il trasferimento degli elettroni a livello del complesso I (NADH deidrogenasi) della catena di trasporto degli elettroni; l'Antimicina blocca la catena respiratoria in corrispondenza del complesso III, impedendo l'ossidazione sia del NADH che del succinato. Nel grafico si può notare una sostanziale riduzione del consumo di ossigeno, sebbene questa non vada a zero, come ci si aspettava. Per questo motivo abbiamo eseguito un'ulteriore prova, sottoponendo i tessuti larvali a tempi prolungati di somministrazione degli inibitori Rotenone ed Antimicina. Come si può osservare dal grafico in Figura 4.5, dopo la stimolazione con il glucosio, il consumo di ossigeno raggiunge livelli prossimi allo zero.

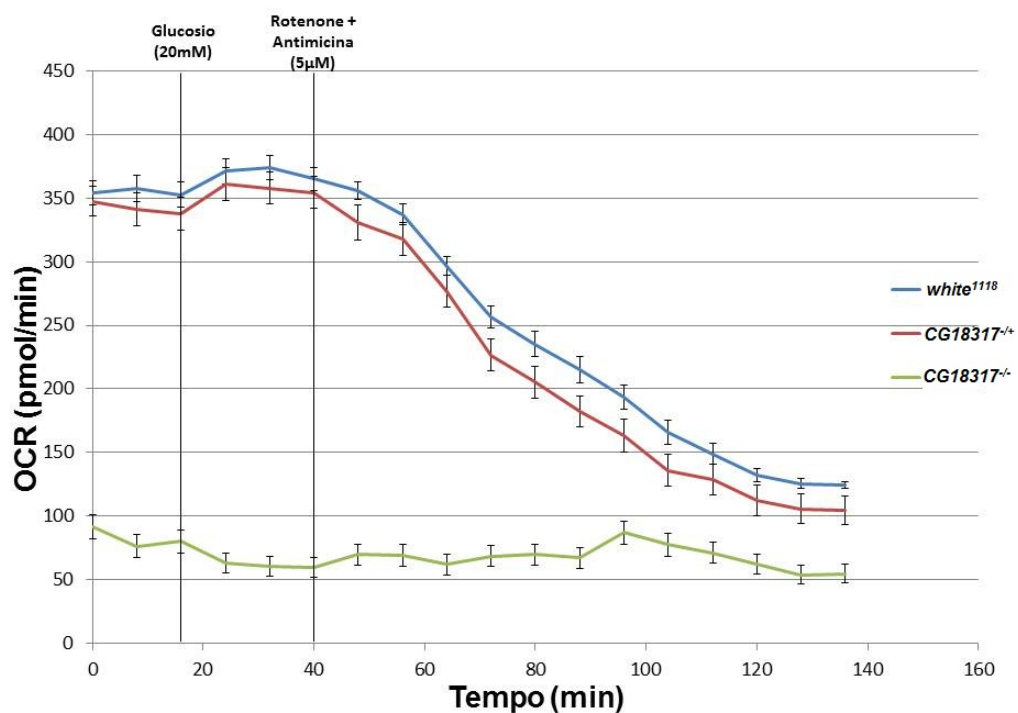


Figura 4.5 – Rappresentazione grafica dei valori di respirazione mitocondriale relativa alle larve di controllo *white*¹¹¹⁸ e alle larve mutanti *CG18317*^{+/+} e *CG18317*^{-/-} dopo somministrazione di glucosio e Rotenone-Antimicina per tempi prolungati.

4.1.4 Osservazione dei mitocondri per mezzo della microscopia elettronica

La caratterizzazione dei nostri mutanti tramite microscopia elettronica effettuata in collaborazione col Prof. Tacchetti di Genova ci ha permesso di stimare il numero e la morfologia dei mitocondri in larve di controllo (*White*¹¹¹⁸), in larve eterozigoti per la delezione (*CG18317*^{+/+}) ed in larve omozigoti per la delezione (*CG18317*^{-/-}).

Come si osserva nelle Figure 4.6 e come poi confermato nella Tabella 4.1, negli individui *CG18317^{-/-}* sono presenti molti più mitocondri rispetto ai controlli e agli individui *CG18317^{+/+}*, occupando un'area superficiale maggiore. Con questi dati si è potuto ricavare l'area media mitocondriale (area dei mitocondri/numero di mitocondri) e la frequenza dei mitocondri (numero dei mitocondri/area mitocondriale); (Tabella 4.2).

	Descrizione	N° profili cellulari	Area profili cellulari (μm^2)	N° profili Mitocondri	Area Mitocondri (μm^2)
<i>White¹¹¹⁸</i>	Wild type	6	155,50	38	8,74
<i>CG18317^{+/+}</i>	Eterozigote	7	181,40	22	12,80
<i>CG18317^{-/-}</i>	Omozigote	8	200,10	176	51,00

Tabella 4.1 – Dati morfometrici ottenuti dall'analisi al microscopio elettronico di una larva III stadio. Profili cellulari: numero di immagini acquisite. Area profili cellulari (μm^2): somma delle singole aree analizzate per ogni immagine acquisita. N° profili Mitocondri: rappresenta il numero totale di mitocondri contati (somma delle singole immagini). Area Mitocondri (μm^2): rappresenta l'area totale occupata dai mitocondri (somma delle singole immagini).

	Descrizione	Area media mitocondriale	Frequenza mitocondriale
<i>White¹¹¹⁸</i>	Wild type	0,23	4,35
<i>CG18317^{+/+}</i>	Eterozigote	0,58	1,72
<i>CG18317^{-/-}</i>	Omozigote	0,29	3,45

Tabella 4.2 – Dati morfometrici ottenuti dall'analisi al microscopio elettronico di una larva III stadio. Area media mitocondriale: Area Mitocondri/N° profili Mitocondri. Frequenza mitocondriale: N° profili Mitocondri/ Area Mitocondri.

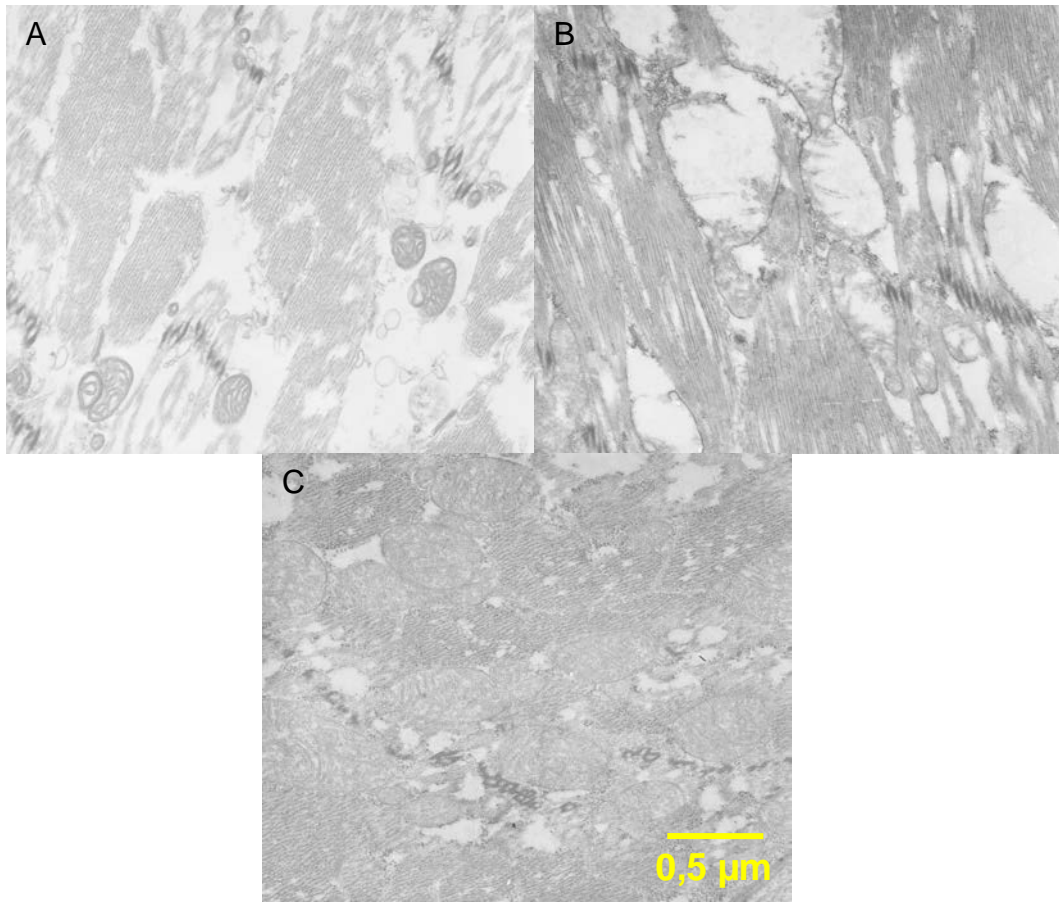


Figura 4.6 – Foto al microscopio elettronico dei tessuti larvali, con particolare riferimento ai mitocondri. A. Tessuti di larve *white*¹¹¹⁸. B. Tessuti di larve eterozigoti *CG18317*^{+/+}. C. Tessuti di larve omozigoti *CG18317*^{-/-}.

