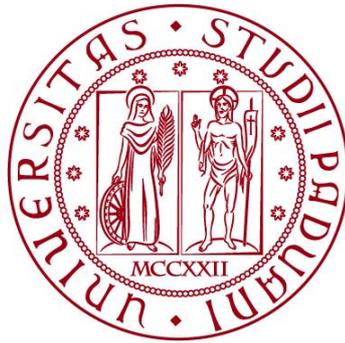


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in BIOTECNOLOGIE



ELABORATO DI LAUREA

**Approcci molecolari per lo studio della relazione
tra CRYPTOCHROME e CALMODULINA in lievito
e in *Drosophila melanogaster***

Tutor: Prof.ssa Gabriella Margherita Mazzotta
Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott. Davide Colaianni
Dipartimento di Biologia

Laureanda: Elisa Vanoni

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. ABSTRACT	1
2. STATO DELL'ARTE	2
2.1. L'orologio circadiano	2
2.2. L'orologio circadiano in <i>Drosophila melanogaster</i>	2
2.2.1. Anatomia.....	2
2.2.2. Meccanismo molecolare e proteine coinvolte	3
2.3. CRYPTOCHROME (CRY)	3
2.3.1. L'interazione tra CRYPTOCHROME e CALMODULINA.....	4
2.4. Obiettivo dello studio.....	6
3. APPROCCIO SPERIMENTALE	7
3.1. <i>Error-Prone</i> PCR (EP-PCR).....	7
3.2. Elettroforesi su gel di agarosio.....	8
3.3. Digestione enzimatica del plasmide	8
3.4. Estrazione da banda e purifica del plasmide linearizzato.....	8
3.5. Preparazione dei terreni di coltura per <i>S.cerevisiae</i>	9
3.6. Trasformazione del lievito e <i>screening</i> tramite Y2H <i>assay</i>	10
3.7. Estrazione di DNA da lievito e PCR di verifica	12
3.8. Linee di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzate e loro mantenimento	13
4. RISULTATI e DISCUSSIONE.....	14
4.1. Mutagenizzazione casuale della sequenza di <i>dCRY</i>	14
4.2. Linearizzazione del plasmide pEG202	15
4.3. <i>Screening</i> dell'interazione tra <i>dCRY</i> e CaM tramite sistema Y2H.....	16
4.4. Recupero e analisi delle sequenze <i>dCRY</i> mutagenizzate	18
4.5. Ottenimento di una linea di <i>D. melanogaster</i> per lo studio del metabolismo del Ca ²⁺ a livello retinico.....	19
5. BIBLIOGRAFIA	21

1. ABSTRACT

La flavoproteina fotosensibile CRYPTOCHROME (CRY), che nel moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* è espressa nella retina e nei neuroni laterali e dorsali, è di primaria importanza nella regolazione dei ritmi circadiani. In ricerche precedenti è stato osservato che uno dei meccanismi regolatori di CRY si basa sulla sua interazione con la CALMODULINA (CaM); tale legame influenza la stabilità di CRY ed è mediato da stimoli luminosi e da oscillazioni nelle concentrazioni di Ca^{2+} . Allo scopo di individuare i domini di interazione tra CRY e CaM responsabili della regolazione mediata dal Ca^{2+} , in questo studio abbiamo ottimizzato un protocollo di mutagenesi casuale tramite *error-prone* PCR (EP-PCR) a partire dalla sequenza codificante CRY, con l'obiettivo di modificare il suo dominio di legame con CaM. Le sequenze così mutagenizzate sono state poi trasformate in lievito e, tramite *yeast 2-hybrid* (Y2H) *assay*, si è cercato di identificare eventuali mutanti di CRY che non fossero più in grado di interagire con la Calmodulina, individuando così la localizzazione del loro dominio di interazione. Parallelamente, è stata generata una linea di *Drosophila* per indagare le variazioni dei livelli di Ca^{2+} nella retina. A partire da tali basi sarà dunque possibile approfondire la relazione tra CRY, CaM e Ca^{2+} in *Drosophila*.

2. STATO DELL'ARTE

2.1. L'orologio circadiano

I ritmi circadiani (il termine 'circadiano' deriva dalle parole latine "circa" e "diem" e significa "intorno al giorno") sono cicli biologici di circa 24 ore che negli organismi regolano molteplici funzioni, tra cui sonno, alimentazione, produzione di ormoni e numerose attività metaboliche. Questi ritmi sono generati da orologi interni, noti come orologi (o "clock") circadiani, che vengono costantemente sincronizzati con l'ambiente esterno attraverso *input*, definiti *zeitgeber*, come la luce e la temperatura. La maggioranza degli eucarioti superiori, così come anche alcuni procarioti, possiedono uno o più orologi circadiani: un orologio centrale ed eventuali altri orologi periferici. Questi orologi contribuiscono a regolare differenti aspetti della vita di questi organismi, ed in particolare negli animali è stato osservato che un'alterazione dei ritmi circadiani è associata alla comparsa di disordini neuronali o anche, negli esseri umani, disturbi psichiatrici (Logan *et al.*, 2019). In merito alla localizzazione anatomica di questi orologi, essa varia da organismo ad organismo. Nei mammiferi l'orologio centrale è situato nella regione dell'ipotalamo nota come nucleo soprachiasmatico (SCN), mentre a livello di fegato, ipofisi, cuore, reni e molti altri tessuti sono presenti degli orologi periferici (Hirota and Fukada, 2004). Negli insetti, e quindi anche nel moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*, l'orologio circadiano centrale è invece localizzato a livello cerebrale in specifici gruppi di neuroni, mentre gli orologi periferici sono presenti in diversi distretti, tra cui i tubuli malpighiani (organi secretori tipici degli insetti, simili per funzione ai reni per i vertebrati), il *cardium* e le antenne (Benito *et al.*, 2008).

2.2. L'orologio circadiano in *Drosophila melanogaster*

La *Drosophila melanogaster* è ampiamente usata nella ricerca come organismo modello per numerosi motivi: ha un ciclo vitale breve, raggiungendo lo stadio adulto in circa 10-11 giorni dalla deposizione delle uova; ha un genoma relativamente semplice, strutturato in 4 coppie di cromosomi, ampiamente studiato e facilmente manipolabile; il suo mantenimento in laboratorio è semplice ed economico. Inoltre, molti dei suoi meccanismi fisiologici sono simili a quelli umani. In linea con questo, negli anni la *Drosophila* si è rivelata un modello particolarmente adatto anche per studiare la ritmicità circadiana, in quanto i principali geni dell'orologio del moscerino sono ortologhi a quelli dei mammiferi.

2.2.1. Anatomia

L'orologio circadiano centrale in *D. melanogaster* è localizzato in specifici gruppi di neuroni (detti *pacemaker*): nei piccoli e grandi neuroni laterali ventrali (s-LN_{vs} e l-LN_{vs}), nei neuroni laterali dorsali (LN_{ds}) e nei neuroni dorsali 1s, 2s e 3s (DN1s,

DN2s, DN3s). L'espressione dei geni dell'orologio in questi neuroni *pacemaker* avviene seguendo un'oscillazione ciclica di 24 ore, durante la quale le relative proteine interagiscono in meccanismi complessi ed altamente conservati (Benito *et al.*, 2008).

