



UNIVERSITÀ DI NAPOLI FEDERICO II

**DOTTORATO IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E
MOLECOLARE**

TESI DI DOTTORATO, 2007

**ANALISI FUNZIONALE DELL'INTERAZIONE TRA I GENI
CUP E *HSP83* DURANTE L'OOGENESI DI *DROSOPHILA***

DOTTORANDA:	VIVIANA PISA DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E BIOTECNOLOGIE MEDICHE
DOCENTE-GUIDA:	Prof. ARTURO VERROTTI DI PIANELLA
COORDINATORE:	Prof. GIUSEPPE D'ALESSIO

*"I always felt that insects are the general rule,
and everything else is a special case".
Paul Bystrak*

*Ai miei genitori,
che hanno creduto in me e
sostenuto la mia scelta.*

INDICE

INDICE	I
SOMMARIO	II
SUMMARY	III
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE.....	1
1.1 Oogenesi in <i>Drosophila melanogaster</i>	2
1.1.1 Morfologia dell'ovaio	2
1.1.2 Formazione della camera ovarica	6
1.1.3 Stadi dell'oogenesi	7
1.2 I molteplici aspetti della proteina Cup in <i>Drosophila</i>	9
1.2.1 Espressione del gene <i>cup</i>	10
1.2.2 Funzioni di Cup	11
1.2.3 Ortologhi di Cup	12
1.3 Le heat shock protein: la famiglia delle Hsp90.....	14
1.3.1 Struttura e funzioni delle Hsp90	16
1.3.2 Hsp90 in <i>Drosophila</i>	18
CAPITOLO 2: SCOPO DEL LAVORO.....	20
CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI	22
CAPITOLO 4: RISULTATI	29
4.1 Identificazione di nuovi interattori di Cup ed eIF4E	30
4.1.1 L'interazione di Hsp90 con <i>cup</i> ed eIF4E è di natura indiretta	32
4.2 Distribuzione dei prodotti genici di <i>Hsp83</i> durante lo sviluppo delle ovaie	34
4.2.1 Co-localizzazione tra Hsp90 e Cup.....	37
4.2.2 Effetti degli alleli di <i>Hsp83</i> sull'oogenesi	38
4.3 Interazione genetica tra <i>cup</i> ed <i>Hsp83</i>	40
4.3.1 Analisi dell'interazione genetica tra <i>cup</i> , <i>Hsp83</i> ed eIF4E	47
CAPITOLO 5: DISCUSSIONI.....	50
BIBLIOGRAFIA	i

SOMMARIO

In *Drosophila*, il prodotto del gene *cup* è una proteina multifunzionale che agisce sia durante l'oogenesi che nelle prime fasi dell'embriogenesi (Piccioni *et al.* 2005a).

Il presente lavoro di tesi mostra l'identificazione e la caratterizzazione di Hsp90, uno chaperone molecolare altamente conservato nel corso dell'evoluzione, quale nuovo interattore della proteina Cup in *Drosophila melanogaster*.

Tramite analisi di proteomica funzionale abbiamo dimostrato un'interazione fisica tra Hsp90 e Cup. In ovaie wild-type, il pattern di espressione del gene *Hsp83*, che codifica per Hsp90, è stato analizzato sia a livello dell'mRNA, mediante esperimenti di ibridazione *in situ*, che della proteina, mediante tecniche di immunofluorescenza. In particolare, abbiamo mostrato che le proteine Hsp90 e Cup co-localizzano nel citoplasma delle cellule germinali all'interno del germario ed in tutti gli stadi dell'oogenesi. Inoltre, *Hsp83* e *cup* interagiscono geneticamente in quanto una diminuita attività di Hsp90 in mutanti omozigoti di *cup* provoca un drammatico peggioramento del loro fenotipo ovarico. In conclusione, questi risultati incominciano a fare luce sulle funzioni di Hsp90 durante lo sviluppo delle cellule germinali femminili di *Drosophila* e rinforzano il concetto che Cup svolge diverse funzioni essenziali durante l'oogenesi.

SUMMARY

In *Drosophila*, the product of the *cup* gene is a multi-functional protein acting both during ovary development and early embryogenesis (Piccioni *et al.* 2005a).

The present work shows the identification and characterization of the product of *Hsp83* gene, the evolutionarily conserved chaperone Hsp90, as a new Cup interacting-protein.

By a functional proteomic approach, we demonstrated that Hsp90 associates with Cup. In wild-type ovaries, the expression pattern of the *Hsp83* gene products was determined at the mRNA level, by whole-mount *in situ* hybridization, and at the protein level, by immunofluorescence techniques. In particular, we show that Hsp90 specifically co-localizes with Cup in the cytoplasm of all female germline cells within the germarium. Moreover, *cup* and *Hsp83* interact genetically, since reducing the level of *Hsp83* activity deteriorates the development of ovaries bearing homozygous *cup* mutant alleles.

Our results begin to shed light on Hsp90 functions during *Drosophila* female germline cell development and reinforce the concept that Cup has different essential roles during oogenesis.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Oogenesi in *Drosophila melanogaster*

In tutti gli organismi che si riproducono sessualmente, la propagazione ed il mantenimento della specie è assicurata dall'unione di due tipi di cellule altamente specializzate: l'uovo e lo spermatozoo. La cellula che ne deriva, lo zigote, eredita il patrimonio genetico di entrambi i gameti, ed il citoplasma materno che contiene tutte le molecole necessarie allo sviluppo dell'embrione durante le prime fasi dell'embriogenesi. La formazione di gameti maturi funzionali è, quindi, un evento fondamentale che si realizza attraverso una serie di meccanismi molecolari che, per molti aspetti, sono altamente conservati tra organismi anche evolutivamente distanti (Pisa *et al.* 2007).

Il processo di oogenesi, ed in particolare l'oogenesi in *Drosophila melanogaster*, costituisce un valido modello per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo degli eucarioti superiori. L'ovaio della *Drosophila*, infatti, è costituito da un numero relativamente piccolo di tipi cellulari che sono coinvolti in processi complessi come il “signaling” intracellulare, la migrazione cellulare, la divisione asimmetrica, il trasporto intracellulare e la migrazione nucleare. Inoltre l'uso dell'oogenesi di *Drosophila*, come modello *in vivo*, presenta una serie di vantaggi: il programma di sviluppo è stato ben studiato; diversi “pathways” genetici e molecolari sono stati chiaramente identificati; e soltanto due tipi di cellule (somatiche e germinali) contribuiscono allo stesso programma di sviluppo.

1.1.1 Morfologia dell'ovaio

L'apparato riproduttore delle femmine adulte di *Drosophila melanogaster* si compone di un paio di ovaie, di dotti genitali dotati di tutte le

strutture accessorie e di genitali esterni (Spradling, 1993).

Un ovaio è formato da 14-16 ovariooli; ogni ovarioolo, con la sua struttura tubulare, rappresenta l'unità morfologica e funzionale indipendente di ciascun ovaio. L'integrità di ciascun ovarioolo è determinata dalla presenza di una membrana basale e di uno strato sottile di cellule muscolari, localizzato tra due strati di cellule epiteliali, che insieme formano la guaina epiteliale. Gli ovariooli, inoltre, sono tenuti insieme da una rete di tessuto connettivo, la guaina peritoneale, dove sono presenti una serie di strutture necessarie per fornire l'ossigeno indispensabile per il metabolismo dell'ovaio (Spradling, 1993) (Figura 1).

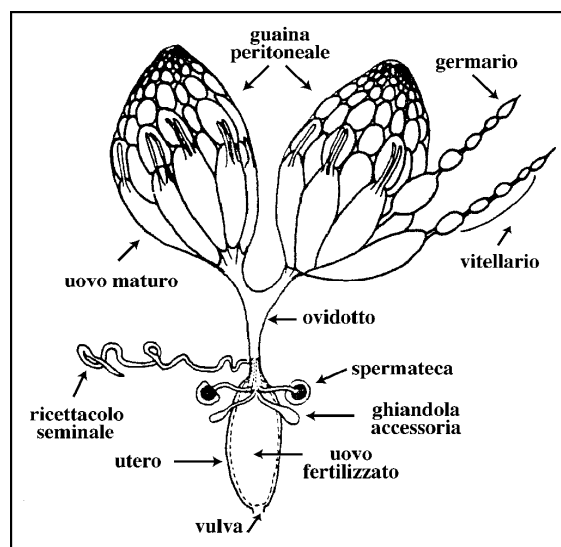


Figura 1. Struttura dell'ovaio di una femmina adulta di *Drosophila*.

All'estremità anteriore di ciascun ovarioolo, in una regione chiamata germario, sono presenti 2-3 cellule staminali germinali che daranno origine all'oocita ed alle cellule nutrici (Wieschaus e Szabad, 1979), e 2 cellule staminali somatiche che daranno origine alla popolazione delle cellule

follicolari. La regione posteriore, conosciuta come vitellario, è costituita da una serie di camere ovariche a differenti stadi di sviluppo. Ogni ovario contiene 6-7 follicoli, o camere ovariche, interconnessi tra loro ed in via di maturazione. Ciascun follicolo è separato da un piccolo cordone di 8 cellule interfollicolari somatiche (“stalk cells”) (Spradling, 1993) (Figura 2)

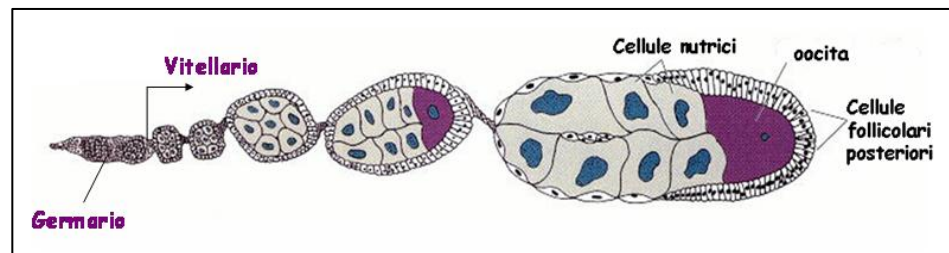


Figura 2. Struttura di un ovario di *Drosophila*.

Il germario è la sede in cui si verifica la divisione delle cellule staminali ed il loro differenziamento (Lin *et al.* 1994). All'estremità di ciascun germario, le cellule staminali germinali (GSCs) sono intimamente associate con due sottopopolazioni di cellule somatiche che originano dal mesoderma: le cellule basali del filamento terminale e le cellule del cappuccio. Il filamento terminale, costituito da una serie di cellule appiattite, collega il germario alla guaina che circonda ciascun ovario ed assicura l'auto-rinnovamento (“self-renewal”) delle cellule staminali della linea germinale, mentre le cellule del cappuccio partecipano alla formazione della guaina peritoneale che avvolge ciascun ovaio. Il germario è diviso convenzionalmente in tre regioni morfologicamente distinte, indicate come regioni 1, 2 e 3. La regione 1 è un'area mitoticamente attiva che contiene sia cellule singole, cellule staminali e cistoblasti (precursori della cellula uovo), che cistociti, ossia gruppi di 16 cellule interconnesse

mediante ponti citoplasmatici. La zona centrale, definita regione 2, è suddivisa ulteriormente in regione anteriore (2a) e posteriore (2b) a seconda dell'invasione delle cellule mesodermiche, che si staccano dalla tunica di rivestimento e si muovono verso il centro, tra i gruppi di 16 cellule, per formare intorno a ciascuno di essi un rivestimento follicolare, e della posizione dell'oocita in via di sviluppo all'interno della camera ovarica (Mahowald e Strassheim, 1970). La regione 3, infine, è un'area occupata da una cisti in via di maturazione (Dej e Spradling 1999) (Figura 3).

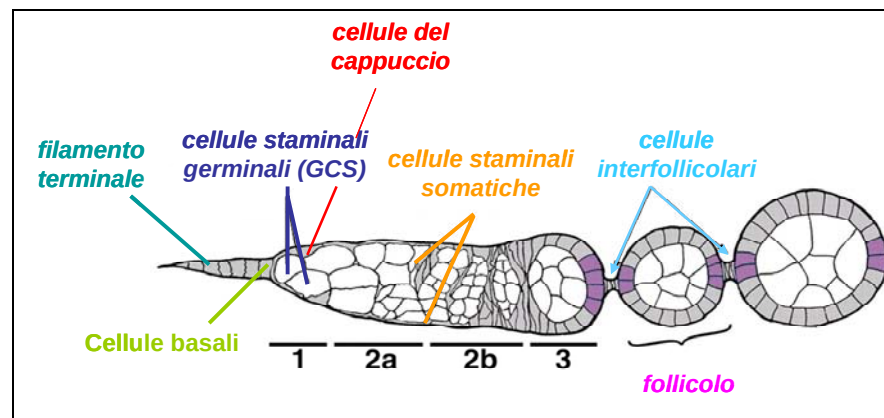


Figura 3. Rappresentazione dei diversi tipi di cellule che compongono il germario.

Procedendo verso la regione posteriore dell'ovariolo si rileva la presenza di camere ovariche in via di maturazione, ciascuna composta da tre tipi di cellule: l'oocita, con il suo prominente nucleo, è connesso a 15 cellule nutrici, mentre l'involucro della cellula uovo è formato da un singolo strato di circa 1000 cellule follicolari, responsabili anche dello sviluppo della membrana vitellina e del corion durante gli stadi tardivi dell'oogenesi (Spradling, 1993) (Figura 4).

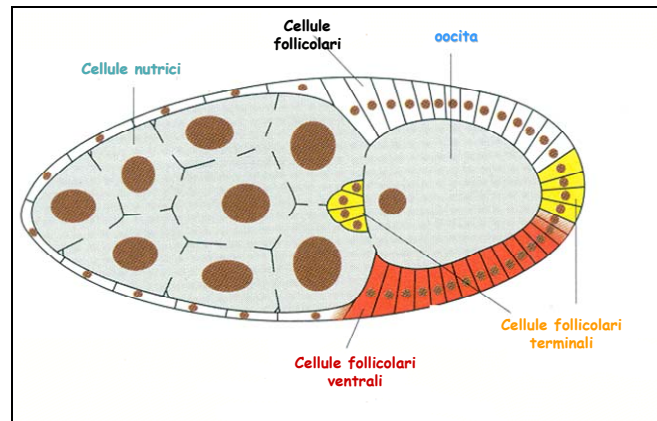


Figura 4. Struttura di un follicolo ovarico di *Drosophila*.

