

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA IN GENETICA
E MEDICINA MOLECOLARE

XXI CICLO

2005-2008

**“Ruolo del gene *minifly* nello sviluppo di
Drosophila melanogaster”**

Tutor

Ch.ma Prof.ssa Maria Furia

Candidato

Dr. Giuseppe Tortoriello

Coordinatore

Ch.mo Prof. Carmelo Bruno Bruni

Indice

Indice

Premessa	pag. 1
Introduzione	pag. 6
Sviluppo e differenziamento in <i>Drosophila melanogaster</i>	pag. 7
Struttura e specificazione dei dischi imaginali delle ali	pag. 9
La determinazione degli assi di sviluppo	pag. 10
L'ala	pag. 17
Lo sviluppo della cuticola addominale durante la metamorfosi	pag. 21
Controllo della crescita cellulare nel disco imaginale dell'ala	pag. 22
Il meccanismo della competizione cellulare	pag. 24
Scopo del lavoro	pag. 27
Il gene <i>minifly</i> di <i>Drosophila melanogaster</i>	pag. 30
Il gene <i>mfl</i> mostra una complessa organizzazione coding/non-coding	pag. 38
La discheratosi congenita: una malattia genetica	
Multi sistemica	pag. 43
Correlazioni strutturali e funzionali fra i geni appartenenti alla famiglia Cbf5/ <i>mfl</i> /DKC1	pag. 46
Risultati	pag. 52
Caratterizzazione fenotipica del mutante ipomorfo <i>mfl</i> ¹	pag. 54
Le anomalie dello sviluppo delle ali mostrate dai mutanti <i>mfl</i> ¹	pag. 59
Silenziamento del gene <i>mfl</i> mediante RNAi in vivo	pag. 63
Il silenziamento del gene <i>minifly</i> provoca una riduzione della proliferazione e della dimensione cellulare	pag. 73
L'espressione ectopica del gene <i>d-myc</i> nella zona di formazione del margine D/V del disco dell'ala è sufficiente per recuperare il fenotipo selvatico nelle linee <i>vgGAL4</i> , <i>UAS-IRmfl</i>	pag. 80
Effetti provocati dal silenziamento del gene <i>mfl</i> nei dischi imaginali dell'ala	pag. 83
Analisi di cloni mitotici omozigoti per la mutazione letale <i>mfl</i> ⁰⁵ nei dischi imaginali dell'ala	pag. 94
Strategia di espressione del gene <i>mfl</i>	pag. 101
Quantizzazione dei trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb in adulti dei due sessi	pag. 102
Quantizzazione dei trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb nei mutanti <i>mfl</i> ¹	pag. 106
Regolazione esercitata dall'oncogene <i>d-myc</i> sull'espressione di <i>mfl</i>	pag. 109
Discussione	pag. 115
Materiali e Metodi	pag. 128
Bibliografia	pag. 143

Premessa

Il completamento dei progetti di sequenziamento del genoma di numerosi metazoi è stato una delle svolte decisive dell'ultimo decennio. Le analisi genomiche, combinate alla compilazione di estensive banche dati di Expressed Sequence Tags (ESTs), ha offerto agli scienziati una visione pressoché completa del proteoma di queste specie. Studi concernenti l'evoluzione molecolare delle proteine e delle loro sequenze codificanti possono adesso essere condotti con una ricchezza di dati senza precedenti. Questi studi rappresentano un contributo importante per la comprensione delle basi molecolari dello sviluppo e del differenziamento. Nonostante l'enorme varietà morfologica che accompagna l'evoluzione e la divergenza delle specie, molti dei meccanismi coinvolti nell'ontogenesi di una specie sono simili, e spesso comuni a quelli di altre specie. Sono esemplificativi in tale senso i disegni di Haeckel (1874) che, per quanto controversi, rendono bene un concetto comunque accettato dalla comunità scientifica: l'ontogenesi ricapitola la filogenesi. Questi disegni, esemplificativi dei primi studi di embriologia, si limitavano all'osservazione e alla descrizione ("embriologia descrittiva"), mancando gli strumenti necessari alla manipolazione delle cellule. Non appena ciò fu possibile, si poté procedere alle manipolazioni sperimentali. Una parte importante dei progressi dell'embriologia sperimentale è però basata su dati genetici, forniti dall'isolamento e dalla caratterizzazione di mutanti che alterano lo sviluppo di alcuni organismi

modello, largamente utilizzati tutt'ora: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, *Mus musculus*.

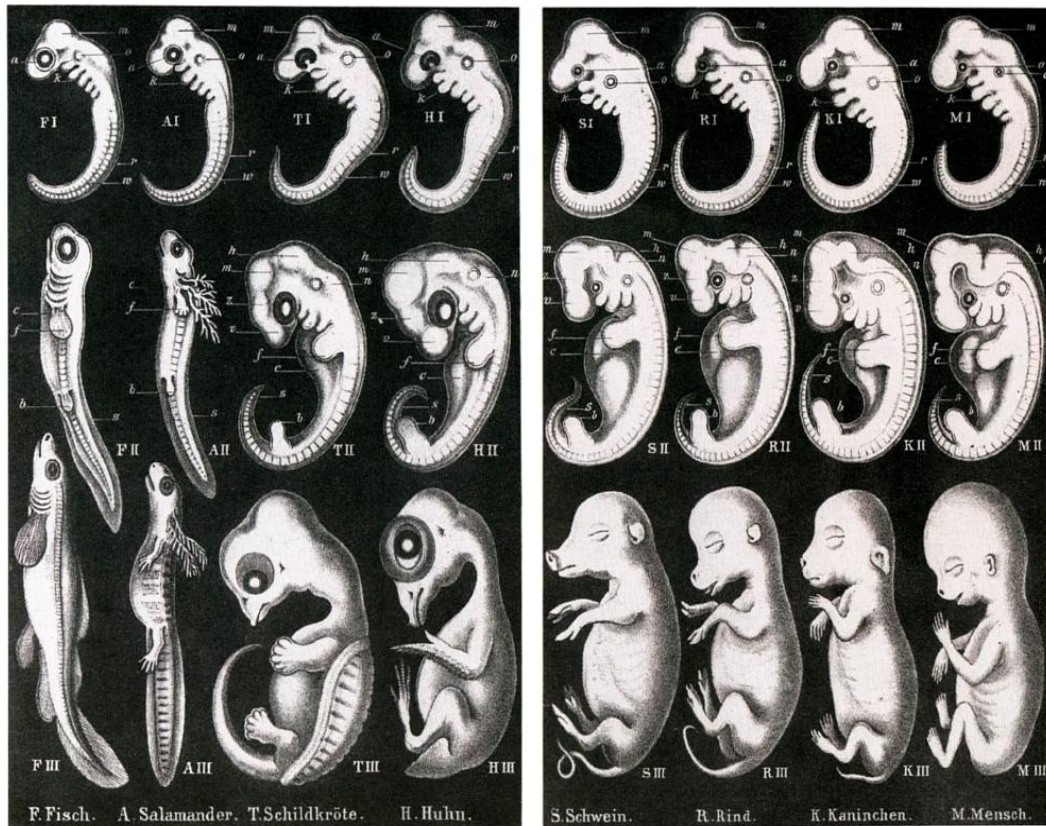


Fig. 1. L'ontogenesi ricapitola la filogenesi (da Haeckel, 1874).

La mole di dati genetici disponibile per la *Drosophila* ancora oggi supera di gran lunga quella disponibile per qualunque altro organismo pluricellulare. Dai primi dati, forniti dagli studi condotti nel laboratorio di Thomas Hunt Morgan nel primo decennio del ventesimo secolo, ad oggi, la *Drosophila* continua a rappresentare l'organismo modello ideale per gli studi di genetica dello sviluppo. Le ragioni di questo successo dipendono in larga parte dalle peculiari caratteristiche di questo moscerino, ma in parte non trascurabile anche dalla lungimiranza degli scienziati che per primi li scelsero come

oggetto dei loro studi. All'inizio, la *Drosophila* è stata probabilmente preferita per la notevole facilità di allevamento, il breve tempo di generazione, la numerosa progenie ed il vantaggio di possedere in molti tessuti larvali particolari cromosomi, i cromosomi politenici, le cui dimensioni giganti facilitano l'osservazione citologica. Le tecniche di incrocio e di riconoscimento dei mutanti sono facili da apprendere, ma quello che ha realmente dato valore aggiunto al rapido progredire dell'analisi genetica è stata la possibilità, per ogni scienziato, di accedere in modo relativamente libero ai mutanti e alle tecniche descritti da ogni altro ricercatore. Sin dall'inizio, ogni nuovo mutante è stato considerato proprietà dell'intera comunità scientifica, ed il laboratorio di Morgan istituì una rete di scambio mediante la quale ogni ricercatore poteva chiedere ed ottenere i mutanti di suo interesse. Attualmente, il solo stock center di Bloomington (Indiana-USA), istituito grazie agli sforzi iniziali di Morgan, Sturtevant e Bridges nel 1928, può vantare una collezione di oltre 23.250 stock, tutti completamente a disposizione dell'ampia comunità scientifica dei drosophilisti che ne possono prendere visione attraverso il sito web <http://flystocks.bio.indiana.edu>, i cui dati sono in continuo aggiornamento.

Per molto tempo, la *Drosophila* ha rappresentato un sistema modello per studi genetici, ma anche un organismo su cui risultava difficile studiare l'embriologia. Per quanto Jack Schultz e altri avessero cercato di correlare la genetica della *Drosophila* al suo sviluppo, gli embrioni del moscerino si

dimostrarono troppo complessi e difficili da maneggiare, non essendo abbastanza grandi per essere manipolati sperimentalmente, né abbastanza trasparenti per essere osservati con facilità. Solamente quando le tecniche di biologia molecolare permisero ai ricercatori di identificare e manipolare geni ed RNA, fu possibile correlare i dati genetici a quelli dello sviluppo. La sinergica combinazione dei dati molecolari e genetici con le analisi embriologiche ha contribuito fortemente a stabilire molte delle nozioni fondamentali su cui oggi si basa la genetica dello sviluppo e la biologia evolutiva.

In *Drosophila*, l'analisi genetica ha riscontrato un eccezionale successo, e la caratterizzazione funzionale e molecolare dei geni del moscerino ha consentito e facilitato studi paralleli sui vertebrati accelerando, di conseguenza, la comprensione di importanti pathway biologici evolutivamente conservati. Considerato che circa il 60-70% dei geni responsabili di malattie umane sono conservati nella *Drosophila*, tali studi rappresentano un importante contributo verso la comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base di quei complicati processi responsabili dell'insorgenza e dello sviluppo di numerose e complesse patologie.

Introduzione

Sviluppo e differenziamento in Drosophila melanogaster

L'acquisizione del destino cellulare, in un pattern spaziale e temporale, è uno degli aspetti centrali dello sviluppo. Durante l'embriogenesi della *Drosophila* il momento della segmentazione del blastoderma rappresenta un buon modello per lo studio di tali meccanismi. Infatti, durante questo processo le cellule vengono assegnate ad un particolare destino che dipende dalla loro posizione lungo gli assi anteroposteriore (A/P) e dorsoventrale (D/V) dell'embrione, attraverso la generazione di progressivi, gerarchici ed altamente regolati domini spaziali di espressione genica (Pankratz and Jackle, 1993). L'attività modulare di regioni regolatorie che conferisce a ciascun gene la capacità di essere attivato o represso in siti particolari e l'integrazione, in queste regioni, di differenti combinazioni di fattori trascrizionali, rappresentano il punto chiave della regolazione durante la segmentazione. Tuttavia, la segmentazione non richiede la proliferazione cellulare, che invece rappresenta un aspetto necessario per gran parte dei processi morfogenetici durante lo sviluppo dell'animale.

Gran parte degli organi e delle strutture esterne del moscerino adulto derivano dalla proliferazione e dal differenziamento di corpi appiattiti e tondeggianti, avvolti in sottili sacche epiteliali, già presenti nelle larve, che prendono il nome di dischi imaginali (Cohen, 1993); ciascun disco, o coppia di dischi, è localizzato in posizioni precise all'interno del corpo larvale (fig. 2). I dischi

immaginali si formano durante l'embriogenesi in punti di intersezione tra i gradienti dorsoventrali, anteroposteriori e segmentali e costituiscono gruppi di cellule progenitrici che prolifereranno abbondantemente durante lo sviluppo larvale per formare il disco "maturo" (Bate and Martinez-Arias, 1991; Goto and Hayashi, 1997). Al contrario del processo di segmentazione, la morfogenesi degli organi imaginali richiede un'ordinata proliferazione cellulare. La proliferazione cellulare e l'acquisizione di un preciso destino cellulare da parte di ogni singola cellula coinvolge sia i meccanismi di *signalling* cellulare sia l'espressione localizzata di geni cellula-(tessuto)-specifici.

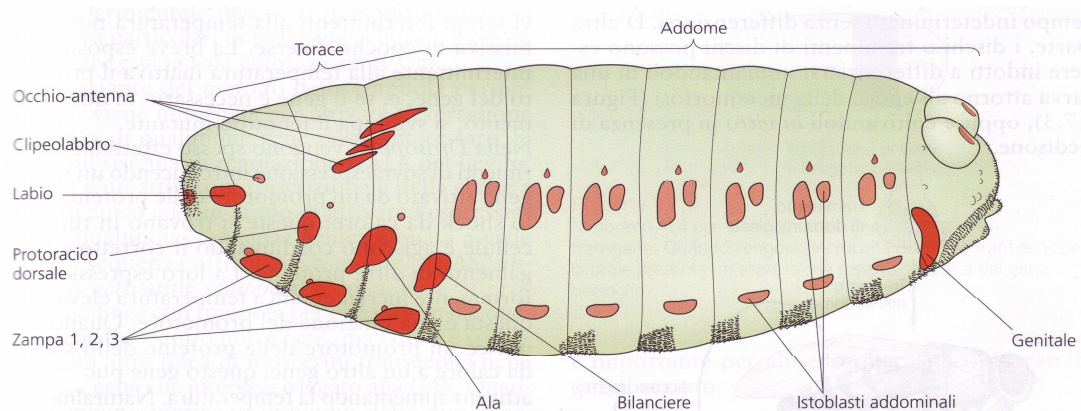


Fig. 2. Dischi imaginali. Localizzazione dei dischi imaginali in una larva di terzo stadio

Lo sviluppo dei dischi imaginali avviene progressivamente ed i differenti territori del disco acquisiscono particolare identità man mano che aumentano le sue dimensioni (Williams et al., 1993). Nella formazione di ciascun organo, le cellule dei dischi rappresentano un classico esempio di cellule "determinate" ma non ancora differenziate. Fin dall'inizio, il disco

immaginale possiede quindi le informazioni di uno schema interno, ereditato dai campi di morfogeni; tale schema stabilisce precocemente la polarità anteroposteriore e dorsoventrale.

Struttura e specificazione dei dischi imaginali delle ali

I dischi imaginali delle ali sono localizzati nel mesotorace, e già nell'embrione sono attraversati da un confine lineare o di "compartimento" che ne delimita la regione anteriore da quella posteriore. Durante l'embriogenesi, l'azione dei geni della *segment-polarity* definisce i confini di restrizione dei parasegmenti e le informazioni posizionali necessarie per la specificazione dei futuri dischi imaginali (Cohen, 1990). Il gene selettore *engrailed* presenta un profilo d'espressione che lo localizza nella regione anteriore di ciascun parasegmento e nella regione posteriore del disco imaginale dell'ala, suggerendo una sua derivazione da due distinti parasegmenti (Kornberg, 1981a, 1981b; Kornberg et al., 1985; Di Nardo et al., 1985; Ingham, 1985). Il primordio del disco imaginale è costituito da circa 40 cellule fondatrici, identificate mediante l'espressione di marker specifici. La principale sorgente in grado di originare quei segnali di posizione indispensabili alle cellule fondatrici è l'espressione del gene *wingless (wg)*, in assenza della quale non si formano queste strutture imaginali (Cohen et al., 1993). Numerose evidenze dimostrano che il disco dell'ala si origina ventralmente come una propaggine del disco relativo al secondo paio di

zampe (Averof et al., 1997). L'attivazione di differenti geni selettori separa precocemente le due strutture rendendole indipendenti, per cui il disco dell'ala cresce dorsalmente, mentre le zampe ventralmente.

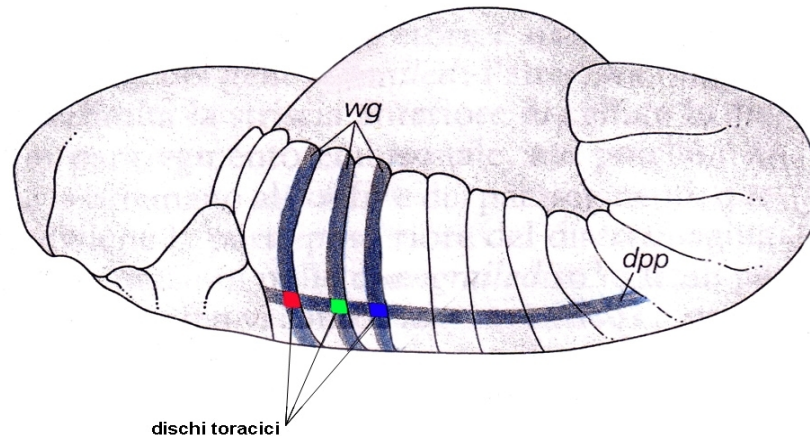


Fig. 3. Formazione dei dischi imaginali toracici nell'embrione. L'intersezione dei morfogeni *wg* e *dpp* determina la formazione dei dischi toracici, da cui derivano il primo paio di zampe (rosso), le ali ed il secondo paio di zampe (verde), le altere e terzo paio di zampe (blu).