2.2.2. Meccanismo molecolare e proteine coinvolte

I componenti principali dell'orologio circadiano del moscerino sono i fattori trascrizionali CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC), i quali interagiscono in un complesso (CLK/CYC) che promuove l'espressione di altri geni fondamentali dell'orologio quali *period* (*per*) e *timeless* (*tim*). Le proteine sintetizzate da questi geni, PER e TIM, si accumulano nel citoplasma e formano dei complessi (PER/TIM) che traslocano poi nel nucleo, dove agiscono da repressori trascrizionali dei loro stessi geni tramite il legame a CLK/CYC, in un sistema a *feedback* negativo (Figura 1). Di giorno, per via dello stimolo luminoso, viene attivato un ulteriore elemento dell'orologio, la flavoproteina CRYPTOCHROME (CRY), che interviene indirizzando TIM alla degradazione; CLK e CYC tornano quindi attivi e promuovono la trascrizione dei geni dell'orologio, le cui proteine ricominciano ad accumularsi nel citoplasma, completando un ciclo di 24 ore (Figura 1) (Mazzotta *et al.*, 2013).

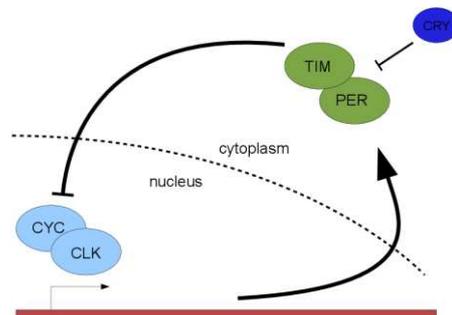


Figura 1. Rappresentazione schematica (semplificata) del meccanismo a *feedback loop* negativo che caratterizza l'orologio circadiano della *Drosophila melanogaster* (adattata da Kidd, 2015).

2.3. CRYPTOCHROME (CRY)

In *Drosophila* CRY (*dCRY*) è presente come unica isoforma, la quale agisce da fotorecettore sensibile alla luce blu e, in seguito allo stimolo luminoso, lega TIM e lo indirizza alla degradazione tramite proteasoma portando al *reset* dell'orologio circadiano, che viene così sincronizzato con i cicli luce-buio (Mazzotta *et al.*, 2013). Anche *dCRY* è a sua volta ciclicamente espresso, e raggiunge il suo picco di espressione in piena notte (Mazzotta *et al.*, 2013). È espresso in particolare nei neuroni laterali ventrali (s-LN_{vs} e l-LN_{vs}) e dorsali (LN_{ds}) e nei neuroni dorsali DN1s; inoltre, *dCRY* è espresso anche a livello degli organi sensoriali, soprattutto nella retina (Benito *et al.*, 2008). Qui *dCRY* svolge un ruolo anche nella modulazione circadiana del comportamento visivo, in quanto interagisce con le proteine del complesso di trasduzione visiva Signalplex, regolando la foto-

sincronizzazione del processo da esse operato di trasduzione dei segnali luminosi in segnali neuronali, che il cervello poi rielabora permettendo la visione (Mazzotta *et al.*, 2018). Coerentemente con il suo ruolo nel processo di fototrasduzione, è emerso che la capacità visiva dei moscerini in cui *dCRY* è mutato risulta alterata (Mazzotta *et al.*, 2013). Il legame tra *dCRY* e Signalplex è mediato dalla proteina *scaffold* INAD, in un meccanismo che sfrutta i cambiamenti conformazionali indotti dalla luce su *dCRY* per assemblare il complesso di segnalazione visiva.

In merito alla struttura di *dCRY* (Figura 2A), è stato dimostrato che la flavoproteina è altamente conservata e simile alle fotoliasi, enzimi riparatori capaci di sfruttare la luce blu per trasferire temporaneamente elettroni alla doppia elica di DNA e così ripararne i danni indotti dai raggi UV (Chaves *et al.*, 2011). Da un punto di vista strutturale *dCRY* diverge dalle fotoliasi solo a livello della coda C-terminale (CTT), che è essenziale per la sua funzione di fotorecettore; il CTT ospita infatti numerosi motivi lineari di interazione che formano siti di fosforilazione, sequenze segnale e domini di legame (Mazzotta *et al.*, 2013). Il CTT influenza quindi la relazione di *dCRY* con una serie di altre proteine, tra cui TIM e PER ma anche altre come la CALMODULINA (CaM), regolando così i processi di sincronizzazione dell'orologio circadiano e, nel caso di CaM, modulando anche la visione tramite l'associazione al complesso Signalplex.

2.3.1. L'interazione tra CRYPTOCHROME e CALMODULINA

La CALMODULINA (CaM) è una proteina ubiquitaria ed estremamente conservata, che possiede la funzione di sensore in grado di captare le variazioni di calcio (Ca^{2+}) intracellulare e di mediarne il *signalling*. Strutturalmente è composta da due domini connessi da un *linker* flessibile, ognuno dei quali possiede due motivi *EF-hands* in grado di legare il Ca^{2+} (Figura 2B). I fotorecettori della retina di *D. melanogaster* contengono alti livelli di CaM. Al loro interno, CaM interagisce con numerosi componenti del Signalplex ed anche con INAD, di cui promuove il legame a *dCRY* agendo da molecola regolatoria, capace di rinforzarne le risposte foto-indotte (Mazzotta *et al.*, 2018). Infatti, molti aspetti della risposta visiva sia nei vertebrati che negli invertebrati sono regolati da un meccanismo di segnalazione dipendente da Ca^{2+} /CaM: l'aumento di Ca^{2+} induce infatti un cambiamento conformazionale nei domini di CaM, che le permette di legare le proteine bersaglio (tra cui *dCRY*) e modularne la risposta (Liang *et al.*, 2016). In uno studio precedente è stata approfondita la relazione che intercorre tra *dCRY*, CaM ed INAD (Mazzotta *et al.*, 2018). Sono stati infatti caratterizzati dei *CaM-binding motifs* localizzati al C-terminale di *dCRY* e su un sito a monte del dominio PDZ2 di INAD (Figura 3), arrivando in seguito a dimostrare che le tre proteine si associano in un complesso ternario *in vivo*, nei fotorecettori del

iniziale e l'afflusso di Ca^{2+} all'interno della cellula tramite canali TRP, rafforzando in ultimo la trasmissione del segnale (Figura 4) (Mazzotta *et al.*, 2018).

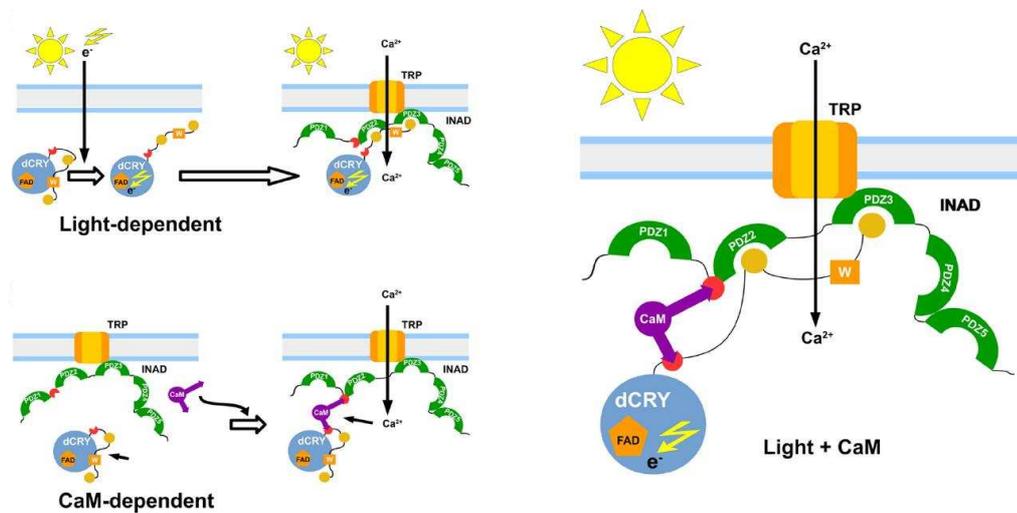


Figura 4. Modello proposto per la partecipazione di dCRY, INAD e CaM al processo di fototrasduzione nella retina, in cui il legame tra dCRY ed INAD è favorito sia tramite un meccanismo luce-dipendente che tramite un meccanismo CaM-dipendente (Mazzotta *et al.*, 2018).