1.1.2 Formazione della camera ovarica

La formazione dei follicoli ovarici, che in *Drosophila* avviene durante tutta la vita adulta, richiede la regolazione coordinata di processi quali proliferazione, differenziamento e morfogenesi di due distinte linee cellulari: somatica e germinale.

Lo sviluppo delle camere ovariche inizia nella regione 1 del germario, dove la divisione asimmetrica delle cellule staminali germinali genera una nuova cellula staminale, che resta in contatto con le cellule basali e con le cellule del cappuccio, e una cellula figlia destinata a diventare progressivamente un cistoblasto (od ovogonio), ossia un precursore della cellula uovo. Il cistoblasto, a sua volta, muovendosi posteriormente, subisce quattro mitosi sincronizzate con citochinesi incompleta, dando origine ad un complesso di 16 cellule, la cisti, dove le singole cellule (i cistociti) sono interconnesse fra loro da ponti citoplasmatici, detti canali ad anello (“ring canals”) (Spradling, 1993). Solo le due cellule che presentano 4 interconnessioni citoplasmatiche sono potenzialmente capaci di svilupparsi in oociti; in realtà, solo una, quella situata all'estremità più caudale della camera

ovarica, entrerà in meiosi diventando un oocita maturo, mentre le altre 15 cellule diventeranno cellule nutrici poliploidi (Ribbert, 1979; Spradling, 1993)

Mentre la cisti procede all'interno della regione 2a, organelli citoplasmatici, inclusi mitocondri e centrioli (Mahowald e Strassheim, 1970), e specifici RNA (Wharton e Struhl, 1989; Suter *et al.*, 1989; Yue e Spradling, 1992) iniziano ad essere trasportati dalle cellule nutrici nel futuro oocita. Nella regione 2a, la cisti non è ancora completamente circondata da cellule follicolari, ma è ancora in contatto con le cisti confinanti. Successivamente, nella regione 2b, cellule di origine mesodermica che provengono da cellule staminali somatiche situate ai margini delle regioni 2a e 2b avvolgono la cisti, formando un monostrato di cellule follicolari intorno a ciascuna di esse. Nella regione 3 infine, l'oocita assume una posizione posteriore all'interno della cisti, e questo è il primo segnale della formazione dell'asse antero-posteriore del futuro embrione. Nel vitellario viene così rilasciata la camera ovarica allo stadio 1 che si svilupperà fino a diventare una cellula-uovo matura.

All'interno del germario tutte le 16 cellule della cisti entrano in una lunga fase S che costituisce la fase S pre-meiotica del futuro oocita, ma all'uscita dal germario la sincronia delle 16 cellule viene persa: una sola continua attraverso la meiosi, mentre le altre 15 abbandonano il ciclo meiotico ed iniziano a crescere senza ulteriori divisioni, formando i cosiddetti cromosomi politenici (esse replicano i loro cromosomi fino a produrne 512 copie) (Ribbert, 1979; Spradling, 1993).

1.1.3 Stadi dell'oogenesi

L'oogenesi in *Drosophila* è convenzionalmente suddivisa in 14 stadi

distinti che sono ordinati in maniera spaziale e temporale nei singoli ovariooli che compongono ciascun ovaio (King 1970). Durante questi stadi di sviluppo della camera ovarica si susseguono specifici cambiamenti morfologici che culminano con la localizzazione dell'oocita, completamente sviluppato, nella porzione terminale del vitellario. Diversi sono i criteri utilizzati per la caratterizzazione dei 14 stadi:

- misura, forma e localizzazione delle camere ovariche nell'ovarioilo;
- dimensioni dell'oocita rispetto alle cellule nutrici e all'intera camera ovarica;
- rapporto tra le cellule follicolari ed il complesso cellule nutrici-oocita;
- secrezione di proteine da parte delle cellule follicolari;
- relativa abbondanza dei vari organelli nel citoplasma dell'oocita.

Gli stadi previtellogeni che hanno inizio nel germario (stadio S1) non sono facilmente distinguibili tra loro; infatti, tra lo stadio 2 e lo stadio 7, l'oocita rimane approssimativamente delle stesse dimensioni delle cellule nutrici, mascherando quelle specifiche differenze citologiche che sono invece evidenti e di più facile identificazione negli stadi più tardivi di sviluppo della camera ovarica (Spradling, 1993). Durante questi stadi, l'intera camera ovarica è caratterizzata da un accrescimento in volume senza significative variazioni morfologiche. A partire dallo stadio 7 l'oocita occupa una posizione più posteriore nella camera ovarica risultando distinguibile dalle cellule nutrici.

La vitellogenesi ha inizio durante lo stadio 8, quando viene depositato il materiale vitellino, costituito principalmente da granuli di proteine (vitellogenine), particelle ricche di glicogeno e gocce lipidiche, e necessario a nutrire l'embrione in via di sviluppo (Spradling, 1993).

Durante lo stadio 9 si evidenziano i movimenti compiuti dalle cellule follicolari verso l'oocita: le cellule del bordo ("border cells", gruppi di sei - dieci cellule follicolari che circondano le cellule polari anteriori), cominciano a migrare dal margine anteriore della camera ovarica verso il margine anteriore dell'oocita dove, passando da una forma cuboidale ad una colonnare, iniziano a concentrarsi attorno all'oocita stesso. Siamo quindi allo stadio 10A, in cui l'oocita occupa la metà posteriore della camera ovarica, le cellule nutrici la metà anteriore ed il nucleo dell'oocita è posizionato all'angolo dorsale anteriore dell'oocita stesso (Spradling, 1993). Durante lo stadio 10B, le cellule follicolari più vicine al confine cellule nutrici-oocita cominciano a migrare centripetamente, tra le cellule nutrici e l'oocita, e sono dette cellule centripete. Queste ultime secernono l'opercolo (un sottile strato di involucro embrionale che funziona come porta di uscita della larva), il collare (un perno su cui oscilla l'opercolo) ed il micropilo (struttura d'ingresso per gli spermatozoi). Subito dopo la migrazione centripeta (stadio 10B), le cellule nutrici trasferiscono rapidamente il loro contenuto nell'oocita (stadio 11), poi iniziano a degenerare andando incontro ad apoptosi (stadi 12-14). Durante gli stadi 13-14 non ha luogo alcun aumento di volume dell'oocita, ma avvengono grossi cambiamenti nei costituenti dell'ooplasma.

1.2 I molteplici aspetti della proteina Cup in *Drosophila*

Cup è una proteina multi-funzionale che agisce in *Drosophila* sia durante lo sviluppo delle ovaie che nei primi stadi dell'embriogenesi. Cup svolge queste funzioni modulando direttamente e/o indirettamente l'attività di differenti mRNA e proteine. Il gene *fs(2)cup* (*cup*) è stato identificato nel 1991,

attraverso uno screening genetico per geni della sterilità femminile in *Drosophila* (Schupbach e Wieschaus, 1991) e successivamente clonato e caratterizzato (Keyes e Spradling, 1997). Il gene *cup* è localizzato sul secondo cromosoma del genoma di *Drosophila* e codifica per una proteina di 1132 aminoacidi.

1.2.1 Espressione del gene *cup*

L'mRNA di *cup* è stato evidenziato, tramite esperimenti di ibridazione *in situ*, nell'ovaio e negli embrioni di età compresa tra 0 e 2 ore, ma non in embrioni tardivi o in altri tessuti. L'mRNA di *cup* è presente nel citoplasma delle cellule germinali durante lo sviluppo pre-vitellogenico, ma non nelle cellule follicolari somatiche (Keyes e Spradling, 1997; Verrotti e Wharton, 2000). Il trascritto è presente nella regione 1 del germario, dove è rilevabile nelle cellule germinali staminali, nei cistoblasti e nelle cisti in divisione; nella regione 2a la sua espressione diminuisce, mentre aumenta nuovamente nella regione 2b; negli stadi 3 e 4 aumenta ulteriormente ed i suoi livelli permangono elevati fino allo stadio 8; tra gli stadi 8 e 10 l'mRNA non risulta più rilevabile. Un secondo ciclo di espressione inizia allo stadio 10 e continua fino allo stadio 14 (Keyes e Spradling, 1997).

Mediante esperimenti di immunofluorescenza, la proteina Cup è stata rivelata nel citoplasma di tutte le cellule della linea germinale, a partire dalle cellule staminali germinali, ma non nel nucleo delle cellule nutrici o dell'oocita. Nella regione 2a del germario, ed in particolare, all'interno della cisti a 16 cellule, Cup si accumula preferenzialmente nel futuro oocita, mentre l'mRNA è completamente assente in questa regione.

Durante gli stadi pre-vitellogenici Cup forma un cappuccio all'estremità posteriore dell'oocita; questa localizzazione viene conservata negli stadi successivi, insieme ad un piccolo accumulo riscontrato sulla superficie dell'oocita. Contemporaneamente, ed in modo particolarmente evidente allo stadio 4, la proteina Cup si trova sotto forma di aggregati localizzati soprattutto intorno alla periferia del nucleo delle cellule nutrici. In seguito, Cup lascia la membrana nucleare per divenire dispersa nel citoplasma delle cellule nutrici e per dirigersi verso la periferia cellulare.

A partire dallo stadio 8, la proteina Cup inizia a raccogliersi nell'oocita, quando si verifica un'estesa riorganizzazione dei microtubuli. Durante lo stadio 9 le cellule nutrici e l'oocita contengono quantità paragonabili di proteina, tuttavia dallo stadio 10 in poi la proteina si ritrova quasi completamente localizzata in particelle presenti lungo la superficie corticale delle cellule nutrici (Keyes e Spradling, 1997; Verrotti e Wharton, 2000).

Negli embrioni Cup ha una localizzazione citoplasmatica suggerendo una sua origine materna. L'intensità del segnale perdura fino allo stadio 9 dell'embriogenesi, mentre è assente nelle successive fasi dell'embriogenesi e durante la gastrulazione (Keyes e Spradling, 1997).

1.2.2 Funzioni di Cup

La proteina Cup ha almeno sei differenti ruoli durante l'oogenesi e le prime fasi dell'embriogenesi. L'interazione del gene *cup* con *ovarian tumor* (*otu*) è importante per la struttura e funzione dei cromosomi delle cellule della linea germinale (Keyes e Spradling, 1997). L'associazione della proteina Cup con Nanos, un regolatore traduzionale responsabile dello sviluppo delle

strutture addominali dell'embrione, è necessaria per il mantenimento e la sopravvivenza delle cellule staminali germinali femminili (verrotti e Wharton, 2000). Inoltre *cup* ed *eIF4E* interagiscono geneticamente per il controllo dello sviluppo e crescita delle ovaie (Zappavigna *et al.* 2004). Attraverso l'interazione diretta con eIF4E e fattori legati alle regioni 3' non tradotte, Cup è capace di reprimere la traduzione di specifici messaggeri, come *oskar* nell'oocita in crescita e *nanos* nelle prime fasi dell'embriogenesi. Inoltre Cup sembra controllare lo stato di fosforilazione di eIF4E e, quindi, l'efficienza traduzionale, nell'ovaio in via di sviluppo. Infine la proteina è in grado di fare la spola tra nucleo e citoplasma in cellule Schneider (S2), ed interagire con una proteina del poro nucleare, suggerendo un possibile ruolo anche nel nucleo (Piccioni *et al.* 2005a, Grimaldi *et al.* 2007). Il meccanismo d'azione di Cup è stato ben studiato nell'oocita, dove è in grado di inibire la traduzione dell'mRNA *oskar* agendo da ponte molecolare tra eIF4E, legato al cap al 5' del messaggero, e la proteina Bruno, che lega invece, sequenze specifiche nella sua 3'-UTR (Nakamura *et al.* 2004; Nelson *et al.* 2004; Wilhelm *et al.* 2003). Ulteriori dati evidenziano che anche la localizzazione di eIF4E nell'oocita è alterata in alleli mutati di *cup* (Zappavigna *et al.* 2004). Da tutti questi studi si evince che Cup agisce, più generalmente, come regolatore della localizzazione e traduzione di differenti mRNA attraverso l'interazione con una serie di fattori ancora sconosciuti (figura 5).

1.2.3 Ortologi di Cup

Putativi ortologi di Cup sono stati identificati in diversi vertebrati; in topo il potenziale omologo corrisponde alla proteina Clast4 e nell'uomo a

eIF4E-Transporter (4E-T). In cellule di mammifero, 4E-T media l'importo nucleare di eIF4E e, in maniera simile a Cup, è una proteina che fa la spola tra nucleo e citoplasma. L'mRNA e la proteina di *Clast4*, a loro volta, sono espresse ad alti livelli nel citoplasma di oociti murini in via di sviluppo. *Clast4*, inoltre interagisce direttamente con eIF4E attraverso una canonica sequenza di legame ad eIF4E. Questi dati suggeriscono che *Clast4* e 4E-T agiscono, in maniera simile a Cup, a livello traduzionale durante lo sviluppo della linea germinale femminile di mammifero.