La determinazione degli assi di sviluppo

Alla fine dello sviluppo larvale il disco dell'ala è costituito da un epitelio colonnare pseudostratificato, da cui origina l'effettivo disco imaginale maturo, e da un epitelio squamoso che forma la membrana peripodiale. Il primo dà origine alle strutture del torace (notum e pleura) ed al complesso dell'ala/hinge (struttura di congiunzione tra ala e torace), il secondo dà origine ad un sottile velo epiteliale che andrà a suturare le strutture che derivano da dischi imaginali adiacenti (Bryant, 1975).

I compartimenti del disco imaginale dell'ala furono originariamente definiti da Antonio Garcia-Bellido nel 1973, come i componenti basali del piano di sviluppo corporeo. In termini genetici, i compartimenti rappresentano la parte

di un organo che origina dalla stessa genealogia (*lineage*) cellulare. Sin dai primi stadi dell'embriogenesi, a seguito dell'espressione dei geni *pair-rule* e del differenziamento specifico di ciascun segmento, il primordio del disco imaginale dell'ala contiene già due differenti *lineage* cellulari che formeranno rispettivamente il compartimento anteriore e posteriore. Il gene *engrailed* (*en*), infatti, si esprime precocemente nella metà posteriore del disco, stabilendo un asse anteroposteriore che riflette il pattern di espressione di questo gene nel parasegmento embrionale dal quale il disco deriva. Garcia-Bellido nel 1973 dimostrò, mediante analisi clonale, l'esistenza di un confine di restrizione tra la regione anteriore e quella posteriore del disco dell'ala che i cloni cellulari non erano in grado di attraversare durante la fase proliferativa. L'esistenza di questi confini di restrizione nei dischi imaginali ha permesso di formulare dei modelli di sviluppo riguardo al programma genetico che guida la morfogenesi. In particolare, i margini dei compartimenti furono considerati gli "organizzatori" del programma di sviluppo, in quanto responsabili del corretto raggiungimento sia delle dimensioni che della forma dell'ala, mediante l'attivazione di specifici geni selettori. L'espressione di questi geni consente il rilascio di fattori diffusibili, definiti per l'appunto "morfogeni", rilasciati in maniera graduale e distribuiti secondo uno specifico gradiente che decresce allontanandosi dal confine di compartimento (per esempio *dpp* o *wingless*); ciò genera dei precisi segnali di posizione che le cellule rilevano in base alla quantità di uno o più fattori presenti. A differente distanza dal

marginale è disponibile una diversa dose di questi fattori per cui, questi gradienti dirigono la proliferazione, la specificazione e la sopravvivenza cellulare (Wolpert, 1969; 1971).

Oltre alla caratterizzazione del margine A/P, furono individuati anche altri confini: il confine dorso/ventrale (D/V), determinato dall'attività di *Notch* e *wingless*, e il confine prossimo/distale (P/D), un po' meno canonico, ma che separa la lamina alare dall'hinge e l'hinge dal notum (fig. 4).

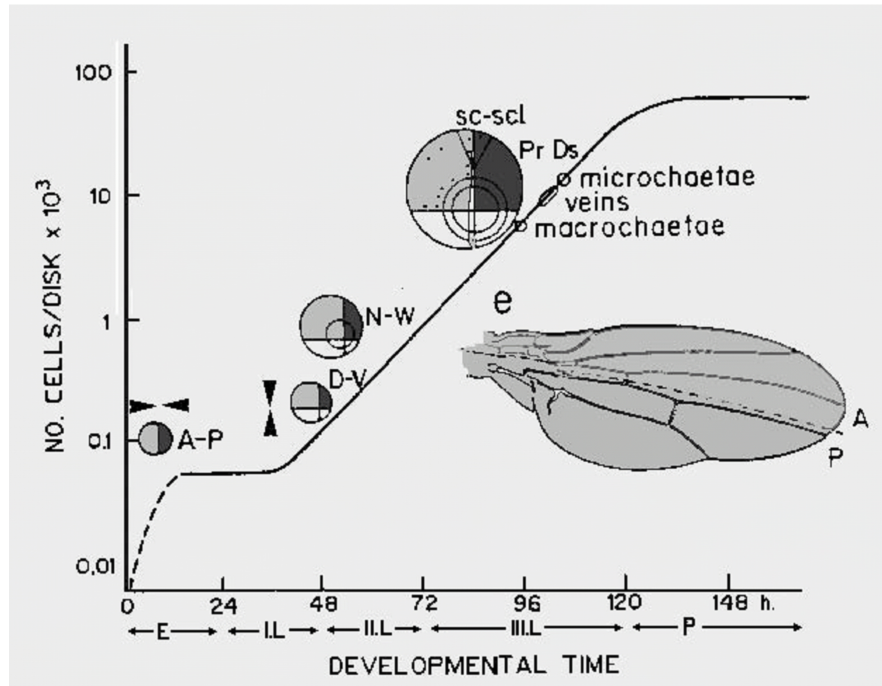


Fig. 4. Restrizioni clonali e tempi di sviluppo dell'ala (da Garcia-Bellido and Marriam, 1991).

Asse antero/posteriore (A/P)

Come già accennato, uno dei primi eventi nello sviluppo del disco imaginale è la definizione della polarità antero-posteriore a seguito dell'attivazione del gene *engrailed*. Questo gene è precocemente espresso in tutto il compartimento posteriore ed induce l'espressione di *hedgehog* (*hh*) (Tabata

and Kornberg, 1994; Zecca et al., 1995). La proteina *hh* è un morfogeno che agisce a breve distanza, ed è in grado di diffondere in una linea di cellule lungo il bordo A/P, laddove induce l'espressione di un altro morfogeno essenziale, *Decapentaplegic (Dpp)*, che porta alla determinazione del margine A/P (Tabata and Kornberg, 1994; Zecca et al., 1995; fig. 5).

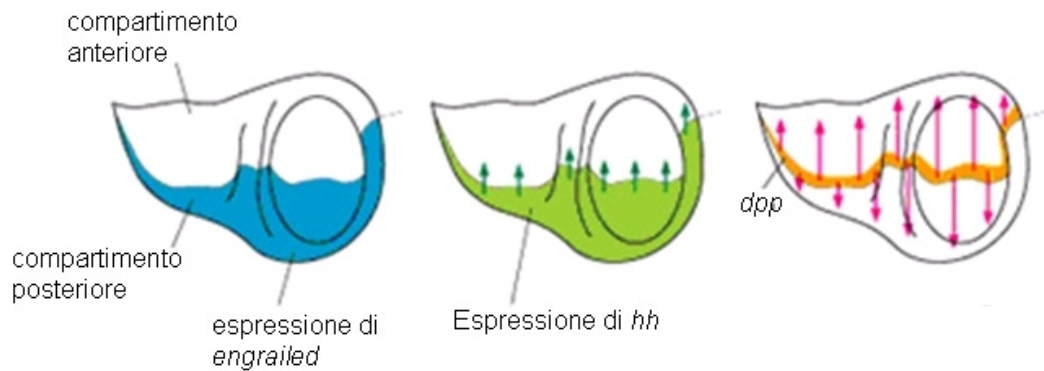


Fig. 5. Formazione del compartimento A/P. L'espressione di *en* (prima) e di *hh* (dopo) nella regione posteriore del disco fa sì che la diffusione a breve distanza della proteina *hh* nelle vicine cellule del compartimento anteriore attivi *Decapentaplegic (Dpp)*. *Dpp* comincia a diffondere, sia posteriormente che anteriormente, formando un gradiente.

Asse dorso/ventrale (D/V)

La polarità dorso/ventrale rappresenta, in successione temporale, il secondo asse che viene formato. La definizione di questo asse avviene all'inizio del secondo stadio larvale (Garcia-Bellido et al., 1973). Il margine di restrizione D/V deriva dall'attività del gene selettore *apterous (ap)* che si esprime unicamente nel compartimento dorsale (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993; Blair, 1993). La proteina *ap* attiva nel compartimento dorsale *fringe* (Irvine and Wieschaus, 1994), un fattore di secrezione che induce l'attivazione di *Serrate* (Kim et al., 1995), un ligando di *Notch* (Rebay et al., 1991) il quale, a sua volta, inibisce l'espressione di *Delta*, un altro ligando di *Notch* (de Celis

et al., 1996; Milàn and Cohen, 2000). L'attività glicosil-trasferasica di *fringe* modifica, attivandolo, il recettore *Notch*, inibendo la sua affinità per *Serrate* e incrementando la sua affinità per *Delta* che, a sua volta, si mostra più affine per *Notch*. Come risultato finale, *Serrate* è inibito dorsalmente dall'attività di *fringe*, mentre ventralmente *Delta* non può attivare *Notch*. Ne consegue che l'unica regione in cui *Serrate* e *Delta* possono entrambe attivare *Notch* è esattamente al confine D/V in due sole linee di cellule (de Celis et al., 1996). *Notch* può quindi attivare l'espressione di *wingless*, *cut* e *vestigial* portando alla formazione del confine di restrizione D/V e definendo i presuntivi territori del disco (fig. 6).

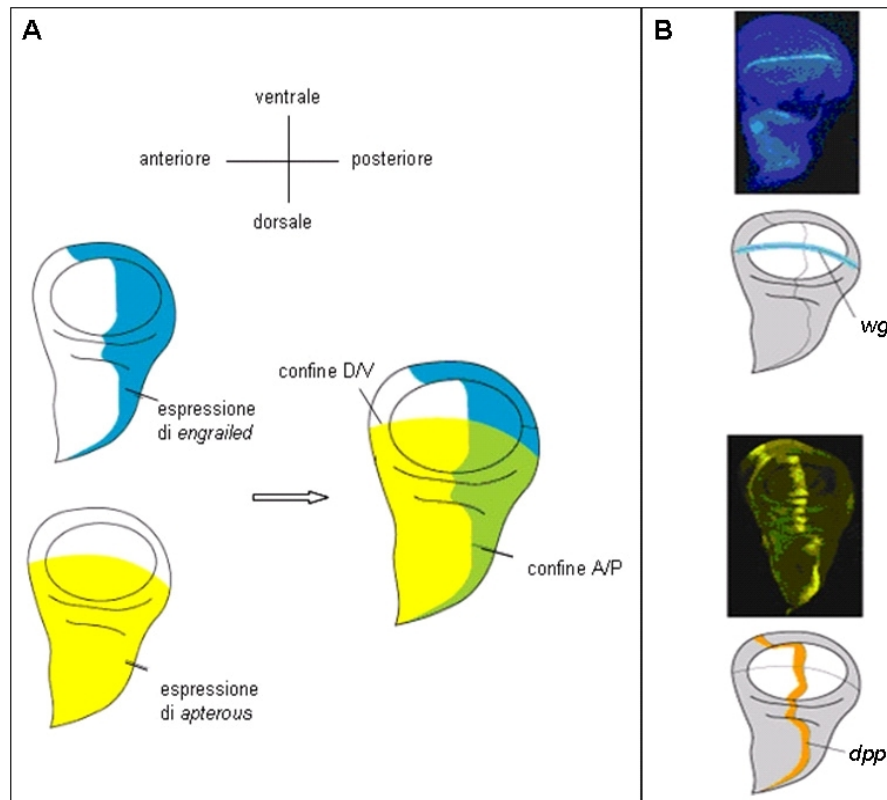


Fig. 6. Il disco imaginale dell'ala è organizzato in compartimenti distinti e definiti. (A) L'espressione precoce dei geni *engrailed* e *apterous* è così netta da dividere l'ala in quattro quadranti, a cui corrisponderanno future regioni della lamina alare; tali quadranti rappresentano dei compartimenti circoscritti e tra loro non può più esserci scambio di cellule. (B) Rappresentazione schematica e mediante localizzazione per immunofluorescenza di *wg* e *dpp* che indicano rispettivamente il margine D/V e A/P.

Asse prossimo/distale (P/D)

Sebbene il meccanismo che determina lo sviluppo e la formazione degli assi A/P e D/V sia stato ben caratterizzato, il processo di realizzazione dell'asse P/D resta invece ancora piuttosto oscuro. L'origine delle strutture lungo questo asse (notum, hinge e wing blade) è dovuta alla progressiva attivazione/repressione di una moltitudine di geni selettori in risposta alla formazione degli assi A/P e D/V. Le cellule che delineano i confini dei compartimenti finiscono per creare delle ristrette bande di cellule specializzate che consentono di costruire uno schema più dettagliato dell'ala grazie alla generazione di un'attività morfogena (*dpp* lungo il margine A/P e *wg* lungo quello D/V). Il regolare patterning dell'ala richiede l'attività del morfogeno *wg*; infatti, la riduzione della sua funzione determina la perdita totale delle strutture dell'ala ed una duplicazione del notum (Morata and Lawrence, 1977). L'espressione di *wg* comincia nel quadrante ventrale-anteriore all'inizio del secondo stadio larvale ed è estremamente dinamica durante le successive fasi (Couso et al., 1993; Ng et al., 1996). A questo stadio, dopo la formazione degli assi A/P e D/V, interviene un'ulteriore suddivisione lungo l'asse P/D che suddivide il disco dell'ala nelle regioni del notum, hinge e wing blade (Klein, 2001). L'attività di *wingless*, infatti, reprime il gene omeotico *teashirt* coinvolto nella formazione della parete del corpo ed attiva l'espressione di *vestigial* (Wu and Cohen, 2002; fig. 7).

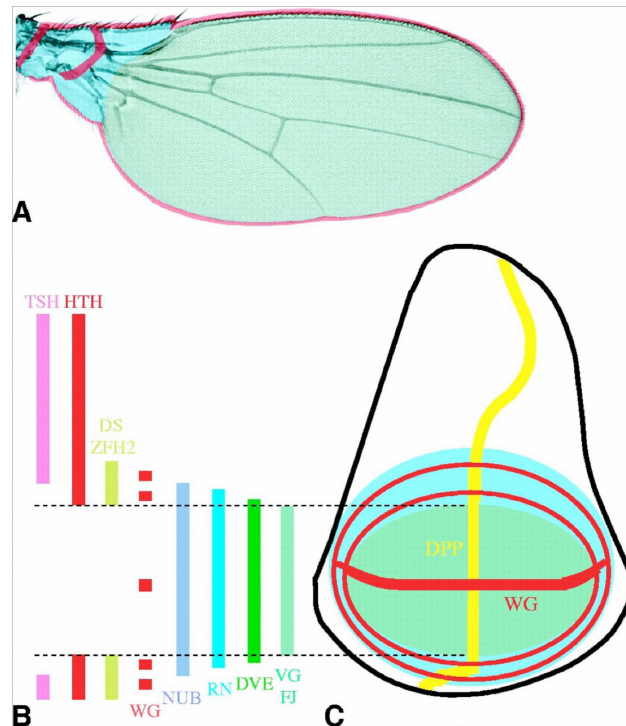


Fig. 7. Determinazione dell'asse prossimo/distale. (A) Ala adulta: regione distale (verde), regione prossimale e hinge (azzurro), cellule che esprimono *wg* (rosso). (B) Domini di espressione genica lungo l'asse P/D. (C) Disco immaginale dell'ala colorato in base ai presuntivi territori dell'ala adulta mostrati in A (da Cho and Irvine, 2004).

Durante il secondo stadio larvale, *wingless* viene represso nel compartimento dorsale e posteriore dall'attività di EGFR (Baonza et al., 2000), che promuove la specificazione del notum nella regione prossimale, grazie all'attivazione del complesso *Iroquois* (Iro-C) (Zecca and Struhl, 2002a,b); l'espressione ectopica di EGFR in questo stadio causa una duplicazione del notum simile a quella riscontrata dalla perdita di *wg* (Wang et al., 2000). In questo stadio l'attività combinata di *wg* e del pathway di *Notch* induce l'espressione della proteina nucleare *vestigial* (*vg*), anch'essa essenziale per lo sviluppo dell'ala. La proteina *Vg* è inizialmente espressa lungo il margine D/V grazie all'attivazione del cosiddetto *boundary enhancer* (vg^{BE} ; Couso et al., 1995;

Kim et al., 1996); successivamente, all'inizio del terzo stadio larvale, *N*, *wg* e *vg* agiscono congiuntamente per attivare un secondo enhancer, il *vg quadrant enhancer* (vg^{QE}) che induce l'espressione di *vg* in tutto la lamina alare (Klein and Martinez Arias, 1998). L'integrazione dei segnali che derivano da *dpp*, *wg* e *N* genera una graduale attività di *vg* lungo l'asse P/D che scatena interazioni locali tra cellule adiacenti in grado di modulare, nel complesso, la crescita e la forma dell'ala generando informazioni di tipo posizionale (Baena-Lopez and Garcia-Bellido, 2006).

Esperimenti di analisi clonale non sono finora riusciti a individuare i confini di restrizione tra la regione prossimale e distale dell'ala; tuttavia il gene selettore *nubbin* (*nub*) sembrerebbe avere un ruolo fondamentale nello sviluppo di questo asse. Alla fine del terzo stadio larvale (L3) *nub* è espresso nella regione del wing blade; analisi clonali hanno rivelato che cloni mutanti per il gene *nubbin*, anche se piccoli, possono interferire sull'intero pattern P/D quando si presentano nella regione prossimale dell'ala, mentre ciò non avviene quando il clone si origina nella regione distale (Ng and Garcia-Bellido, 1998). Questa evidenza suggerisce, pertanto, l'esistenza di un centro di organizzazione P/D situato nella regione prossimale.

L'ala

I tessuti imaginali sono strutture essenzialmente bidimensionali, sebbene negli adulti originino delle appendici che si sviluppano lungo i tre assi (A/P, D/V,

P/D); ciò è dovuto al meccanismo di emersione durante la metamorfosi in cui, la maggior parte della regione centrale del disco originerà le strutture distali, mentre le regioni più periferiche porteranno alla formazione delle strutture prossimali dell'appendice. L'ala dei moscerini adulti è costituita da un epitelio bistratificato in cui è presente una superficie dorsale ed una ventrale. Quattro rilevanti caratteristiche permettono di distinguere la superficie dorsale da quella ventrale: la morfologia delle setole sul margine anteriore; la presenza/assenza di setole nell'alula; la superficie di corrugazione delle vene; il posizionamento di organi sensori (Milán et al., 2001).