2.4. Obiettivo dello studio

L'obiettivo di questo studio è stato quello di testare e di ottimizzare diversi approcci molecolari per approfondire la conoscenza del legame tra le proteine dCRY e CaM, col fine ultimo di individuare la localizzazione del loro dominio di interazione dipendente dal Ca^{2+} . A tale scopo, in primo luogo è stata impiegata una tecnica di mutagenesi casuale, operata sulla sequenza codificante dCRY. Si è quindi cercato sfruttare il metodo del *yeast two-hybrid* (Y2H) *assay* per identificare i casi in cui il legame tra le due proteine si fosse rivelato alterato a seguito di tale mutagenesi. In seguito, tramite estrazione del DNA plasmidico, sarà possibile recuperare la sequenza dCRY mutagenizzata e per questo responsabile della mancata interazione con CaM, e così caratterizzarne il sito di legame.

3. APPROCCIO SPERIMENTALE

3.1. *Error-Prone* PCR (EP-PCR)

L'*Error-Prone* PCR (EP-PCR) è una variante della classica reazione di PCR. Essa introduce mutazioni puntiformi casuali nella sequenza nucleotidica in presenza di condizioni sperimentali restrittive, che riducano la fedeltà della *Taq* polimerasi durante la sintesi del DNA (Cirino *et al.*, 2003). Per eseguire una EP-PCR il protocollo standard di PCR viene solitamente modificato tramite una o più delle seguenti variazioni: aumento della concentrazione di MgCl₂, aggiunta di MnCl₂, sbilanciamento delle proporzioni tra i dNTPs, minore quantità di DNA di partenza, maggiore durata della fase di estensione della reazione o aumento del numero di cicli di PCR (Cirino *et al.*, 2003). Lo scopo di questo approccio è ottenere, attraverso la generazione di mutazioni puntiformi, proteine con alterazioni fenotipiche tali da modificarne la stabilità strutturale, la solubilità o, come nel caso di questa ricerca, l'affinità per un certo ligando. Caratterizzando poi le mutazioni introdotte e i domini all'interno dei quali esse ricadono, sarà possibile ricavare nuove informazioni sulla proteina in esame, sia di carattere strutturale che funzionale. Nello specifico, in questo studio sono state condotte 7 reazioni di EP-PCR, ognuna con differenti condizioni di stringenza per la processività della *Taq* polimerasi, e quindi diverse concentrazioni di molti dei reagenti di seguito elencati. I reagenti utilizzati sono stati: acqua *RNase-free*; *GoTaq*[®] *Reaction Buffer* (Promega, Madison, USA); dNTPs mix (Promega, Madison USA); MgCl₂ (Promega, Madison, USA); MnCl₂ (Promega, Madison, USA); *GoTaq*[®] *G2* polimerasi (Promega, Madison, USA); primer (Eurofins Genomics Italy srl, Milano, Italia) *forward* (5'-cggcgactggctggaattcATGGCCACGCGAGGGGCGAATG-3') e *reverse* (5'-ctgcaggtcgactcgagTCAAACCACCGTCGGCCAGC-3') per l'amplificazione del gene *dCRY*, dotati di code (indicate in minuscolo) per la sua successiva trasformazione in lievito; DNA di partenza, rappresentato da un plasmide pAct contenente la sequenza *dCRY*. Il programma della reazione di EP-PCR, eseguita in un termociclatore Applied Biosystems™ Veriti™, ha previsto: un primo step di denaturazione a 95 °C per 2 minuti, un secondo step ripetuto per 40 cicli composto da una fase di denaturazione a 95°C per 20 secondi, una fase di appaiamento dei primers (*annealing*) a 50°C per 20 secondi ed una fase di estensione a 72°C per 2 minuti e 30 secondi e, infine, un terzo step a 72°C per 5 minuti (estensione finale). Una volta che il programma è terminato, i campioni sono stati purificati su colonnina sfruttando il *QIAquick*[®] PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germania), seguendo il protocollo fornito dal produttore. La loro concentrazione finale è stata quantificata allo spettrofotometro NanoDrop™

2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA), quindi sono stati posti a -20°C fino al loro utilizzo nei successivi esperimenti.

3.2. Elettroforesi su gel di agarosio

I campioni di DNA sono stati fatti correre su un gel elettroforetico a base di agarosio. L'agarosio è stato utilizzato ad una concentrazione all'1% per lo *screening* degli amplificati delle EP-PCR e per quello delle PCR di verifica eseguite sui campioni di DNA estratti da lievito, e ad una concentrazione allo 0.7% nel caso dell'elettroforesi del plasmide linearizzato tramite taglio enzimatico poi recuperato tramite estrazione da banda. La visualizzazione delle bande è stata resa possibile dall'aggiunta dell'intercalante *Midori Green Advance* (NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Germania). Il *buffer* di corsa usato è il Tris-acetato EDTA (TAE). Per preparare un gel di 50 mL con agarosio all'1% si sciolgono 0.5 g di agarosio in 50 mL di TAE, quindi, una volta che la soluzione raggiunge una temperatura inferiore ai 60°C, si aggiungono 2.5 µL di Midori Green. Una volta lasciato solidificare il gel in un'apposita vaschetta, i campioni sono stati caricati nei singoli pozzetti. I campioni caricati contenevano, oltre al DNA (5 o 7.5 µL per le EP-PCR e le PCR di verifica, 5 µg per l'estrazione da banda del plasmide), un volume di *acqua RNase-free* tale da portarli a 10 o 100 µL totali e 2 o 20 µL di *Purple Loading Dye 6X* (New England BioLabs®, Ipswich, USA). Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato lo *SHARPMASS™ 1Kb* (Euroclone S.p.A., Milano, Italia), di cui sono stati caricati su gel 6 µL. Il gel è stato infine fatto correre ad un voltaggio di 50-100 V e, una volta terminata la corsa, questo è stato posto su di un transilluminatore per la visualizzazione dei risultati.

3.3. Digestione enzimatica del plasmide

Le digestioni enzimatiche del plasmide pEG202 sono state eseguite in un volume totale di 100 µL utilizzando gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XhoI*. La mix per la reazione è stata allestita come segue: 49 µL di *acqua RNase-free*, 10 µL di *rCutSmart buffer 10X* (New England BioLabs®, Ipswich, USA), 5 µg (31 µL ad una concentrazione di 160 µg/mL) di plasmide pEG202, 5 µL di *EcoRI-HF™* (20,000 U/mL) (New England BioLabs®, Ipswich, USA) e 5 µL di *XhoI* (20,000 U/mL) (New England BioLabs®, Ipswich, USA). La soluzione è stata incubata a 37°C per 1 ora per il taglio enzimatico, per poi essere incubata a 65°C per 20 minuti così da inattivare gli enzimi di restrizione.