4.2 Cellule di *Drosophila melanogaster*

4.2.1 Effetti dell'RNAi in cellule S2 ed S2R+

L'RNA interference è una tecnica molto utilizzata nelle colture cellulari di *Drosophila*; permette infatti il silenziamento post-trascrizionale del gene d'interesse, come descritto nel paragrafo 1.2.6, mimando in tal modo il modello KO *in vivo* delle larve *CG18317*^{-/-}.

Tale silenziamento è stato ottenuto, previa sintesi dei dsRNA necessari per l'interference, trasfettando le colture cellulari con l'RNA a doppio filamento, costruito sulla base della sequenza genica da interferire. In Figura 4.7 si può vedere un'immagine del gel di Agarosio all'1% nel quale

è stata condotta l'elettroforesi dei prodotti di reazione della PCR (Line 1, 2, 3). Il DNA template presenta alle proprie estremità le sequenze per l'enzima T7 e complessivamente, la sua sequenza è di circa 700bp.

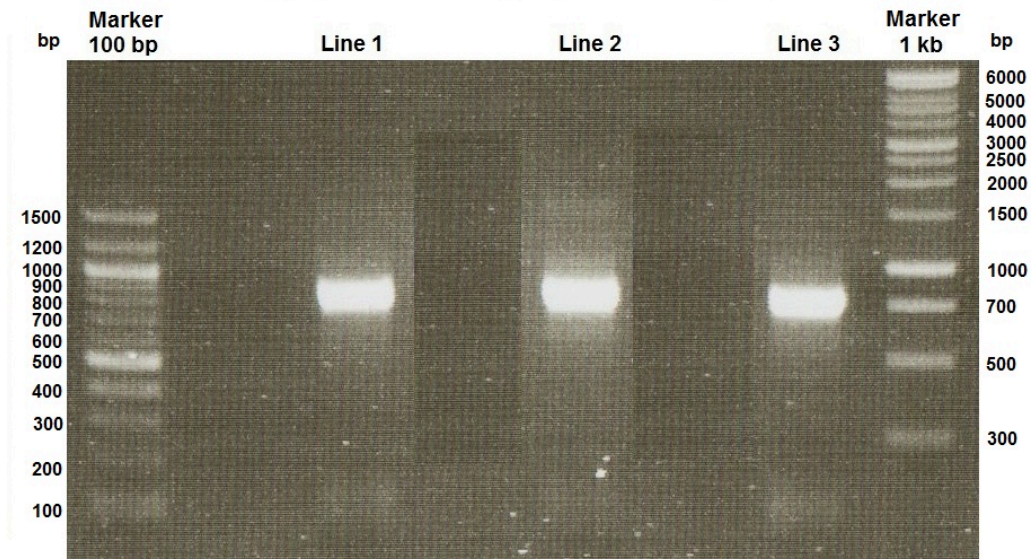


Figura 4.7 – Elettroforesi su gel di Agarosio all'1% della PCR eseguita sul DNA template del gene *CG18317* con alle estremità le sequenze di attacco per l'enzima T7. A sinistra è stato caricato un marcatore di 100 bp, a destra un marcatore di 1 kb. Line 1, 2 e 3 prodotti di reazione della PCR.

Per mezzo di questo DNA template abbiamo sintetizzato dei dsRNA grazie all'utilizzo del kit *MEGAscript[®] RNAi* (*Ambion*). Il risultato sono degli RNA a doppio filamento lunghi circa 700 bp.

Le cellule sono state poi trasfettate con questi dsRNA al fine di produrre il silenziamento desiderato. Abbiamo eseguito due prove di silenziamento: con 5 µg e con 10 µg di RNA a doppio filamento. Abbiamo notato che dopo tre giorni dall'incubazione, sia nei pozzetti con 5 µg di dsRNA che con 10 µg, le cellule hanno cominciato a diminuire in numero e a morire, a differenza dei controlli che continuavano a crescere e a duplicarsi, come si può notare dalla tabella e dal grafico sottostanti (Tabella 4.3, Figura 4.8).

	Controllo (CNTR)	CG18317IR_5µg dsRNA	CG18317IR_10µg dsRNA
Ore	Milioni di cellule		
0	1	1	1
24	1,45	1,2	0,7
48	2	1	0,3
72	2,52	0,8	0
96	3,7	0,3	0

Tabella 4.3 – Dati di crescita delle cellule di controllo S2R+ e delle cellule trasfettate con 5 µg e 10 µg di dsRNA. I valori fanno riferimento alla media di tre conte indipendenti.

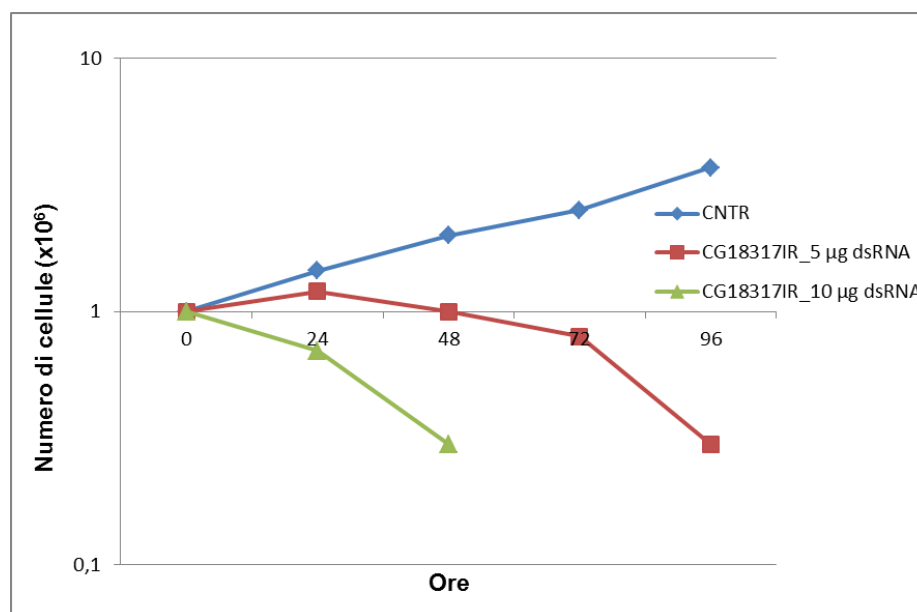


Figura 4.8 – Grafico logaritmico della crescita delle cellule di controllo e delle cellule trasfettate con 5 µg e 10 µg di dsRNA. In blu sono indicate le cellule S2R+ di controllo; in rosso sono indicate le cellule trasfettate con 5 µg di dsRNA; in verde sono indicate le cellule trasfettate con 10 µg di dsRNA.

4.2.2 Quantificazione dell'espressione del gene *CG18317* in cellule mediante qRT-PCR

Dopo aver applicato il protocollo di RNAi in cellule S2 e S2R+, abbiamo voluto dimostrare l'effettiva riuscita del silenziamento del gene *CG18317*. Per fare questo abbiamo eseguito la PCR quantitativa come per le larve.

Come mostrato in Figura 4.9 A, le cellule S2R+ mostrano un silenziamento post-trascrizionale pari a circa l'85% sia trasfettandole con 5 μ g che con 10 μ g di dsRNA. Analogamente, le cellule S2, come mostrato in Figura 4.9 B, hanno subito un silenziamento del 92% utilizzando 10 μ g di dsRNA e dell'85% utilizzando 5 μ g di dsRNA.