Il margine anteriore dell'ala (AWM) è marcato da tre file di setole, due posizionate sulla superficie dorsale ed una su quella ventrale (fig. 8b). Il margine dorsale differenzia una densa fila di spesse setole meccanosensorie ed una seconda fila di esili e curvate setole chemiosensorie. E' interessante notare che sull'AWM le setole chemiosensorie si trovano regolarmente distribuite, a livello spaziale, ogni cinque setole meccanosensorie. Dall'altro lato, sulla pagina ventrale, è invece presente una sola fila di sottili setole chemiosensorie, regolarmente spaziate tra loro come nella pagina dorsale. L'alula, situata nel compartimento posteriore, presenta una sola fila di sottili setole sulla superficie ventrale (fig. 8c). Lungo la lamina alare, l'ala sviluppa cinque vene longitudinali (L1-L5) e due vene trasversali (a-cv, p-cv), che la attraversano secondo un preciso e rigoroso pattern (fig. 8a). Oltre a conferire rigidità strutturale all'ala, le vene possono anche rappresentare, in alcuni casi,

dei sistemi di conduzione per assoni sensoriali, emociti e cellule tracheali (de Celis, 2003). Ciascuna vena possiede una componente dorsale ed una ventrale che sono specificate indipendentemente durante la crescita del disco e diventano unite solo dopo la sovrapposizione delle superfici dorsale e ventrale. La formazione delle vene e intervene inizia nei dischi imaginali quando le regioni da cui si origineranno queste strutture, dette “provene” e “prointervene”, cominciano ad esprimere nei loro territori, ed in maniera simmetrica rispetto al margine D/V, numerosi fattori di trascrizione e molecole di segnalazione cellulare (fig. 8e).

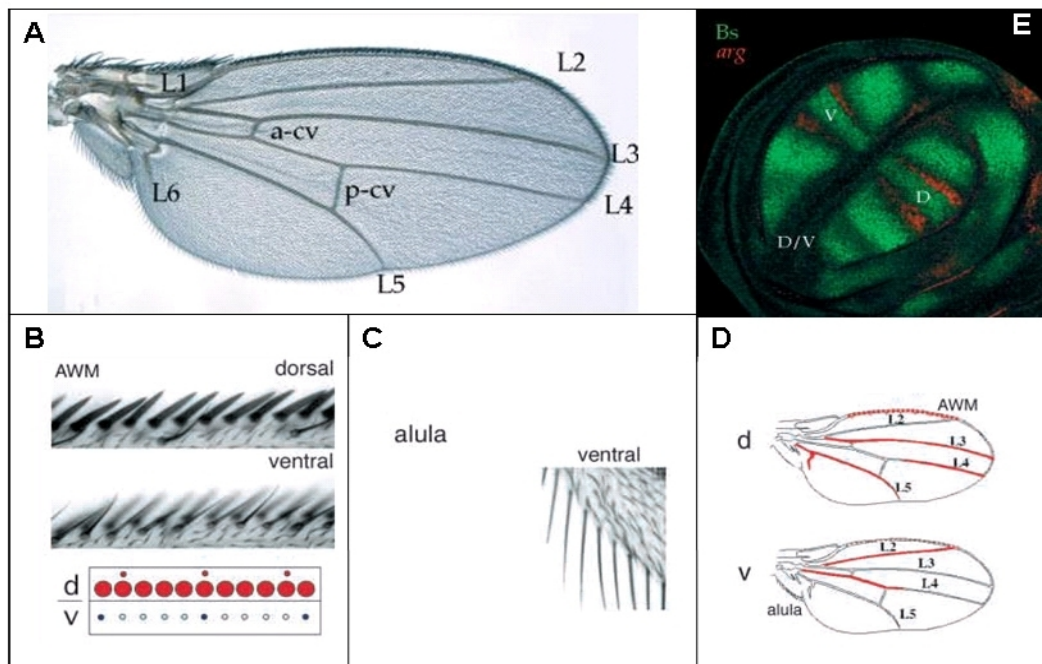


Fig. 8. Organizzazione strutturale dell'ala di *Drosophila*. (A) Disposizione e numerazione delle vene (B) Organizzazione delle setole meccanosensorie e chemiosensorie lungo l'AWM. (C) Distribuzione delle setole nella regione ventrale dell'alula. (D) Corrugazione delle vene tra compartimento dorsale e ventrale. (E) Disco dell'ala al terzo stadio larvale che mostra l'espressione di *Blistered* nelle intervene (verde) ed *argos* nelle vene (rosso). (da de Celis, 2003 e Milán et al., 2001).

Ciascuna intervena è caratterizzata, nei dischi delle larve di terzo stadio, dall'espressione del gene *blistered* (*bs*), un gene determinante per la formazione dell'intervena; allo stesso momento, ciascuna provena esprime

fattori di trascrizione provena-specifici, come *Iroquois* (per L1, L3 e L5), *Knirps* (L2) e *abrupt* (L5). Una volta determinato il territorio delle intervane e delle provene, in queste ultime avviene una singolare interazione cellulare mediata dai pathway di segnalazione di *Notch* e *Epidermal growth factor receptor (DER)* che restringe e mantiene il destino cellulare della provena (fig. 9).

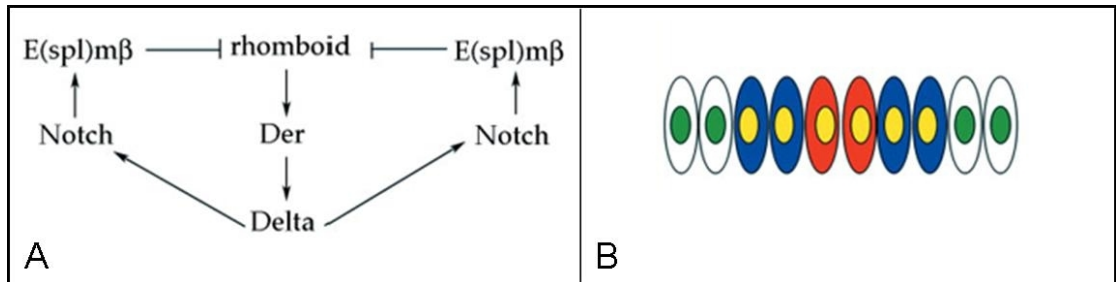


Fig. 9. Interazioni tra i pathways di Notch e Der nella formazione delle vene e delle intervane. (A) L'espressione del fattore di trascrizione *rhomboid* (*rho*) nelle vene determina l'attivazione del recettore *Der* e l'espressione di *Dl*. Il ligando *Dl* attiva *Notch* nelle cellule adiacenti che porta all'attivazione di *enhancer of split* [*E(spl)*], il quale reprime *rho* restringendo la sua espressione alla vena. (B) Rappresentazione schematica di una sezione trasversale dell'ala, che mostra l'attività dei pathway *Der* e *Notch* (rispettivamente in rosso e blu) in relazione all'espressione dei fattori di trascrizione espressi nelle regioni delle vene e delle intervane (rispettivamente in giallo e verde; da de Celis, 2003).

Infine, sulla lamina dell'ala sono presenti 7 organi campaniformi, 3 dei quali allineati lungo la vena L3, uno sull'intervena anteriore, uno detto "gigante" localizzato sull'alula e due, detti organi gemelli I e II, sulla vena marginale anteriore (fig. 10).

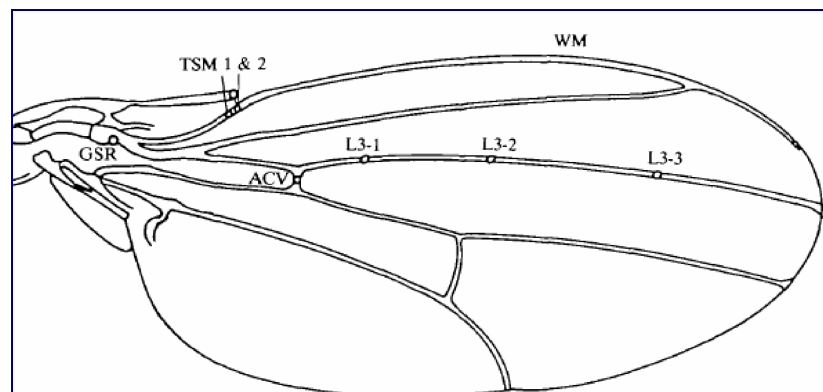


Fig. 10. Posizione degli organi campaniformi sulla superficie dell'ala.

Lo sviluppo della cuticola addominale durante la metamorfosi

In *Drosophila*, come in tutti gli insetti, la formazione della cuticola, che rappresenta l'esoscheletro dell'animale, è un processo finemente regolato dall'attività dell'ormone steroideo *ecdisione* (Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992). La cuticola è formata da un'organizzazione complessa di composti organici macromolecolari che nell'insieme devono conferire all'esoscheletro rigidità, elasticità e inerzia chimica. Diversamente dallo sviluppo nei vertebrati, il corpo dell'insetto adulto non si forma dal continuo sviluppo dei tessuti embrionali ma, come già accennato, da cellule imaginali da cui si originano i vari organi e strutture del moscerino adulto. La cuticola addominale della *Drosophila* è prodotta da istoblasti imaginali che proliferano e migrano durante la metamorfosi, sostituendosi alle cellule epidermiche poliploidi larvali. Nell'adulto, ciascun segmento addominale si origina da quattro paia di istoblasti: la coppia dorsale anteriore e posteriore produce i tergiti; la coppia ventrale origina sterniti e pleura, e la coppia spiracolare dà origine allo spiracolo ed al tessuto che circonda la pleura (Roseland and Schneiderman, 1979; fig. 11).

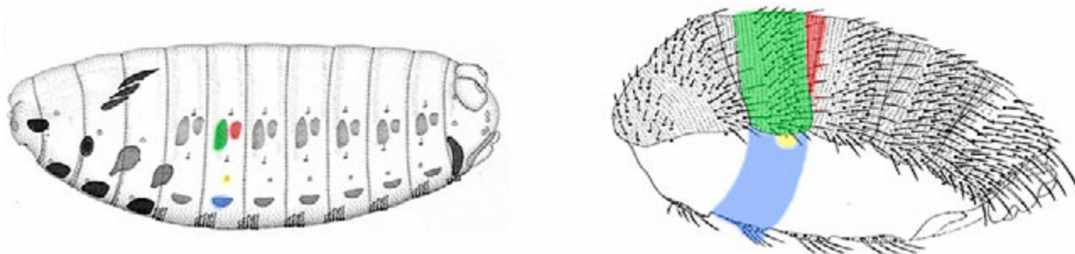


Fig. 11. Formazione della cuticola addominale del moscerino adulto: proliferazione cellulare e dinamica di sviluppo degli istoblasti. Durante gli stadi embrionali, quattro coppie di istoblasti addominali (i precursori delle cellule epidermiche) possono essere riconoscibili in ciascun emisegmento: dorsale anteriore (in verde), dorsale posteriore (rosso), ventrale (blu) e spiracolare (giallo). Durante la metamorfosi, dagli istoblasti si formano le differenti strutture che compongono l'epidermide addominale dell'adulto: i tergiti (verde), la membrana intertergitica (rosso), la pleura e gli sterniti (blu) e lo spiracolo (giallo; da Ninov et al., 2007).

Gli istoblasti addominali, composti inizialmente da circa 16 cellule, cominciano a dividersi nelle prime ore della formazione della pupa e solo successivamente iniziano a migrare sostituendosi alle cellule larvali. A seguito della proliferazione e della migrazione, le cellule di segmenti adiacenti si fondono al margine dorso/ventrale e si differenziano per produrre il tessuto epidermico, incluso microchaetae e macrochaetae (organi meccanosensori appartenenti al sistema nervoso periferico), secernendo la cuticola dell'adulto (Curtiss and Heilig, 1995).

Controllo della crescita cellulare nel disco imaginale dell'ala

I meccanismi che durante lo sviluppo regolano la crescita e la dimensione di differenti organi e tessuti sono tra i processi biologici meno conosciuti. L'ala di *Drosophila* è generalmente considerata un utile sistema modello in cui analizzare il controllo della crescita. Come già detto, essa si origina dalle cellule del rispettivo disco imaginale, formato inizialmente da circa 40 cellule (Lawrence and Morata, 1977) che proliferano durante il periodo larvale fino a raggiungere un numero di ~50.000. Le cellule iniziali subiscono circa 10-11 divisioni, ciascuna delle quali richiede ~9-10hr (García-Bellido and Merriam, 1971). Subito dopo l'inizio della formazione della pupa, le divisioni cellulari si arrestano ed inizia il differenziamento delle strutture dell'adulto (Milán et al., 1996). Durante gran parte del periodo larvale c'è uno stimolo che induce

la divisione cellulare e che consente la crescita del disco; tale stimolo è il risultato di due differenti meccanismi: il primo generato da segnali esterni al disco e dipendente dal sistema insulina/insulin-like growth factor (insulina/IGF), ed il secondo interno al disco e probabilmente dipendente dall'attività del pathway di segnalazione di *dpp* (Day and Lawrence, 2000). Il sistema insulina/IGF esercita un controllo generale sulla dimensione e proliferazione cellulare in risposta a condizioni nutrizionali (Oldham and Hafen, 2003); d'altro canto, mentre la mancanza di attività di *dpp* impedisce la crescita dei dischi (Spencer et al., 1982; Zecca et al., 1995), il suo eccesso produce delle ali spropositatamente grandi (Martín-Castellanos and Edgar, 2002; Martín et al., 2004). Tuttavia, evidenze sperimentali mostrano che i livelli di *dpp* funzionale rispondono ai livelli di attività insulina/IGF (Teleman and Cohen, 2000). Pertanto, l'attivazione del pathway insulina/IGF sembrerebbe essere lo stimolo principale che influenza la dimensione di tutte le regioni del corpo. Nelle cellule del disco dell'ala, i livelli di insulina/IGF sono tradotti in attività di *dpp* che controlla direttamente la crescita del disco. Siccome lo scopo finale del processo di sviluppo è quello di formare un'ala di superficie stereotipata, le divisioni cellulari devono essere strettamente regolate affinché si raggiunga la corretta dimensione.

Il meccanismo della competizione cellulare

Come tutti gli organismi animali, gli insetti adulti raggiungono una dimensione ed una proporzione corporea pressoché costanti. Uno dei processi che regolano le dimensioni degli organi è rappresentato dalla competizione cellulare, un meccanismo omeostatico che regola la dimensione che deve essere raggiunta dai tessuti in crescita. La competizione cellulare è un fenomeno competitivo che si manifesta nel momento in cui la crescita viene perturbata. Nei dischi imaginali, da cui originano differenti strutture della mosca adulta, la competizione cellulare coordina sia la crescita che l'apoptosi, ed è necessaria per il mantenimento di una dimensione costante (de la Cova et al., 2004). La competizione cellulare fu inizialmente descritta da Morata and Ripoll (1975) studiando alcuni parametri di crescita dei mutanti *Minute (M)*. Le mutazioni *Minute* sono per lo più a carico di geni che codificano proteine ribosomiali e/o prodotti coinvolti nel processo di sintesi proteica e tutte mostrano ritardi e difetti di crescita (Lambertsson, 1998). In omozigosi queste mutazioni sono letali a livello cellulare, mentre in eterozigosi (M/M^+) esse sono vitali, pur presentando un ridotto tasso proliferativo. Nel corso dei loro esperimenti, Morata and Ripoll osservarono che, in base alla competizione clonale, le cellule che presentavano bassi tassi di divisione, sebbene vitali, erano eliminatele dalle cellule fiancheggianti se queste erano in grado di crescere più efficientemente. Quando cloni di cellule *wild-type* venivano a trovarsi, mediante ricombinazione mitotica, a fianco di cellule M/M^+ , le

cellule eterozigoti *Minute* venivano eliminate dall'apoptosi. Ciò provocava, di conseguenza, un aumento spropositato delle cellule *wt* che talvolta determinavano la formazione dell'intero compartimento in cui il clone veniva espresso. La competizione cellulare si estende in un ristretto range di 5-8 cellule dalla sorgente di competitività ed è incapace di oltrepassare i confini dei compartimenti. Mutazioni ipomorfe a carico del gene *diminutive (d-myc)*, omologo dell'oncogene umano *c-myc*, sono risultate anch'esse essere sfavorite dalla competizione cellulare (Moreno, 2008). Cloni di cellule epiteliali che portano la mutazione ipomorfa *d-myc* sono infatti svantaggiate competitivamente e muoiono quando fiancheggiate dalle cellule *wt* del clone gemello; al contrario, le stesse cellule sono vitali quando circondate da cellule aventi lo stesso genotipo ipomorfo. Quindi, la competizione dipende non solo dal genotipo cellulare, ma anche dal contesto in cui la stessa cellula cresce e si divide. La competizione si verifica anche tra cellule nell'ambito dello stesso compartimento, ma che differiscono per i livelli di espressione di *d-myc* (de la Cova et al., 2004; Moreno and Basler, 2004; Moreno, 2008). Anche mutazioni a carico di alcuni geni coinvolti nel pathway di *dpp*, come il fattore di trascrizione *Brinker (Brk)* e il recettore *thickveins (tkv)*, possono innescare la competizione cellulare, sebbene non sia ancora ben chiaro se anche i componenti del pathway dell'insulina possano innescare questo meccanismo (de la Cova et al., 2004; Moreno and Basler, 2004).

La competizione svolge un ruolo importante nello sviluppo del disco

immaginale, consentendo l'eliminazione selettiva delle cellule mal differenziate senza alterare la configurazione della struttura finale dell'organo adulto. Questo importante ruolo è avvalorato dal fatto che la crescita delle cellule che iperesprimono *d-myc*, sebbene mediante competizione cellulare possa sostituire il tessuto *wt* circostante, non modifica la dimensione finale e la forma dell'organo (Johnston and Gallant, 2002). Infine, è molto importante sottolineare che molte mutazioni che aumentano l'incidenza di tumori nell'uomo sono in grado di indurre competizione cellulare in *Drosophila*, suggerendo che questo meccanismo svolge un ruolo importante nello sviluppo dei tumori e delle metastasi e potrebbe essere utilizzato come target per interventi terapeutici o per la diagnosi precoce dei tumori umani (Moreno, 2008; fig. 12).