3.4. Estrazione da banda e purifica del plasmide linearizzato

Per recuperare il plasmide pEG202 linearizzato in seguito al taglio enzimatico, questo è stato fatto correre su un gel di agarosio allo 0.7% ed è stato successivamente recuperato tramite estrazione da banda usando il *Monarch®*

DNA Gel Extraction Kit (New England BioLabs®, Ipswich, USA), seguendo il protocollo fornito dal produttore. In breve: il gel di agarosio viene inciso così da rimuoverne il frammento di DNA di interesse, il quale viene incubato a 50°C previa aggiunta del *Gel Dissolving Buffer* fino a scioglierlo completamente; la soluzione viene quindi sottoposta ad una serie di lavaggi su colonnina con *DNA Wash Buffer* e, infine, tramite l'aggiunta dell'*Elution Buffer* (in questo caso sostituito da acqua *RNAse-free*) e un'ultima centrifugazione, si recupera l'eluato contenente il DNA. Il plasmide linearizzato così ottenuto è stato conservato a -20°C fino al suo utilizzo nelle successive reazioni di trasformazione.

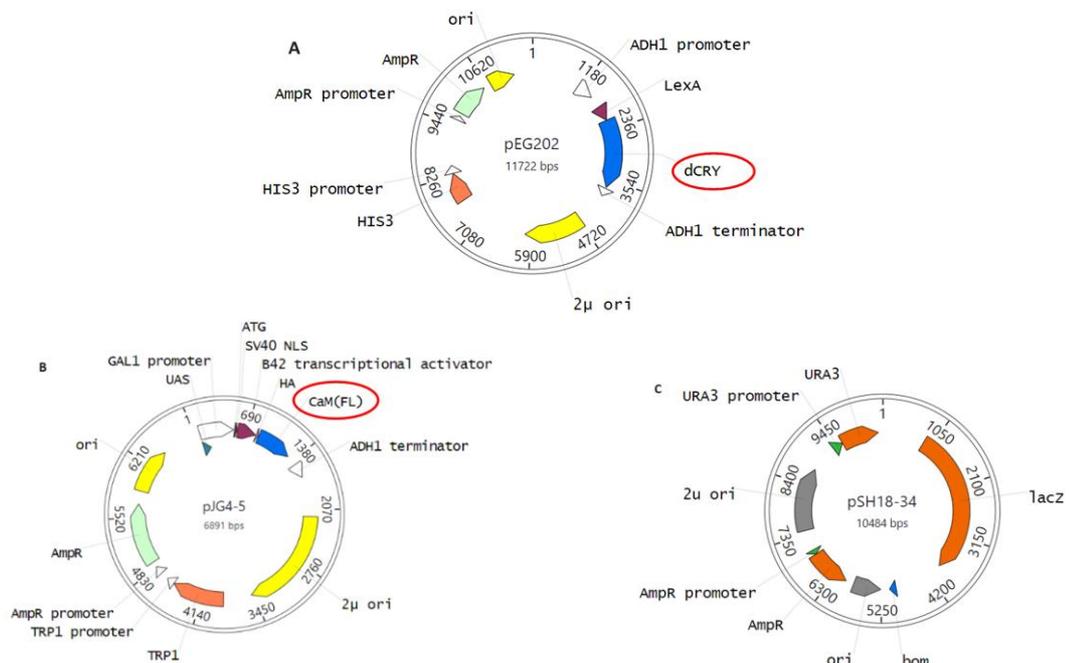
3.5. Preparazione dei terreni di coltura per *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae è un lievito unicellulare, ampiamente studiato ed utilizzato come organismo modello in biologia molecolare. A seconda delle esigenze sperimentali, *S. cerevisiae* può essere fatto crescere su terreno ricco (solitamente YPD), per promuovere una crescita rapida e robusta, oppure su terreni selettivi come il terreno minimo (W0), spesso arricchito con amminoacidi e metaboliti specifici, utilizzato per far avvenire la crescita solo dei lieviti mutanti in grado di sintetizzare autonomamente le altre molecole necessarie, permettendo quindi la selezione dei lieviti trasformati con plasmidi opportuni.

La preparazione delle diverse tipologie di terreno prevede protocolli differenti. Per ottenere 400 mL di terreno W0 liquido si sciolgono in questo volume di acqua 2.8 g (0.67%) di *Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids* (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germania) e 8.0 g (2%) di glucosio (Carlo Erba Reagents srl, Italia), per poi autoclavare il tutto. Per preparare un terreno W0 solido invece, oltre ai reagenti sopra indicati, è necessario aggiungere anche 8.0 g (2%) di agar (Invitrogen, Hampton USA); una volta autoclavato, il terreno può o essere fatto solidificare in bottiglia per futuri utilizzi oppure essere colato direttamente su piastra, in volume di 20 mL per ogni piastra Petri. Per preparare terreni addizionati, invece, si aggiungono circa 0.1 g degli amminoacidi e/o precursori nucleosidici d'interesse. In questo studio sono stati utilizzati: L-leucina (L), istidina (H), L-triptofano (W) e uracile (U) (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germania); gli amminoacidi e/o metaboliti sono stati combinati in modi differenti per ottenere i terreni, liquidi e/o solidi, W0+L e W0+L+H. Per quanto riguarda invece la preparazione del terreno per lo *screening* tramite *Y2H assay* (W0+L+X-Gal), ad una base di terreno W0+L+agar senza glucosio sono stati aggiunti galattosio (Carlo Erba Reagents srl, Italia) e X-Gal (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in K_3PO_4 0.7M dopo sterilizzazione in autoclave, al raggiungimento di una temperatura tale da non degradare questi composti, appena prima che questo venisse colato nelle apposite piastre.

3.6. Trasformazione del lievito e *screening* tramite *yeast two-hybrid* (Y2H) *assay*

Il Y2H *assay* è una tecnica di indagine molecolare che permette di svolgere, in lievito, lo *screening* di una libreria di *prey* cDNA e quindi di individuare quali proteine interagiscono selettivamente con la proteina di interesse. Per fare ciò, il sistema Y2H sfrutta la natura modulare degli attivatori trascrizionali eucariotici, quindi l'interazione che deve avvenire tra un DNA *binding domain* (DBD) ed un *activation domain* (AD) per attivare la trascrizione, legando al DBD la proteina di interesse ("*bait*") ed al AD la proteina con la quale potenzialmente interagisce ("*prey*"). Nel nostro caso, per lo *screening* tramite sistema Y2H, le colonie di *Saccharomyces cerevisiae* sono state trasformate con tre plasmidi: pJG4-5 CaM(FL) (di seguito indicato come pJG-CaM(FL)), che contiene la sequenza codificante per la forma *full-length* di CaM, pSH18-34, che porta la sequenza per il gene *reporter LacZ*, essenziale a permettere lo *screening* utilizzando X-Gal, e pEG202-dCRY, recante la sequenza, mutagenizzata o *wild type* (controllo positivo), codificante per dCRY (Figura 5). Quindi, per poter distinguere i lieviti che li hanno effettivamente internalizzati, si sfrutta la selezione per auxotrofia: a partire da un ceppo di *S. cerevisiae* *his-*, *trp-*, *ura-* e *leu-*, la loro crescita potrà avvenire solo nel caso in cui il terreno di coltura sia addizionato coi 3 amminoacidi ed il precursore nucleosidico in questione (W0+L+H+W+U), oppure quando i lieviti saranno stati correttamente trasformati coi plasmidi recanti le sequenze codificanti per gli enzimi biosintetici di cui mancano (pJG-CaM(FL), pSH18-34, pEG202) (Figura 5).