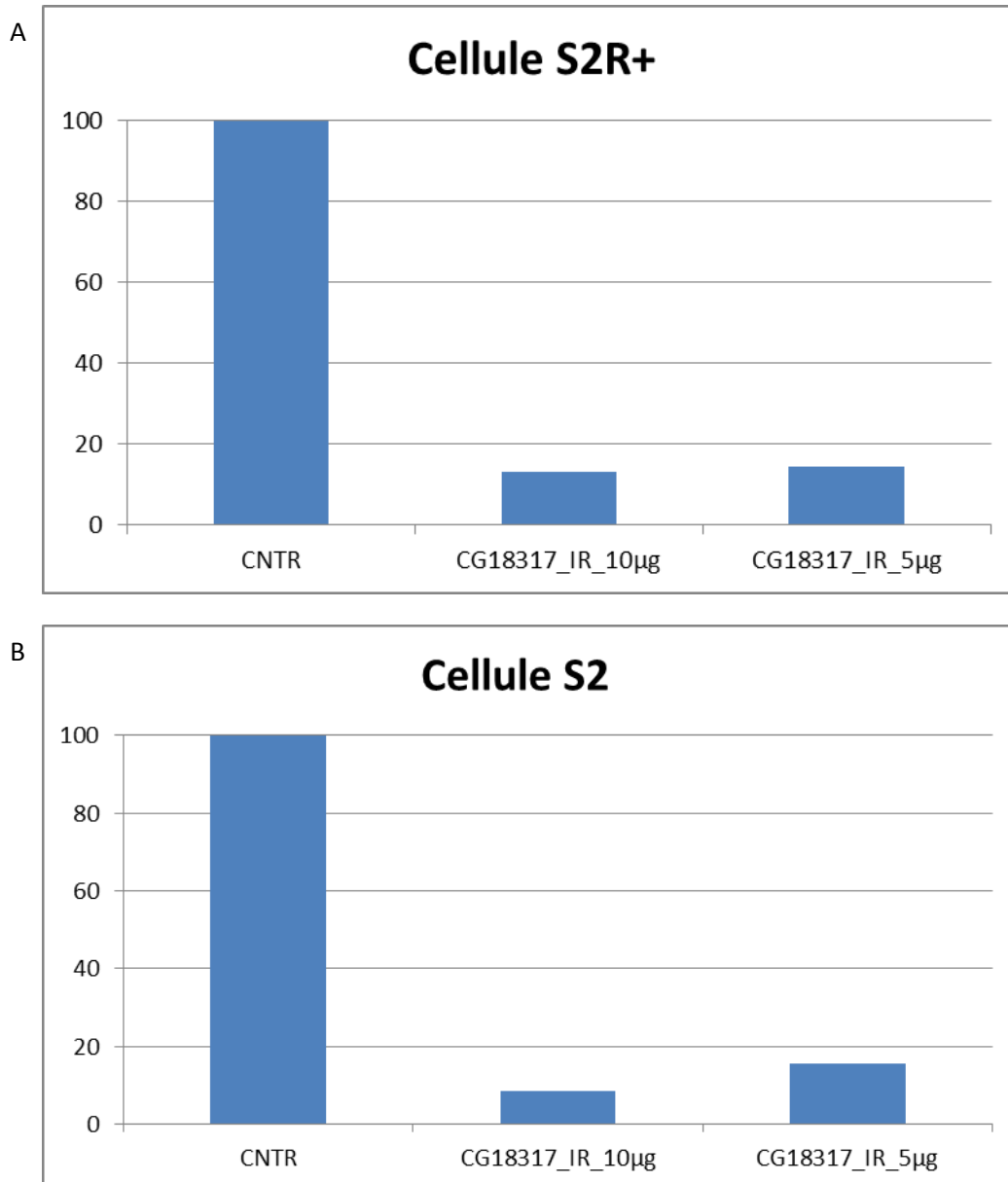


Figura 4.9 – Grafici, espressi in percentuale, relativi ai livelli di espressione del trascritto del gene *CG18317*, ottenuti tramite qRT-PCR, nelle due linee cellulari, S2R+ ed S2, con diversi quantitativi di dsRNA. La Figura A si riferisce alle cellule S2R+; la Figura B si riferisce alle cellule S2. CNTR: cellule di controllo non interferate. CG18317_IR: cellule che hanno subito silenziamento del gene *CG18317* per mezzo di RNAi. 10 μ g e 5 μ g: quantità di dsRNA utilizzato nell'RNAi.

4.2.3 Respirazione delle cellule wild-type ed interferate

Abbiamo monitorato il consumo di ossigeno per mezzo dell'analizzatore extracellulare XF₂₄ in cellule S2 di *Drosophila*. Come mostrato in Figura 4.10, abbiamo eseguito tali misurazioni su cellule di controllo, non trattate, su cellule silenziate prima per un periodo pari a 48 ore e in seguito per un tempo pari a 96 ore. Si può subito notare che le cellule sottoposte ad RNAi per 48 ore mostrano un profilo molto simile, se non uguale, alle cellule non trattate. Le cellule nelle quali il trattamento di RNA interference è durato più a lungo (incubazione coi dsRNA per un tempo totale pari a 96 ore) presentano livelli di respirazione basale molto più bassi rispetto ai controlli, come abbiamo in precedenza visto nelle larve KO *CG18317* (figure 4.4 e 4.5). Abbiamo però notato che sia i controlli che le cellule silenziate, a differenza delle larve, rispondono sia all'azione delle sostanze stimolanti la respirazione (Glucosio ed FCCP) sia ai veleni che inibiscono la respirazione mitocondriale (Oligomicina, Rotenone ed Antimicina).

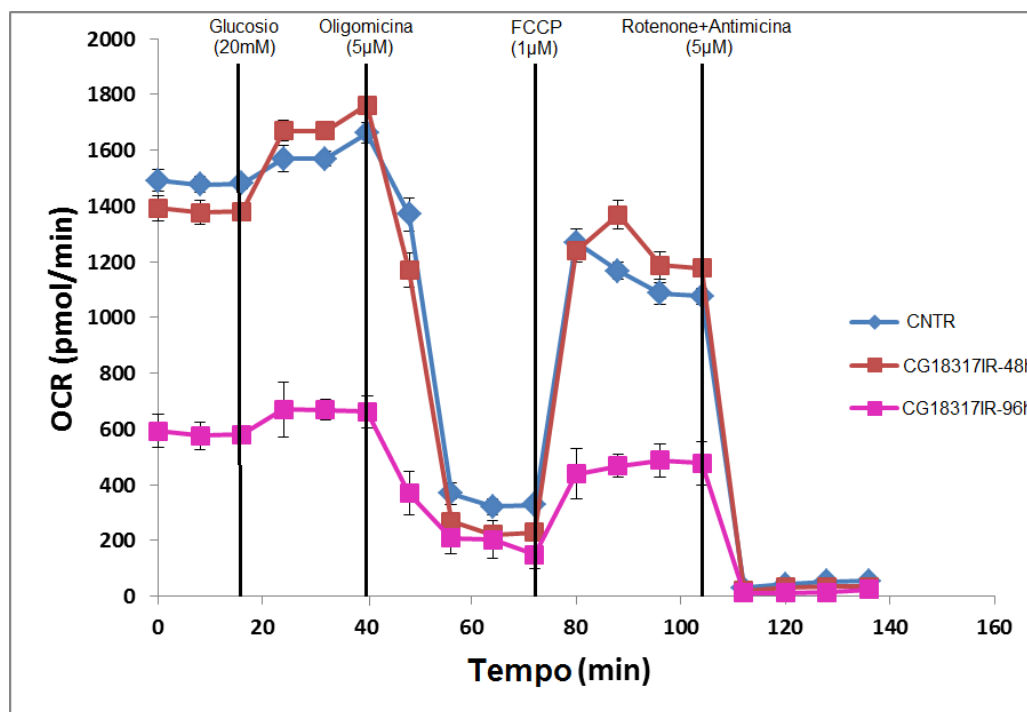


Figura 4.10 - Rappresentazione grafica dei valori di consumo di ossigeno relativi alle cellule di controllo S2 e alle cellule interferate per un trascorso di 48 ore e di 96 ore. La respirazione mitocondriale è calcolata come misura del tasso di consumo di ossigeno (OCR) nel tempo ed espresso in unità di pmoli per minuto.

4.2.4 Caratterizzazione del ciclo cellulare delle cellule S2 ed S2R+ wild-type ed interferate

Per poter stimare eventuali variazioni, determinate dal trattamento di RNA interference, dei livelli di crescita, del numero di cellule totali e del loro stato generale, abbiamo ricavato le curva di crescita relative alle due linee cellulari da noi utilizzate: S2 ed S2R+. In due piastre da 12 pozzetti sono state seminate 1 milione di cellule in 1 ml, ed ogni giorno veniva contato il numero di cellule totali presenti nelle Petri, al fine di monitorarne la crescita (Tabella 4.4 e Figura 4.11).

S2R+		S2	
Ore	Milioni di cellule	Ore	Milioni di cellule
0	1	0	1
24	1,3	24	1,24
48	2,33	48	1,965
72	3,03	72	2,95
96	4,11	96	4,37
120	5,67	120	5,7

Tabella 4.4 – Dati di crescita delle cellule S2 ed S2R+.

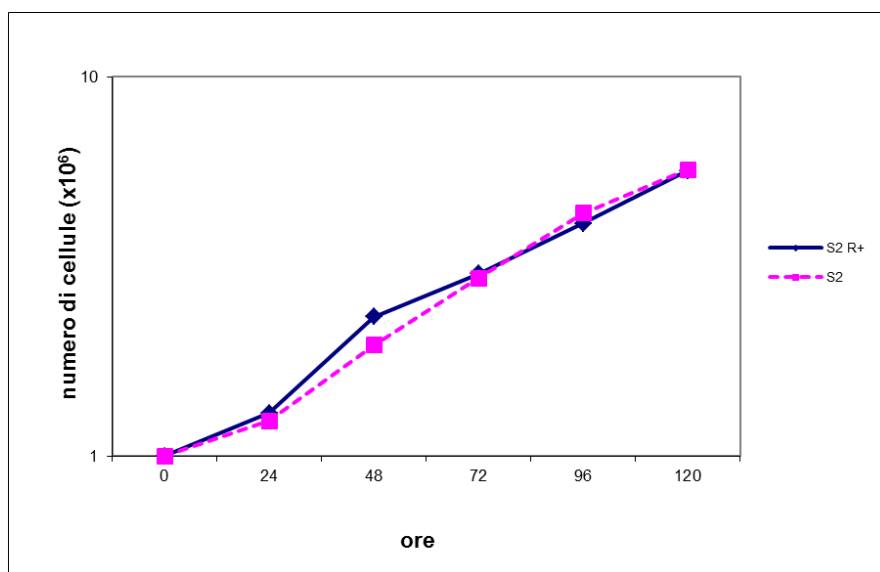


Figura 4.11 – Grafico logaritmico della crescita delle cellule S2R+ e S2. In blu sono indicate le cellule S2R+, in rosa le cellule S2.

In collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Bianchi, esperimenti effettuati al FACS ci hanno permesso di stabilire la percentuale di cellule presenti nelle varie fasi del ciclo cellulare. Come si può notare dalle figure 4.12 e 4.13, la quantità di cellule in fase S è molto simile sia nei controlli sia nelle cellule silenziate con 5 μ g e con 10 μ g di dsRNA. Per quanto riguarda le fasi G1/G0 e G2/M, le cellule trattate presentano un andamento inverso rispetto alle cellule di controllo (come si può notare dai picchi più alti nelle fasi G1/G0 rispetto a quelli nelle fasi G2/M, inversamente ai controlli).

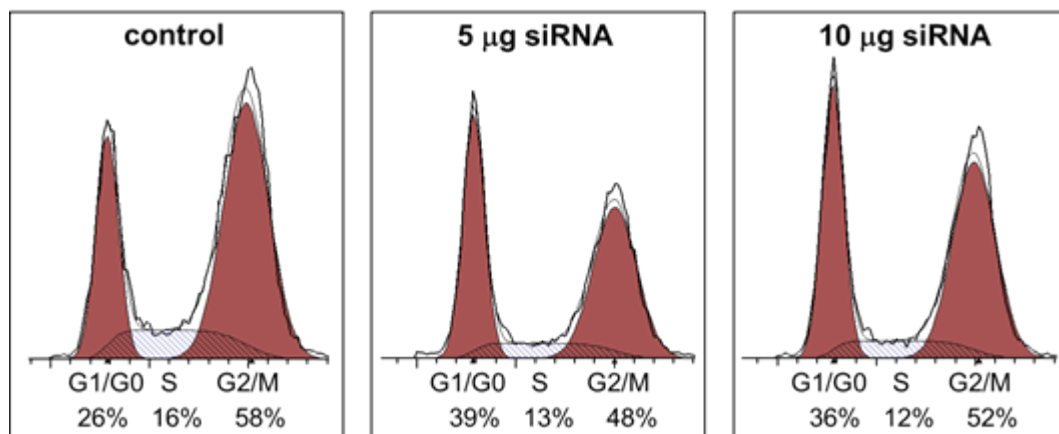


Figura 4.12 - Grafico relativo ai dati ottenuti al FACS. Ogni singolo pannello prende in considerazione una differente linea cellulare (in successione da sinistra: cellule non trattate, cellule silenziate con 5 μ g e con 10 μ g di dsRNA). I picchi di ciascun pannello sono indicativi della quantità di cellule presenti nelle fasi G1/G0, S, G2/M.

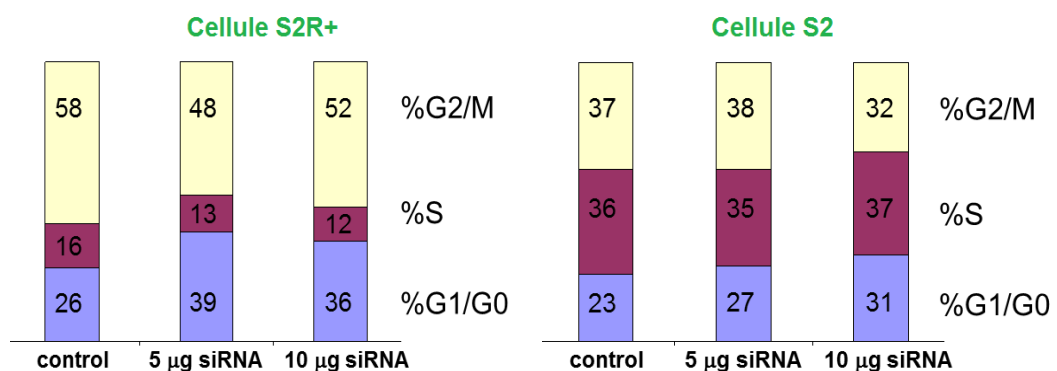
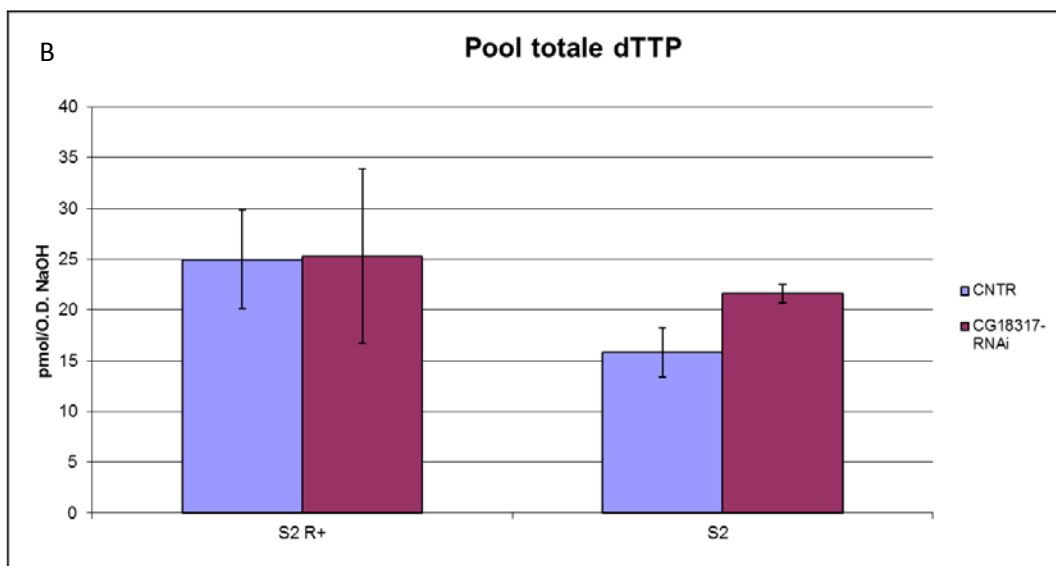
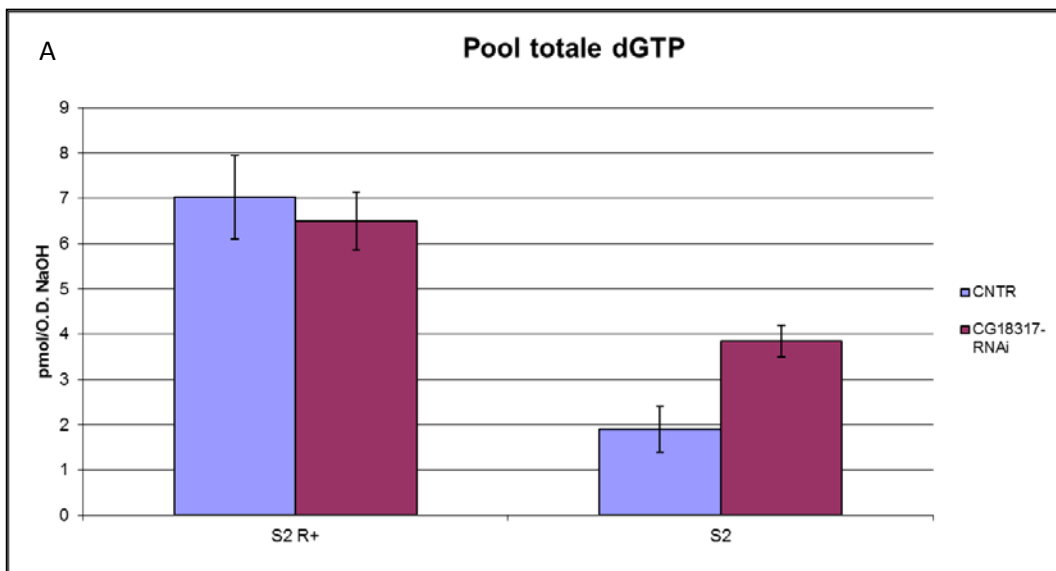


Figura 4.13 – Istogrammi relativi ai dati ottenuti al FACS. Gli istogrammi di sinistra si riferiscono alle cellule S2R+, mentre gli istogrammi di destra si riferiscono alle cellule S2. I dati sono indicati in percentuale e ricavati dai grafici presenti in Figura 4.12.