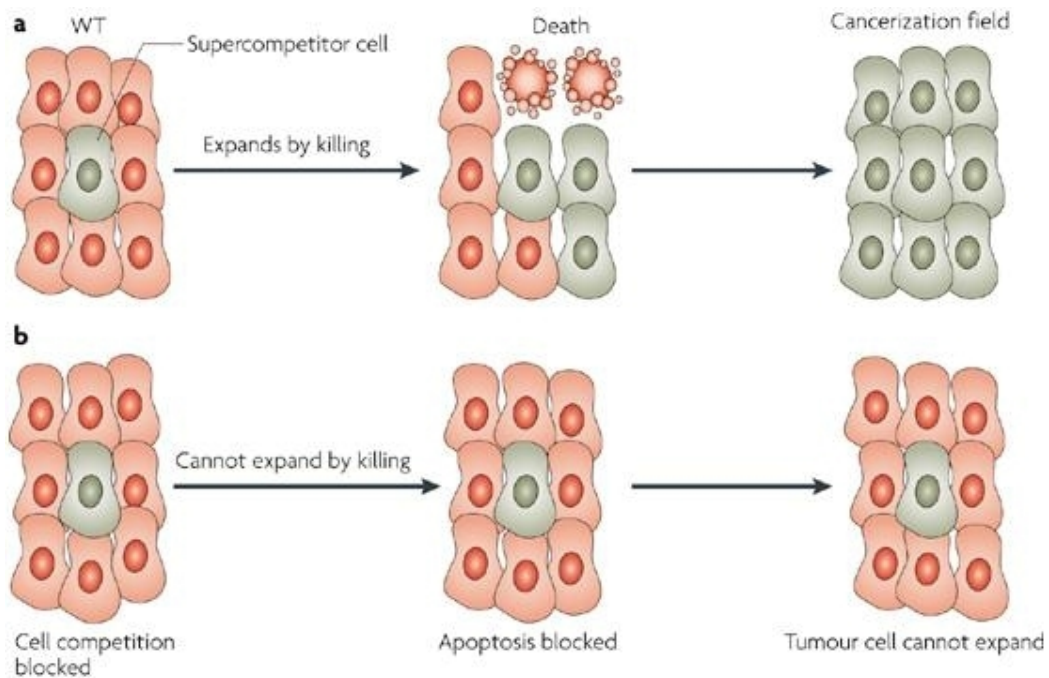


Fig. 12. Competizione cellulare e cancerogenesi. (A) Cellule supercompetitrici si espandono uccidendo le cellule circostanti *wt*, senza causare malformazioni morfologiche. (B) Arrestando l'apoptosi delle cellule normali che circondano la cellula pre-tumorale si potrebbe influire sulla crescita del tumore (modello proposto da Moreno, 2008).

Scopo del lavoro

Il progetto di ricerca sviluppato nel corso della mia tesi di dottorato è stato centrato sulla caratterizzazione molecolare e funzionale del gene *minifly* di *D. melanogaster*, ponendo particolare attenzione al ruolo svolto da questo gene nello sviluppo. Il gene *minifly* (*mfl*) appartiene ad una famiglia altamente conservata lungo la scala evolutiva, i cui membri svolgono funzioni essenziali che includono la biogenesi del ribosoma e la pseudouridilazione di RNA target. Mutazioni nell'ortologo umano *Dkc1* sono state dimostrate responsabili della patologia ereditaria denominata Discheratosi congenita X-linked (DC; Heiss et al., 1998), cosicché l'esistenza di un elevato grado di identità fra il gene *Dkc1* ed il gene *mfl*, nonché la forte conservazione funzionale, rendono i mutanti *mfl* di *Drosophila* un ottimo sistema modello per la comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base dell'insorgenza di questa patologia.

Nel corso del mio lavoro, alcune analisi sperimentali sono state inizialmente concentrate sulla caratterizzazione del mutante ipomorfo *mfl^l*, che rappresenta l'unico mutante vitale allo stadio adulto, essendo gli altri due mutanti disponibili, *mfl⁰⁵* e *mfl⁰⁶*, letali durante le fasi di vita larvale (Giordano et al., 1999). Successivamente ho invece analizzato gli effetti determinati dalla parziale inattivazione del gene in linee transgeniche in cui ho attivato, sia in maniera ubiquitaria che localizzata, il silenziamento di *mfl* mediante RNAi in

vivo. In particolare ho ritenuto vantaggioso approfondire l'analisi degli effetti determinati dal silenziamento del gene nell'ala degli individui adulti e nei dischi imaginali dell'ala, che rappresentano un sistema modello ideale sia per lo studio dell'organogenesi che per il differenziamento del tessuto epiteliale (Cohen, 1993). Con particolare interesse ho seguito gli effetti del silenziamento sul pathway di trasduzione del segnale innescato dall'attivazione del gene *Notch* (*N*), anch'esso evolutivamente conservato e coinvolto in numerosi ed importanti processi cellulari, quali la specificazione del destino cellulare, il differenziamento, la proliferazione, l'apoptosi, l'adesione, la migrazione, l'angiogenesi e lo sviluppo ed il funzionamento neuronale (Bolòs et al., 2007). L'attenta caratterizzazione effettuata sia sui mutanti *mfl*¹ che in seguito a silenziamento genico mediato da RNAi, ha mostrato che la ridotta espressione di *mfl* riduce sensibilmente l'attivazione di *Notch*, con conseguenze importanti sul normale processo di sviluppo e differenziamento.

Infine, ho analizzato in maggior dettaglio il ruolo regolativo svolto dall'oncogene *myc*, che è noto innescare l'espressione del gene *mfl* (Pierce et al., 2008) in *Drosophila* e del gene *Dkc1* (Alawi et al., 2007) nell'uomo. In entrambi gli organismi questi due geni rappresentano infatti i principali target di *myc*, che è noto regolare l'espressione di molti componenti del macchinario traduzionale (Oskarsson and Trump, 2005; Orian et al., 2003, 2005; Grewal et al., 2005; Gomez-Roman, 2006). In *Drosophila*, il fenotipo osservato nei

mutanti ipomorfi $d\text{-myc}^{P0}$ è quasi sovrapponibile a quello mostrato dai mutanti mfl^l , suggerendo che mfl possa rappresentare un importante gene effettore del pathway attraverso cui myc regola la crescita cellulare. Nei paragrafi successivi dell'introduzione sono riportate le principali informazioni sull'attuale stato dell'arte delle varie problematiche toccate da questo lavoro.

Il gene minifly di Drosophila melanogaster.

Il gene *minifly* appartiene ad una famiglia altamente conservata dagli *Archaea* ai mammiferi, i cui membri codificano per proteine coinvolte in numerosi processi essenziali per il corretto funzionamento del macchinario traduzionale e nel dirigere la pseudouridilazione di un'ampia categoria di RNA target.

Queste proteine (denominate MFL in *Drosophila*, Cbf5p in lievito, Nap57 in ratto e discherina in topo e uomo) costituiscono uno dei quattro componenti fondamentali dei complessi ribonucleoproteici che si associano specificamente ai piccoli RNA nucleolari (snoRNA) della classe H/ACA, formando i complessi snoRNP di tipo H/ACA che dirigono i processi di maturazione e pseudouridilazione degli RNA bersaglio. In questi complessi, le proteine della famiglia MFL/discherina agiscono da pseudouridina sintetasi, mentre le molecole di snoRNA di tipo H/ACA riconoscono i specifici residui che verranno modificati (Bachellerie et al., 2002).

Esperimenti di delezione genica effettuati in vari organismi hanno costantemente dimostrato che queste proteine sono essenziali per la loro sopravvivenza, suggerendo un importante ruolo biologico (Cadwell et al., 1997; Giordano et al., 1999; He et al., 2002). L'ortologo umano (*Dkc1*) è inoltre responsabile di una patologia ereditaria denominata Discheratosi congenita X-linked. Nell'uomo, questa rara malattia genetica si manifesta con una frequenza di 1/1.000.000, ed è causata da mutazioni ipomorfe a carico di

Dkc1. La discheratosi risulta caratterizzata da un'ampia insufficienza sistemica che riguarda essenzialmente quei tessuti caratterizzati da un alto tasso di proliferazione, quali in particolare il tessuto cutaneo, le mucose ed il midollo osseo. Il gene umano *Dkc1* codifica per la proteina denominata discherina, la quale è stata recentemente identificata anche come componente essenziale del complesso attivo della telomerasi umana (Cohen et al., 2007; Venteicher et al., 2008). La conservazione funzionale delle pseudouridine sintetasi è così elevata che la proteina di Archaea aCbf5p è risultata in grado di associarsi efficientemente con alcuni componenti dei complessi snoRNP di lievito e con l'RNA telomerasico umano, il quale porta un motivo H/ACA (Hamma et al., 2005). Tuttavia, il ruolo biologico della pseudouridilazione è ancora poco chiaro, sebbene alcune evidenze suggeriscano il suo contributo nel *folding* dell'rRNA e nell'assemblamento delle rRNP e delle subunità ribosomali.

Mutazioni a carico del gene ortologo di *Drosophila*, il gene *mfl*, sono state ottenute mediante inserzione di un elemento P a monte della regione codificante; tali inserzioni hanno determinato una significativa riduzione dell'espressione del gene. Due mutazioni (mutazioni *mfl*⁰⁵ e *mfl*⁰⁶) hanno provocato una pressoché totale perdita di funzione, determinando letalità larvale, mentre una mutazione (mutazione *mfl*¹) ha causato una parziale perdita di funzione, determinando un fenotipo ipomorfo (fig. 13), caratterizzato da ampi difetti pleiotropici che includono un'estrema riduzione

della dimensione corporea, ritardo dello sviluppo (dovuto al prolungamento della vita larvale di 4-5 giorni), difetti nella cuticola addominale, forte riduzione della lunghezza e dello spessore delle setole addominali e ridotta fertilità femminile (Giordano et al., 1999) e maschile (Kauffman et al., 2003). I mutanti *mfl* condividono alcune delle caratteristiche fenotipiche già riscontrate nei mutanti *Minute*, *mini* e *bobbed* che influenzano rispettivamente la sintesi di proteine ribosomali, del 5S e del 18S e 28S (Giordano et al., 1999). Questa convergenza fenotipica suggerì per *mfl* un possibile ruolo nella biogenesi dei ribosomi, confermato da successivi esperimenti in cui i mutanti mostrarono alterazioni nel meccanismo di maturazione del pre-rRNA, provocando una significativa riduzione degli rRNA maturi 18S e 28S ed un accumulo di molecole di pre-rRNA non maturate (Giordano et al., 1999).

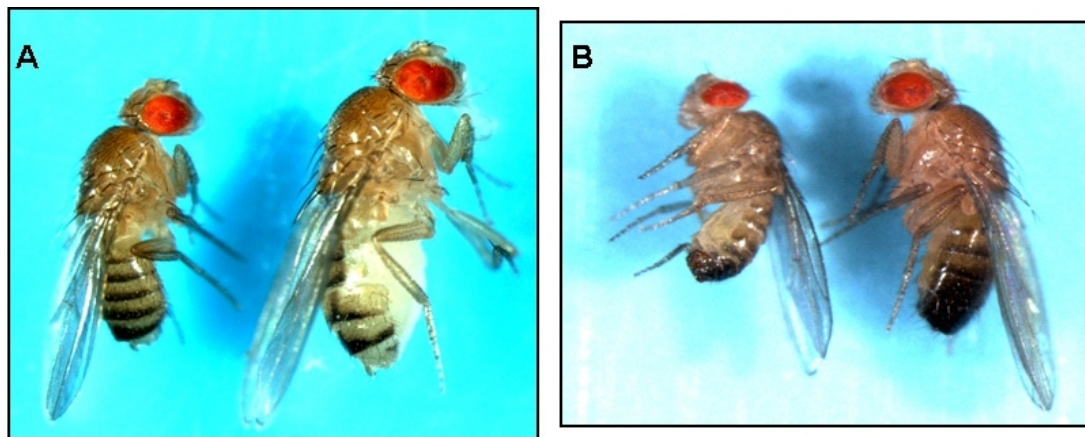


Fig. 13. Fenotipo del mutante *mfl*¹. E' evidente una forte riduzione della dimensione corporea nei mutanti *mfl*¹ rispetto al wt. (A) Confronto tra una femmina selvatica (dx) ed una mutante (sx); (B) a confronto un maschio selvatico (dx) ed uno mutante (sx).

Una prima caratterizzazione molecolare del gene *mfl* rivelò che esso produceva due trascritti, lunghi rispettivamente 1.8 e 2.0 kb. Mentre la specie di 1.8 kb era costitutivamente espressa durante tutto il ciclo vitale, quella di

2.0 kb fu osservata solo nelle preparazioni di RNA ottenute da femmine adulte e da embrioni (Giordano et al., 1999). Mediante esperimenti di ibridazione *in situ* condotta su ovari fu notato che il trascritto da 2.0kb veniva prodotto durante l'oogenesi e trasmesso per via materna all'oocita, per essere poi ereditato dall'embrione maturo. Pertanto, queste evidenze suggerirono che il trascritto materno di 2.0 kb sopperisce all'assenza del trascritto zigotico durante le prime fasi dello sviluppo embrionale, finché la sua sintesi non viene attivata. Questo comportamento è piuttosto frequente per trascritti che svolgono un ruolo fondamentale nei processi di sviluppo e differenziamento, la cui carenza determina spesso sterilità ad effetto materno.

Considerata la varietà dei ruoli biologici attribuiti al gene *mfl*, la sua attività trascrizionale è stata recentemente analizzata in maggior dettaglio, con l'obbiettivo di identificare nuovi prodotti che potessero fornire un'adeguata base molecolare alle molteplici funzioni attribuite ai membri di questa famiglia genica (Riccardo et al., 2007). L'identificazione dei soli trascritti da 1.8 kb e 2.0 kb non fu infatti sufficiente a spiegare i risultati ottenuti da precedenti esperimenti di recupero fenotipico. Infatti, i tentativi di recuperare la letalità provocata dalle mutazioni *mfl*⁰⁵ e *mfl*⁰⁶ utilizzando un transgene comprendente il cDNA completo del trascritto da 1.8 kb, sotto il controllo del promotore *hsp70*, non diedero esito positivo (Giordano et al., 1999).

Una serie di sistematiche analisi ha portato di recente a stabilire la presenza di un terzo sito alternativo di poliadenilazione che dà origine ad un trascritto

lungo 2.2 kb. Questo trascritto, come quello da 2.0 kb, mostra un'espressione preferenziale in femmine e differisce solo per la lunghezza della 3' UTR (fig. 14; Riccardo et al., 2007). I tre trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb comprendono la stessa *Open Reading Frame* (ORF) in grado di codificare per una proteina di 508 amminoacidi, con una massa molecolare di 56 kDa. Questa proteina è ubiquitaria e la sua localizzazione subcellulare è essenzialmente nucleolare, anche se occasionalmente è stata osservata diffondere nel citoplasma (Giordano et al., 1999). Sebbene le 3'UTR rappresentino l'unica differenza che distingue gli mRNA di 1.8, 2.0 e 2.2 kb, non sono stati identificati finora all'interno di queste sequenze elementi di controllo che potrebbero influenzarne la stabilità, la localizzazione e/o l'efficienza della traduzione.

È noto, però, che il gene *mfl* appartiene alla classe dei geni 5'TOP (Giordano et al., 1999; Tycowski et al., 1998), cui appartengono prevalentemente geni che codificano per proteine implicate nella biogenesi del ribosoma o nella funzionalità dell'apparato traduzionale. Dal punto di vista strutturale, i geni 5'TOP condividono un'organizzazione comune delle loro sequenze 5'UTR, che sono sempre brevi ed iniziano con una C seguita da un Tratto Oligo-Pirimidinico costituito da 6-10 pirimidine. La sequenza 5'TOP svolge un importante ruolo regolativo a livello traduzionale; infatti, in cellule in attiva proliferazione i messaggeri sono localizzati sui polisomi, mentre in cellule quiescenti o in condizioni di *starvation*, che determinano arresto della crescita cellulare, essi vengono per lo più sequestrati in complessi mRNP

traduzionalmente inattivi (Amaldi and Pierandrei, 1997). Nei geni 5'TOP, la stringenza di questa regolazione sembra diminuire all'aumentare della lunghezza della 3'UTR, un parametro che non influenza la traduzione di trascritti privi delle sequenze 5'TOP (Ledda et al., 2005). E' quindi possibile ipotizzare che, in condizioni di arresto della crescita, l'efficienza di traduzione dei diversi mRNA prodotti dal gene *mfl* possa essere influenzata dalla lunghezza della sequenza 3' UTR che li caratterizza specificamente.

E' stato ipotizzato un ulteriore ruolo funzionale svolto dalle differenti 3'UTR del gene *mfl*, basato sul modello a cappio chiuso. Secondo questo modello, le proteine associate con le estremità 5' e 3' di un mRNA interagiscono tra loro avvicinandone le estremità e facilitando così il re-inizio della traduzione; queste interazioni proteina-proteina potrebbero anche selezionare gli mRNA integri proteggendoli dalla degradazione. Infine, è noto che le sequenze 3'UTR svolgono un ruolo importante nella regolazione post-trascrizionale, legando specifiche molecole di microRNA (miR) che agiscono da regolatori negativi della traduzione. Mediante ricerca computazionale sono stati identificati molteplici putativi siti di legame per miR nelle sequenze 3'UTR che caratterizzano i diversi trascritti del gene *mfl* (dati non pubblicati). Tra i miR capaci di legare in più posizioni le 3'UTR dei trascritti del gene *mfl* vi è *miR184*, un miR evolutivamente conservato anche nei mammiferi, ed alcuni miR finora descritti solo negli insetti, tra cui *iab-4-5p* il quale, se ectopicamente espresso nei dischi immaginali delle altere, inibisce *in vivo*

l'attività di *Ultrabitorax* (Ubx), inducendo la classica trasformazione omeotica delle altere in ali (Ronshaugen et al., 2005).