Plasmide	Elementi di interesse	Marker di selezione
pEG 202 - dCRY	LexA (DBD) e dCRY	HIS3
pJG - CaM(FL)	B42 (AD) e CaM	TRP1
pSH - 18-34	LacZ (<i>reporter gene</i>)	URA3

Figura 5. Mappe dei plasmidi utilizzati per la trasformazione dei lieviti: (A) pEG202 contenente la sequenza, *wild type* (controllo positivo) o mutagenizzata, codificante per dCRY (il *bait* DNA, evidenziato nell'immagine), (B) pJG4-5 contenente la sequenza codificante per la forma *full-length* della CaM (CaM(FL), il *prey* DNA evidenziato nell'immagine), (C) pSH18-34 contenente la sequenza codificante il gene *reporter LacZ*. Gli elementi principali di ognuno di questi plasmidi sono riportati nella tabella riassuntiva in basso.

Il ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* utilizzato è il EGY48, il quale era stato già precedentemente trasformato (seguendo una versione semplificata del protocollo descritto di seguito per la successiva trasformazione con il plasmide pEG202-dCRY) con i plasmidi pJG-CaM(FL) e pSH18-34 e piastrato su un terreno selettivo W0+L+H. Il protocollo inizia quindi con la preparazione del pre-inoculo di tale coltura, tramite prelievo ("*picking*") di una colonia e suo stemperamento in 3 mL di terreno liquido W0+L+H, che viene quindi posto in agitazione a 29°C per 24-48 ore. Si prosegue quindi preparando l'inoculo effettivo, diluendo (1:200) 250 µL del pre-inoculo in 50 mL di terreno W0+L+H, lasciando poi in agitazione a 29°C *over-night*. Quando la coltura liquida raggiunge una densità cellulare compresa tra 5×10^6 e 10^7 cellule/mL, quantificata tramite la lettura dell'OD₆₀₀ (considerando che un OD₆₀₀=1 è indicativo di una coltura con una concentrazione di circa 3×10^7 cellule/mL) utilizzando il lettore di piastre BioTek Epoch (Agilent, Santa Clara, USA), si procede con la trasformazione. Il protocollo (basato su Gietz and Schiestl, 2007) prosegue con una serie di centrifugazioni consecutive allo scopo di ottenere un *pellet* concentrato di cellule di lievito e di eliminare i residui di terreno. Col fine di permeabilizzare la parete delle cellule di lievito, al *pellet* viene aggiunto un volume di litio acetato (LiAc) 0.1M tale da portare la soluzione ad una densità di $2 \cdot 10^9$ cellule/mL, quindi la si incuba a 30°C per 20 minuti. A questo punto si prepara un numero di aliquote pari a quello dei campioni di DNA da trasformare nei lieviti, ognuna contenente 50 µL della soluzione di cellule trattata con LiAc e 5 µL (10 mg/mL) di ssDNA *carrier* (*salmon sperm*) (Clontech, Mountain View, USA) precedentemente denaturato a 95°C per 10 minuti. Ad ogni soluzione vengono aggiunti 100 ng del plasmide pEG202 precedentemente linearizzato e 1 µg di prodotto di una specifica EP-PCR, rappresentato dalla sequenza di *dCRY* mutagenizzata e dotata di code per la trasformazione. Dopo un'iniziale incubazione di 20 minuti a 30°C si aggiungono per ogni aliquota 300 µL di una soluzione di LiAc 0.1M/PEG3350 40% e si incuba nuovamente a 30°C per 20 minuti. In seguito, si aggiungono 40 µL di DMSO (Voden, Monza, Italia) e si sottopongono i campioni a *shock* termico, a 42°C per

10 minuti. Il DMSO (dimetilsolfossido) è un solvente organico altamente polare, che per le sue capacità di idrolisi ed ossidazione di composti sia organici che inorganici viene frequentemente sfruttato nei *buffer* per la trasformazione di cellule competenti, oltre che come agente crioprotettore. Proseguendo, si effettua una centrifugazione e si scarta il surnatante per eliminare i reagenti non più necessari, mentre i *pellet* di cellule trasformate si risospendono e si trasferiscono in tubi a "U" da 13 mL contenenti 3 mL di terreno W0+L+H, lasciati poi in agitazione a 30°C per circa 3 ore. Infine, le colture vengono piastrate su terreno W0+L e lasciate crescere in incubatore a 29°C per 2-3 giorni.

Trascorso il periodo di crescita iniziale su terreno selettivo, si è passati allo *screening* su terreno contenente X-Gal: tramite l'utilizzo di spatoline, le colonie cresciute da ogni trasformazione vengono piastrate sul nuovo terreno, si lasciano le piastre a 29°C per altri 2-3 giorni ed in seguito si possono distinguere eventuali colonie che hanno assunto colorazione bluastra (all'interno delle quali avviene l'interazione tra dCRY e CaM) ed altre che sono rimaste di colore bianco (al cui interno l'interazione tra le due proteine non avviene non permettendo l'espressione di *lacZ*).

3.7. Estrazione di DNA da lievito e PCR di verifica

Il protocollo per l'estrazione del DNA da lievito, step necessario per poi confermare la presenza del plasmide recante la sequenza *dCRY* mutagenizzata di interesse, prevede inizialmente un inoculo della colonia selezionata dalla piastra con terreno W0+L+X-Gal in 3 mL di terreno liquido W0+L, che viene lasciato in agitazione a 29°C *over-night*. Quindi, previa centrifugazione per eliminare il terreno di coltura, le cellule vengono addizionate con 100 µL di una soluzione di LiAc 0.2M-SDS 1% per indurle la lisi, ed incubate a 75°C per 10 minuti. Si eseguono poi consequenzialmente due lavaggi in etanolo (EtOH) per favorire la precipitazione del DNA, il primo con 300 µL di EtOH 100% ed il secondo con 150 µL di EtOH 70%. Dopodiché, il *pellet* viene posto ad asciugare a 37°C per 20 minuti, quindi si aggiungono 100 µL di acqua *RNase-free*, si incuba la soluzione a 37°C per altri 5 minuti, la si centrifuga e si recuperano 85 µL di surnatante contenenti il DNA del lievito, sia genomico che plasmidico. Per verificare poi se l'estrazione di DNA è avvenuta correttamente e si è riusciti a recuperare anche il plasmide con la sequenza di *dCRY* di interesse, si effettua una PCR di verifica. Questa reazione di PCR è stata allestita mantenendo la stessa mix di reagenti descritta nel punto 3.1, ad eccezione del DNA di partenza, che in questo caso è stato quello estratto come sopra riportato, e dei primers utilizzati, che in questo caso sono stati pEG-*check forward* (5'-CGTAGATCTTCGTCAGCAG-3') e *reverse* (5'-AGCAACCTGACCTACAGG-3'), i quali dovrebbero amplificare la sequenza *dCRY* appaiandosi sul plasmide pEG202.

3.8. Linee di *Drosophila melanogaster* utilizzate e loro mantenimento

Il mantenimento degli esemplari di *Drosophila melanogaster* utilizzati durante lo studio prevede che siano sottoposti ad un ciclo di illuminazione LD, ovvero a 12 ore di luce (09:00-21:00) e a 12 ore di buio (21:00-9:00), alla temperatura costante di 23°C. I moscerini vengono fatti crescere in tubi monouso in polistirene chiusi con un tappo in cotone che contengono sul fondo una pappa composta, per ogni litro di acqua, da: 72 g di farina, 79.3 g di zucchero, 50 g di lievito secco, 8.5 g di agar, 3 mL di acido propionico e 13.5 mL di nipagina. Le linee di *D. melanogaster* utilizzate in questo studio sono state tre: *w;GMR-GAL4* (in cui il fattore di trascrizione di lievito GAL4 è espresso in maniera tessuto-specifica a livello dell'occhio del moscerino), *w;UAS-Cameleon/TM3* (in cui a valle della sequenza UAS, riconosciuta da GAL4, è presente la sequenza codificante per Cameleon, un *sensor* sensibile alle oscillazioni cellulari di Ca²⁺) ed infine la linea *GMR-GAL4>UAS-Cameleon*, ottenuta dall'incrocio delle precedenti, la quale esprime il *sensor* Cameleon a livello delle cellule retiniche.