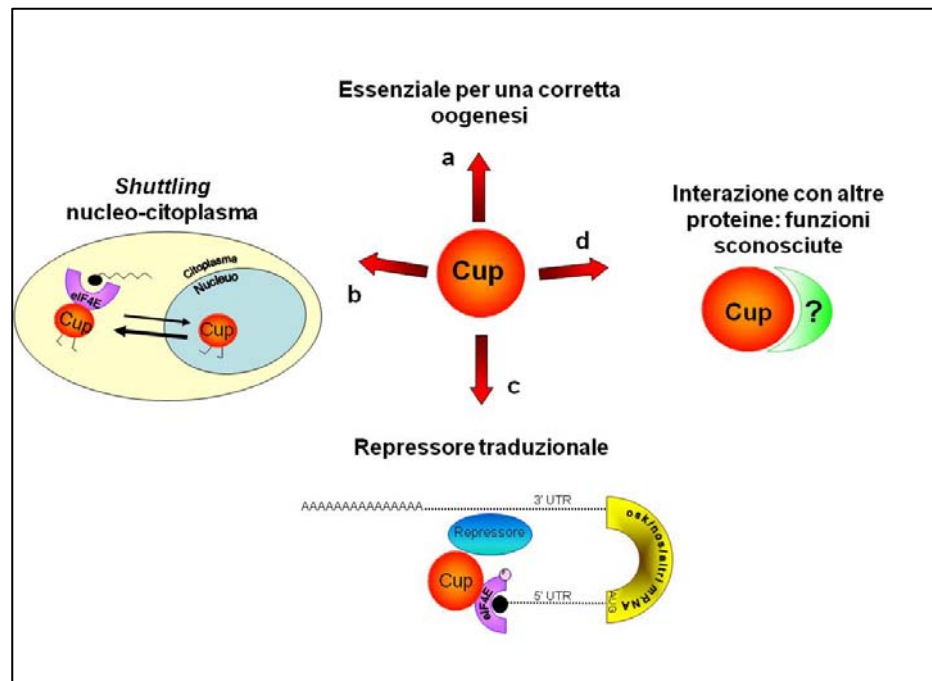


Figura 5. Le molteplici funzioni della proteina Cup. Cup ha un ruolo essenziale durante l'oogenesi, per la formazione della cisti, per la struttura e funzione dei cromosomi delle cellule della linea germinale e per lo sviluppo e crescita dell'oocita. **(a).** Cup è capace di fare la spola tra nucleo e citoplasma interagendo con proteine del poro nucleare **(b)**. Inoltre è un repressore traduzionale: interagendo con Bruno e Smaug, reprime rispettivamente la traduzione degli mRNA *oskar* e *nanos* **(c)**. Infine, la capacità di interagire con diversi tipi di proteine suggerisce potenziali funzioni ancora inesplorate **(d)**.

1.3 Le proteine heat shock: la famiglia delle Hsp90

Tutte le cellule, procariotiche ed eucariotiche, sono in grado di difendersi dall'esposizione a stress ambientali (variazioni di temperatura, pH, radiazioni) incrementando la sintesi di un gruppo di proteine note come "heat shock proteins" (Hsp) (Ritossa 1962; Tissieres *et al.* 1974). Anche se con strategie distinte, le proteine che appartengono a questa grande famiglia di chaperoni molecolari, hanno come funzione principale quella di prevenire l'aggregazione ed aiutare il "folding" e la maturazione delle altre proteine cellulari. Nonostante il nome "heat shock", la maggior parte degli chaperoni è espressa costitutivamente ed in modo ubiquitario. La loro azione è infatti richiesta per una serie di funzioni "housekeeping" essenziali: "folding" *de novo* di una catena polipeptidica nascente, traslocazione delle proteine attraverso le membrane, e "turnover" proteico. Inoltre gli chaperoni sono richiesti per funzioni più complesse: regolazione post-traduzionale di molecole di segnale, assemblaggio-disassemblaggio di complessi trascrizionali, processamento degli antigeni da parte del sistema immunitario (Figura 6). Tutte queste funzioni sono spesso svolte all'interno di complessi multi-proteici che contengono più tipi di chaperoni, co-chaperoni, ed altre proteine (Whitesell *et al.* 2005).

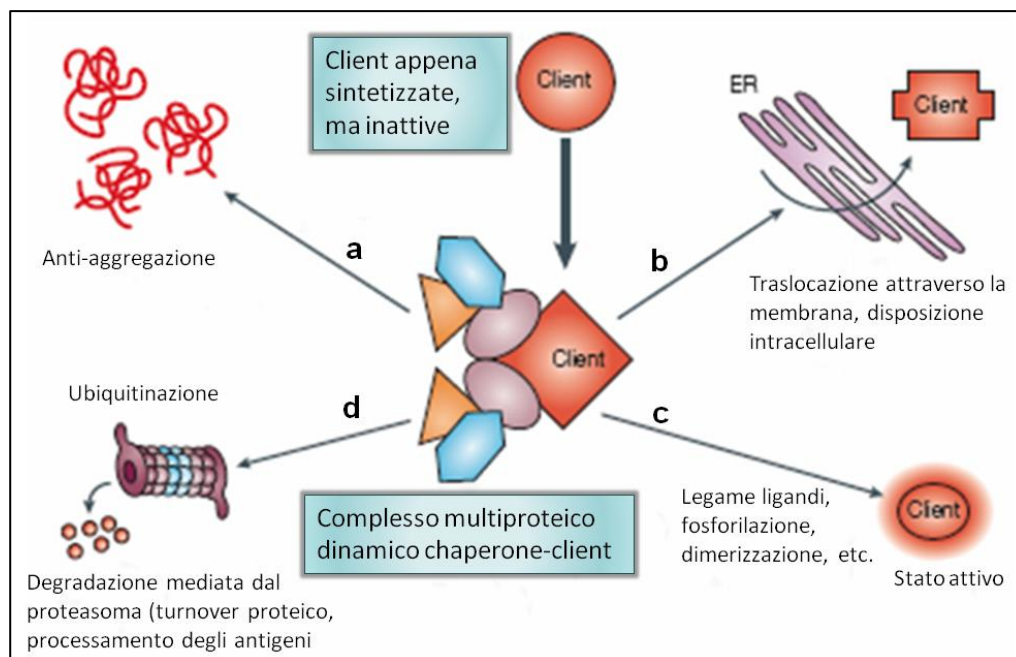


Figura 6. Rappresentazione schematica di alcuni dei ruoli svolti dagli chaperoni molecolari nella regolazione post-traduzionale delle proteine. Le proteine “client”, appena sintetizzate e conformazionalmente labili, si associano in complessi multi-proteici contenenti diversi tipi di chaperoni, co-chaperoni e molecole accessorie. Questa associazione può prevenire la loro aggregazione **(a)** ed aiutare la loro traslocazione intracellulare da un compartimento all’altro, soprattutto attraverso le strutture membranose come quelle del reticolo endoplasmatico (ER) **(b)**. Nel caso di “client” coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale, l’associazione con il complesso permette di mantenere uno stato conformazionale di semi-stabilità pronto per l’attivazione in seguito a stimoli specifici **(c)**. In assenza di questi stimoli il complesso proteico può indirizzare la proteina “client” al proteasoma, controllandone il suo turnover **(d)** (figura modificata da Whitesell *et al.* 2005).

La grande super-famiglia delle proteine heat shock, è suddivisa in specifiche famiglie classificate soprattutto in base al peso molecolare e ad omologie funzionali. Tra queste, la famiglia altamente conservata delle Hsp90 include l’eponimo Hsp90 (90 KDa) presente nel citoplasma delle cellule eucariotiche, il cui nome cambia a seconda della specie (Hsp90 α o β per le due isoforme dell’uomo, Hsp84 e 86 per il topo, Hsp82 per il lievito e Hsp83 in *Drosophila*). Altri membri sono le Grp94/gp96 presenti nel reticolo endoplasmatico delle cellule eucariotiche, le HtpG nei batteri e le Hsp75/TRAP1 recentemente scoperte nella matrice mitocondriale (Kopecek *et al.* 2001).

1.3.1 Struttura e funzioni delle Hsp90

Hsp90 è la proteina citosolica più abbondante nelle cellule eucariotiche, costituendo circa l'1% delle proteine solubili anche in assenza di stress. Tra gli chaperoni, Hsp90 ha delle caratteristiche uniche perché non è richiesta generalmente per la biogenesi dei polipeptidi. Infatti, la maggior parte dei suoi substrati sono trasduttori del segnale conformazionalmente labili, la cui attività è fondamentale nel controllo della crescita, per la sopravvivenza cellulare e nei processi di sviluppo. In condizioni fisiologiche, Hsp90 è stata trovata associata ad una grande varietà di proteine tra cui la calmodulina, l'actina, la tubulina, differenti chinasi ed alcuni recettori. In particolare Hsp90 ha un ruolo cruciale nello stabilizzare e mantenere nella conformazione attiva i recettori degli ormoni steroidei (Csermely *et al.* 1998, Buchner 1999).

Tutte le proteine appartenenti a questa famiglia condividono un comune piano strutturale, suggerendo, quindi, un meccanismo conservato d'azione (Figura 7).

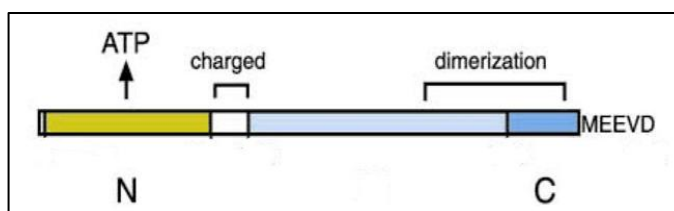


Figura 7. Struttura altamente conservata delle Hsp90

Il dominio N-terminale contiene il sito di legame per l'ATP e per la geldanamicina, un antibiotico della classe delle ansamicine che selettivamente inibisce l'attività ATPasica delle Hsp90. La struttura centrale della proteina contiene un dominio carico estremamente variabile nei diversi organismi, ed

una porzione strutturalmente flessibile che è richiesta, insieme al dominio C-terminale, per la dimerizzazione della proteina. Anche il dominio C-terminale, altamente conservato, è implicato nel legame con substrati ed altri cofattori; ad esempio, la sequenza C-terminale “MEEVD”, ritrovata in tutte le Hsp90, è necessaria per l’interazione con diversi tipi di proteine che contengono questo dominio modulare ripetuto, detto “tetratricopeptide repeat” (TPR).

Il numero di proteine che potenzialmente interagiscono con Hsp90 si sta espandendo rapidamente: un recente studio, basato su metodi proteomici e genomici, ha identificato in lievito 198 putative interazioni fisiche e 451 putative interazioni genetiche (Zhao *et al.* 2005). Attraverso l’interazione con i vari substrati, Hsp90 costituisce il legame della cellula al suo ambiente, e permette di accoppiare la risposta allo stress con i cambiamenti integrati nelle vie di trasduzione del segnale e nelle risposte trascrizionali. La molecola, quindi, costituisce un punto focale nelle reti di regolazione dello sviluppo e rappresenta, inoltre, il primo esempio descritto del fenomeno di “buffering” molecolare. Hsp90 è infatti capace di celare le mutazioni stocastiche e dello sviluppo che altrimenti provocherebbero improvvisi cambiamenti morfologici in una grande varietà di organismi tra cui la *Drosophila* (Rutherford *et al.* 2007; Yahara 1999). La capacità di Hsp90 di riconoscere la struttura non nativa dei suoi substrati, permette di rendere silenti quelle che sono le mutazioni che portano a cambiamenti conformazionali del substrato. La soglia di comparsa del fenotipo alterato è funzione del numero di mutazioni criptiche accumulate ed è ridotta dalla mancata disponibilità di Hsp90 a causa di un evento di stress o una mutazione nello stesso gene. Queste mutazioni silenti possono colpire virtualmente tutti i tessuti e le strutture di un organismo.

1.3.2 *Hsp90 in Drosophila*

In *Drosophila melanogaster*, Hsp90 è una proteina di circa 83 KDa codificata da un unico gene denominato *Hsp83* e localizzato sul terzo cromosoma. Mutazioni nel gene sono letali se in omozigosi, riflettendo l'essenzialità di questa proteina nella *Drosophila*. Pur essendo noti alcuni degli interattori di Hsp90, le sue funzioni nel contesto dell'intero organismo, restano in gran parte ancora sconosciute. Analisi genetiche hanno dimostrato che mutazioni nel gene *Hsp83* alterano il "signaling" di Torso, un recettore tirosin-chinasico coinvolto nella determinazione dell'asse antero-posteriore (Doyle and Bishop, 1993), e di Sevenless, un recettore tirosin-chinasico coinvolto nella maturazione del fotorecettore R7 (van der Straten *et al.* 1997). Probabilmente queste interazioni genetiche dipendono dall'interazione fisica di Hsp90 con la chinasi Raf che interviene in entrambe le vie di segnalazione (van der Straten *et al.* 1997). Inoltre, Lange *et al.* (2000) ha dimostrato che una frazione della proteina Hsp90 è presente nei centrosomi di *Drosophila* e vertebrati, dove è richiesta per il corretto funzionamento del centrosoma. La distruzione della proteina in cellule di *Drosophila* e di mammifero, causa infatti, difetti nella separazione e maturazione del centrosoma, fusi aberranti durante la divisione cellulare ed alterata segregazione dei cromosomi. In *Drosophila*, Hsp90 ricopre un ruolo critico nello sviluppo della linea germinale, in particolare la spermatogenesi risulta essere molto sensibile alla perdita di funzione di Hsp90. Mutazioni omozigoti per *Hsp83* sono letali, mentre alcune combinazioni trans-eterozigoti (ovvero i due cromosomi omologhi recano lo stesso gene in forme alleliche differenti) producono adulti

vitali, sia maschi che femmine, sterili o debolmente fertili. Nei maschi la riduzione di Hsp90 colpisce soprattutto la struttura e organizzazione microtubulare degli spermatozoi, probabilmente come conseguenza, almeno in parte, di una anormale funzione del centrosoma (Yue *et al.* 1999; Lange *et al.* 2000).

Esperimenti di ibridazione in situ hanno rivelato che il messaggero di *Hsp83* assume una localizzazione dinamica durante l’embriogenesi: durante i primi cicli di divisione nucleare, nella fase di sincizio, l’mRNA di origine materna tende a generare un gradiente postero-anteriore, per andarsi a localizzare specificamente nelle cellule primordiali germinali attraverso un meccanismo di generale degradazione e localizzata protezione (Ding *et al.* 1993). All’attivazione della trascrizione dei geni zigotici, il messaggero di *Hsp83* ricompare anche anteriormente per poi andarsi a concentrare, nelle fasi tardive dello sviluppo, nel neuroblasto, nella regione della testa e nelle gonadi.

Song e colleghi (2007) hanno dimostrato che Hsp90 agisce come fattore di localizzazione per gli mRNA *nanos* e *pgc*, due componenti del plasma polare. Sebbene il meccanismo d’azione non sia chiaro, è probabile che la proteina non interagisca direttamente con i due messaggeri. Alcune linee di evidenza suggeriscono che la proteina “client” di Hsp90 per la localizzazione di *pgc*, ma non per *nanos*, sia la chinasi LKB1, coinvolta nella polarizzazione dei microtubuli del citoscheletro nell’oocita e la corretta localizzazione dell’mRNA di *oskar* al polo posteriore. Presumibilmente altri partners o targets di Hsp90 mediano la localizzazione del messaggero *nanos*.