4.2.5 Quantificazione dei pool nucleotidici citosolici e mitocondriali

A seguito degli esperimenti eseguiti al FACS, sempre in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Bianchi, sono stati ricavati i pool totali di nucleotidi dGTP, dTTP e dCTP. Come si può osservare dai grafici in Figura 4.14 le cellule S2R+ che hanno subito il trattamento con 10 µg di dsRNA non presentano una riduzione dei pool nucleotidici rispetto alle cellule di controllo. La linea cellulare S2, invece, presenta dopo il silenziamento un sostanziale aumento dei tre pool nucleotidici considerati.



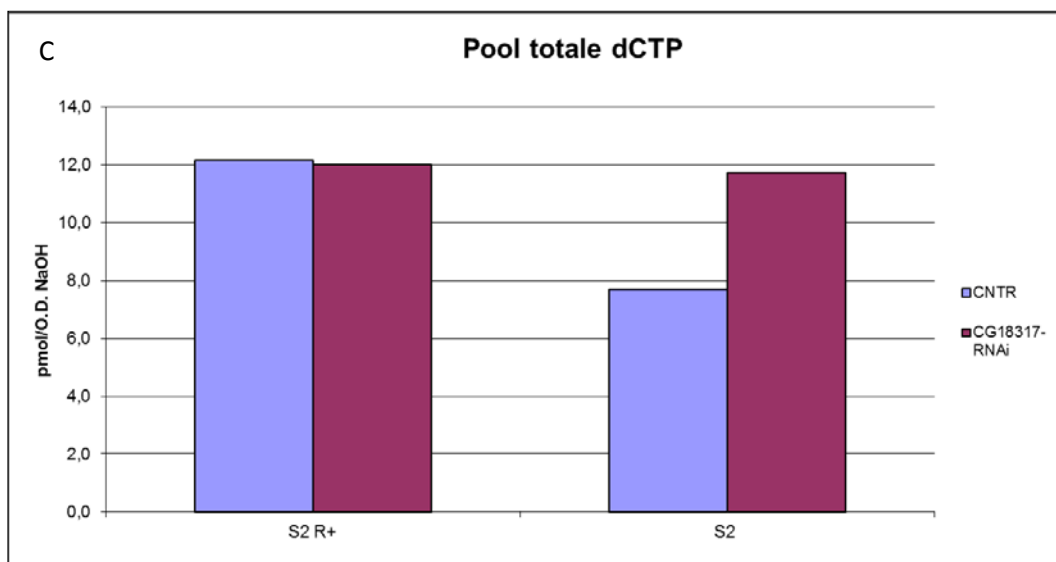


Figura 4.14 – Istogrammi rappresentanti la quantificazione dei pool nucleotidici totali in cellule S2R+ ed S2 di controllo e trattate con i dsRNA. Il grafico A rappresenta il pool totale di dGTP; il grafico B rappresenta il pool totale di dTTP; il grafico C rappresenta il pool totale di dCTP. I grafici sono espressi in unità di pmol/ O. D. NaOH.

5. DISCUSSIONE

Drosophila melanogaster rappresenta, oggi, un ottimo modello per lo studio di malattie mitocondriali dovute a mutazioni nel DNA sia mitocondriale che nucleare. *Drosophila*, infatti, presenta numerosi geni ortologhi a geni malattia umani; inoltre, in tale organismo modello, l'intero apparato mitocondriale, con i relativi complessi enzimatici coinvolti nella fosforilazione ossidativa, risulta altamente conservato (Sánchez-Martínez *et al.*, 2006).

Nell'ambito di questo lavoro di tesi ci si è concentrati nel caratterizzare dal punto di vista funzionale il gene di *Drosophila melanogaster* *CG18317*, omologo del gene *Rim2* di lievito, in cui è stato descritto come un trasportatore di deossinucleotidi pirimidinici dal citosol al mitocondrio e viceversa. Nel moscerino, la funzione di tale gene è ancora sconosciuta, tuttavia, nel laboratorio in cui ho svolto il mio internato di laurea, è stata condotta una profonda caratterizzazione del gene in questione, che ha permesso la formulazione di alcune solide ipotesi riguardo il ruolo biologico di *Rim2* in *Drosophila*.

Il punto di partenza di qualsiasi studio dedicato alla comprensione della funzione di un dato prodotto genico è la creazione di un modello nel quale il gene in questione sia aberrato o, meglio, completamente assente; in tal modo si può appurare l'insorgenza di un evidente difetto a livello dello sviluppo, e/o di un determinato fenotipo "malato", e/o di una perdita di funzione. Al fine di determinare sperimentalmente se il gene *CG18317* svolge un ruolo nello scambio di desossinucleotidi tra mitocondri e citoplasma, è stato generato un ceppo di *Drosophila* *CG18317Δ* mancante del gene *CG18317*. Nello specifico il ceppo knock out (KO) per il gene in questione è stato generato in *Drosophila* mediante un meccanismo di ricombinazione tra linee di moscerini contenenti elementi inserzionali localizzati alle estremità del gene da eliminare (Parks *et al.*, 2004).

- (i) Il mutante da noi generato presenta letalità allo stadio larvale, in associazione ad evidenti difetti legati allo sviluppo. Moscerini omozigoti *CG18317^{-/-}* non superano il terzo stadio larvale e appaiono di dimensioni assai ridotte se confrontati con individui wild type. I mutanti di *Drosophila* per geni associati a malattie mitocondriali umane, mostrano spesso letalità allo stadio larvale; tale condizione è una caratteristica fenotipica che si ritrova, ad esempio, nei mutanti per la subunità α della ATP-sintasi mitocondriale (Talamillo *et al.*, 1998) e per la subunità 9 della ubiquinolo-citocromo c reduttasi mitocondriale (Frolov *et al.*, 2000). Inoltre, la letalità larvale risulta frequentemente associata a difetti

neuromuscolari e fotocomportamentali; infatti, tali aspetti risultano, in *Drosophila*, particolarmente sensibili alle carenze energetiche correlate alla fosforilazione ossidativa mitocondriale. Similmente, il mutante *technical knockout (tko)*, portatore di una mutazione puntiforme nella proteina mitoribosomale S12, presenta un ritardo nello sviluppo larvale, difetti nel corteggiamento da parte dei maschi, iporeattività e danni al sistema visivo ed uditivo. I mutanti *tamas* muoiono all'inizio dello stadio pupale e manifestano profonde alterazioni del sistema visivo e locomotorio (Iyengar *et al.*, 1999); infine, i mutanti *sluggish-A* presentano deficit locomotorio e foto tattico (Hayward *et al.*, 1993).

(ii) Altro aspetto comune a moltissimi mutanti mitocondriali è un difetto a livello della respirazione mitocondriale. Citando un esempio, il mutante di *Drosophila* per il gene *low power (lopo)*, che codifica per una proteina di legame al mtDNA a singolo filamento (*mitochondrial single-stranded DNA-binding protein*, mtSSB), muore prima della metamorfosi, in seguito ad una ridotta proliferazione cellulare; anche in questo caso, come nei mutanti *tamas* e *sluggish-A*, si osservano gravi alterazioni a livello del sistema visivo. Indagini molecolari, istochimiche e fisiologiche hanno rilevato una deplezione nel contenuto di mtDNA, associata ad una diminuzione nelle capacità di respirazione mitocondriale (Maier *et al.*, 2001).

Nel nostro caso le larve KO, nelle quali è stato misurato il consumo di ossigeno, mostrano evidenti difetti di respirazione mitocondriale (paragrafo 4.1.3). Nello specifico, misurando in larve singole omozigoti per la delezione i livelli di consumo di ossigeno, questi risultano assai inferiori se rapportati a quelli delle larve eterozigoti o wild type. Come si nota dai grafici 4.4 e 4.5, la capacità respiratoria basale delle larve *CG18317^{-/-}* si colloca a livelli molto bassi rispetto ai controlli. Inoltre, questa risulta essere insensibile all'inibizione da parte di veleni della catena respiratoria quali Rotenone ed Antimicina, contrariamente a ciò che accade nei controlli. Da questi dati emerge l'evidenza di un profondo difetto a livello respiratorio in questi mutanti. Difetto che, già preso singolarmente potrebbe essere responsabile del mancato avanzamento nello sviluppo delle larve *CG18317^{-/-}*. Infatti, nel momento in cui le larve III stadio devono affrontare la metamorfosi, esse necessitano di quantità di energia superiori a quelle di cui avevano bisogno negli stadi larvali. La trasformazione in pupa e successivamente in moscerino adulto, è un processo assai dispendioso dal punto di vista energetico. Le larve mutanti, non essendo in grado di produrre quantità di ATP pari o, per lo meno, simili ai controlli, non sono capaci di

sopravvivere oltre gli stadi larvali. Il difetto respiratorio, unitamente ad altre, molte, anomalie che verranno discusse in seguito, non permette l'avanzamento dello sviluppo e quindi lo sfarfallamento dell'individuo adulto.