4. RISULTATI & DISCUSSIONE

4.1. Mutagenizzazione casuale della sequenza di *dCRY*

Allo scopo di generare una libreria di sequenze di *dCRY* mutagenizzate si è sfruttata la tecnica della *Error-Prone* PCR (EP-PCR) (Cirino *et al.*, 2003). Abbiamo eseguito complessivamente 7 reazioni di EP-PCR (6 EP-PCR effettive ed una PCR standard, la EP-PCR 4, utilizzata come controllo), tutte a partire da una stessa mix iniziale di reagenti (Tabella 1) ma variando, per ognuna, le concentrazioni assolute (per il MgCl₂ e il MnCl₂) o relative (per i dNTPs) di altri reagenti, ottenendo così differenti condizioni di stringenza per la processività della *Taq* polimerasi (Tabella 2).

Reagente	Concentrazione iniziale	Volume aggiunto
acqua <i>RNAse-free</i>		50.0 µL -V _{tot} altri reagenti
<i>GoTaq</i> [®] <i>Reaction Buffer</i>	5X	10.0 µL
primer <i>forward</i> per <i>dCRY</i> (con coda)	10 µM	1.5 µL
primer <i>reverse</i> per <i>dCRY</i> (con coda)	10 µM	1.5 µL
DNA di partenza (plasmide pAct-CRY)	10 ng/µL	1.0 µL
<i>GoTaq</i> [®] <i>G2</i> polimerasi	5 U/µL	1.0 µL

Tabella 1. Mix di reagenti iniziale, utilizzata per l'allestimento di tutte le reazioni di EP-PCR.

	MgCl ₂	MnCl ₂	dNTPs (G:C:T:A)
EP-PCR 1	5.0 mM	0.20 mM	1:1:1:1
EP-PCR 2	5.0 mM	0.00 mM	1:1:1:5
EP-PCR 3	0.0 mM	0.20 mM	1:1:1:5
EP-PCR 4 (PCR di controllo)	0.0 mM	0.00 mM	1:1:1:1
EP-PCR 5/7	7.5 mM	0.20 mM	1:1:1:1
EP-PCR 6	5.0 mM	0.50 mM	1:1:1:1
EP-PCR 8	5.0 mM	0.35 mM	1:1:1:1

Tabella 2. Variazioni reazione-specifiche nelle concentrazioni assolute o relative degli altri reagenti, con lo scopo di inficiare la processività della polimerasi e indurre mutagenesi casuale.

Terminate le reazioni di EP-PCR, il loro risultato è stato testato tramite corsa su gel elettroforetico per verificare l'avvenuta amplificazione di *dCRY*. Dal risultato dell'elettroforesi (Figura 6) è emerso che le EP-PCR che hanno prodotto degli amplificati sono state, oltre alla EP-PCR 4 (controllo), le EP-PCR 1, 2, 5/7, 6 e 8; l'unica a non produrre un amplificato è stata la EP-PCR 3, in cui evidentemente le condizioni di stringenza per la *Taq* polimerasi hanno compromesso del tutto la sua attività. Di conseguenza abbiamo deciso di procedere a trasformare in lievito i prodotti di queste 5 reazioni (escludendo il controllo positivo).

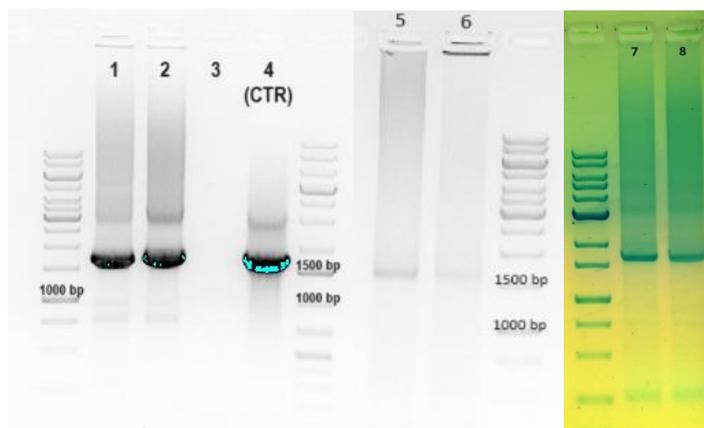


Figura 6. Risultato del *gel screening* dell'amplificazione di *dCRY* nelle reazioni di EP-PCR.

4.2. Linearizzazione del plasmide pEG202

Col fine di sfruttare il plasmide pEG202 come vettore nelle successive reazioni di trasformazione delle sequenze mutagenizzate di *dCRY*, abbiamo effettuato una digestione enzimatica del plasmide con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *XhoI*. Per verificare il taglio enzimatico ed eventualmente procedere al recupero del plasmide linearizzato, abbiamo eseguito una corsa elettroforetica (Figura 7), che ha rilevato la presenza di una banda netta di circa 10 kb, coerente con le dimensioni del plasmide, e di una banda del peso molecolare atteso per lo *stuffer* del plasmide di partenza, ma anche di uno *smear* tra le due bande principali. Dopo aver ripetuto sia il taglio enzimatico che la corsa elettroforetica ottenendo un risultato analogo, è stato deciso di utilizzare comunque questo prodotto come plasmide linearizzato per le successive reazioni di trasformazione.

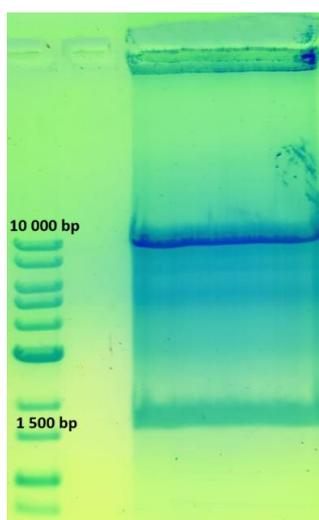


Figura 7. Risultato del *gel screening* della digestione enzimatica del plasmide pEG202.