Capitolo 2

SCOPO DEL LAVORO

2. SCOPO DEL LAVORO

L'interesse principale del nostro gruppo di ricerca è lo studio della proteina Cup, fattore necessario per lo sviluppo delle cellule germinali femminili di *Drosophila*.

Lo scopo di questa tesi di Dottorato è stato quello di identificare nuovi interattori della proteina Cup durante l'oogenesi di *Drosophila* per estendere le nostre conoscenze sulle funzioni di questa proteina. Per questo motivo, la prima parte del progetto è stata dedicata ad esperimenti di proteomica funzionale per analizzare i complessi che precipitano con Cup ed il fattore di inizio della traduzione eucariotica 4E (eIF4E) in estratti proteici ovarici. Infatti, siccome Cup ed eIF4E sono entrambi regolatori traduzionali, che interagiscono tra loro per modulare lo sviluppo delle ovaie, abbiamo previsto che un interattore comune alle due proteine potesse, a sua volta, rappresentare un nuovo potenziale regolatore della traduzione. Tra i putativi interattori abbiamo scelto di validare ed approfondire lo studio della proteina Hsp90, che è capace di interagire sia con Cup che con eIF4E.

La seconda parte del progetto è stata dedicata alla caratterizzazione dell'interazione genetica tra *cup* e *Hsp83* durante lo sviluppo delle cellule germinali femminili in *Drosophila*. Lo studio del complesso Cup-Hsp90 durante l'oogenesi ci ha permesso sia di rivelare un nuovo ed inatteso ruolo di Hsp90 sia di migliorare la comprensione delle funzioni di Cup, per molti aspetti ancora sconosciute.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 Costruzione dei plasmidi

Per generare le tre varianti di Hsp90 utilizzate per la tecnica del doppio ibrido in lievito (protocollo descritto in Verrotti e Wharton, 2000), il cDNA di *Hsp83* è stato inserito nel vettore pACT2 (Clontech), così da ottenere una proteina di fusione con il dominio di attivazione (AD) del fattore trascrizionale GAL4.

Il vettore pACT2-Hsp90 (21-687) è stato ottenuto inserendo nel sito *Bam*HI di pACT2 il frammento del cDNA di *Hsp83*, digerito con l'enzima *Bcl*II e derivato dal plasmide pAS10-Hsp83 (nt 1-2904).

Il vettore pACT2-Hsp90 (21-717) è stato ottenuto inserendo nel vettore pACT2, tagliato con *Sac*I ed *Xho*I, il frammento *Sac*I-*Pvu*I (reso "blunt") ottenuto dal vettore pAS10-Hsp83 (nt 1-2904).

Per preparare il vettore pACT2-Hsp90 (2-717) è stato, per prima cosa, necessario amplificare per PCR un frammento del cDNA di *Hsp83* (corrispondente ai nucleotidi 345-2845) utilizzando i primers *Hsp83F* (5'-GTCCCCGGGACCAGAAGAAGCAGAGACC-3'), che inserisce nel frammento un sito per *Sma*I al suo 5', e *Hsp83R* (5'-GGACTGTGAAAGAGCCTCCG-3'). 5 ng del plasmide pAS10-Hsp83 (nt 1-2904) sono stati utilizzati come stampo ed amplificati nelle seguenti condizioni: 3 minuti a 93°C, 2 cicli a 93°C, 54°C e 72°C (45 secondi), 28 cicli a 93°C, 60°C e 72°C (45 secondi), e 10 minuti di estensione a 72°C. Il prodotto della reazione è stato quindi controllato su gel di agarosio, tagliato con gli enzimi *Sma*I e *Stu*I, ed inserito nel vettore pACT2-Hsp90 (21-717) tagliato con gli stessi enzimi.

Le proteine intere Cup (2-1132) ed eIF4E (2-259), saggiate per l'interazione con AD-Hsp90 in lievito, sono state fatte esprimere come proteine di fusione con il dominio di legame al DNA (DBD) di GAL4, clonando ciascun cDNA nel vettore pGBT9 (Clontech), come descritto in Zappavigna *et al.* (2004).

Il vettore pGEX3X-Cup (593-962), utilizzato per esprimere la proteina di fusione GST-Cup in *E. coli*, è descritto in Verrotti e Wharton (2000).

Per gli esperimenti di ibridazione *in situ*, il vettore pAS10-Hsp83 (1-2904) è stato digerito con l'enzima *Pst*I ed il frammento di 834 nucleotidi ottenuto, è stato clonato successivamente nel vettore pBlueScript KS (Stratagene), digerito con lo stesso enzima di restrizione. Il vettore pKS-Hsp83 (669-1503) è stato, quindi, digerito con gli enzimi *Bam*HI ed *Eco*RI per trascrivere, rispettivamente, la sonda senso e quella antisenso (Boehringer Mannheim GmbH).

3.2 Estratti proteici di lievito

Lieviti, co-trasformati con i vettori esprimenti AD-Hsp90 e DBD-Cup, sono stati prima cresciuti per una notte, a 30°C, in mezzo liquido standard SD (Clontech) in assenza di triptofano, leucina ed istidina. Dopo diluizione 1:10 in mezzo YPD (Clontech), la coltura è stata fatta crescere fino ad ottenere una concentrazione finale di 0,4-0,6 OD₆₀₀. Le cellule, raccolte per centrifugazione e lavate in acqua fredda, sono state quindi lisate secondo il metodo Urea/SDS (Clontech).

3.3 Cromatografie di affinità: GST pull-down e precipitazione su resina m⁷GTP-sefariosio

I vettori pGEX3X e pGEX3X-Cup (593-962) sono stati introdotti, mediante trasformazione, in cellule di *E. coli* BL21DE3 (Stratagene) e l'induzione e la successiva lisi batterica sono state eseguite secondo un protocollo standard (Verrotti e Wharton 2000). Le frazioni solubili dei lisati batterici, esprimenti rispettivamente GST e GST-Cup, sono state incubate per 1h a temperatura ambiente con 250 µl di resina di sefariosio funzionalizzata con il glutatione (Amersham Biosciences). Dopo lavaggi in tampone TN (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl), la resina è stata dapprima controllata su SDS-PAGE 10% per la sua purezza, e successivamente incubata per 3 h a 4°C con estratti proteici derivati da ovaie di mosche wild-type (3.5 µg di ciascuna proteina legata alla resina per 10 paia di ovaie) nel tampone di legame (50 mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20), supplementato con un cocktail di inibitori di proteasi (Roche). La resina è stata quindi lavata cinque volte nello stesso tampone di legame e le proteine, ad essa legate, sono state eluite in tampone Laemmli (62.5mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 2% mercaptoetanolo, 10% glicerolo, 0.1% blu di bromofenolo) per 10 minuti a 95°C.

Per l'analisi delle proteine leganti la struttura "cap" è stata utilizzata la resina m⁷GTP-sefariosio (Amersham) secondo il protocollo di Zapata *et al.* (1994) con le seguenti modifiche: il contenuto proteico di 10 paia di ovaie derivanti da mosche wild-type è stato pre-incubato con 30 µl di sefariosio-4B (Amersham) per 1 h in rotazione, nel tampone di legame (50 mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% Tween-20)

supplementato con un cocktail di inibitori di proteasi (Roche), allo scopo di eliminare eventuali interattori aspecifici. Dopo una centrifugazione di 5 minuti a 0.3 g, il sopranatante è stato, quindi, incubato con 30 µl di resina m⁷GTP per 2 h in rotazione nello stesso tampone. La resina è stata successivamente lavata cinque volte nel tampone di legame, una volta nello stesso tampone supplementato con 0.1 mM GTP per ridurre i legami aspecifici, ed infine raccolta mediante una centrifugazione di 5 minuti a 0.3 g. Le proteine legate alla resina sono state quindi eluite in 40 µl di tampone Laemmli (come descritto sopra) e separate in SDS-PAGE al 12%. Tutte le operazioni sono state condotte a 4°C.

3.4 Spettrometria di massa

Le bande proteiche, separate per SDS-PAGE e visualizzate Coomassie colloidale, sono state tagliate dal gel, e decolorate con lavaggi alternati di ammonio bicarbonato 50mM pH 8.0 e acetonitrile. Successivamente, le bande sono state ridotte con DTT 10 mM a 56°C per 45 minuti ed alchilate con iodoacetammide 55 mM, per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio. I pezzi di gel sono stati lavati diverse volte nel suddetto tampone, risospesi in 50 mM di bicarbonato di ammonio ed incubati con 100 ng di tripsina, prima a 4°C per 2 h e poi a 37°C per tutta la notte. Il sopranatante contenente i peptidi è stato quindi, analizzato mediante spettrometria di massa MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Mass Spectrometry) utilizzando uno spettrometro Voyager DE-PRO (Applied Biosystem) e come matrice l'acido alfa-ciano-4-idrossicinnamico. Per la calibrazione dello strumento è stata utilizzata una miscela standard fornita dalla ditta. I pesi molecolari accurati dei

peptidi sono stati impiegati in strategie di Peptide Mass Fingerprinting per identificare le proteine d'origine mediante ricerche in banche dati con il programma Mascot. In alcuni casi le miscele peptidiche sono state analizzate mediante cromatografia liquida capillare e tecniche di spettrometria di massa tandem utilizzando uno spettrometro di massa ibrido Q-ToF (Micromass, Waters). I dati di sequenza dei peptidi unitamente ai pesi molecolari misurati sono stati inseriti in appositi programmi di ricerca (i.e. Mascot) ed utilizzati per l'identificazione delle proteine in banca dati.

3.5 Estratti ovarici di *Drosophila*

Gli estratti proteici sono stati ottenuti da ovaie di mosche di età compresa tra i 3 ed i 5 giorni, omogeneizzate meccanicamente, mediante pestelli sterili, in un tampone di lisi contenente 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris pH 8.0, 5% glicerolo, supplementato con inibitori di proteasi (Roche).

3.6 Ibridazione *in situ*

Gli esperimenti di ibridazione *in situ* su ovaie sono stati condotti secondo il protocollo descritto in Galasso *et al.* (2007). La sonda antisenso di RNA, marcata con digossigenina (Boehringer Mannheim GmbH), è stata sintetizzata utilizzando come stampo un frammento di 834 nucleotidi del cDNA di *Hsp83* ottenuto dalla digestione con *Pst*I (nt 669-1503). La sonda senso è stata utilizzata come controllo dell'esperimento.

3.7 Immunofluorescenze e colorazione del DNA

Le ovaie, dissezionate manualmente, sono state fissate, rese permeabili ed ibridate con anticorpi secondo il protocollo descritto in Gigliotti *et al.* (1998). Per gli esperimenti sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: rabbit anti-Cup (1:200) (Verrotti e Wharton, 2000); mouse anti-Hsp90 (1:50) (gentilmente donato dal Dr R. Tanguay; Carbajal *et al.* 1990). Come anticorpi secondari sono stati utilizzati: donkey anti-rabbit alexa 488 e donkey anti mouse alexa 555 (1:400, Molecular Probes), secondo le istruzioni della ditta. Per la visualizzazione del DNA è stato utilizzato il colorante Hoechst 33258 (Sigma) come descritto in Zappavigna *et al.* (2004).

3.8 Ceppi di *Drosophila*

Le *Drosophila* sono state cresciute su terreno convenzionale a 22-25°C. Gli alleli *cup*²¹ e *cup*¹⁵ sono descritti in Keyes e Spradling (1997); gli alleli *Hsp83*^{e6A} e *Hsp83*^{19F2}, descritti in Yue *et al.* (1999), sono stati ottenuti dal Bloomington Drosophila Stock Center e dal Dr. Stocker (Università di Zurigo, Svizzera). Tutte le mosche wild-type utilizzate in questo lavoro sono *D. melanogaster* Oregon R.

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 Identificazione di nuovi interattori di Cup ed eIF4E.

Allo scopo di identificare nuovi fattori coinvolti con Cup nel controllo traduzionale all'interno dell'ovaio di *Drosophila*, è stata condotta un'analisi comparativa dei complessi proteici che interagiscono, rispettivamente, con Cup e con eIF4E, attraverso un approccio di proteomica funzionale. Gli interattori di Cup sono stati isolati attraverso un esperimento di "GST pull-down": il costrutto codificante per una porzione della proteina Cup (amminoacidi 593-962), già disponibile in laboratorio, fuso al cDNA codificante per la Glutathione S-Transferasi, è stato fatto esprimere in batteri, e la proteina GST-Cup, purificata attraverso una resina di sefarosio legata al glutathione, è stata incubata con estratti proteici preparati da ovaie di mosche wild-type.

Per l'isolamento dei complessi proteici che interagiscono con eIF4E è stata utilizzata una cromatografia di affinità. Estratti proteici ovarici sono stati incubati con una resina di sefarosio legata a gruppi 7-metil-GTP (un analogo della struttura "cap" dei messaggeri eucariotici) per precipitare eIF4E e tutti i complessi proteici ad esso associati. *In vivo*, infatti, eIF4E lega direttamente la struttura "cap" e recluta i diversi componenti del complesso di inizio della traduzione eucariotica (Piccioni *et al.* 2005b)

Per entrambi gli esperimenti, le proteine eluite sono state separate mediante SDS-PAGE e visualizzate attraverso colorazione d'argento o con Coomassie colloidale (Figura 8). Le bande d'interesse sono state tagliate ed analizzate mediante tecniche di spettrometria di massa, ed i putativi interattori sono stati identificati confrontando i valori di massa molecolare dei peptidi ottenuti con quelli depositati nelle diverse banche dati disponibili in rete (ProFound, Mascot, MS-Fit, etc.).