(iii) Esperimenti di microscopia elettronica sono stati indispensabili per comprendere lo stato generale dei mitocondri, il loro numero, la conformazione delle loro creste, la loro disposizione in corrispondenza delle strie Z delle fibre muscolari. Le larve omozigoti ($CG18317^{-/-}$) presentano mitocondri di dimensione paragonabile alle wild type, ma di numero decisamente superiore alle eterozigoti ($CG18317^{+/+}$). Tale dato è assolutamente in accordo con quanto visto nella quantificazione delle copie di DNA mitocondriale eseguita tramite qRT-PCR. In parallelo al lavoro di tesi qui descritto, nello stesso mutante sono stati condotti degli esperimenti di qRT-PCR mirati alla determinazione del numero di copie del DNA mitocondriale (mtDNA).

Tali dati, ottenuti dal Dott. Biscontin, evidenziano un sostanziale decremento del numero di copie di mtDNA negli individui eterozigoti; omozigoti e wild type, invece, presentano livelli comparabili del numero di copie di mtDNA.

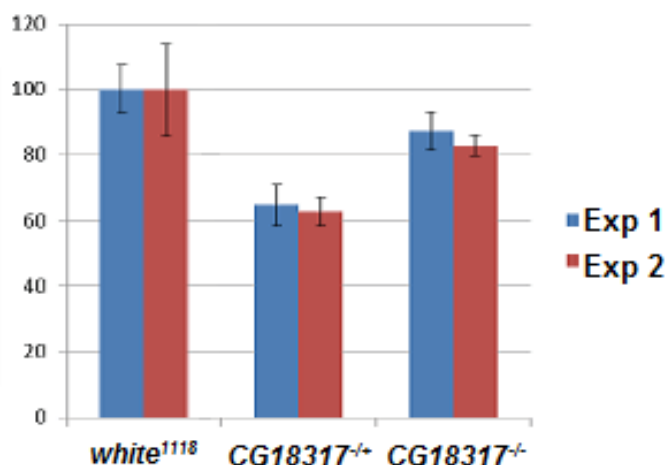


Figura 5.1 – Real-time PCR quantitativa determinante il numero di copie del mtDNA.

Ciò significa che negli omozigoti ci sono più mitocondri e di dimensioni inferiori rispetto agli eterozigoti. Tale numero è leggermente inferiore agli individui wild type.

Effettivamente sembra intervenire una sorta di effetto compensatorio che si attiva nel momento in cui si esegue il KO di *CG18317* che porta ad un aumento del numero di mitocondri e di conseguenza ad un aumento dell' mtDNA. Le dimensioni dei

mitocondri nelle larve eterozigoti sono decisamente maggiori sia del wild type che dell'omozigote. Alla luce di quanto emerso sembrerebbe che l'effetto fenotipico più eclatante (almeno per quanto riguarda la morfologia ed il numero di mitocondri) si osserva nell'eterozigote in cui presumibilmente è presente una down-regolazione di *CG18317* pari a circa il 50% che permette lo sviluppo della larva in adulto, cosa che non accade per i wild type. La localizzazione dei mitocondri a livello delle fibre muscolari negli eterozigoti sembra essere all'interno della stria zeta.

In accordo con quanto appena descritto, nel caso della proteina umana PNC-1, omologa alla proteina di lievito RIM2, la soppressione della trascrizione della stessa porta ad uno sbilanciamento nella produzione dei componenti della catena respiratoria. Si ha quindi una conseguente produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed un aumento della biogenesi mitocondriale (Favre *et al.* 2010).

Lo studio di determinati processi *in vivo* a volte risulta ostacolato da molteplici vincoli tecnici, per questo motivo spesso si conducono esperimenti, impossibili da realizzare nell'organismo intero, *in vitro*, su linee cellulari. Nel nostro caso esperimenti di quantificazione dei pool nucleotidici sono stati condotti appunto su linee cellulari S2 ed S2R+ di *Drosophila*. Molti sono i vantaggi delle colture cellulari: un miglior controllo delle condizioni sperimentali (ambiente fisicochimico e fisiologico) e la proliferazione di una colonia di cellule identiche (clone) a partire da una singola cellula. Fin dai primi anni '60 sono state create molte linee cellulari di *Drosophila*, rappresentanti differenti tipi cellulari (Schneider, 1972). L'elevata conservazione con i mammiferi delle vie di traduzione di segnale e delle funzioni di molte proteine e la riproducibilità dei risultati *in vitro* nell'intero organismo, hanno reso possibile lo studio dei processi biochimici in un ambiente relativamente semplice da analizzare, grazie ad esperimenti di silenziamento dell'espressione genica. Un metodo molto semplice, altamente riproducibile ed efficiente nelle colture cellulari di *Drosophila*, utile per indagare la funzione genica, è, infatti, l'RNA interference (RNAi).

(iv) Il silenziamento dell'espressione genica di *CG18317* in cellule di *Drosophila melanogaster* è avvenuto previa sintesi dei dsRNA necessari ad abbattere il trascritto del gene d'interesse. Grazie a questa tecnica abbiamo potuto mimare il modello KO anche *in vitro*. Gli esperimenti sono stati eseguiti su due linee cellulari: S2 ed S2R+. Il silenziamento del gene *CG18317* è stato effettuato utilizzando piccole quantità di dsRNA (5 µg e 10 µg), come si può osservare nei grafici in Figura 4.9. L'impiego di una piccola dose di

RNA a doppio filamento (5 µg) è risultata sufficiente ad indurre il silenziamento post-trascrizionale. Visto l'effetto deleterio del trattamento di RNA interference nelle cellule (dopo tre giorni dal trattamento con i dsRNA le cellule cominciano a non duplicarsi e a morire; Tabella 4.3, Figura 4.8) si può affermare che il gene in questione sia necessario per la crescita e la vitalità cellulare. Questi dati validano ulteriormente i risultati ottenuti sul modello KO *in vivo* (letalità larvale): se il difetto di trasporto nucleotidico dal citosol al mitocondrio nelle larve produce mortalità, lo stesso effetto si osserva nelle cellule.

(v) L' mtDNA codifica per molte subunità necessarie alla catena di trasporto degli elettroni; danni a suo carico provocano quindi difetti anche a livello della catena respiratoria. Abbiamo eseguito esperimenti di consumo di ossigeno con il Seahorse Bioscience anche nelle colture cellulari di *Drosophila* per poter stimare eventuali difetti respiratori. Le analisi sono state effettuate con la linea cellulare S2 e non S2R+; questo perché le cellule S2 risultano formare un tappeto maggiormente adeso ed omogeneo rispetto alle S2R+. Questa caratteristica è infatti fondamentale per la buona riuscita degli esperimenti con l'Analizzatore Extracellulare XF₂₄. Le colture cellulari S2R+ presentando troppe cellule in sospensione e soprattutto poco adese, non si sono dimostrate utilizzabili per gli esperimenti al Seahorse. Come mostrato in Figura 4.10, le cellule sia di controllo che quelle silenziate rispondono a tutti gli stimoli a cui sono state sottoposte (Glucosio, Oligomicina, FCCP e Rotenone + Antimicina). E' importante notare che, trascorse 48 ore dal silenziamento, il consumo di ossigeno relativo alle cellule interferate risulta comparabile a quello del controllo; invece, cellule in cui in trattamento di interference è stato mantenuto per 96 ore presentano un profilo molto più basso rispetto ai controlli. Tale risultato trova spiegazione nel fatto che la proteina RIM2 presenta un "turnover" molto lento. Probabilmente dopo 48 ore dal silenziamento questa risulta essere ancora presente, mentre dopo 96 ore non si è prodotta nuova proteina e quella di partenza risulta degradata.

(vi) L'analisi del consumo di ossigeno nelle colture cellulari ci ha posti di fronte al confronto tra il profilo ottenuto nelle larve (Figure 4.4 e 4.5) e quello ottenuto nelle cellule (Figura 4.10). Risulta subito evidente come le cellule rispondano a tutti gli stimoli somministrati, sia eccitatori (Glucosio e FCCP) che inibitori (Oligomicina e Rotenone + Antimicina), a differenza delle larve, le quali sembrano non rispondere alle sostanze fornite. Sono in corso studi approfonditi

sul metabolismo larvale, in quanto indicazioni preliminari dimostrano come il metabolismo delle larve di *Drosophila* sia prevalentemente di tipo glicolitico. Sembra infatti che a livello larvale la catena respiratoria mitocondriale sia attiva principalmente per la produzione di calore ad opera delle Uncoupling Proteins. Tale osservazione è in accordo col fatto che *Drosophila* è un pecilotermo, ovvero un insetto in cui la temperatura interna corporea tende a raggiungere valori simili a quelli esterni, per questo motivo necessita di produrre calore per evitare l'ipotermia quando l'ambiente esterno diventa freddo.