4.3. *Screening* dell'interazione tra dCRY e CaM tramite sistema Y2H

Il *yeast two-hybrid* (Y2H) è una tecnica capace di rilevare le interazioni tra due proteine. Questa tecnica sfrutta la natura modulare degli attivatori trascrizionali eucariotici: affinché avvenga la trascrizione sono necessari un DNA *binding domain* (DBD), che leghi il promotore, ed un *activation domain* (AD), che leghi l'apparato di trascrizione basale ed attivi il processo. Per cui, nel sistema Y2H classico, la sequenza della proteina di interesse (detta *bait*) viene fusa al DBD, mentre la proteina potenzialmente interagente (detta *prey*) viene fusa all'AD; se *bait* e *prey* effettivamente interagiscono e ricostituiscono un fattore trascrizionale funzionale allora vi sarà espressione del gene *reporter* da esso regolato (Golemis et al., 2008). Nello specifico, il sistema utilizzato in questo studio è stato il sistema B42/LexA. LexA di *Escherichia coli*, amminoacidi 1-102, è il DBD che lega la sequenza promotoriale LexAop a monte del gene *LacZ*. B42 è un debole attivatore trascrizionale di 89 residui amminoacidi, derivato da *E. coli*. Se la proteina *bait* veicolata da LexA, in questo caso dCRY, e la proteina *prey* veicolata da B42, in questo caso CaM, interagiscono, la β -galattosidasi viene espressa: sarà così possibile discriminare tra colonie blu e bianche, ovvero tra esperimenti o non esperimenti il gene *reporter*. Affinché ciò avvenga e si possa effettuare uno *screening* per l'interazione tra dCRY e CaM, è stato necessario trasformare in un lievito, già precedentemente trasformato con i plasmidi pJG-CaM(FL) e pSH-18-34, l'inserto *dCRY* mutagenizzato tramite EP-PCR e dotato di code, ed il plasmide pEG202 precedentemente linearizzato. Le reazioni di trasformazione hanno mostrato, in generale, una resa discreta: sulle piastre W0+L, dopo 2-3 giorni di incubazione, sono infatti cresciute numerose colonie (Figura 8, in cui per motivi di spazio sono state riportate solamente alcune delle piastre). È importante sottolineare che dal confronto tra lieviti trasformati col solo vettore pEG202 linearizzato senza prodotto di EP-PCR (controllo negativo) (Figura 8A) e quelli trasformati con le sequenze *dCRY* mutagenizzate nelle reazioni EP-PCR 6, 7 ed 8 (Figura 8B-D) emerge che la resa della prima trasformazione è maggiore rispetto alle altre. Il fatto che ci siano state colonie nel controllo negativo può essere dovuto ad un taglio enzimatico del plasmide pEG202 che non è stato completamente efficace, tale per cui è presente una certa percentuale di plasmide richiuso, che potrebbe inficiare la veridicità del successivo *screening* su X-Gal.

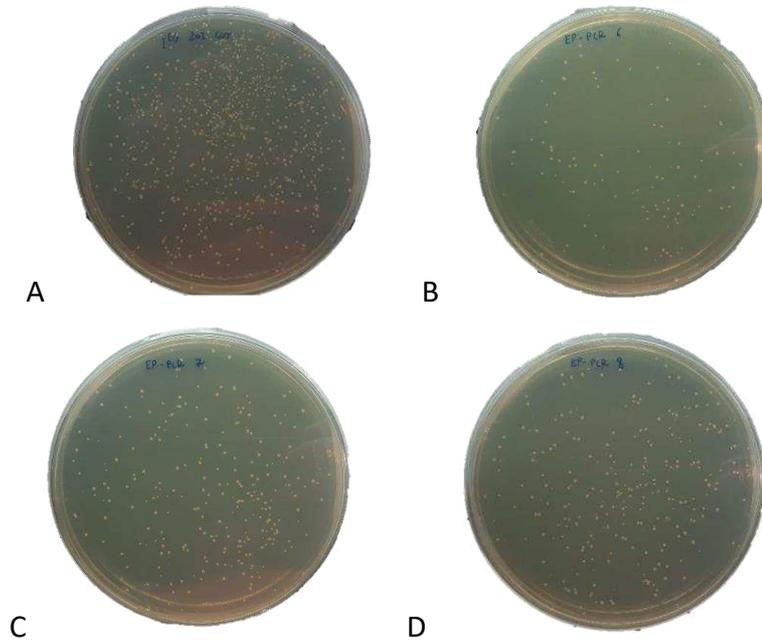


Figura 8. Crescita dei lieviti su terreno W0+L dopo trasformazione con (A) il solo vettore pEG202 linearizzato (controllo negativo) oppure con il vettore pEG202 linearizzato ed il prodotto dell'amplificazione di *dCRY* rispettivamente dalla (B) EP-PCR 6, (C) EP-PCR 7 e (D) EP-PCR 8.

L'esperimento è comunque proseguito con lo *screening* delle colonie ottenute dalle trasformazioni tramite loro strisciamento su piastre W0+L+X-Gal. Trascorso il periodo di crescita, osservando le piastre si sono potute distinguere colonie che hanno assunto una colorazione bluastra e colonie che sono rimaste bianche (Figura 9). Le colonie blu indicano che al loro interno viene espressa una forma di *dCRY* integra o comunque ancora in grado di legare CaM, in quanto l'interazione tra *dCRY* e CaM deve avvenire normalmente per permettere l'espressione del gene reporter *lacZ*. Le colonie che risultano bianche, invece, potrebbero invece contenere una sequenza di *dCRY* mutagenizzata tale per cui la proteina da essa codificata non è più in grado di interagire con CaM, oppure aver semplicemente internalizzato un plasmide pEG202 richiuso su sé stesso, e quindi senza inserto, durante la trasformazione. Per gli esperimenti successivi, ci siamo focalizzati sulle colonie trasformate col prodotto della EP-PCR 5, in quanto queste sono cresciute in numero minore (7), di cui 2 colonie blu e 5 colonie bianche, quindi in una proporzione tale da far pensare che le colonie risultate bianche lo siano perché hanno effettivamente internalizzato una sequenza *dCRY* mutagenizzata nel suo dominio di interazione con CaM.

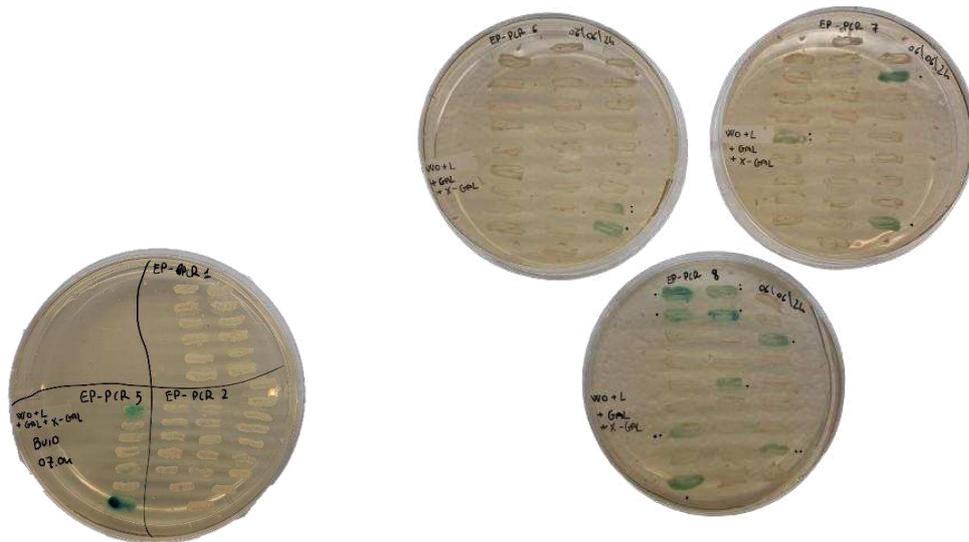


Figura 9. *Screening* dell'interazione tra dCRY e CaM, tramite Y2H *assay*, su terreno selettivo WO+L+X-Gal, delle colonie cresciute dopo il precedente esperimento di trasformazione.