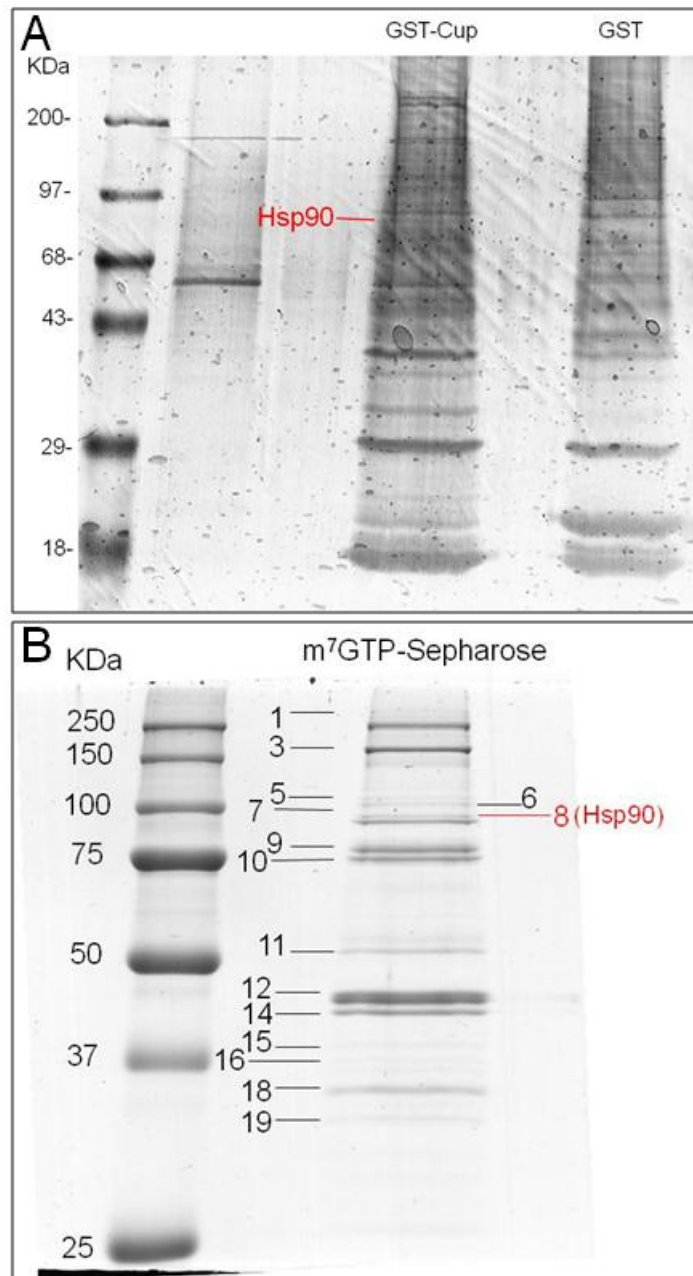


Figura 8. Analisi proteomica dei complessi proteici associati a Cup ed eIF4E in estratti ovarici wild-type. **A)** Il contenuto proteico di 10 paia di ovaie wild-type è stato incubato con la resina legante la proteina di fusione GST-Cup(593-962). Le proteine legate sono state separate tramite SDS-PAGE al 6% ed evidenziate attraverso colorazione d'argento. **B)** I complessi associati ad eIF4E sono stati purificati da estratti ovarici (10 paia di ovaie) attraverso una cromatografia di affinità con una resina di m⁷GTP-sefarosio (Zapata *et al.* 1994); le proteine sono state, quindi, separate per SDS-PAGE al 12% e visualizzate mediante colorazione con Coomassie colloidale. Le bande individuate in entrambi gli esperimenti sono state analizzate per spettrometria di massa utilizzando la tecnica MALDI-MS. Le proteine identificate in **(B)** sono indicate nella Tabella 1.

Come interattore specifico della proteina Cup è stato individuato Hsp90; nel caso di eIF4E, invece, sono stati individuati numerosi interattori, tra cui

alcuni regolatori positivi ubiquitari della traduzione. Questi risultati hanno confermato la validità dell'approccio scelto. In particolare, in Tabella 1 sono rappresentati alcuni dei fattori identificati per eIF4E (le cui bande sono state evidenziate e numerate nella Figura 8B).

La nostra attenzione è stata, quindi, rivolta allo studio della proteina Hsp90, che precipita specificamente sia con Cup che con eIF4E.

N° Banda	Proteina	Descrizione
1	eIF4G gi 3056726	Fattore d'inizio della traduzione
3	Cup gi 24582283	Repressore traduzionale essenziale per l'oogenesi
5	Ef2b gi 24585709	Fattore di elongazione della traduzione
6	Hsc70 gi 4753683	Omologo della Heat shock protein 70
7	Belle gi 17985987	Elicasi della famiglia delle Dead box
8	Hsp90 gi 17647529	Heat shock protein 90
9	Tral gi 45550607	Trailer Hitch, forma complessi ribonucleoproteici coinvolti nel processamento degli RNA
10	PABP gi 495594	Poly(A) binding protein, coinvolta nel meccanismo traduzionale
10	Vasa gi 20129231	Necessaria per la formazione del plasma polare
11	Me31b gi 157594	RNA elicasi ATP-dipendente
11	Yps gi 24663131	Ypslon Schachtel, RNA-binding protein coinvolta nel controllo della trascrizione
12	Cabeza gi 532788	Fattore necessario per l'attività della RNAPol II
14	Yp3 gi 24641865	Yolk protein 3, proteina con attività catalitica coinvolta nella vitellogenesi
15	eIF-2 gi 188600087	Fattore d'inizio della traduzione
16	Trip1 gi 17648041	Fattore d'inizio della traduzione
18	eIF4E gi 17864468	Fattore d'inizio della traduzione
19	RpS3A gi 3915856	Proteina ribosomiale, necessaria nell'oogenesi

Tabella 1. Breve descrizione dei fattori che interagiscono con eIF4E, identificati mediante spettrometria di massa MALDI-MS. I numeri corrispondono alle bande evidenziate in Figura 10B.

4.1.1 L'interazione di Hsp90 con Cup ed eIF4E è di natura indiretta.

L'analisi della sequenza amminoacidica di Hsp90 ha rivelato la presenza di due putativi motivi di legame ad eIF4E (YXXXXLΦ), rispettivamente in

posizione 204-209 (YPIKLLV) e 521-527 (YKGKQLV), suggerendo che il legame tra Hsp90 ed eIF4E potesse essere diretto. Per verificare questa ipotesi è stata, quindi, utilizzata la tecnica del doppio ibrido in lievito. Innanzitutto sono state generate tre porzioni della proteina Hsp90 (amminoacidi 2-717, 21-717 e 21-687), fuse al dominio di attivazione (AD) del fattore di trascrizione GAL4, e testate per la loro corretta espressione in lievito. A tale scopo, è stato fatto un Western blot su estratti proteici totali preparati da lieviti esprimenti AD-Hsp90 e DBD-Cup. Le tre varianti di Hsp90 sono state identificate mediante l'anticorpo anti-HA mAb (F-7; Santa Cruz), che riconosce l'epitopo tag codificato dal plasmide pACT2 in cui sono stati clonati i frammenti del cDNA di *Hsp83* (Figura 9B).

Le suddette proteine AD-Hsp90 sono state, quindi, analizzate per il legame alle proteine eIF4E e Cup intere in due esperimenti paralleli. L'assenza di crescita, su terreno selettivo, di cellule di lievito esprimenti le due proteine di fusione AD-Hsp90 (2-717) e DBD-Cup (2-1132) o DBD-eIF4E (2-259), ha evidenziato una mancata interazione diretta [i costrutti DBD-Cup (2-1132) e DBD-eIF4E (2-259), utilizzati per questo esperimento, erano già stati testati per la loro espressione nel lavoro di Zappavigna *et al.* 2004]. Per minimizzare la possibilità che l'assenza d'interazione fosse causata da un folding non corretto di Hsp90 in lievito, generato da modifiche post-traduzionali che possono avvenire nell'organismo ospite, sono state testate anche le altre due varianti della proteina (amminoacidi 21-717 e 21-687). In Figura 9A è mostrato come tutte e tre le proteine di fusione testate non sono in grado di interagire direttamente né con Cup né con eIF4E.

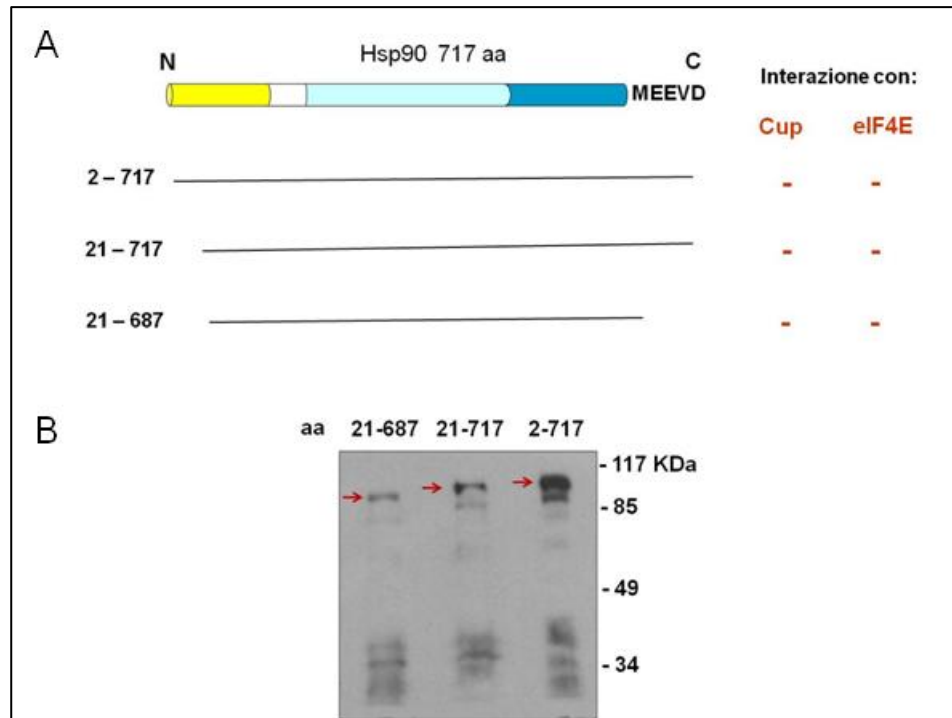


Figura 9. Interazione in lievito di Hsp90 con Cup ed eIF4E. **A)** Rappresentazione schematica dei frammenti di Hsp90 testati per il legame in lievito con le proteine intere Cup ed eIF4E. L'interazione è stata verificata su terreno selettivo privo di leucina, triptofano ed istidina, con l'aggiunta di 3-ammino-triazolo (inibitore diretto dell'istidina) a concentrazioni variabili da 1 a 10 mM. **B)** Analisi dell'espressione delle tre varianti di Hsp90 (indicate dalle frecce).

4.2 Distribuzione dei prodotti genici di *Hsp83* durante lo sviluppo delle ovaie.

Dato che Hsp90 è stato rivelato come specifico interattore di Cup all'interno di estratti ovarici, abbiamo deciso, innanzitutto, di analizzare la distribuzione dei prodotti genici di *Hsp83* all'interno delle camere ovariche nei diversi stadi dell'oogenesi.

Per esaminare la distribuzione del messaggero di *Hsp83*, ovaie wild-type sono state ibridate *in situ* utilizzando come sonda una porzione del cDNA di *Hsp83* marcato con digossigenina (Figura 10).

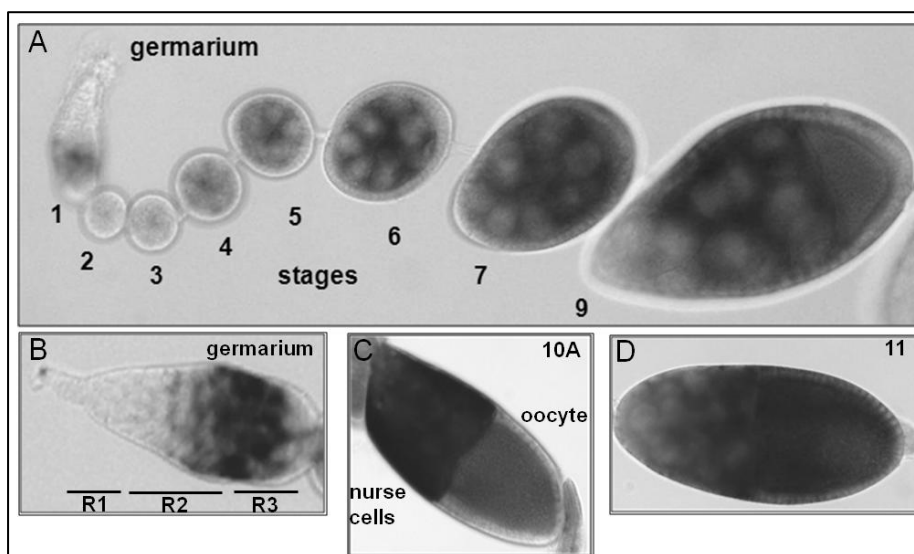


Figura 10. Distribuzione dell'mRNA di Hsp83 all'interno di camera ovariche wild-type. Le immagini A, C e D sono allo stesso ingrandimento; l'immagine B è ad un ingrandimento maggiore. I numeri indicano gli stadi di sviluppo delle camere ovariche; nel germario sono indicate le tre regioni R1, 2 e 3. Lo stadio 1 corrisponde, convenzionalmente, alla regione 3 del germario, inoltre, lo stadio 10 è diviso in 10A e 10B.

Il messaggero di *Hsp83* si distribuisce nelle camere ovariche in modo dinamico. La sua espressione non è rivelabile nella regione 1 (R1) del germario, ma appare chiaramente al termine della regione 2 (R2) e nella regione 3 (R3), in tutte le 16 cellule della cisti germinale (Figura 10B). Al termine dello stadio 1, l'RNA viene rapidamente degradato risultando appena visibile sino allo stadio 3 (Figura 10A). Dallo stadio 4 in poi l'RNA ritorna ad essere espresso ad alti livelli nel citoplasma delle cellule nutrici, sino allo stadio 10A (Figura 10C), momento in cui inizia ad essere progressivamente trasferito nel citoplasma dell'oocita. Negli stadi successivi, quando le cellule nutrici hanno trasferito completamente il loro contenuto all'oocita, la distribuzione diventa uniforme in tutta la camera ovarica (Figura 10D).

Per lo studio della distribuzione della proteina sono stati invece condotti esperimenti di immuno-fluorescenza su ovariole wild-type, utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro Hsp90 di *Drosophila*, fornitoci

gentilmente dal prof. Tanguay (Laval University, Quebec, Canada). La specificità dell'anticorpo è stata verificata attraverso Western blot: l'anticorpo riconosce, in estratti ovarici di mosche wild-type, una singola banda corrispondente ad una proteina con un peso molecolare di circa 85.000 Da (dato non mostrato). Nel germario, Hsp90 assume una localizzazione più specifica: la proteina è presente nella regione R1, dove sono localizzate le cellule staminali in divisione, mentre il suo segnale diminuisce drasticamente nella prima parte della R2, dove sono presenti i cistoblasti in divisione, per aumentare nuovamente al termine della R2 e nella R3 dove sono presenti le camere ovariche in formazione (Figura 11, pannello a destra). Negli stadi tardivi, invece, la proteina si distribuisce in modo omogeneo nel citoplasma di tutte le cellule, sia germinali che follicolari (Figura 11, pannello a sinistra).