Nel corso della caratterizzazione molecolare del gene *mfl* è poi emerso che esso può produrre anche un trascritto alternativo in cui un raro evento di splicing unisce il sito donatore dell'esone 3 al sito di splicing accettore dell'esone 9. Questo trascritto, lungo 1kb, è espresso preferenzialmente in femmine, come già osservato per gli mRNA di 2.0 kb e 2.2 kb, ed è capace di codificare una nuova subforma proteica denominata MFL (Riccardo et al., 2007). Esso presenta una 3'UTR lunga soli 131 nt e ciò, in accordo con i dati di Ledda e collaboratori (2005) implicherebbe una maggiore stringenza nella sua regolazione traduzionale rispetto a quella dei trascritti di 1.8, 2.0 e 2.2 kb (fig. 14).

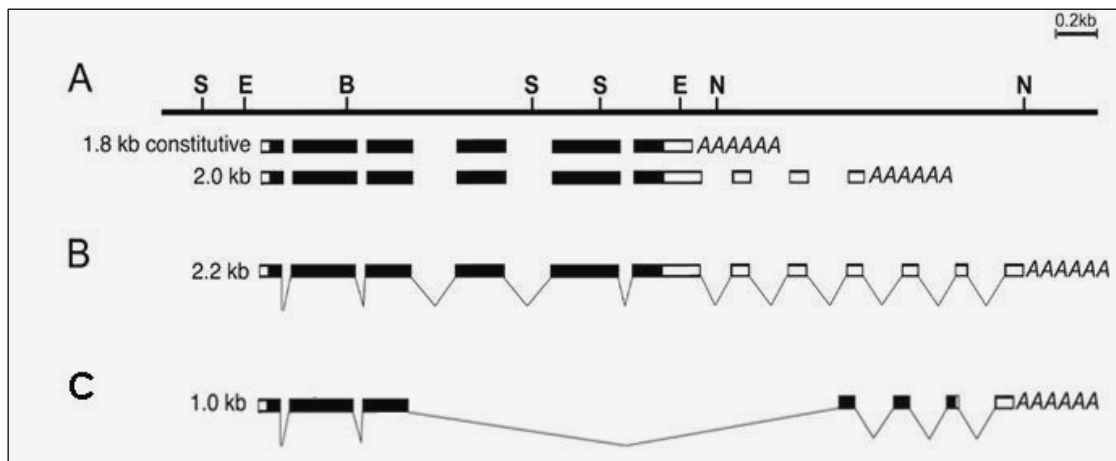


Fig. 14. Organizzazione molecolare del gene minifly. Organizzazione molecolare dei trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb e del trascritto alternativo da 1kb. Le regioni esoniche che fanno parte della ORF sono colorate in nero. (A) da Giordano et al.,1999; (B e C) da Riccardo et al., 2007.

La proteina MFL , presenta 258 residui amminoacidici ed ha una massa molecolare di 28.9 kDa. MFL condivide con MFL un identico tratto di 211 aminoacidi nella porzione N-terminale in cui sono contenuti un segnale di

localizzazione nucleare e due domini altamente conservati, TruBI e TruBII, che hanno una forte omologia con le t-RNA pseudouridina sintetasi di lievito e batteri e che sono considerati essere direttamente coinvolti nei processi di pseudouridilazione (Koonin, 1996). Tuttavia, MFL differisce da MFL nella regione C-terminale dove una breve regione di 43 aa, priva di motivi funzionali noti, sostituisce la regione C-terminale dell'isoforma canonica in cui sono contenuti importanti domini funzionali, come il dominio di legame all'RNA (dominio PUA), il dominio Tyr, che sembra avere un ruolo nell'orientamento dell'uracile che verrà isomerizzato, nonché il segnale di localizzazione nucleare bipartito presente in posizione C-terminale (NLS; fig. 15).

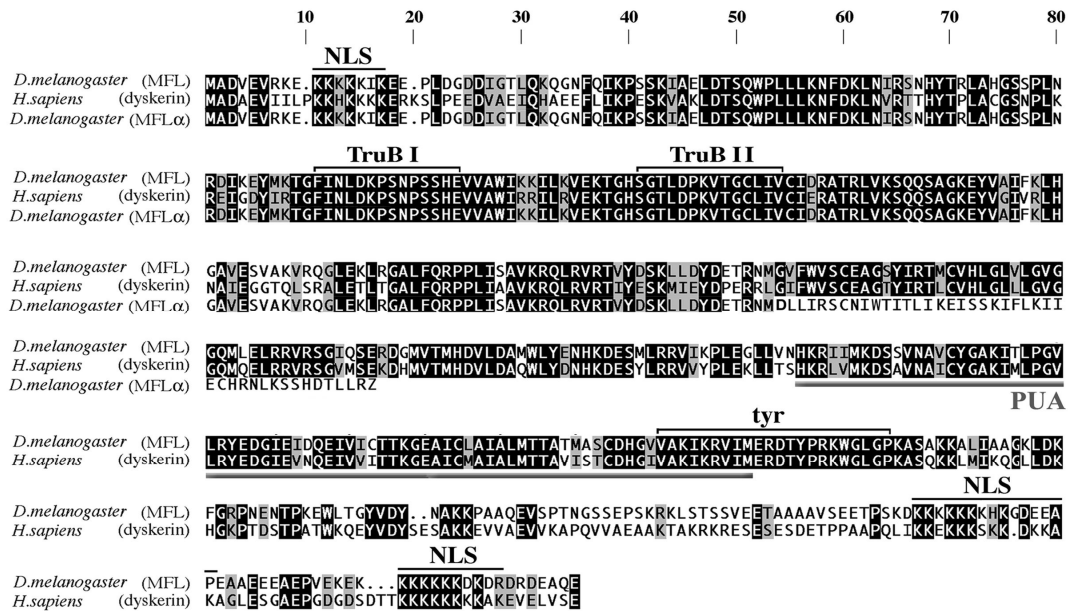


Fig. 15. Allineamento delle sequenze amminoacidiche della proteina MFL, della discherina umana e della proteina MFLα. I tratti di identità sono indicati in nero, quelli di similarità in grigio, quelli di divergenza in bianco. Le linee sopra le sequenze indicano i putativi domini funzionali: NLS, segnale di localizzazione nucleare, TruBI e TruBII, regioni omologhe alle tRNA pseudouridina sintasi batteriche e di lievito; Tyr, dominio di tirosina (da Riccardo et al., 2007).

Numerose evidenze dimostrano che la porzione C-terminale delle proteine Cbf5p/MFL/discherina ha una notevole rilevanza dal punto di vista funzionale. Ad esempio, nella discherina umana la delezione di un cluster ricco di lisine all'estremità carbossi-terminale influenza il tasso di trasporto della proteina nel nucleo, mentre l'eliminazione di un dominio C-terminale della proteina Cbf5p di lievito determina un ritardo nella transizione dalla fase G2 alla fase M, suggerendo che questa porzione della proteina possa influenzare il controllo del ciclo cellulare. Pertanto si è ipotizzato che la presenza di una specifica regione C-terminale possa conferire alla proteina MFL una differente localizzazione cellulare oltre a nuove specifiche proprietà funzionali. Infatti, l'assenza del dominio PUA potrebbe alterare l'interazione con le molecole di snoRNA, conferendo a MFL una diversa proprietà funzionale nell'assemblaggio degli snoRNP.

Il gene *mfl* mostra una complessa organizzazione coding/non-coding

L'analisi trascrizionale del gene *minify* ha evidenziato un'organizzazione molecolare ben più complessa di quanto inizialmente sospettato. Come molti geni che codificano proteine coinvolte nella sintesi, struttura o funzione dell'apparato traduzionale, il gene *mfl* ospita nel suo quarto introne un gene che codifica un piccolo RNA nucleolare (snoRNA) della classe H/ACA. Questo snoRNA dirige la pseudouridilazione del residuo U1820 dell'rRNA

18S di *Drosophila*, un residuo equivalente allo U1689 dell'rRNA umano, la cui modificazione è diretta dallo *snoRNA U70*. Essendo il primo esempio di snoRNA della classe H/ACA identificato in *Drosophila*, lo snoRNA derivato dal IV introne del gene *mfl* è stato denominato H1 (Giordano et al., 1999). Successivamente, nel corso di un'analisi bioinformatica sono state identificate 4 isoforme di uno snoRNA della famiglia C/D, denominate *DmSnR60a-d*, localizzate all'interno degli introni 6, 7, 8 e 9 del gene *mfl* (Accardo et al., 2004; Riccardo et al., 2007). Mediante Northern blot, utilizzando RNA totale ottenute da cellule S2, è stata validata sperimentalmente l'espressione di questi snoRNA, la cui lunghezza è di circa 85nt (Riccardo et al., 2007). È stato inoltre osservato che anche dagli introni 10 e 11 derivano piccole molecole di RNA lunghe circa 100nt. Questi piccoli RNA sono altamente correlati a livello della loro sequenza nucleotidica (condividono l'85% della sequenza totale e mostrano un segmento interno di 59 bp di perfetta identità). Essendo privi dei caratteristici motivi di sequenza e di struttura tipici degli snoRNA di tipo C/D o H/ACA, essi sono stati denominati *snm60a-b*, cioè small non messenger RNA derivati dalla regione politenica 60 (fig. 16). I geni *DmSnR60* appartengono alla classe dei geni che codificano per piccoli RNA della classe C/D, ed è ben noto che gli snoRNA di questa classe sono responsabili della metilazione dei gruppi 2'-OH dei ribosi (Kiss-Laszlo et al., 1998). Gli snoRNA di tipo C/D contengono due corti motivi di sequenza conservati: la box C (5'RUGAUGA3') e la box D (5'CUGA3'), localizzati a

pochi nucleotidi dalle estremità 5' e 3', rispettivamente. Talvolta, queste molecole contengono nella loro porzione centrale una copia meno conservata della box C, chiamata per questo motivo box C' (Kiss-Laszlo et al., 1998) e una copia addizionale della box D, chiamata similmente box D' (Tycowski et al., 1996). Immediatamente a monte della box D e/o D' si trovano elementi guida antisenso, lunghi 10-21 nt, perfettamente complementari alla molecola di RNA bersaglio. Tramite questo appaiamento con la molecola target si viene a formare una doppia elica nella quale è presente il nucleotide da modificare, che è sempre posizionato esattamente 5 nt a monte delle box D o D' (Kiss-Laszlo et al., 1996; Kiss, 2002). Ciascuna copia del gene *DmSnR60* (denominate *a*, *b*, *c*, *d*) possiede i canonici box C, D e D', suggerendo che questi geni possano codificare per snoRNA bifunzionali (fig. 16). Le quattro isoforme *DmSnR60* sono disposte in tandem, con la stessa polarità, e le loro sequenze sono altamente conservate, con polimorfismi occasionali che si verificano essenzialmente all'esterno delle regioni funzionali.

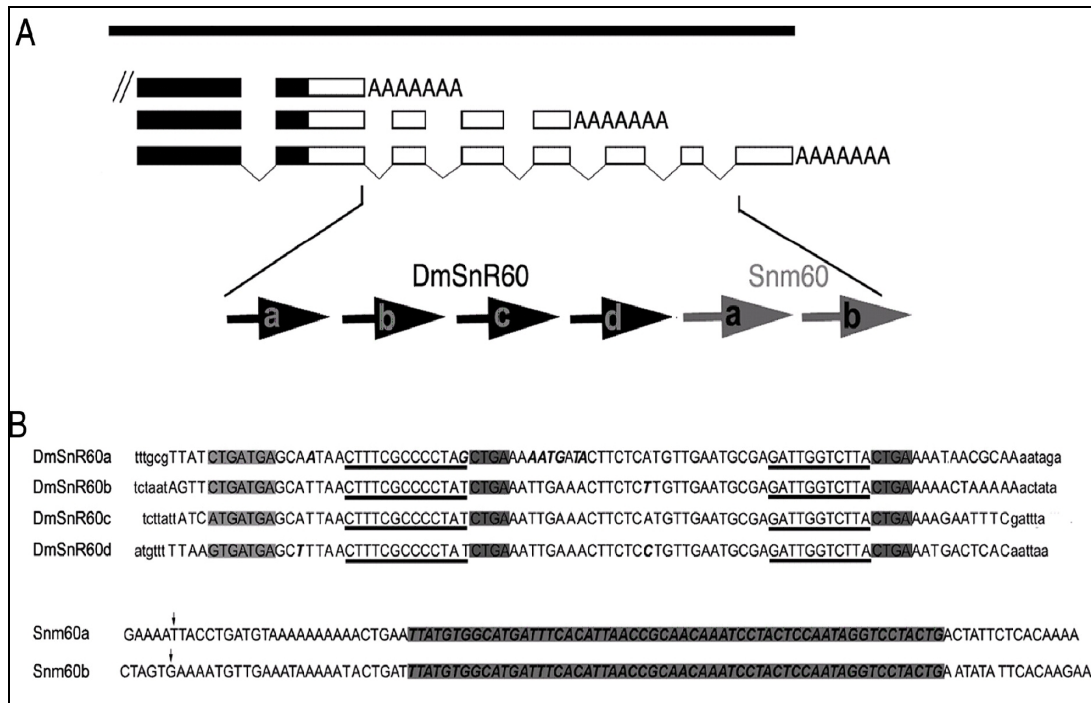


Fig. 16. Organizzazione dei geni *DmSnR60* ed *snm60*, localizzati nella regione 3' del gene *mfl*. (A) Disposizione in tandem delle quattro isoforme *DmSnR60* e delle due isoforme *snm60*. (B) In alto: sequenze dei geni *DmSnR60*; in grigio sono indicate le box C, in nero le box D e D'; le sequenze antisense a monte delle box D e D' sono sottolineate. In basso: sequenze dei geni *snm60*; in grigio è indicata la sequenza di 59 bp comune alle due isoforme. (da Riccardo et al., 2007)

Il cluster dei *DmSnR60a-d* sono stati predetti dirigere la 2'-O-metilazione rispettivamente al residuo G1083 e A1092 (Accardo et al., 2004; Huang et al., 2005; Riccardo et al., 2007) dell'rRNA 28S di *Drosophila*. E' interessante notare che la metilazione di questi due siti è conservata dal lievito ai vertebrati. Infatti, la metilazione al residuo G1083 è equivalente a quella dei residui modificati dallo snR60 in lievito e dallo snoRNA U80 in mammifero; analogamente, la 2'-O-metilazione al residuo Am1092 è stata osservata in lievito, dove è guidata dallo snR84, ed in uomo, dove è guidata da uno snoRNA non ancora identificato. Non è stato finora definito un target per gli *snm60a-b*, cosicché questi piccoli ncRNA devono per ora essere inclusi nella categoria degli "orfani".

Il profilo di espressione di tutti i piccoli ncRNA identificati all'interno degli introni del gene *mfl* è risultato essenzialmente uniforme a quello del gene ospite, in accordo con il comune meccanismo di biogenesi dei ncRNA intronici dipendente dallo splicing (Kiss, 2006). Questo dato è solo in parte spiegato dall'osservazione che lo *snRNA H1* appartiene alla classe H/ACA, i cui membri dipendono dalla proteina MFL per la loro biogenesi e per la loro stabilità (Lafontaine et al., 1998; Giordano et al., 1999) e pone interessanti interrogativi sui meccanismi molecolari che promuovono l'espressione dei geni *DmSnR60a-d* e *snm60a-b*.

La discheratosi congenita: una malattia genetica multisistemica

La Discheratosi Congenita (DC) è una sindrome ereditaria che presenta una marcata eterogeneità sia clinica che genetica. La DC generalmente si presenta con una triade di sintomi mucocutanei: distrofia delle unghie, pigmentazione anomala della pelle e leucoplachia delle mucose. A questa sintomatologia va aggiunta anche un'insufficienza midollare, che rappresenta la principale causa di morte, un'elevata predisposizione all'insorgenza di neoplasie, ed altre anomalie come corta statura, perdita di denti e capelli e difficoltà nell'apprendimento (Heiss et al., 1998; Knight et al., 2001).



Fig. 17. Alcune delle caratteristiche cliniche della discheratosi congenita. (a) leucoplachia orale, (b) distrofia ungueale, (c) anomala pigmentazione cutanea, (d) ipoplasia cerebrale, (e) prematura caduta ed ingrigimento dei capelli (da Kirwan and Dokal, 2008).

Sono stati finora identificati tre modalità di trasmissione di questa patologia: autosomica dominante (AD), autosomica recessiva (AR) e X-linked recessiva

(X-linked DC). La variante autosomica recessiva (MIM 224230), rappresenta la forma meno nota di questa sindrome e solo di recente è stato identificato come gene responsabile della malattia il gene NOP10 (Walne et al., 2007). Tuttavia, non è possibile escludere che esistano altri geni in grado di generare lo stesso fenotipo. La variante autosomica dominante (MIM 127550) è invece essenzialmente causata da mutazioni a carico della componente ad RNA della telomerasi (h-TERC), sebbene siano stati descritti anche alcuni casi in cui sono state riscontrate mutazioni nella componente enzimatica della telomerasi (hTERT; Vulliamy et al., 2001; 2005; Armanios et al., 2005). Questa variante rappresenta la forma più lieve della sindrome ed è caratterizzata da un effetto di “anticipazione” generazionale, ovvero con il procedere delle generazioni la malattia tende ad aggravarsi ed a manifestarsi in tempi sempre più precoci dello sviluppo (Armanios et al., 2005). La variante associata al cromosoma X (MIM 305000) rappresenta comunque la forma più diffusa e più grave con cui si manifesta questa patologia causata da mutazioni a carico del gene *Dkc1*, che codifica per la proteina discherina (Heiss et al., 1998).