4.4. Recupero e analisi delle sequenze *dCRY* mutagenizzate

Abbiamo proseguito lo studio analizzando ulteriormente le colonie bianche, per verificare se effettivamente l'EP-PCR avesse modificato dei domini di interazione di dCRY con CaM. Nel processo di estrazione del DNA, genomico e plasmidico, dalle cellule di lievito, e di successiva amplificazione della sequenza *dCRY*, abbiamo però riscontrato una serie di problematiche. Infatti, in seguito alla PCR effettuata per amplificare *dCRY* dal DNA estratto, il gel *screening* ha dato dei risultati inattesi: ognuna delle 7 colonie dell'EP-PCR 5 (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7), fosse essa bianca o blu, presentava un'unica banda di 250 bp (Figura 10A), coerente con l'assenza di inserto, e nessuna banda della dimensione attesa per la sequenza *dCRY*, fosse essa mutagenizzata o *wild type*. Tale risultato è particolarmente insolito in quanto le colonie Y1 ed Y7 sono blu e, in quanto tali, devono esprimere una proteina dCRY integra, altrimenti non potrebbero interagire con CaM e non avrebbero potuto assumere quella colorazione. Ragionando sui possibili motivi di questo risultato, questi potrebbero essere stati legati alla coppia di primers utilizzati, che magari non avevano amplificato correttamente la sequenza *dCRY*, oppure alla tecnica di estrazione del DNA, procedura durante la quale potrebbe non essere stato correttamente estratto il DNA plasmidico. Perciò, abbiamo proceduto a testare l'efficienza e la specificità dei primers pEG-*check*, effettuando uno *screening* di controllo su tutte le soluzioni di plasmidi utilizzati in diversi momenti di questo studio (pJG-CaM(C2), pJG-CaM(C1), pJG-CaM(N), pJG-CaM(FL), pSH-18-34, pEG-CRY, pAct-HACRY, pEG-202). Dal gel ottenuto (Figura 10B) si osserva che i primers, pur funzionando correttamente, non risultano sufficientemente specifici, avendo amplificato una sequenza anche nelle soluzioni contenenti i plasmidi pJG-CaM(FL) e pSH18-34,

entrambi presenti nelle colonie testate. Parallelamente, anche il tentativo di cambiare tecnica di estrazione del DNA da lievito non ha portato a risultati differenti. A fronte di queste considerazioni è stato deciso di ridisegnare nuovi primers, più specifici; inoltre, la procedura di estrazione del DNA verrà svolta nuovamente, questa volta usando un kit specifico per l'estrazione del DNA plasmidico da lievito.

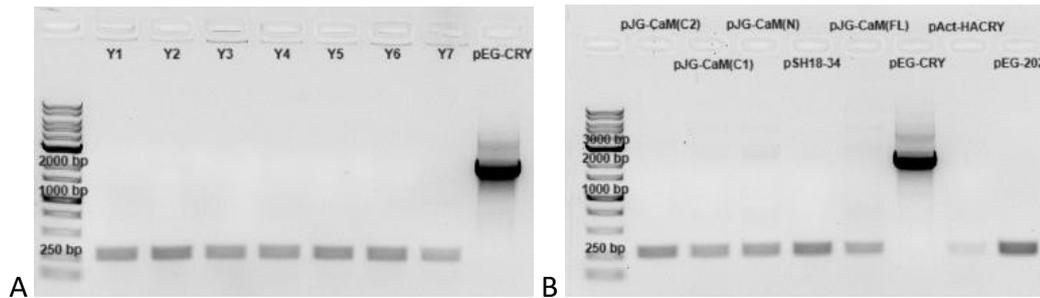


Figura 10. Risultato del *gel screening* (A) delle PCR di verifica delle 7 colonie trasformate con la sequenza *dCRY* mutagenizzata nella EP-PCR 5 prelevate dalla relativa piastra W0+L+X-Gal, a confronto con quella eseguita sul plasmide pEG-CRY (controllo) (B) e della PCR di verifica eseguita su tutti i plasmidi utilizzati per lo studio.

4.5. Ottenimento di una linea di *D. melanogaster* per lo studio del metabolismo del Ca^{2+} a livello retinico

Al fine di studiare le interazioni tra *dCRY* e CaM, oltre a studi su *S. cerevisiae*, sarebbe utile investigare la loro relazione *in vivo* anche in un organismo più complesso, come la *Drosophila melanogaster*. Con l'idea di approfondire il ruolo del Ca^{2+} , e quindi di CaM, a livello retinico, dove *dCRY* è particolarmente espresso, abbiamo pensato di sfruttare il sistema di espressione GAL4-UAS per generare una linea di *D. melanogaster* utile a tale scopo. Il sistema GAL4-UAS, infatti, sfrutta l'interazione (che avviene naturalmente in lievito) tra il fattore trascrizionale GAL4 e specifiche sequenze di DNA note come *Upstream Activating Sequences* (UAS), per promuovere l'espressione del gene bersaglio a valle di UAS. Nel nostro caso, una linea di *Drosophila* esprimeva GAL4, associato all'elemento GMR, il che comporta che la sua espressione avvenga unicamente a livello dell'occhio; mentre un'altra linea di *Drosophila* possedeva il transgene di interesse (Cameleon) posto a valle della sequenza UAS. Per ottenere la linea di *Drosophila* esprime il *sensor* Cameleon nell'occhio, utile per il nostro studio in quanto questo è in grado di captare variazioni nella concentrazione di Ca^{2+} ed esprimere fluorescenza di conseguenza, abbiamo allestito degli incroci tra le linee *w;GMR-GAL4* e *w;UAS-Cameleon/TM3* (Figura 11). Gli esemplari nati da questo incrocio che non mostravano il carattere fenotipico "setole corte" (portato dal cromosoma bilanciatore TM3), ovvero *GMR-GAL4>UAS-Cameleon*,

sono stati identificati come linea desiderata e sono stati raccolti. Sugli esemplari di questa linea verranno condotti in futuro studi sull'effetto che le variazioni circadiane della concentrazione di Ca^{2+} all'interno della retina (visualizzabili tramite la fluorescenza emessa dal *sensor* Cameleon) hanno sulla fisiologia di dCRY e CaM.

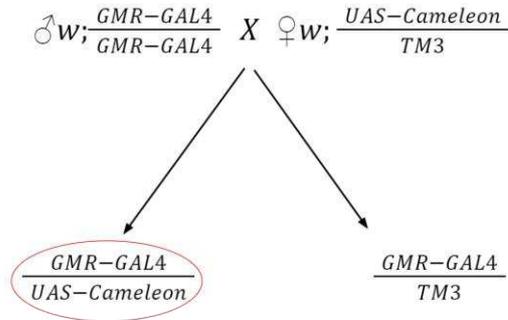


Figura 11. Schema dell'incrocio allestito tra linee di *Drosophila* $w;GMR-GAL4$ e $w;UAS-Cameleon/TM3$ per ottenere la linea $GMR-GAL4>UAS-Cameleon$, capace di esprimere il *sensor* Cameleon a livello delle cellule retiniche.

5. BIBLIOGRAFIA

Benito Juliana *et al.*, The blue-light photoreceptor CRYPTOCHROME is expressed in a subset of circadian oscillator neurons in the *Drosophila* CNS. *Journal of Biological Rhythms* **23**(4), 296-307 (2008).

Cirino Patrick *et al.*, Generating mutant libraries using error-prone PCR. *Methods in Molecular Biology* **231**, 3-9 (2003).

Chaves Inês *et al.*, The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 335-364 (2011).

Golemis Erica *et al.*, Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. *Current Protocols in Molecular Biology* **20** (2008).

Gietz Daniel and Schiestl Robert, High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* **2**, 31-34 (2007).

Hirota Tsuyoshi and Fukada Yoshitaka, Resetting Mechanism of Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Zoological Science* **21**(4), 359-368 (2004).

Liang Xitong *et al.*, Synchronous *Drosophila* circadian pacemakers display nonsynchronous Ca²⁺ rhythms *in vivo*. *Science* **351**, 976-981(2016).

Logan Ryan and McClung Colleen, Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nature Reviews Neuroscience* **20**, 49–65 (2019).

Mazzotta Gabriella *et al.*, Fly cryptochrome and the visual system. *PNAS* **110**(15), 6163-6168 (2013).

Mazzotta Gabriella *et al.*, Calmodulin enhances Cryptochrome Binding to INAD in *Drosophila* Photoreceptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11** (2018).