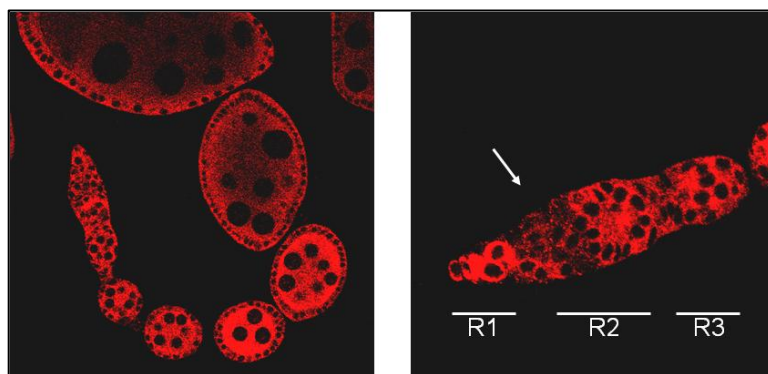


Figura 11. Localizzazione di Hsp90 in camere ovariche wild-type. Entrambi i pannelli mostrano una singola sezione, presa con tecnica di microscopia confocale, di ovariooli ibridati con un anticorpo anti-Hsp90. Nel vitellario, la proteina si distribuisce in modo uniforme nel citoplasma delle cellule germinali e somatiche (pannello a sinistra). Nel germario, la proteina è presente specificamente nel citoplasma delle cellule somatiche e germinali in R1, nella porzione posteriore di R2 ed in R3; una sensibile riduzione di segnale si osserva nella regione anteriore della R2 (pannello a destra, indicato con freccia).

L'interazione fisica di due proteine presuppone una comune localizzazione spazio-temporale. Per supportare, quindi, l'interazione biochimica ottenuta con l'analisi proteomica, abbiamo analizzato contemporaneamente la distribuzione delle proteine Cup ed Hsp90 in camere

ovariche di mosche wild-type. Come descritto nell'introduzione, la proteina Cup mostra una distribuzione dinamica all'interno delle camere ovariche in via di sviluppo; in particolare, dallo stadio 1 in poi, tende ad accumulandosi specificamente in posizioni discrete nel citoplasma dell'oocita e delle cellule nutritive. Negli stessi stadi, Hsp90 non mostra alcuna localizzazione peculiare e discreta, ma si distribuisce in modo diffuso sia nelle cellule della linea germinale che somatica. Le due proteine quindi, necessariamente co-localizzano laddove si distribuisce Cup.

Nel germario, invece, entrambe le proteine assumono una localizzazione specifica. In Figura 12 è mostrata la distribuzione di Cup (in verde) e di Hsp90 (in rosso), e nel pannello a destra la sovrapposizione delle due immagini (overlay). La proteina Cup, nel germario, si localizza nel citoplasma di tutte le cellule della linea germinale (nelle cellule staminali, nei cistoblasti e nelle camere ovariche immature). Hsp90, invece, si localizza nel citoplasma delle cellule sia di natura germinale che somatica nella R1, nella regione posteriore della R2 e nella R3. La co-localizzazione delle due proteine in queste regioni suggerisce che possano svolgere insieme una funzione specifica all'interno delle cellule staminali germinali in divisione (presenti in R1) e nelle cisti già formate (presenti alla fine della R2 ed in R3).

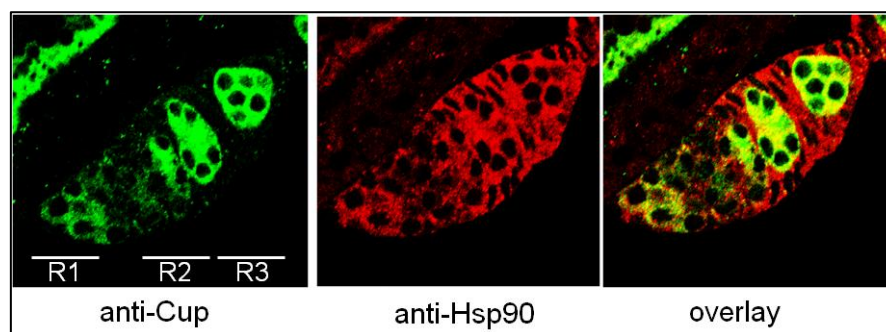


Figura 12. Co-localizzazione delle proteine Cup e Hsp90 nel germario. Immagini, prese con microscopia confocale, di una singola sezione di un germario wild-type, per visualizzare la distribuzione di Cup (verde) e Hsp90 (rosso). Le regioni 1, 2 e 3 del germario sono indicate come R1, R2 ed R3.

4.2.2 Effetti degli alleli di *Hsp83* sull'oogenesi.

La maggior parte degli alleli mutati di *Hsp83* sono mutazioni puntiformi che generano sostituzioni amminoacidiche, in grado di alterare la funzionalità del gene. Tutti questi alleli sono letali in omozigosi, ma riescono a complementare tra loro quando le loro mutazioni cadono in regioni differenti del gene: alcune combinazioni alleliche trans-eterozigotiche producono infatti adulti vitali, sia maschi che femmine, con un fenotipo sterile o debolmente fertile (Yue *et al.* 1999).

Per comprendere l'effetto di una marcata diminuzione di Hsp90 nel processo di oogenesi, è stata analizzata la struttura di camere ovariche derivate da mosche con genotipo etero-allelico per *Hsp83*. Gli alleli utilizzati per questa analisi sono stati *Hsp83^{e6A}*, che presenta una mutazione puntiforme che causa la sostituzione della fenilalanina in posizione 592 con una serina, e *Hsp83^{19F2}*, che presenta una mutazione puntiforme che causa la sostituzione di una cisteina in posizione 48 con una arginina. Tali alleli sono stati scelti in quanto la loro combinazione, in trans-eterozigosi, genera mosche vitali e sterili. Per ottenere questo genotipo trans-eterozigote, è stato necessario incrociare mosche

con singoli alleli mutati e identificare nella loro progenie quelli mancanti del marcatore dominante visibile portato dal cromosoma bilanciante. Questa operazione è stata resa difficile dal fatto che la suddetta combinazione etero-allelica presenta una vitalità inferiore all'1% (Yue *et al.* 1999). È stato quindi, necessario analizzare un numero elevato di individui nella progenie. In figura 15 è mostrato il fenotipo ovarico di mutanti trans-eterozigoti $Hsp83^{e6A}/Hsp83^{19F2}$; femmine con questo genotipo sono sterili e non depongono uova. La maggior parte degli ovariooli raggiunge gli stadi tardivi dell'oogenesi, mostrando una struttura cromosomica delle cellule nutrici inalterata (Figura 13A); tuttavia si osserva un difetto pronunciato nella fase di trasferimento del citoplasma dalle cellule nutrici all'oocita. A causa del blocco di questo processo, i nuclei delle cellule nutrici non riescono a regredire e persistono fino al completamento dell'oogenesi, quando il processo di formazione del corion dell'uovo culmina nella sintesi delle appendici dorsali (strutture necessarie alla respirazione del futuro embrione). Inoltre, alla fine dell'oogenesi, l'uovo maturo, posizionato posteriormente, acquista una morfologia a "tazza" e risulta essere molto più piccolo in dimensioni (Figura 13B e C).

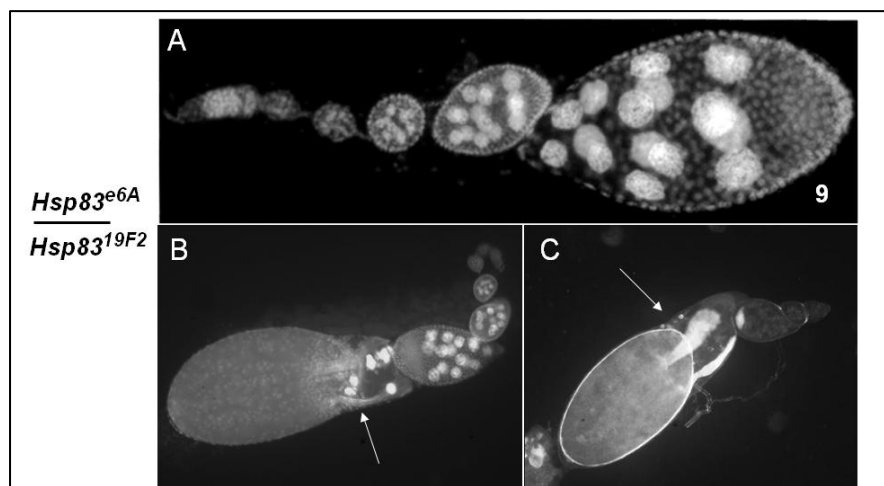


Figura 13. Analisi fenotipica di mutanti trans-eterozigoti per *Hsp83*. La progenie trans-eterozigote per gli alleli *Hsp83^{e6A}* e *Hsp83^{19F2}*, derivante dall'incrocio di mosche mutanti per i singoli alleli ed analizzata per alterazioni del fenotipo ovarico. La morfologia dei nuclei delle cellule nutrici risulta inalterata sino agli stadi tardivi dell'oogenesi (il numero 9 indica lo stadio di sviluppo della camera ovarica) (A). Tuttavia, alla formazione del chorion dell'uovo e delle appendici dorsali (indicate dalle frecce), alcuni nuclei delle cellule nutrici risultano ancora evidenti e non degenerati, suggerendo un blocco nel processo di trasferimento del citoplasma dalle cellule nutrici all'oocita (B e C). I pannelli A e B mostrano microfotografie in fluorescenza di ovariole colorate con Hoechst; il pannello C mostra l'immagine di un ovariole preso con microscopia in campo scuro. Le immagini non sono in scala.

4.3 Interazione genetica tra *cup* ed *Hsp83*.

Per comprendere il ruolo della associazione fisica tra le proteine Hsp90 e Cup durante l'oogenesi, abbiamo quindi deciso di condurre un'analisi genetica *in vivo*. Lo studio di una possibile interazione tra due geni implica la generazione di ceppi di *Drosophila* il cui genotipo rechi alleli mutati di entrambi i geni

Data la letalità in omozigosi degli alleli di *Hsp83*, sono stati inizialmente generati soltanto ceppi con un "background" genetico omozigote per *cup* ed eterozigote per *Hsp83* (*cup/cup;Hsp83/+*): per questo approccio, sono stati utilizzati diversi alleli mutanti di *cup* e di *Hsp83*, ed è stata analizzata quindi ogni possibile alterazione del fenotipo ovarico associato all'ipomorfismo degli alleli di *cup* (Figura 14).

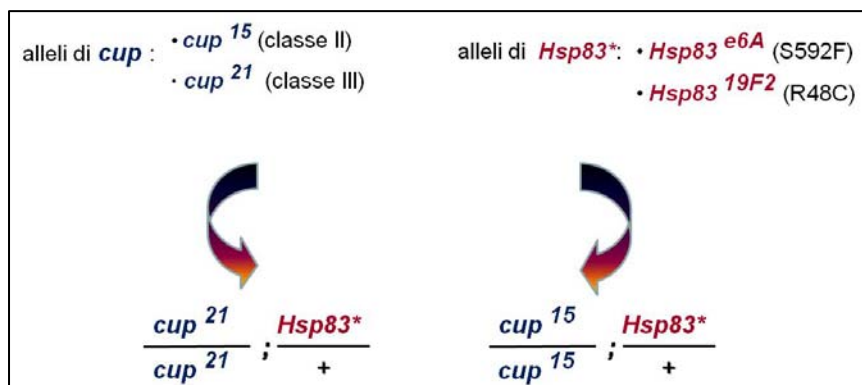


Figura 14. Rappresentazione schematica dei genotipi analizzati per lo studio dell'interazione genetica tra *cup* ed *Hsp83*. Lo schema identifica sia il cromosoma II (in cui è localizzato *cup*) che il cromosoma III (in cui è localizzato *Hsp83*).

Per ottenere mosche con suddetto genotipo, è stato necessario fare i seguenti incroci:

1. *cup**/*Cy*;+/+ X *Sp*/*Cy*;MKRS/TM2 = *cup**/*Cy*;+/TM2
2. *cup**/*Cy*;+/TM2 X *Sp*/*Cy*;MKRS/TM2 = *cup**/*Cy*;MKRS/TM2
3. +/+;*Hsp83**/TM3 X *Sp*/*Cy*;MKRS/TM2 = +/*Cy*;Hsp83*/TM2
4. +/*Cy*;Hsp83*/TM2 X *Sp*/*Cy*;MKRS/TM2 = *Sp*/*Cy*;Hsp83*/TM2
5. *cup**/*Cy*;MKRS/TM2 X *Sp*/*Cy*;Hsp83*/TM2 = *cup**/*cyo*;Hsp83*/TM2
6. *cup**/*Cy*;Hsp83*/TM2 X *cup**/*Cy*;+/+ = *cup**/*cup**;Hsp83*/+

Cy, *Sp*, *MKRS*, *TM3* e *TM2* rappresentano cromosomi bilanciatori, associati ad un marcatore fenotipico, utilizzati per mantenere stabili le mutazioni in eterozigosi, grazie alla loro proprietà di impedire la ricombinazione tra cromosomi omologhi.

Gli alleli di *cup* sono suddivisi in tre classi in relazione al grado di severità del fenotipo ovarico (Keyes e Spradling 1997). Questi alleli sono tutti ipomorfi (al momento non esistono infatti alleli di *cup* nulli) e vitali in omozigosi. Gli alleli utilizzati di *Hsp83* contengono mutazioni puntiformi, letali in omozigosi, e con una vitalità in trans-eterozigosi minore del 1% (Yue

et al. 1999). Gli alleli mutati di entrambi i geni si comportano invece come wild-type in eterozigosi.