Come già menzionato, la DC mostra una considerevole eterogeneità clinica, cosicché gran parte della sua patofisiologia si sovrappone con quella di altre malattie (Marrone and Dokal, 2006), in particolare la sindrome di Hoyeraal-Hreidarsson (HH), l’anemia aplastica (AA) e la mielodisplasia (MDS) (Kirwan and Dokal, 2008). Fra queste, la sindrome di HH è una sindrome grave, che può manifestarsi già nel periodo neonatale e nell’infanzia; ai

sintomi classici della DC si aggiungono immunodeficienza, ipoplasia cerebrale e, soprattutto, un forte ritardo nella crescita, sintomi che si aggravano rapidamente dopo la nascita (Marrone et al., 2005). Le numerose caratteristiche in comune tra DC e HH hanno portato ad analizzare il gene *Dkc1* in pazienti HH. Questi studi hanno mostrato che il decesso di pazienti HH a causa di insufficienza midollare e/o immunodeficienza avveniva prima ancora che comparissero i caratteri diagnostici della DC; tuttavia sono state riscontrate numerose mutazioni nel gene *Dkc1* in pazienti HH (Yaghmai et al., 2000).

Nei pazienti affetti da X-linked DC sono state fino ad oggi identificate oltre 40 mutazioni a carico del gene *Dkc1*, la maggior parte delle quali sono delle mutazioni missenso. Queste mutazioni, seppur distribuite lungo tutta la sequenza codificante, tendono a raggrupparsi prevalentemente in due regioni funzionali: nella regione N-terminale, a monte del dominio TruB, e nella regione che comprende il dominio conservato PUA (fig. 18).

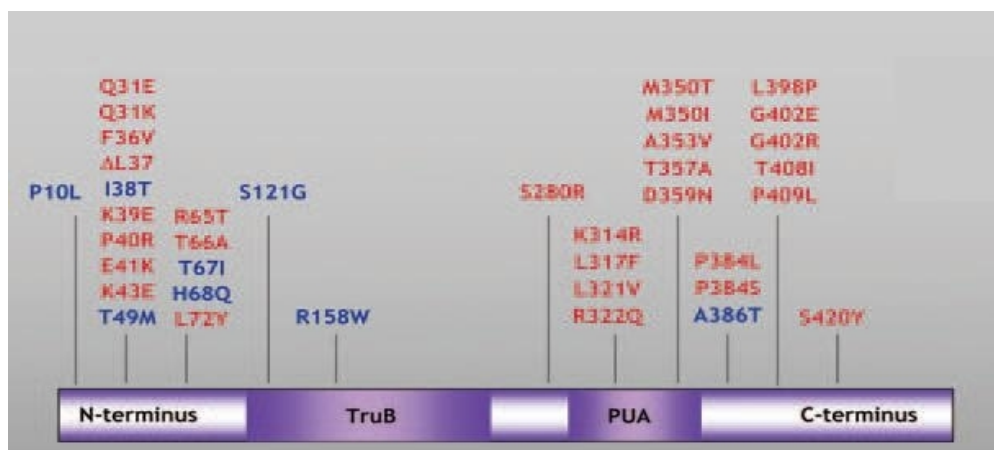


Fig. 18. Sostituzioni aminoacidiche della discherina che causano la discheratosi X-linked o la sindrome HH. Gli aminoacidi mutati responsabili della DC sono indicati in rosso, quelli della HH in blu (da Kirwan and Dokal, 2008).

Correlazioni strutturali e funzionali fra i geni appartenenti alla famiglia Cbf5/mfl/DKC1.

Nell'uomo la discherina, prodotta dal gene *Dkc1*, è una proteina multifunzionale coinvolta in almeno tre processi fondamentali: l'integrità dei telomeri, la biogenesi e la funzionalità del ribosoma, la pseudouridilazione di vari RNA cellulari. Una prima funzione è quella di stabilizzare il complesso enzimatico della telomerasi, legando una specifica sequenza della componente ad RNA, h-TERC, che nei mammiferi presenta un dominio H/ACA ed è classificabile tra gli snoRNA di tipo H/ACA. Un altro ruolo chiave di questa proteina consiste nel dirigere la maturazione e la modificazione dell'rRNA e di altri RNA cellulari, mediante l'attività di particelle ribonucleoproteiche (snoRNP) ed infine quello di consentire l'assemblamento delle subunità ribosomali ed il corretto funzionamento del macchinario traduzionale.

Studi su cellule primarie ottenute da pazienti affetti da X-linked DC e da topi knock-out per il gene *Dkc1*, o topi portatori delle stesse mutazioni riscontrate nei pazienti, hanno soprattutto indicato che la malattia si accompagna ad una progressiva riduzione dei telomeri (Mitchell et al., 1999; Vulliamy et al., 2001). Tuttavia, nei topi transgenici si notò che i sintomi specifici della malattia si manifestavano molte generazioni prima che i telomeri subissero un effettivo accorciamento (He et al., 2002), suggerendo un effetto precoce, probabilmente dovuto al coinvolgimento del gene *Dkc1* nella sintesi proteica

e nella pseudouridilazione. In questi esperimenti, mediante il sistema inducibile Cre/Lox il gene *Dkc1* murino fu sostituito con una variante allelica priva dell'esone 15, riproducendo una mutazione osservata in un paziente affetto da X-linked DC. La delezione di questa regione terminale del gene *Dkc1* si dimostrò letale se indotta durante le fasi precoci dell'embriogenesi. E' interessante notare che le femmine eterozigoti *Dkc1 +/-* erano vitali, mentre i maschi emizigoti per la mutazione morivano precocemente; in più, le femmine erano incapaci di trasmettere il gene mutato a causa di una forte tendenza ad inattivare il cromosoma mutante, conservando trascrizionalmente attivo il cromosoma selvatico in tutte le cellule. Dato che l'inattivazione del cromosoma X è un evento casuale molto precoce nell'embriogenesi, questi dati fecero ipotizzare la presenza di una competizione clonale in cui le cellule che avevano inattivato il cromosoma selvatico risultavano fortemente svantaggiate, e quindi progressivamente eliminate per competizione dalle cellule portatrici del cromosoma selvatico. Infine, dato che i topi sprovvisti di attività telomerasica erano vitali nelle prime generazioni, risultò chiaro che i difetti dell'attività telomerasica non erano la causa di questa letalità (He et al., 2002). In successivi esperimenti fu generato un ulteriore modello murino della X-linked DC, producendo un topo con mutazioni ipomorfe nel gene *Dkc1*. In questi animali fu osservata una efficace riduzione dell'espressione della discherina (quattro volte nei maschi, due volte nelle femmine); questi topi mostrarono i segni cutanei della discheratosi, una moderata anemia ed il

50% sviluppò tumori, prevalentemente a danno di polmoni, reni e ghiandole mammarie. Queste anomalie furono riscontrate in topi di prima e seconda generazione che, sebbene presentassero ridotti livelli di TERC e TERT, mostravano telomeri di lunghezza regolare. Solo nelle successive generazioni si osservò un significativo accorciamento dei telomeri; tale dato rafforzò l'ipotesi che la lunghezza dei telomeri potesse avere un ruolo secondario nello sviluppo della patologia e, poiché le cellule mostravano ridotti livelli di pseudouridilazione e ritardi nella maturazione dell'rRNA, si ipotizzò che i difetti ribosomali ne fossero la causa primaria (Ruggero et al., 2003).

Due mutazioni del gene *Dkc1*, corrispondenti a quelle più comunemente riscontrate nei pazienti affetti da X-linked DC (ALA353Val e Gly402Arg) sono state caratterizzate in linee cellulari ES di topo. In questo studio *in vitro* fu evidenziata una globale riduzione dei livelli di pseudouridilazione degli rRNA, una ridotta efficienza di maturazione del pre-rRNA ed una ridotta stabilità degli snoRNA di tipo H/ACA, evidenziando, pertanto, l'esistenza di un rapporto diretto tra i livelli di discherina ed il grado di pseudouridilazione degli rRNA (Mochizuki et al., 2004).

Come già accennato, in *Drosophila* la parziale perdita di funzione osservata nei mutanti *mfl¹* determina riduzione delle dimensioni corporee, ritardo dello sviluppo, ridotta fertilità ed anomalie morfologiche degli ovari dovute ad apoptosi (Giordano et al., 1999). Poiché in *Drosophila* il mantenimento dei telomeri non è mediato dalle telomerasi, bensì da un meccanismo di

inserzione di trasposoni nelle regioni telomeriche (Biessman et al., 1992; Villasante et al., 2008), è ragionevole attribuire queste alterazioni fenotipiche esclusivamente al ruolo svolto da questo gene nella biogenesi dei ribosomi.

Un ulteriore ruolo funzionale svolto dai membri di questa famiglia genica riguarda un particolare aspetto della sintesi proteica, cioè la traduzione cap-indipendente degli mRNA che si effettua a partire dalle sequenze IRES (Internal Ribosome Entry Site). Infatti, studi effettuati in cellule di topo portatrici di mutazioni nel gene *Dkc1* hanno, nel corso degli ultimi anni, indicato una specifica riduzione della traduzione cap-indipendente di alcuni mRNA, mentre nessun effetto è stato osservato per la sintesi proteica cap-dipendente (Yoon et al., 2006). Dato che molti geni anti-apoptotici e anti-tumorali sono tradotti da sequenze IRES, è possibile che quest'aspetto possa contribuire all'insufficienza midollare e alla suscettibilità di sviluppare neoplasie mostrate dai pazienti X-linked DC.

Il coinvolgimento della discherina nel mantenere integre le estremità telomeriche è stato definitivamente stabilito da recenti esperimenti che hanno identificato mediante spettrometria di massa i tre componenti che formano il complesso attivo della telomerasi umana. In aggiunta alla trascrittasi inversa della telomerasi (hTERT) e la componente ad RNA (hTERC), la discherina è risultata essere un componente essenziale di questo complesso attivo. Sebbene fosse stata ipotizzata l'associazione di almeno altre 32 proteine con il complesso della telomerasi, nessuna di queste, ad esclusione della discherina,

è risultata necessaria per l'attività catalitica (Cohen et al., 2007; Venteicher et al., 2008).

Solo recentemente è stato osservato che quando i telomeri raggiungono una dimensione critica interviene un pathway p53-dipendente che determina arresto del ciclo cellulare da cui ne consegue senescenza, apoptosi e, raramente, instabilità genetica e trasformazione cellulare. Questo stesso pathway è indotto anche in seguito a danni del DNA, ed è interessante notare che la delezione dell'esone 15 del gene *Dkc1* di topo (*Dkc1*¹⁵), in un contesto in cui i telomeri sono di lunghezza regolare determina, oltre ad uno svantaggio proliferativo, anche una incrementata risposta dovuta al danno del DNA attraverso il pathway ATM/p53 (Gu et al., 2008). Pertanto, considerato che l'attivazione di p53 avviene prima ancora che i telomeri raggiungano una lunghezza critica, l'analisi in questi topi *Dkc1*¹⁵ ha mostrato che la ridotta proliferazione di queste cellule mutanti è causata da un'inattesa attivazione del meccanismo di risposta al danno del DNA.

Al di là dei dati sopra riassunti, l'importanza dei ruoli funzionali svolti dai membri della famiglia genica Cbf5/mfl/Dkc1 per la sopravvivenza della cellula è testimoniata dall'alto grado di omologia mantenuto dalle loro sequenze lungo la scala evolutiva. La discherina umana e la proteina MFL di *Drosophila* mostrano un grado di identità del 66% ed una similarità del 79%; ciò rende i geni *mfl* e *Dkc1* altamente correlati, così che i mutanti da perdita di

funzione del gene *mfl* possono rappresentare un eccellente sistema modello per lo studio della X-linked DC.

Risultati

In considerazione delle molteplici funzioni biologiche svolte dai membri della famiglia genica *Cbf5/mfl/DKCI* ho ritenuto opportuno approfondire e definire in maggior dettaglio la caratterizzazione del gene *mfl* (Nop60b), sia a livello fenotipico che molecolare, avvalendomi sia della genetica classica che della genetica inversa.

Una sistematica e dettagliata analisi è stata prima diretta alla caratterizzazione fenotipica del mutante ipomorfo *mfl^l*, che rappresenta l'unico ceppo mutante vitale allo stadio adulto (essendo i due mutanti *mfl⁰⁵* e *mfl⁰⁶* letali durante le fasi di vita larvale; Giordano et al., 1999); l'analisi è stata successivamente estesa alla definizione degli effetti provocati dal silenziamento del gene *minifly* mediante RNA interference (RNAi) *in vivo*, sotto il controllo del sistema binario Gal4/UAS.

A livello molecolare, le analisi sono state dirette prima alla definizione dell'organizzazione molecolare del gene *mfl* (Riccardo et al., 2007) e poi allo studio del profilo d'espressione dei suoi trascritti, sia coding che non-coding, al fine di acquisire ulteriori e più dettagliate informazioni sui relativi ruoli funzionali. Infine, sono state analizzate le interazioni fra il gene *mfl* e l'oncogene *d-myc*, che è noto fungere da attivatore della trascrizione di molti geni coinvolti nella sintesi proteica, e che in *Drosophila* ha come bersaglio più sensibile il gene *mfl* (Grewal et al., 2005; Pierce et al., 2008).

Caratterizzazione fenotipica del mutante ipomorfo *mfl*¹

Precedenti studi sui mutanti *mfl*¹ avevano dimostrato il coinvolgimento di questo gene nella corretta maturazione degli rRNA, nella crescita e nella fertilità della *Drosophila*, sia femminile (Giordano et al., 1999) che maschile (Kauffman et al., 2003).

A livello fenotipico era stato già descritto un ampio effetto pleiotropico provocato dalla mutazione *mfl*¹, che comprendeva un rallentamento dei tempi di sviluppo, riduzione delle dimensioni corporee, presenza di screpolature e difetti della cuticola addominale, nonché una riduzione nel numero e nella dimensione delle setole addominali (Giordano et al., 1999). Considerato però l'ampio ventaglio di funzioni biologiche svolto dai membri della famiglia genica cui appartiene *minifly*, ho ritenuto opportuno effettuare incroci fra moscerini omozigoti per la mutazione in questione per riesaminare in maggior dettaglio e descrivere in maniera esaustiva tutto il repertorio dei possibili difetti fenotipici causati dalla mutazione *mfl*¹, analizzando in maniera sistematica un ampio numero di individui della progenie per ottenere un attendibile quadro statistico. Nel ceppo in cui la mutazione *mfl*¹ è stata originariamente ottenuta mediante inserzione dell'elemento trasponibile P essa era mantenuta in eterozigosi con il cromosoma bilanciatore CyO (Curly of Oster, Wright et al., 1976), che consente di distinguere gli individui eterozigoti mediante la manifestazione di un fenotipo facilmente riconoscibile, dato dalla presenza di ali curve, o arricciate, provocata dalla

mutazione “*Curly*” presente sul bilanciatore. La percentuale di individui omozigoti per la mutazione *mfl*¹ presente nel ceppo era attesa essere del 33%, ed essere facilmente individuabile in base all’assenza del bilanciatore e quindi del fenotipo ali “*Curly*”; in realtà, questa percentuale è sempre risultata di gran lunga inferiore al valore atteso, sia per la ridotta fertilità degli omozigoti sia perché lo sviluppo e la crescita di questi ultimi sono notevolmente sfavoriti rispetto a quella dei moscerini eterozigoti.

Per facilitare l’analisi fenotipica ho quindi preferito incrociare fra loro gli individui omozigoti ad ali dritte, in modo da ottenere una progenie uniforme; inoltre, giacché è noto che molte manifestazioni fenotipiche sono strettamente collegate alla temperatura di crescita, gli incroci sono stati effettuati in replica, mantenendo la temperatura di crescita a due valori estremi (18°C e 28°C). L’osservazione della progenie ottenuta ha dato un risultato del tutto imprevedibile, dato che oltre l’85% della F1 presentava, oltre ai già descritti difetti della cuticola addominale e ridotte dimensioni corporee, anche ali curve, manifestando quindi un fenotipo definito “*Curly-like*” (fig. 19).



Fig. 19. Fenotipo *curly-like* dei mutanti *mfl*¹.

Un'analisi statistica di questi incroci, ottenuta dall'osservazione di una popolazione di circa 400 individui adulti, è riportata in Tab. 1. Dai dati ottenuti si evince chiaramente che il fenotipo *curly-like* caratterizza la maggior parte della progenie, indipendentemente dal sesso e dalla temperatura. Un'osservazione più dettagliata ha poi dimostrato che le ali dei mutanti *mfl¹* presentano, oltre alla caratteristica curvatura, numerosi difetti di sviluppo che sono discussi in dettaglio nel paragrafo successivo. L'analisi ha poi confermato la presenza di anomalie a carico della cuticola addominale, rivelando che, in gran parte, queste si associano non solo a difetti di pigmentazione, ma anche ad evidenti alterazioni di simmetria rispetto all'asse antero-posteriore e/o a quello mediano trasversale, nonché ad irregolare accrescimento della regione intertergitica (fig. 20).

Tratto fenotipico	18°C				28°C			
	96		92		102		95	
	nr.	% value	nr.	% value	nr.	% value	nr.	% value
<i>curly-like wings</i>	84	87,5	76	82,6	95	93,1	82	86,3
Asymmetry at abdominal segments	76	79,1	69	75	84	82,3	74	77,9
	6	6,2	9	9,7	5	4,9	7	7,3
Lack of the pigmented stripe at A6	---	---	---	---	102	100	---	---
Other developmental abnormality	3	2,9 no wings						

Tab. 1. Analisi fenotipica del mutante ipomorfo *mfl¹*. I dati si riferiscono ad una popolazione campione di circa 400 individui (il grassetto si riferisce ad individui con ala *curly-like*, in grigio a moscerini ala diritta).