(vii) Nell'ambito del lavoro svolto con le colture cellulari, si è rivelata di primaria importanza la caratterizzare del ciclo vitale delle cellule di *Drosophila*, in modo da poterne stabilire periodo di crescita e tempo di duplicazione. Dalla curva di crescita descritta nella Figura 4.11 abbiamo stabilito che sia la linea cellulare S2 che quella S2R+ presentano un ciclo cellulare di 48 ore, a differenza delle cellule di mammifero che presentano un ciclo cellulare di circa 24 ore. Inoltre, grazie alla collaborazione con la Dott.ssa Franzolin si sono ottenuti dati indicativi del numero di cellule presenti nelle varie fasi del ciclo cellulare, al fine di poter poi eseguire l'analisi del pool totale di nucleotidi.

Da questa analisi abbiamo dedotto che le cellule che avevano subito RNAi presentavano un andamento simile ai controlli, per quanto riguarda la fase S, ed un andamento inverso, invece, nelle fasi G1/G0 e G2/M (Figure 4.12 e 4.13). Possiamo pensare che, per quanto riguarda le cellule trattate con i dsRNA, non ci sia un aumento significativo delle cellule che stanno sintetizzando il proprio genoma (fase S), bensì ci sia un lieve aumento di cellule che entrano in quiescenza (G1/G0) piuttosto che nella fase di divisione (G2/M). Questo potrebbe essere un significativo segnale di risposta ad un possibile danno a livello del mtDNA: se infatti viene diminuita la replicazione, si diminuisce anche l'uso dei dNTPs necessari alla sintesi del nDNA e del mtDNA.

(viii) Come ultima analisi si sono quantificati i pool totali dei nucleotidi dGTP, dTTP e dCTP, sempre in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Bianchi. Tale analisi ha dimostrato che, a differenza di quanto aspettato, non c'è una riduzione dei pool nucleotidici, dovuta ad una mancata espressione del trasportatore mitocondriale RIM2, bensì si può osservare un aumento degli stessi nelle cellule S2 trattate ed un mantenimento nelle cellule S2R+ trattate (Figura 4.14).

Poiché la proteina RIM2 risulta essere un trasportatore mitocondriale di nucleotidi, siamo portati a pensare che probabilmente solo il pool nucleotidico mitocondriale sarà sbilanciato, ma avendo misurato il pool totale non possiamo esserne certi. Per questa ragione si sta lavorando per ricercare un protocollo che permetta di analizzare separatamente i due pool nucleotidici.

6. CONCLUSIONI

Durante il mio internato di laurea ho preso parte ad un progetto di ricerca mirato alla caratterizzazione funzionale del gene *CG18317* di *Drosophila melanogaster*, omologo al gene *Rim2* di lievito (Marobbio *et al.*, 2006).

A tal fine è stata generata una linea knock out di moscerini in cui il gene *CG18317* è stato rimosso attraverso una specifica tecnica di ricombinazione tra elementi inserzionali presenti alle estremità del gene stesso (Parks *et al.*, 2004). I mutanti omozigoti non raggiungono lo stadio adulto, muoiono durante gli stadi larvali, per questo motivo è stato necessario mantenere la mutazione in eterozigosi (ceppo *CG18317Δ/CyO-GFP*).

Si ritiene che la proteina RIM2 sia necessaria per lo scambio di deossinucleotidi tra mitocondrio e citosol, e che una disfunzione della stessa possa provocare uno sbilanciamento nel pool nucleotidico e quindi ad un danno all' mtDNA. Il genoma mitocondriale codifica per molte subunità dei complessi della catena respiratoria mitocondriale; un danno a livello dell' mtDNA può provocare difetti anche nella respirazione mitocondriale. Per questo motivo si sono condotti esperimenti mirati a misurare il consumo di ossigeno in tessuti larvali wild type e mutati. I risultati indicano una sostanziale riduzione della respirazione negli individui omozigoti per la delezione presupponendo un forte danno a livello della catena respiratoria.

Studi di microscopia elettronica, eseguiti in collaborazione col Prof. Tacchetti di Genova, hanno evidenziato come nei moscerini mutanti ci sia un aumento del numero di mitocondri rispetto agli individui wild-type, ad indicare una possibile compensazione del danno respiratorio con un aumento della biogenesi mitocondriale.

Dal momento che non è possibile stimare i livelli di deplezione dei pool nucleotidici *in vivo* è stato necessario condurre parte degli esperimenti in colture cellulari di *Drosophila melanogaster*. Esperimenti di RNA interference eseguiti *in vitro* su linee cellulari S2 ed S2R+ mimano il modello *in vivo* in quanto dopo tre giorni dal trattamento con siRNA le cellule cominciano a morire e il loro consumo di ossigeno è fortemente diminuito rispetto ai controlli. La determinazione dei pool nucleotidici totali, eseguita in collaborazione con il laboratorio della Prof.ssa Bianchi di Padova, non ha rivelato una particolare riduzione degli stessi come ci si aspettava; tuttavia, abbiamo misurato solo i pool nucleotidici totali, senza distinguere tra pool mitocondriale e pool citosolico. Esperimenti successivi mirano alla messa a punto di un protocollo utile per eseguire tali

misurazioni, infatti la nostra ipotesi è che il difetto potrebbe riguardare solo il pool mitocondriale.

Nel complesso questo lavoro di tesi ha contribuito allo studio del gene di *Drosophila CG18317* dal punto di vista morfologico, funzionale, biochimico e molecolare.

7. APPENDICE 1

CG18317

```
1 acagtcgcag tgcggtcact ctcacggacg tgttttttta catcggatcg
51 aaaataaatt aatgcaaagc taaatcacia acgctagggg tccgagagct
101 cgaaatcgaa tcagtgcacc ggccgaccga cggactttaa ctgcgcgcaa
151 gctaaccgta ggtaagttta acgctcagca ctgcaaccac tgcagttgca
201 taaccgttgc cgaaaatcaa gtcgaaaagt cggagaatcg cggccaagcg
251 aaagcccca aagttcaaag gacaatagaa agtggcaaga ggaagagagg
301 agagcgtgct aagagcccct cccctggggg ccccgcccc cacacctccg
351 cccacaaagt gccttaacaa tatagtgcgt tttgccaag ttaaaccaa
401 gtgcgcgctc aagtagccgc ccatttcggt ggagcctatt cgggaactgg
451 gaagacaacg aagatggccc agaacacggc cgacactctc atccacctga
501 tcgcccggcg atccgctggc acagtgggtg ccgttgtcac atgccccctg
551 gaggtggtga agactcgcct gcagagctcc acggcgttca tgacgccgtc
601 gcggctggcg gagaatgccg gaggaggacc ggcgaacggt ggccaatcgg
651 agctgctgcy gccggaacaa cgacgtaagc taagcacaac gatattacgt
701 aacagatcac agccacaggt gattgggggt gtgcgtagga tcatggccat
751 ttcacactgc ggcattcat ccacaacgcc caaatccatg agcatcgtgc
801 agtgccctgc gcacattgtc cagaacgagg gtccacgcgc cctgttcaag
851 ggtctgggtc cgaatctcgt gggcgtggcc ccatcccgtg ccatttactt
901 ctgcacctac tcgcaaacca aaaacacgct caacagtctg ggctttgttg
951 aacgtgactc gccactggtg cacatcatga gtgcagcgag tgccggcttt
1001 gtctcctcca cggcaacgaa tcccatttgg tttgtgaaga cgccaatgca
1051 gctggactac aactccaagg tgcagatgac cgtgaggcag tgcacgaga
1101 ggggtgacgc ccagggaggc gtggcggcct tctacaaggg catcacggcc
1151 agctactttg gaatctgcga gacgatggtg cactttgtca tctacgagtt
1201 tatcaagtcc aagttgctag agcagcgaaa tcagcggcat acggacacca
1251 agggatcccg cgactttctg gagttcatga tggctggcgc tgtttccaaa
1301 accatcgctt cctgcacgc ctatcccac gaagtggcac gcactcgtct
1351 gcgggaggag ggcaacaaat acaactcctt ctggcagacc ctgcacactg
1401 tttggaagga ggagggcaga gcaggactct acagaggctt ggccaagcag
1451 ctggtgcygac agattcccaa cacggcgatc atgatggcca cctatgaggc
1501 ggtcgtctat gtgctcacgc ggcgcttcaa caacaaatcg aacgagttct
1551 acgactttta gatgcctttc aaaggactgg agaaggagta acccaatctg
1601 tgcatatgta gacgcgactg ctgcaacttt atgtaatttt atccctcgtt
1651 tttaaacgat ccaaaccaac gacgcgcaaat tcttagttaa ctgacttcta
1701 agtcagatat gaaacgaact cgatagactt aagacgtag acgttgaacg
1751 ttggccaacc aatcgaaaaa aaaaaa
```

Primer Forward della PCR per la sintesi dei dsRNA

5' **TTAATACGACTCACTATAGGGAGATGTA** tgcgttttgccaagttaaa 3'

Primer Reverse della PCR per la sintesi dei dsRNA

5' **TTAATACGACTCACTATAGGGAGATGG** tacaccctctcgatgcactg 3'

Primer F Real Time PCR quantitativa

5' **acaactccttctggcagacc** 3'

Primer R Real Time PCR quantitativa

5' **cgtggccaagcctctgta** 3'

8. BIBLIOGRAFIA

Adams MD, *et al.* (2000). **The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*.** *Science* **287**, 2185–2195.