In prima analisi sono state studiate ovaie derivate da femmine omozigoti per l'allele *cup*²¹ (come rappresentante della classe III degli alleli deboli di *cup*) le quali contengono ovaroli che producono tipiche uova a forma di tazza ("cup-shaped") con oociti non sviluppati, che non riescono ad occupare l'intera camera ovarica. Successivamente sono state analizzate ovaie derivate da femmine omozigoti per l'allele *cup*¹⁵ (come rappresentante della II classe di alleli medio-forti di *cup*), le quali mostrano un arresto precoce dell'oogenesi (intorno agli stadi 7-8). Entrambi i suddetti alleli sono stati analizzati in combinazione con due diversi alleli di *Hsp83*: *Hsp83*^{e6A} (sostituzione della fenilalanina in posizione 592 con una serina) e *Hsp83*^{19F2} (sostituzione di una cisteina in posizione 48 con una arginina). In Figura 15 sono mostrate microfotografie, acquisite in ottica Nomarski (pannelli a sinistra), che permettono l'analisi della struttura macroscopica delle ovaie, e microfotografie, acquisite in fluorescenza (pannelli a destra), di camere ovariche colorate con Hoechst, un colorante del DNA, che ci permette di analizzare la struttura nucleare delle cellule che compongono le camere ovariche in via di sviluppo.

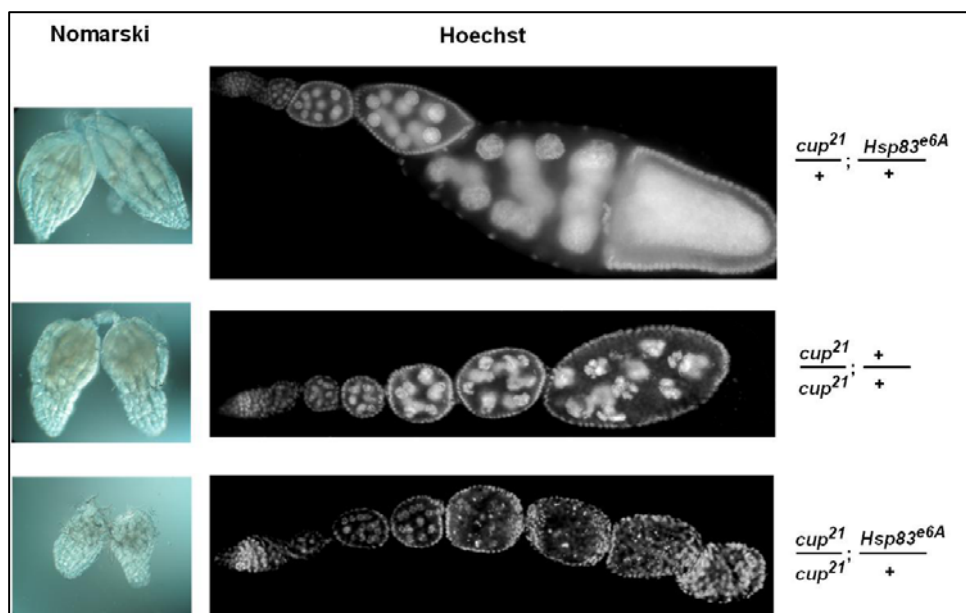


Figura 15. Analisi morfologica di ovaie derivanti da mutanti omozigoti di cup^{21} con una ridotta attività di $Hsp83$ (allele $e6A$). A sinistra, ciascun pannello mostra microfotografie di ovaie intere acquisite in ottica Nomarski. A destra, ciascun pannello mostra microfotografie in fluorescenza di camere ovariche colorate con Hoechst per evidenziare la morfologia dei nuclei (tutte le immagini sono state prese allo stesso ingrandimento).

Ovaie derivanti da mosche $cup^{21}/cup^{21}; Hsp83^{e6A}/+$ sono sensibilmente più piccole di dimensioni rispetto ad ovaie cup^{21}/cup^{21} ed ancora di più rispetto ad ovaie doppio eterozigoti ($cup^{21}/+; Hsp83^{e6A}/+$) che rappresentano il nostro controllo wild-type: ciò suggerisce un difetto di crescita delle ovaie (Figura 15, pannelli a sinistra). Inoltre, la riduzione dell'attività di $Hsp90$ in mutanti omozigoti cup^{21} causa un drammatico peggioramento nello sviluppo delle camere ovariche: si osserva, infatti, un blocco precoce dello sviluppo delle camere ovariche (l'arresto avviene intorno allo stadio 4-5), ed una degenerazione precoce dei nuclei delle cellule nutrici, la cui cromatina appare già alterata agli stadi 2-3 e quasi completamente distrutta dallo stadio 4 in poi (Figura 15, pannelli a destra).

Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando l'allele 19F2 di $Hsp83$ (Figura 16). In dettaglio, ovaie derivate da mosche $cup^{21}/cup^{21}; Hsp83^{19F2}/+$

hanno un difetto di crescita meno pronunciato rispetto ad ovaie di mosche $cup^{21}/cup^{21};Hsp83^{e6A}/+$ (Figura 16, pannelli a sinistra). I difetti più vistosi sono stati osservati, invece, a livello della struttura delle camere ovariche. Oltre all'arresto precoce dello sviluppo intorno ad uno stadio 4, osservato in gran parte degli ovariooli, i difetti riguardano soprattutto la gemmazione dal germario: le camere infatti non riescono a fuoriuscire correttamente dal germario, risultando spesso fuse e con nuclei soprannumerari (Figura 16, pannelli a destra). Anche in questo caso le ovaie doppio eterozigoti ($cup^{21}/+;Hsp83^{19F2}/+$) per i due alleli hanno costituito il nostro controllo wild-type.

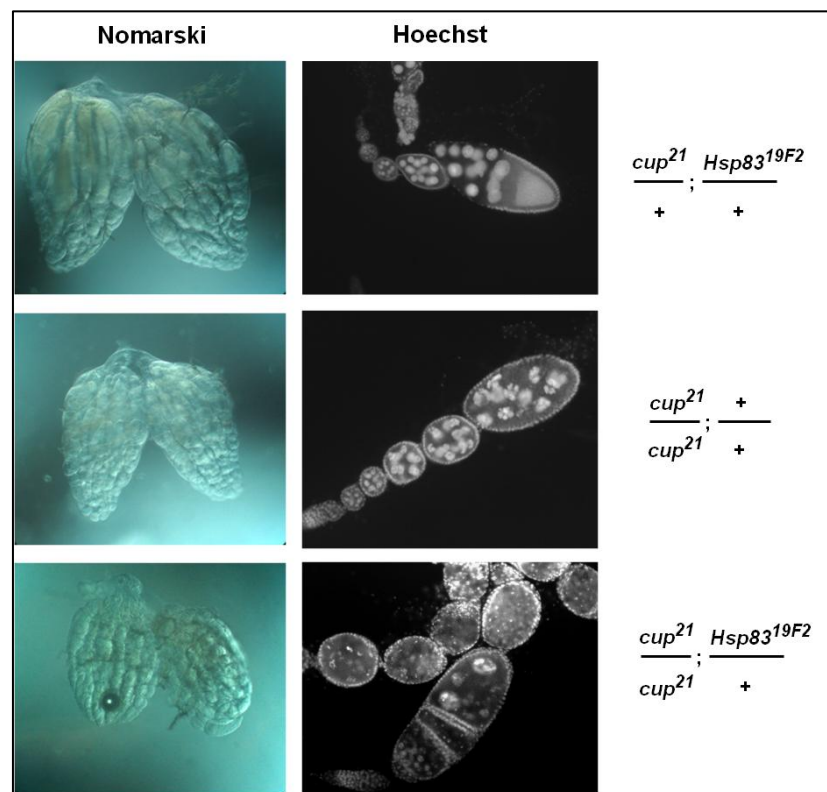


Figura 16. Analisi morfologica di ovaie derivanti da mutanti omozigoti di cup^{21} con ridotta attività di Hsp90 (allele $19F2$). A sinistra, microfotografie di ovaie acquisite in ottica Nomarski; a destra, immagini in fluorescenza di camere ovariche colorate con Hoechst. Anche in questo caso il mutante doppio eterozigote si comporta come wild-type. Tutte le immagini sono state prese allo stesso ingrandimento.

L'interazione genetica rivelata con l'uso dell'allele *cup*²¹ e i due diversi alleli di *Hsp83* (*e6A* e *19F2*) è stata osservata anche utilizzando l'allele di classe II *cup*¹⁵ (Figura 17). Anche in questo caso, i difetti morfologici ovarici, associati alla riduzione delle funzioni di Hsp90, hanno riguardato soprattutto il processo di gemmazione della camera ovarica dal germario, che si evidenzia con la formazione di camere fuse. Nel caso della combinazione *cup*¹⁵/*cup*¹⁵; *Hsp83*^{*e6A*}/+ si può, inoltre, notare una riduzione marcata delle dimensioni delle ovaie. Il controllo dell'esperimento è stato rappresentato dal mutante doppio-eterozigote (*cup*¹⁵/+; *Hsp83*^{*e6A*}/+) che si comporta come wild-type .

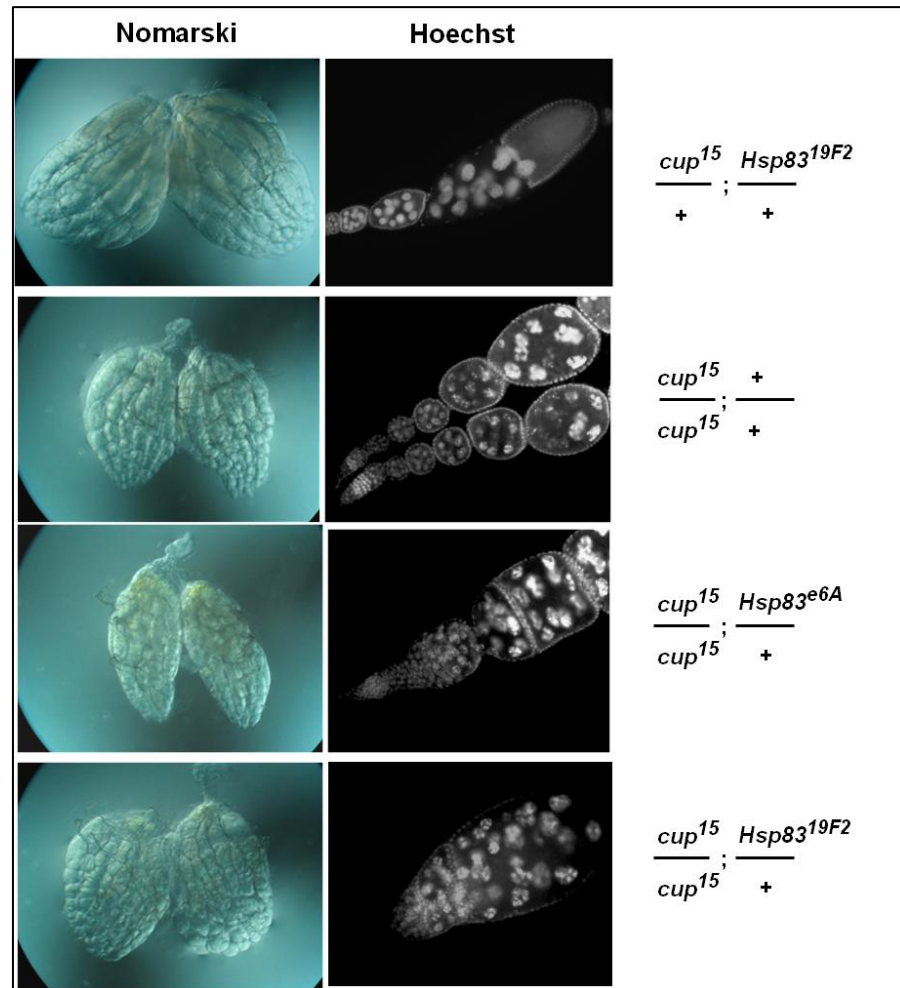


Figura 17. Analisi morfologica di ovaie derivanti da mutanti omozigoti per cup^{15} con ridotta attività di Hsp90 (alleli $e6A$ e $19F2$). A sinistra, microfotografie di ovaie, acquisite in ottica Nomarski; a destra, microfotografie in fluorescenza di camere ovariche colorate con Hoechst. Tutti i mutanti doppi eterozigoti si comportano come wild-type (il pannello in alto mostra, come esempio rappresentativo, ovaie contenenti l'allele $19F2$) Tutte le immagini sono state prese allo stesso ingrandimento.

Poiché l'interazione genetica tra *cup* ed *Hsp83* è stata dimostrata con multipli alleli dei due geni, possiamo concludere che i fenotipi ovarici risultanti non sono dovuti né ad uno specifico allele di *Hsp83*, né ad uno di *cup*. La specificità di questa interazione è confermata anche dal fatto che la riduzione dell'attività di un altro gene, che compromette lo sviluppo delle cellule germinali (*nanos*), non altera il fenotipo di *cup* (Zappavigna *et al.* 2004). In conclusione, *cup* ed *Hsp83* interagiscono geneticamente per modulare lo sviluppo della linea germinale femminile di *Drosophila*.

4.3.1 Analisi dell'interazione genetica tra *cup*, *Hsp83* ed *eIF4E*.

I dati di proteomica funzionale suggeriscono che Hsp90 interagisce non solo con Cup, ma anche con eIF4E.

Al fine di comprendere se i geni *cup*, *Hsp83* ed *eIF4E* agiscono nello stesso pathway per garantire lo sviluppo e la crescita delle ovaie, è stato analizzato se il fenotipo ovarico di mosche con un genotipo *cup*²¹/*cup*²¹; *Hsp83*^{e6A}/+ potesse essere modificato da una diminuita attività di *eIF4E*.

L'allele *eIF4E*^{P11720}, utilizzato per questo esperimento, contiene un elemento-P inserito all'interno del primo introne del gene e causa un fenotipo letale se in omozigosi (Lachance *et al.* 2002), mentre mosche eterozigoti per questo allele sono invece wild-type. La riduzione dei livelli di eIF4E aggrava i difetti ovarici associati all'ipomorfismo dell'allele *cup* (Zappavigna *et al.* 2004). In un background genetico omozigote per *cup*²¹, infatti, la ridotta attività di eIF4E genera un blocco nello sviluppo delle camere ovariche intorno allo stadio 6, mentre la morfologia dei nuclei delle cellule nutrici rimane pressoché inalterata (Figura 28, pannello B). Il fenotipo osservato in ovaie *cup*²¹/*cup*²¹ quando la funzione di Hsp90 è ridotta, risulta invece, molto più grave: l'arresto nell'oogenesi è più precoce (stadio 4) e la cromatina dei nuclei risulta chiaramente degenerata (Figura 18, pannello C).