Dato che la cuticola addominale della *Drosophila* si sviluppa da istoblasti imaginali che proliferano attivamente durante tutta la vita larvale, le asimmetrie osservate potrebbero essere dovute ad un asincrono e/o differente tasso di accrescimento e/o proliferazione dei due membri della coppia di istoblasti presente in ciascun segmento, che si tradurrebbe nei più comuni difetti osservati, cioè un'incompleta o alterata formazione dei tergiti (fig. 20, A-N), un irregolare sviluppo della pleura (fig. 20A,G,L,M) ed iperpigmentazione o assenza della pigmentazione nel VI tergite (fig. 20, D,I,L). Inoltre, le evidenti asimmetrie a carico dei segmenti addominali si manifestavano talvolta in combinazione con un alterato sviluppo delle ali che, oltre alle anomalie descritte nel paragrafo seguente, in alcuni casi rimanevano come strutture vestigiali (fig. 20, O).

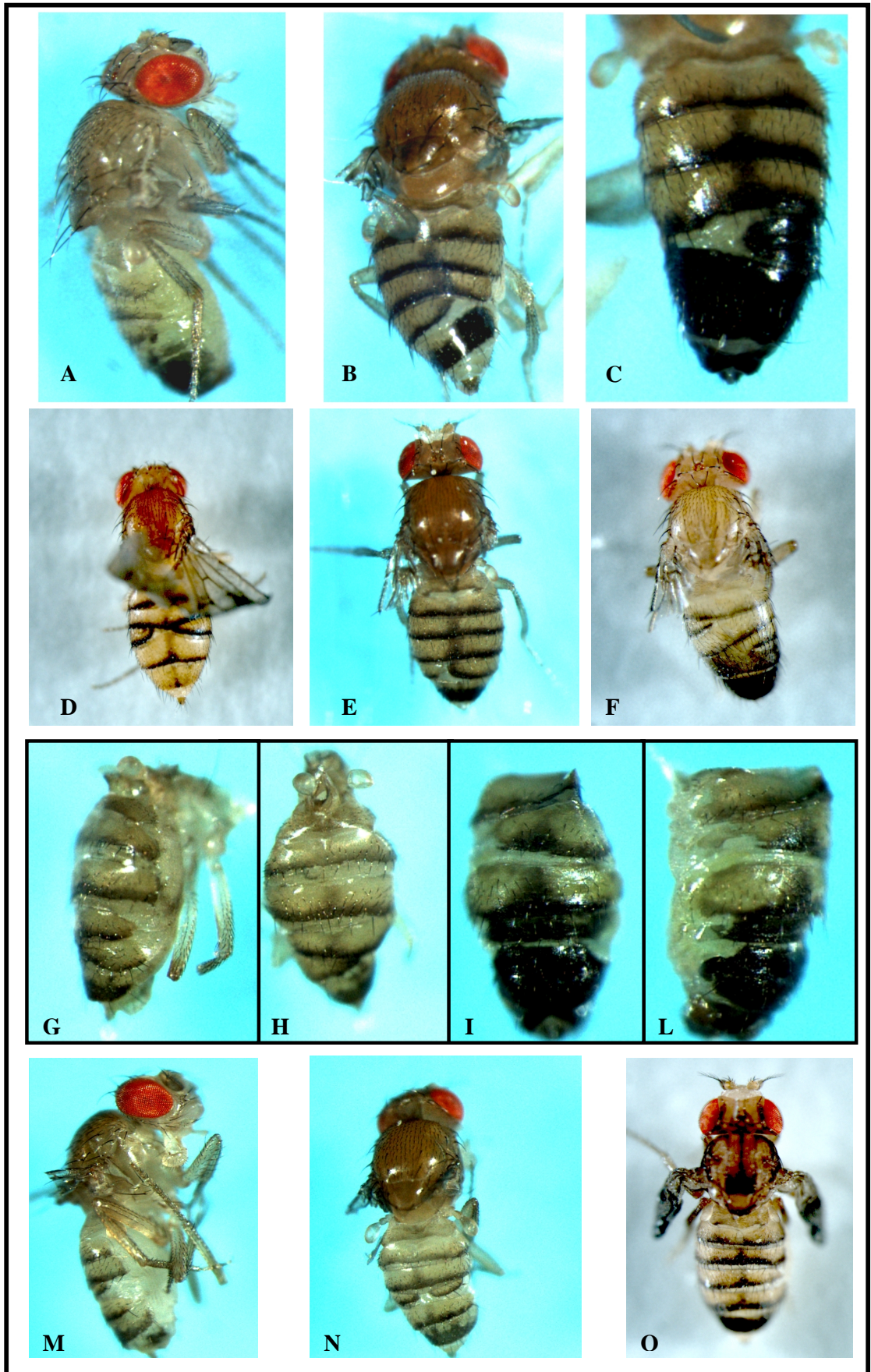


Fig. 20. Difetti di sviluppo associati alla mutazione *mft¹*.

Le anomalie dello sviluppo delle ali mostrate dai mutanti *mfl*¹

Come detto in precedenza, una notevole percentuale degli omozigoti *mfl*¹ presenta ali “*curly-like*”; questa caratteristica è però accompagnata da altre evidenti irregolarità dello sviluppo. Una prima evidente anomalia è data dalla presenza, lungo la superficie dell’ala, di numerose linee di frattura, probabilmente dovute alla torsione meccanica esercitata dalla marcata curvatura mostrata dalle ali stesse (fig. 23a). Una seconda alterazione riguarda l’integrità e la regolare morfologia del margine Dorso-Ventrale (D/V), che nei mutanti appare interrotto da “notch” più o meno estesi. La presenza di “notch” lungo il margine D/V è caratteristica di alterazioni a carico del pathway di trasduzione del segnale *Notch/Delta*, che è stato inizialmente caratterizzato proprio in base alla presenza di questi difetti, tipici dei mutanti *Notch*- (fig. 23b,f). Lungo la superficie dorsale del margine anteriore dell’ala (AWM) è poi spesso evidenziabile una distribuzione delle setole, o “bristles” del tutto irregolare, che porta ad alterazioni del rapporto 1:5 con cui si alternano regolarmente le setole chemio- e meccano-sensorie; nei mutanti *mfl*¹ sono, infatti, frequentemente osservati tratti in cui le setole chemio-recettive si ritrovano più ravvicinate o, viceversa, molto più disperse o addirittura assenti (fig. 23c,d,e). E’ interessante osservare che anche queste anomalie sono compatibili con un’alterata espressione del pathway regolativo di *Notch*. Le setole meccano-sensorie presenti sull’AWM si originano infatti da elementi precursori chiamati SOP (Sensory Organ Precursor; Li et al., 2006): le cellule

selezionate a diventare SOP esprimono alti livelli del ligando *Delta*, che va ad attivare *Notch* nelle cellule adiacenti (non-SOP). Dopo la sua attivazione, *Notch* rilascia il suo dominio intracellulare (N^{IC}) che trasloca nel nucleo e si lega a *Suppressor of Hairless* [Su(H)] convertendolo nella forma attiva [Su(H)^{Act}]. Il complesso $N^{IC}/ Su(H)^{Act}$ attiva *Enhancer of Split* [E(spl)] e di conseguenza reprime la trascrizione del gene *senseless* (*sens*), un fattore di trascrizione la cui espressione è dinamicamente regolata durante lo sviluppo. Nei SOPs, *Notch* non è attivato, per cui Su(H) funge da repressore di E(spl). Alti livelli di *sens* sono richiesti per consentire l'espressione dei geni proneurali nelle cellule SOP, mentre un basso livello di *sens* è riscontrato nelle cellule adiacenti (non-SOP) (Nolo et al., 2000).

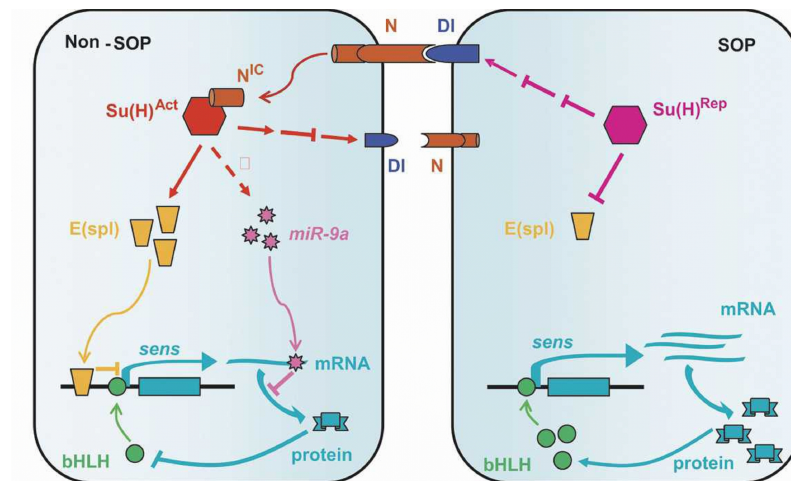


Fig. 21. Modello di specificazione degli organi sensoriali in *Drosophila* (da Li et al., 2006).

Alterazioni di questo processo potrebbero pertanto consentire a *sens* di essere continuamente espresso in cellule originariamente non-destinate a diventare strutture chemiosensorie, consentendo in tal modo l'attivazione di geni neuro-

specifici (bristles chemio-sensorie ravvicinate) oppure manterrebbero costantemente basso il livello di *sens* impedendo il regolare differenziamento delle cellule SOP (bristles chemio-sensorie distanziate o assenti). Altra caratteristica anomala frequentemente manifestata dai mutanti *mfl*¹ riguarda l'orientamento dei tricomi che ricoprono le superfici dorsale e ventrale dell'ala. L'epitelio dell'ala di *Drosophila* presenta una caratteristica polarità planare (*Planar Cell Polarity*; PCP). Ciascuna cellula epiteliale possiede infatti un singolo pelo (Wu et al., 2007) e poiché è noto che le cellule della lamina alare proliferano in direzione P/D, fatta eccezione per le cellule del margine che proliferano in direzione D/V, ogni pelo della lamina si trova regolarmente orientato in direzione prossimo/distale (fig. 22). Tale regolare orientamento è fortemente alterato nei mutanti *mfl*¹ in cui, al contrario, la direzionalità dei peli si mostra confusa e disordinata, indicando perdita della PCP (fig. 23g). Questo dato suggerisce che *mfl* possa far parte del gruppo di geni che regola la *Planar Cell Polarity* (PCP) in *Drosophila*.

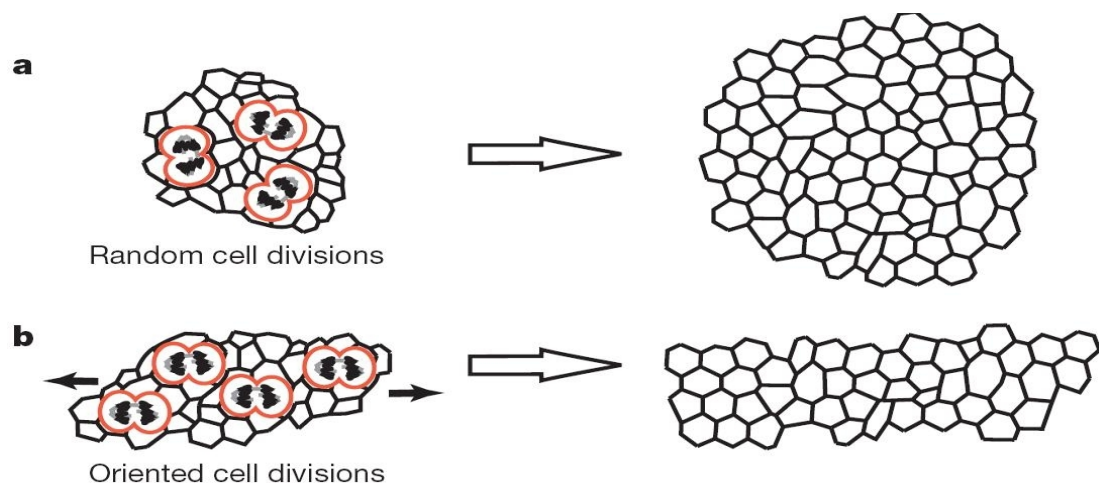


Fig. 22. Schemi alternativi di proliferazione cellulare. Divisione cellulare random (A) e orientata (B) (da Lecuit and Le Goff, 2007).

Sebbene con una incidenza minore, è stata spesso osservata nei mutanti l'incompleta formazione di una delle cinque vene normalmente presenti nella lamina (fig. 23b), ed in alcuni casi anche la disposizione ectopica degli organi sensilli campaniformi (fig. 23h).

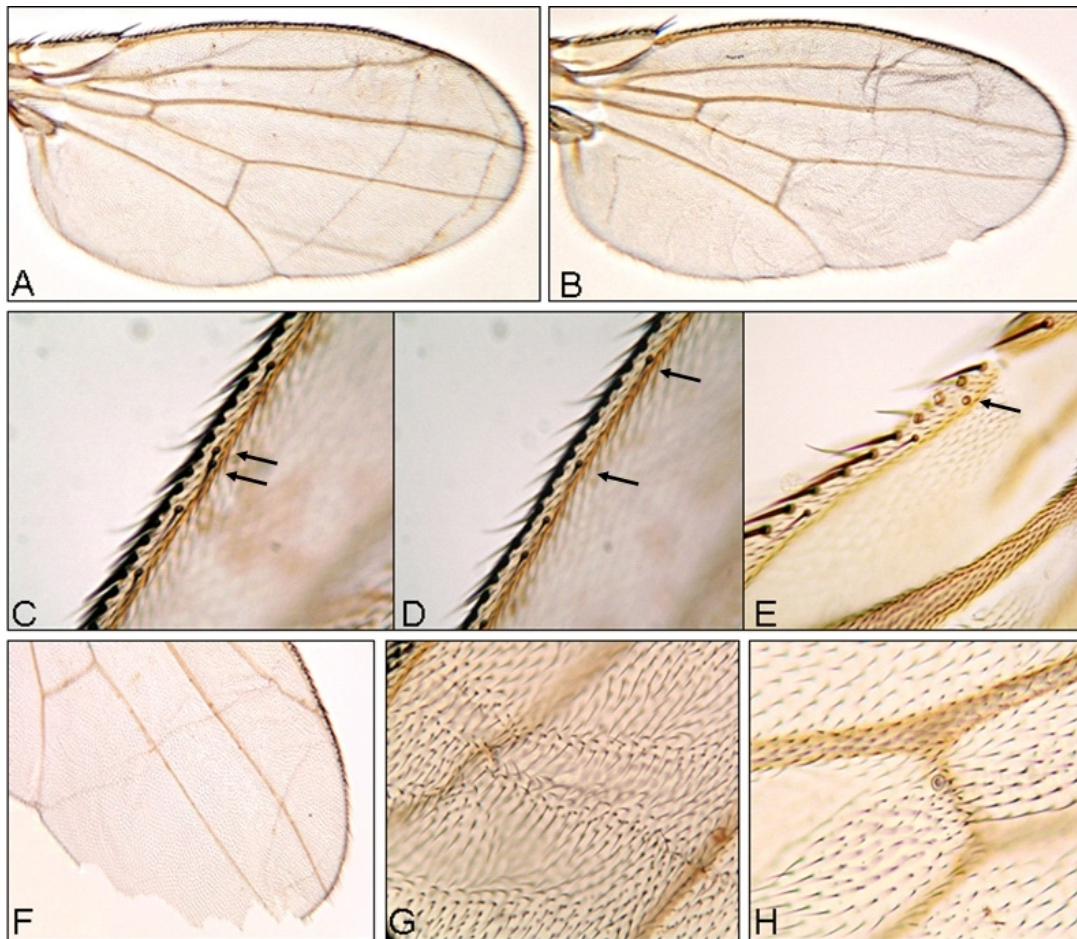


Fig. 23. Difetti dello sviluppo dell'ala associati alla mutazione *mfl*. (A) Sono evidenti lunghi segni di frattura trasversali alla lamina alare. (B) La presenza di fratture è accompagnata anche da irregolare sviluppo della vena L2, che non raggiunge il margine dell'ala. (C, D, E) Irregolare spaziatura fra le setole lungo l'AWM. (F) Interruzioni (notches) del margine dorso-ventrale. (G) Effetti dovuti alla perdita della *planar cell polarity*. (H) Localizzazione ectopica di un organo campaniforme in prossimità dell'*anterior cross vein* (acv).

In conclusione, l'insieme delle alterazioni osservate a carico delle strutture dell'ala ha rivelato che il gene *mfl* riveste un ruolo importante nello sviluppo di quest'organo. Poiché, come già accennato, la formazione dell'ala di

Drosophila segue un preciso e rigoroso schema di sviluppo in cui differenti pathway e vie di trasduzione del segnale intervengono in maniera ordinata e dettagliatamente descritta, è risultato opportuno programmare una serie di esperimenti tesi a meglio definire il ruolo del gene *mfl* nel processo di sviluppo di quest'organo. Gli esperimenti descritti nel paragrafo successivo hanno quindi tratto vantaggio dalla possibilità di silenziare il gene *mfl in vivo*, nell'organismo *in toto* o in specifiche regioni del disco imaginale dell'ala, utilizzando il sistema di attivazione binario GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993) ed il meccanismo dell'RNAi.

Silenziamento del gene mfl mediante RNAi in vivo

In *Drosophila*, l'RNAi è un processo cellulare autonomo (Van Roessel et al., 2002; Roignant et al., 2003) e può essere innescato dall'espressione di un transgene che porta alla formazione di una doppia elica di RNA (Kennerdell et al., 2000; Lam and Thummel, 2000; Giordano et al., 2001). Attraverso l'utilizzo del sistema di espressione GAL4/UAS tali transgeni possono essere agevolmente utilizzati per dirigere l'inattivazione del gene target selettivamente, in specifici tipi cellulari ed in qualunque stadio di sviluppo dell'insetto. L'inibizione della funzione genica tramite RNAi, associata alla disponibilità dell'intera sequenza genomica, ha spinto alla creazione di una collezione di ceppi transgenici capaci di silenziare in maniera specifica molte delle sequenze codificanti (ORF) presenti nel genoma del moscerino. Ogni

ceppo transgenico della collezione porta integrata una singola copia di uno specifico transgene, clonato all'interno del vettore pMF3 (Dietzl et al., 2007). Ogni transgene è formato da brevi frammenti genici (300-400 bp) disposti in maniera invertita e ripetuta; essi sono separati da una breve sequenza spaziatrice ed inseriti a valle di dieci copie in tandem dell'elemento UAS (UAS-*IR*). Tale collezione, recentemente completata dall'Università di Vienna e denominata VDRC, attualmente dispone di oltre 22.000 ceppi transgenici, ciascuno dei quali ha subito l'inserimento di un transgene UAS-RNAi capace di silenziare specificamente un singolo gene target. 12,251 geni, ovvero l'88,2% del genoma di *Drosophila* sono rappresentati in questa collezione, che è attualmente disponibile presso il sito <http://www.vdrc.at>.