Arnér ESJ and Eriksson S (1995). **Mammalian deoxyribonucleoside kinases.** *Pharmacology & Therapeutics* **67**, (2): 155–186.

Bai J, Sepp KJ and Perrimon N (2009). **Culture of *Drosophila* primary cells dissociated from gastrula embryos and their use in RNAi screening.** *Nature protocols* **4**, (10):1502–12.

Berk AJ and Clayton DA (1973). **A genetically distinct Thymidine Kinase in mammalian mitochondria. Exclusive labeling of mitochondrial deoxyribonucleic acid.** *The Journal of Biology Chemistry* **248**, (8): 2722–2729.

Bogenhagen D and Clayton DA (1976). **Thymidylate nucleotide supply for mitochondrial DNA synthesis in mouse L-Cells. Effect of 5-fluorodeoxyuridine and methotrexate in thymidine kinase plus and thymidine kinase minus cells.** *The Journal of Biology Chemistry* **251**, (10): 293–844.

Bradshaw HD Jr and Deininger PL (1984). **Human thymidine kinase gene: Molecular cloning and nucleotide sequence of a cDNA expressible in mammalian cells.** *Molecular and Cellular Biology* **4**, (11): 2316–2320.

Carvalho AB (2002). **Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome.** *Current Opinion in Genetics & Development* **12**, (6): 664–668.

Chabes A and Thelander L (2000). **Controlled protein degradation regulates Ribonucleotide Reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks.** *The Journal of Biological Chemistry* **275**, (23): 17747–17753.

DiMauro S and Schon EA (2003). **Mitochondrial respiratory-chain diseases.** *The New England Journal of Medicine* **348**, (26): 2656–2668.

DiMauro S and Schon EA (2008). **Mitochondrial disorders in the nervous system.** *The Annual Review of Neuroscience* **31**, 91–123.

Dolce V, Fiermonte G, Runswick MJ, Palmieri F and Walker JE (2001). **The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, (5): 2284–2288.

Favre C, Zhdanov A, Leahy M, Papkovsky D and O'Connor R (2010). **Mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier (PNC1) regulates mitochondrial biogenesis and the invasive phenotype of cancer cells.** *Oncogene* **29**, 3964–3976.

Ferraro P, Franzolin E, Pontarin G, Reichard P and Bianchi V (2010). **Quantitation of cellular deoxynucleoside triphosphates.** *Nucleic Acids Research* **38**, (6): e85.

Floyd S, Favre C, Lasorsa FM, Leahy M, Trigiante G, Stroebel P, Marx A, Loughran G, O'Callaghan K, Marobbio CM, Slotboom DJ, Kunji ER, Palmieri F and O'Connor R (2007). **The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth.** *Molecular Biology of the Cell* **18**, (9): 3545–3555.

Frolov MV, Benevolenskaya EV and Birchler JA (2000). **The oxen gene of *Drosophila* encodes a homolog of subunit 9 of yeast ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex: Evidence for modulation of gene expression in response to mitochondrial activity.** *Genetics* **156**, (4): 1727–1736.

Hayward DC, Delaney SJ, Campbell HD, Ghysen A, Benzer S, Kasprzak AB, Cotsell JN, Young IG and Miklos GLG (1993). **The sluggish-A gene of *Drosophila melanogaster* is expressed in the nervous system and encodes proline oxidase, a mitochondrial enzyme involved in glutamate biosynthesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, (7): 2979–2983.

Iyengar B, Roote J and Campos AR (1999). **The *tamas* gene, identified as a mutation that disrupts larval behavior in *Drosophila melanogaster*, codes for the mitochondrial DNA polymerase catalytic subunit (DNAPol-125).** *Genetics* **153**, (4): 1809–1824.

Johansson M and Karlsson A (1997). **Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2.** *The Journal of Biology Chemistry* **272**, (13): 8454–8458.

Jordan A and Reichard P (1998). **Ribonucleotide reductases.** *Annual Review of Biochemistry* **67**, 71–98.

Leanza L, Ferraro P, Reichard P and Bianchi V (2008). **Metabolic interrelations within Guanine deoxynucleotide pools for mitochondrial and nuclear DNA maintenance.** *The Journal of Biological Chemistry* **283**, (24): 16437–16445.

Maier D, Farr CL, Poeck B, Alahari A, Vogel M, Fischer S, Kaguni LS and Schneuwly S (2001). **Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in *Drosophila melanogaster*.** *Molecular Biology of the Cell* **12**, (4): 821–830.

Marobbio CM, Di Noia MA and Palmieri F (2006). **Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: Bacterial expression, reconstitution and functional characterization.** *Biochemical Society* **393**, 441–446.

Mathey-Prevot B and Perrimon N (2006). ***Drosophila* genome-wide RNAi screens: Are they delivering the promise?** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **71**, 141–148.

Moraes CT, Shanske S, Tritschler HJ, Aprille JR, Andreetta F, Bonilla E, Schon EA and DiMauro S (1991). **mtDNA depletion with variable tissue expression: A novel genetic abnormality in mitochondrial diseases.** *The American Journal of Human Genetics* **48**, (3): 492–501.

Parks AL et al. (2004). **Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome.** *Nature Genetics* **36**, (3): 288-292.

Pfaffl MW (2001). **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research* **29**, 2002:2007.

Piskur J, Sandrini MP, Knecht W and Munch-Petersen B (2004). **Animal deoxyribonucleoside kinases: 'Forward' and 'retrograde' evolution of their substrate specificity.** *FEBS Letters* **560**, (1-3): 3–6.

Pontarin G, Gallinaro L, Ferraro P, Reichard P and Bianchi V (2003). **Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: Dynamic relations to cytosolic pools.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, (21): 12159–12164.

Rampazzo C, Ferraro P, Pontarin G, Fabris S, Reichard P and Bianchi V (2004). **Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation.** *The Journal of Biological Chemistry* **279**, (17): 17019–17026.

Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001). **A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster***. *Genome Research* **11**, (6): 1114--1125.

Rubin GM (1988). ***Drosophila melanogaster* as an experimental organism**. *Science* **240**, (4858):1453–1459.

Sánchez-Martínez A, Luo N, Clemente P, Adán C, Hernández-Sierra R, Ochoa P, Fernández-Moreno MA, Kaguni LS, Garesse R (2006). **Modeling human mitochondrial diseases in flies**. *Biochimica et Biophysica Acta* **1757**, 1190–1198.

Schneider I (1972). **Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster***. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **27**, 353–65.

Spinazzola A and Zeviani M (2005). **Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling**. *Gene* **354**, 162–168.

Talamillo A, Chisholm AA, Garesse R and Jacobs HT (1998). **Expression of the nuclear gene encoding mitochondrial ATP syntase subunit alpha in early development of *Drosophila* and sea urchin**. *Molecular Biology Reports* **25**, (2): 87–94.

Van Dyck E, Jank B, Ragnini A, Schweyen RJ, Duyckaerts C, Sluse F and Foury F (1995). **Overexpression of a novel member of the mitochondrial carrier family rescues defects in both DNA and RNA metabolism in yeast mitochondria**. *Molecular and General Genetics* **246**, 426–436.

Yanagawa S, Lee JS and Ishimoto A (1998). **Identification and characterization of a novel line of *Drosophila* Schneider S2 cells that respond to wingless signaling**. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, (48): 32353–32359.

Zeviani M and Di Donato S (2004). **Mitochondrial disorders**. *Brain* **127**, (10): 2153–2172.

SITI WEB CONSULTATI

<https://dgrc.cgb.indiana.edu/cells/store/catalog.html>

<http://flybase.org/>

<http://flymove.uni-muenster.de/>

<http://www.docstoc.com/docs/89461663/ANATOMY-AND-DEVELOPMENT-OF-DROSOPHILA-LARVA>

[http:// www.invitrogen.com/cellculturebasics](http://www.invitrogen.com/cellculturebasics)

http://www.lngs.infn.it/calendario/doc_2009/

http://www.rnaiweb.com/RNAi/What_is_RNAi/

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento a tutti coloro che hanno collaborato a questa ricerca e a questo lavoro di tesi:

Dott.ssa Caterina Da Rè (Università di Padova)

Prof. Mauro Agostino Zordan (Università di Padova)

Prof.ssa Vera Bianchi (Università di Padova)

Dott.ssa Elisa Franzolin (Università di Padova)

Dott. Alberto Biscontin (Università di Padova)

Prof. Carlo Tacchetti (Università di Genova)

Dott.ssa Antonia Piazzesi (Università di Padova)

Dott.ssa Paola Cisotto (Università di Padova)

Laboratorio del Prof. Rodolfo Costa (Università di Padova)

Laboratorio della Prof.ssa Lucia Celotti (Università di Padova)