Nel momento in cui viene ridotta la funzione di eIF4E in un background genetico *cup*²¹/*cup*²¹; *Hsp83*^{e6A}/+, non si osservano, comunque, ulteriori evidenti alterazioni fenotipiche. (Figura 18, pannello D).

Questo risultato può avere due possibili spiegazioni: da un lato, l'assenza di alterazioni fenotipiche può indicare che le vie di segnale in cui partecipano i prodotti dei geni *Hsp83* ed *eIF4E* per lo sviluppo dell'ovaio sono indipendenti tra loro; dall'altro, siccome il fenotipo ovarico espresso dal mutante *cup²¹/cup²¹;Hsp83^{e6A}/+* è già drammaticamente alterato, probabilmente una diminuzione di solo il 50% della quantità di eIF4E non è sufficiente per indurre un ulteriore peggioramento fenotipico.

Un'analisi dettagliata della potenziale interazione genetica tra *Hsp83* ed *eIF4E* è complicata dal fatto che entrambi i geni sono localizzati sul III° cromosoma. Ulteriori informazioni potrebbero quindi essere ottenute dalla generazione, attraverso l'induzione di un evento di ricombinazione genetica, di un ceppo stabile di *Drosophila* recante i due alleli mutati sullo stesso cromosoma.

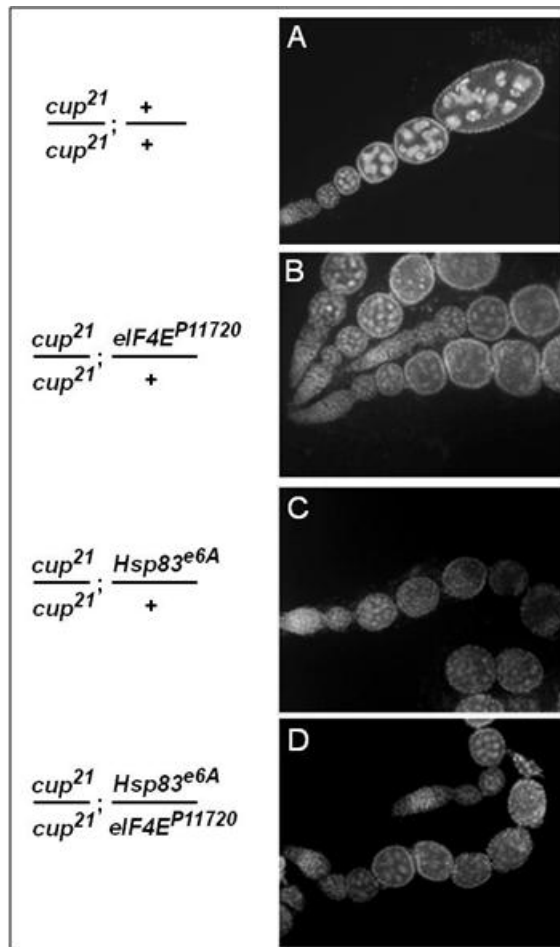


Figura 18. Interazione genetica tra *cup*, *Hsp83* ed *eIF4E*. Camere ovariche di mutanti *cup²¹/cup²¹* mostrano un blocco precoce dello sviluppo (A). In questo background, la riduzione funzionale di *eIF4E* (B) o *Hsp90* (C) provoca un peggioramento del fenotipo. La riduzione della funzionalità di *eIF4E*, in un background genetico *cup²¹/cup²¹;Hsp83^{e6A}/+*, non induce invece alcuna ulteriore alterazione fenotipica (D). Tutte le immagini sono state prese allo stesso ingrandimento.

Capitolo 5

DISCUSSIONI

Sebbene le funzioni di Hsp90 durante lo sviluppo delle cellule germinali maschili siano note, il ruolo di Hsp90 durante l'oogenesi di *Drosophila* è ancora in gran parte sconosciuto. La situazione risulta essere completamente diversa per Cup, le cui funzioni durante lo sviluppo e la crescita delle ovaie incominciano ad essere comprese con chiarezza (Piccioni *et al.* 2005a; Piccioni *et al.* 2007), mentre rimane inesplorata la sua funzione nella crescita e sviluppo dei testicoli.

La proteina Cup è nota agire da repressore traduzionale durante l'oogenesi e le prime fasi di sviluppo embrionale di *Drosophila*. In particolare Cup reprime la traduzione degli mRNA *oskar/nanos* mediante un'interazione 5'-3' mediata da complessi eIF4E-Cup-Bruno/Smaug. eIF4E lega direttamente la 7-metil-guanosina (m⁷GpppN o struttura cap) presente all'estremità 5' di tutti gli mRNA eucariotici, mentre Bruno e Smaug legano direttamente specifiche sequenze segnale presenti all'interno delle regioni 3' non tradotte (3'-UTR) degli mRNA di *oskar* e *nanos* rispettivamente. Cup quindi è capace di antagonizzare il legame di eIF4E con eIF4G, una tappa cruciale nell'inizio della traduzione eucariotica cap-dipendente.

È interessante notare come *cup* interagisca geneticamente sia con *eIF4E* che con *Hsp83* per garantire un normale svolgimento dell'oogenesi (Zappavigna *et al.* 2004; questo lavoro). Alleli mutati di *cup* e *Hsp83*, a loro volta, mostrano un'alterata localizzazione di specifici mRNA: rispettivamente, *oskar* nelle camere ovariche e *nanos* negli embrioni (Nakamura *et al.* 2004; Song *et al.* 2007). Il risultato del nostro lavoro suggerisce un legame tra queste due funzioni: la localizzazione dell'mRNA di *nanos* negli stadi precoci dell'embriogenesi dipende, infatti, dalla corretta localizzazione della proteina

Oskar. La localizzazione della proteina Oskar dipende, a sua volta, da una normale espressione spazio-temporale e traduzione del suo mRNA al polo posteriore dell'oocita in via di sviluppo. E' interessante notare come la localizzazione e la traduzione dell'mRNA di *oskar* siano eventi correlati tra loro e coordinati dalle funzioni del gene *cup*. È quindi possibile immaginare uno scenario in cui un complesso eIF4E-Cup-Hsp90 possa controllare la localizzazione/traduzione dell'mRNA di *oskar* durante l'oogenesi allo scopo di assicurare la futura localizzazione di *nanos* nell'embrionogenesi.

Tuttavia è necessario considerare che i geni *oskar* e *Hsp83* sono correlati anche nel seguente modo: durante i primi stadi dell'embrionogenesi, l'mRNA *Hsp83* di origine materna si localizza preferenzialmente al polo posteriore (Ding *et al.* 1993), attraverso un meccanismo che sembra coinvolgere una combinazione di generalizzata degradazione dell'RNA all'interno dell'embrione e di locale protezione limitata all'estremità posteriore; in particolare l'mRNA di *Hsp83* risulta degradato posteriormente in mutanti di geni, tra cui *oskar*, coinvolti nella formazione del plasma polare (in cui sono localizzati i determinanti delle cellule germinali) (Semotok *et al.* 2005). Considerata questa evidenza, è possibile ipotizzare che Hsp90 controlli, attraverso un loop a feedback positivo, la localizzazione/traduzione dell'mRNA di *oskar* nell'oocita, la cui proteina sarà poi necessaria per proteggere lo stesso messaggero di *Hsp83* nell'embrione.

Nel loro complesso queste osservazioni suggeriscono che Cup controlli la localizzazione/traduzione dell'mRNA di *oskar* attraverso l'associazione con numerose proteine, tra le quali Hsp90, che si associano in complessi funzionali sia durante l'oogenesi che l'embrionogenesi.

BIBLIOGRAFIA

- Buchner, J. 1999. *Trends Biochem Sci.* 24:136-41.
- Carbajal, M.E., J.P. Valet, P.M. Charest, and R.M. Tanguay. 1990. *Eur J Cell Biol.* 52:147-56.
- Csermely, P., T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka, and G. Nardai. 1998. *Pharmacol Ther.* 79:129-68.
- Dej, K.J., and A.C. Spradling. 1999. *Development.* 126:293-303.
- Ding, D., S.M. Parkhurst, S.R. Halsell, and H.D. Lipshitz. 1993. *Mol Cell Biol.* 13:3773-81.
- Doyle, H.J., and J.M. Bishop. 1993. *Genes Dev.* 7:633-46.
- Galasso, A., L.S. Pane, M. Russo, M.R. Grimaldi, A.C. Verrotti, S. Gigliotti, and F. Graziani. 2007. *Gene Expr Patterns.* 7:730-7.
- Gigliotti, S., G. Callaini, S. Andone, M.G. Riparbelli, R. Pernas-Alonso, G. Hoffmann, F. Graziani, and C. Malva. 1998. *J Cell Biol.* 142:1195-207.
- Grimaldi, M.R., L. Cozzolino, C. Malva, F. Graziani, and S. Gigliotti. 2007. *Genetics.* 175:1751-9.
- Keyes, L.N., and A.C. Spradling. 1997. *Development.* 124:1419-31.
- King, R.C. 1970. *Int Rev Cytol.* 28:125-68.
- Kopecek, P., K. Altmannova, and E. Weigl. 2001. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 145:39-47.
- Lachance, P.E., M. Miron, B. Raught, N. Sonenberg, and P. Lasko. 2002. *Mol Cell Biol.* 22:1656-63.
- Lange, B.M., A. Bachi, M. Wilm, and C. Gonzalez. 2000. *Embo J.* 19:1252-62.
- Lin, H., L. Yue, and A.C. Spradling. 1994. *Development.* 120:947-56.
- Mahowald, A.P., and J.M. Strassheim. 1970. *J Cell Biol.* 45:306-20.

- Nakamura, A., K. Sato, and K. Hanyu-Nakamura. 2004. *Dev Cell*. 6:69-78.
- Nelson, M.R., A.M. Leidal, and C.A. Smibert. 2004. *Embo J*. 23:150-9.
- Piccioni, F., V. Zappavigna, and A.C. Verrotti. 2005 (a). A cup full of functions. *RNA Biol*. 2:125-8.
- Piccioni, F., V. Zappavigna, and A.C. Verrotti. 2005 (b). *C. R. Biologies*. 328.
- Pisa, V., S. Gigliotti, F. Graziani and A.C. Verrotti. *Functional Development and Embryology* 1: 135-145
- Ribbert, D. 1979. *Chromosoma*. 74:269-98.
- Ritossa, F. (1962) *Experientia* 18, 571–573
- Rutherford, S., J.R. Knapp, and P. Csermely. 2007. *Adv Exp Med Biol*. 594:190-7.
- Schupbach, T., and E. Wieschaus. 1991. *Genetics*. 129:1119-36.
- Semotok, J.L., R.L. Cooperstock, B.D. Pinder, H.K. Vari, H.D. Lipshitz, and C.A. Smibert. 2005. *Curr Biol*. 15:284-94.
- Song, Y., L. Fee, T.H. Lee, and R.P. Wharton. 2007. *Genetics*. 176:2213-22.
- Spradling, A.C. (1993). pp 1-70. In: The Development of *Drosophila melanogaster*. eds. Bate, M. and Martinez Arias, A. Cold Spring Harbor Press: Long Island, NY
- Suter, B., L.M. Romberg, and R. Steward. 1989. *Genes Dev*. 3:1957-68.
- Tissieres, A., H.K. Mitchell, and U.M. Tracy. 1974. *J Mol Biol*. 85:389-98.
- van der Straten, A., C. Rommel, B. Dickson, and E. Hafen. 1997. *Embo J*. 16:1961-9.
- Verrotti, A.C., and R.P. Wharton. 2000. *Development*. 127:5225-32.
- Wharton, R.P., and G. Struhl. 1989. *Cell*. 59:881-92.
- Whitesell, L., and S.L. Lindquist. 2005. *Nat Rev Cancer*. 5:761-72.

- Wieschaus, E., and J. Szabad. 1979. *Dev Biol.* 68:29-46.
- Wilhelm, J.E., M. Hilton, Q. Amos, and W.J. Henzel. 2003. *J Cell Biol.* 163:1197-204.
- Yahara, I. 1999. *Genes Cells.* 4:375-9.
- Yue, L., T.L. Karr, D.F. Nathan, H. Swift, S. Srinivasan, and S. Lindquist. 1999. *Genetics.* 151:1065-79.
- Yue, L., and A.C. Spradling. 1992. *Genes Dev.* 6:2443-54.
- Zapata, J.M., M.A. Martinez, and J.M. Sierra. 1994. *J Biol Chem.* 269:18047-52.
- Zappavigna, V., F. Piccioni, J.C. Villaescusa, and A.C. Verrotti. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:14800-5.
- Zhao, R., M. Davey, Y.C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, and W.A. Houry. 2005. *Cell.* 120:715-27.

RINGRAZIAMENTI

*Desidero esprimere la mia più profonda gratitudine al Prof. Verrotti, mio docente guida, per aver sostenuto con entusiasmo e professionalità il mio percorso formativo, e soprattutto, per avermi trasmesso la sua passione per la *Drosophila*.*

Ringrazio il Dr. Graziani, per tutti i preziosi consigli e l'affetto che mi ha sempre dimostrato e la Dr.ssa Gigliotti, per la sua disponibilità soprattutto nelle lunghe ore trascorse al confocale.

Desidero inoltre, ringraziare il Prof. Pucci e tutto il suo gruppo, per gli esperimenti di proteomica, e la Prof.ssa Pollice, mio controrelatore, per i suggerimenti offerti per migliorare il contenuto di questa Tesi.

Un ringraziamento particolare lo devo a Federica, un riferimento per tutto, e a Cristina, una preziosa collega e soprattutto, un'amica.

Grazie di cuore a Paoletta e a Serena, per tutto il sostegno, sia pratico che morale, che mi hanno sempre offerto, e grazie agli amici della "pausa caffè", per aver reso allegre anche quelle giornate più nere.

Infine ringrazio Patrizio, per me "l'altro punto di vista", per tutto il coraggio e la forza che mi ha sempre dato, e ringrazio tutti coloro che direttamente o indirettamente hanno contribuito a rendere indimenticabile questa mia esperienza.

Viviana Pisa