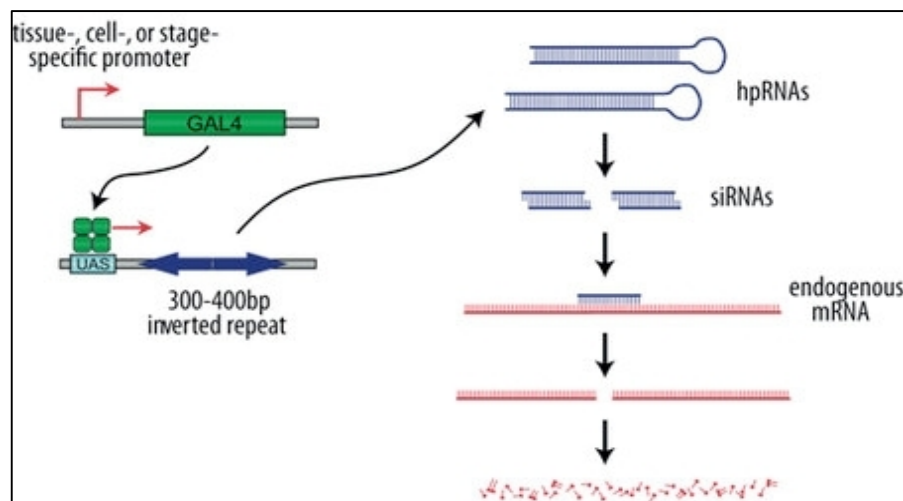


Fig. 24. Schema di funzionamento del silenziamento genico inducibile basato sull'attivazione del RNAi mediato dal sistema GAL4-UAS. Il sistema Gal4/UAS è utilizzato per guidare la produzione di un *hairpin* RNA (*hpRNAs*). Tali dsRNA vengono processati da Dicer nei *siRNA*, che dirigono la degradazione sequenza-specifica degli mRNA target.

La disponibilità di diverse linee transgeniche "driver", che esprimono l'attivatore GAL4 (Duffy, 2002) con modalità diverse e specifiche, consente di attivare mediante un semplice incrocio il silenziamento del gene target

virtualmente in quasi tutti i tipi cellulari. Diversamente dalla strategia convenzionale del mosaico cellulare che utilizza le mutazioni classiche, l'espressione dei transgeni silenziatori non è ristretta alle cellule clonalmente correlate.

Nell'ambito della collezione VDRC sopra descritta, erano disponibili per il silenziamento del gene *mfl* quattro diverse linee transgeniche, che differivano sia per il costrutto in grado di mediare l'RNAi, che per il cromosoma nel quale il vettore si era inserito (fig. 25).

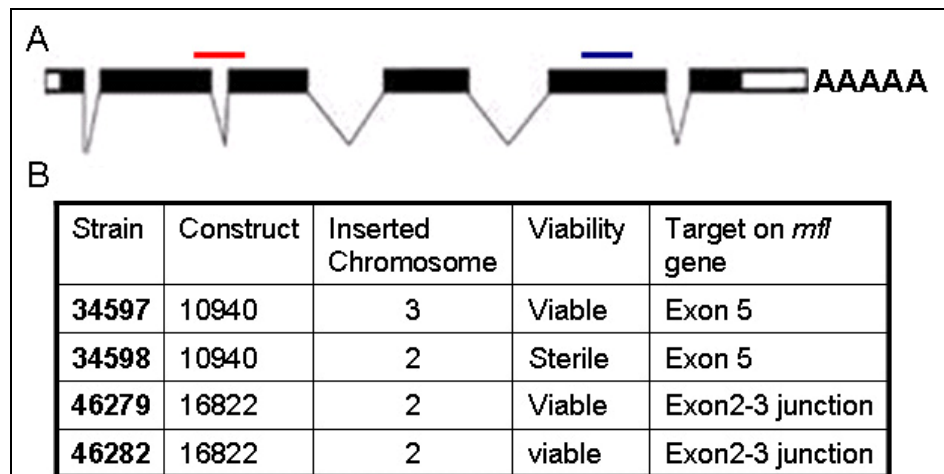


Fig. 25. Stock in grado di dirigere l'RNAi del gene *minifly*. (A) Isoforma costitutiva del gene *minifly*. In rosso è indicato il costrutto #16822 in grado di riconoscere la giunzione Esone2-Esone3; in blu, il costrutto #10940 che usa come target l'esone 5. (B) Caratteristiche genetiche dei quattro stock considerati.

Tutte le linee disponibili sono state saggiate per la loro efficienza di silenziamento in un primo ciclo preliminare di esperimenti con il driver *vestigial*-GAL4 da cui è risultato che le linee 46279 e 46282 erano in grado di presentare, fenotipicamente, effetti più gravi sullo sviluppo del margine dell'ala. Per questa ragione ho scelto la linea 46282 per i successivi esperimenti di RNAi localizzata. Inoltre, come controllo preliminare per

verificare l'efficienza di silenziamento ottenibile in ciascuna linea, ho attivato in maniera ubiquitaria ciascuna delle linee disponibili, mediante incrocio con la linea driver ActGAL4.

Per ciascuna linea, l'attivazione del transgene silenziatore mediata dal driver ActGAL4 è risultata letale durante la vita larvale, bloccando la metamorfosi ed impedendo la formazione degli individui adulti. Inoltre, le larve che riuscivano a svilupparsi fino al terzo stadio (LIII) mostravano, oltre ad un ritardo di sviluppo di 5-6 giorni, anche tumori melanotici multipli, osservabili in circa il 90% della popolazione. I tumori erano variamente posizionati all'interno della cavità del corpo larvale (emocele), senza una localizzazione preferenziale (fig. 26).



Fig. 26. Le larve ActGAL4/UAS-IR*mfl* presentano tumori melanotici multipli. I tumori melanotici presenti non presentano una localizzazione definita.

E' interessante però notare che in *Drosophila* questa classe di tumori non è ritenuta essere di natura neoplastica. Infatti, i tumori melanotici possono

originarsi o da overproliferazione delle cellule del sangue, gli emociti o, come appare evidente in questo caso, da una risposta immunitaria verso cellule anormali o tessuti non opportunamente differenziati che vanno incontro a necrosi (Sparrow, 1978).

Per quantizzare l'efficienza dell'RNAi, il livello di accumulo dei trascritti del gene *mfl* è stato determinato mediante Real Time RT-PCR in preparazioni di RNA totale ottenute da larve di terzo stadio *ActGAL4/UAS-IRmfl* e, come controllo, da larve *ActGAL4/+*.

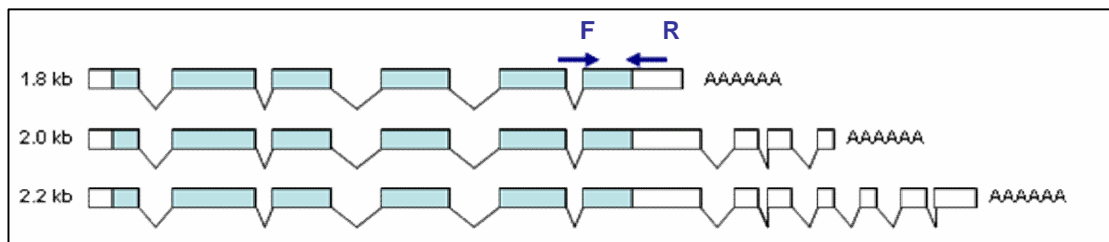


Fig. 27. Schema sperimentale seguito per la quantizzazione dei trascritti di *mfl* mediante Real-Time RT-PCR. In blu sono indicati gli oligo utilizzati per l'amplificazione: l'oligo forward (F) si appaia con la regione a cavallo tra ex5-ex6; l'oligo reverse (R) riconosce una regione nell'esone 6.

Come mostrato in fig. 28, il livello dei trascritti specifici è risultato ridotto a meno del 20% rispetto al controllo, confermando che le condizioni sperimentali seguite provocano un silenziamento molto efficiente del gene *mfl*.

La drastica riduzione dei trascritti di *minifly* giustificherebbe, pertanto, la letalità osservata nelle larve interferite. E' poi interessante notare che nessuno degli snoRNA saggiati ha mostrato un silenziamento similare, a conferma della localizzazione citoplasmatica del processo di RNA interference. La quantizzazione del livello d'accumulo dello snoRNA *H1* ha mostrato una

riduzione di circa il 30% rispetto al controllo, molto probabilmente dovuta alla riduzione della proteina MFL che lega e stabilizza questa classe di snoRNA. A differenza dello snoRNA *H1*, gli snoRNA *DmSnR60 a-d* hanno invece mostrato un discreto incremento. Sebbene questa classe di snoRNA non viene stabilizzata dalla proteina MFL ma dalla fibrillarina, questo dato richiede ulteriori approfondimenti. Infine, è stato riscontrato un considerevole aumento del trascritto del gene *d-myc*, regolatore di *mfl*, un dato interessante che suggerisce un potenziale loop regolativo tra questi due geni.

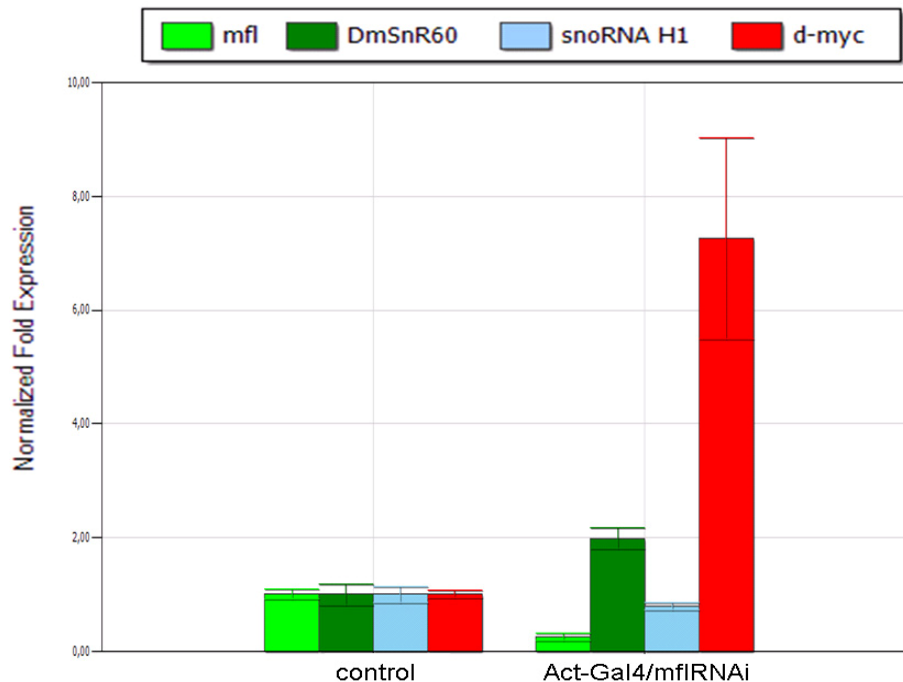


Fig. 28. Risultati degli esperimenti di Real Time RT-PCR in cui è stata valutata la quantità dei trascritti dei geni *mfl*, *DmSnR60 a/d*, *snoRNAH1* e *d-myc*. A sinistra sono riportati i valori misurati nel non interferito e posti uguale al 100% (controllo); a destra sono indicati i livelli d'espressione dei geni considerati nelle larve act-Gal4/UAS-IR*mfl*.

E' interessante notare che il driver *Act-GAL4*, che induce un silenziamento ubiquitario, non è l'unico ad aver determinato letalità nelle fasi precoci dello sviluppo; infatti, anche l'utilizzo di linee che esprimono la proteina GAL4 in

regioni più ristrette, mediante i driver *apterous*-, *hedgehog*-, *spalt*-GAL4 (Calleja et al., 1996; Tanimoto et al., 2000; Boube et al., 2000), ha determinato letalità larvale, indicando che anche perturbazioni locali del livello di espressione del gene *mfl* determinano gravi alterazioni del normale pattern di sviluppo.

Ho quindi indotto il silenziamento del gene *mfl* in diversi territori del disco immaginale dell'ala, utilizzando le linee transgeniche attivatrici *engrailed*-GAL4 (*en*-GAL4, Baonza et al., 2000), *vestigial*-GAL4 (*vg*-GAL4, Simmonds et al., 1995), *nubbin*-GAL4 (*nub*-GAL4, Calleja et al., 1996), MS1096-GAL4 (Capdevila and Guerrero, 1994) e *decapentaplegic*-GAL4 (*dpp*-GAL4, Staehling-Hampton et al., 1994). Ognuna di esse guida l'espressione della proteina di lievito GAL4 in specifiche regioni presuntive del disco dell'ala, coinvolgendo sia singoli compartimenti che l'intera lamina alare. Con eccezione del driver *dpp*-GAL4, ottenuto mediante inserzione random di un costrutto che porta il trans-attivatore GAL4 a valle della sequenza enhancer di *dpp* (Staehling-Hampton et al., 1994), le rimanenti linee driver portavano l'inserzione della sequenza GAL4 all'interno della sequenza regolativa dei geni indicati. Una rappresentazione schematica dell'ala di *Drosophila* con le presuntive regioni d'espressione degli enhancers saggiati è mostrata in fig. 29.

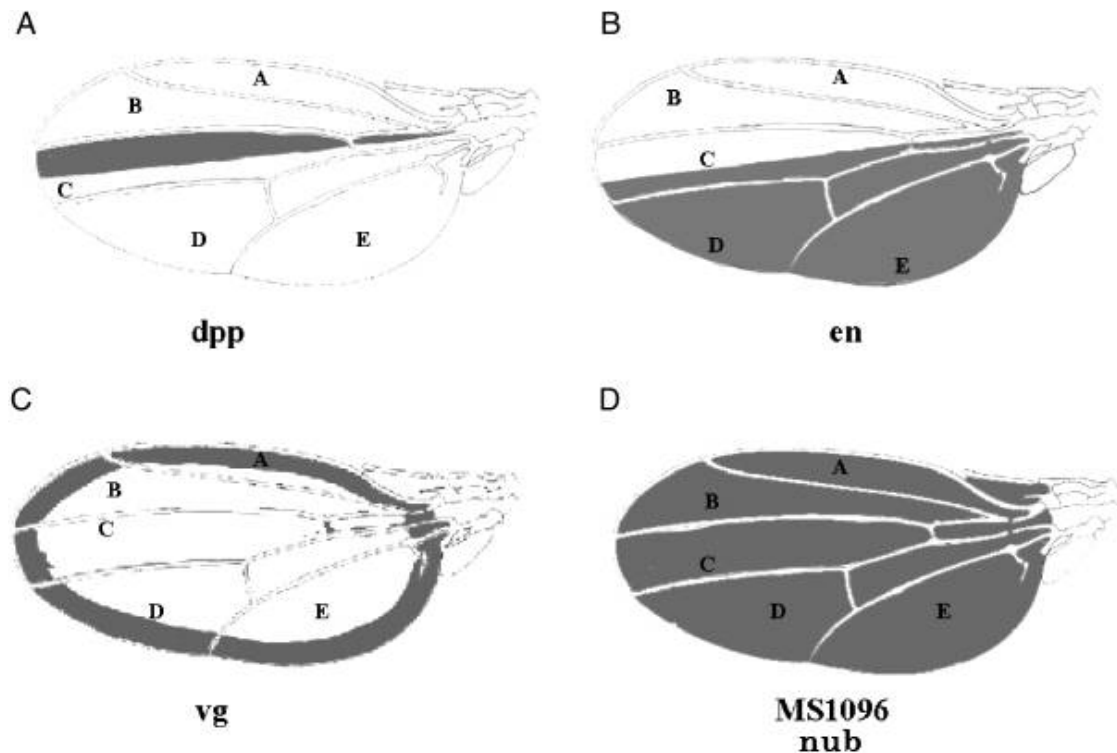


Fig. 29. Rappresentazione schematica dei territori marcati dall'espressione di GAL4 sotto il controllo di *dpp* (A), *en* (B), *vg* (C) e *nub* e MS1096 (D) nell'ala adulta di *Drosophila*. A, B, C, D ed E rappresentano le regioni intervena comprese nei compartimenti anteriore e posteriore (da Trotta et al., 2005).

Ad eccezione della progenie ottenuta dall'incrocio con *dpp*-GAL4, che ha mostrato, salvo rare eccezioni, un fenotipo essenzialmente selvatico, la F1 osservata dai restanti incroci ha manifestato una serie di anomalie fenotipiche molto interessanti che hanno per lo più riprodotto le alterazioni osservate nei mutanti *mfl*¹, confermando il coinvolgimento di questo gene nella corretta formazione dell'ala.

Il silenziamento diretto dal driver *en*-GAL4 ha provocato una drastica riduzione del compartimento posteriore dell'ala, talvolta accompagnato da una completa perdita della normale morfologia dell'intera struttura (vedi fig. 30a,b). E' stato inoltre osservato un fenotipo del tutto inatteso, consistente

nella formazione di un'anomala protuberanza che sporge dalla parte anteriore del *notum* (fig. 30c); tale struttura, la cui dimensione e forma appare piuttosto variabile, presenta un aspetto articolato e ricoperto di tricomi. La comparsa di questa struttura, non chiaramente definibile, appare però essere un chiaro segno di iperproliferazione del disco protoracico dorsale.

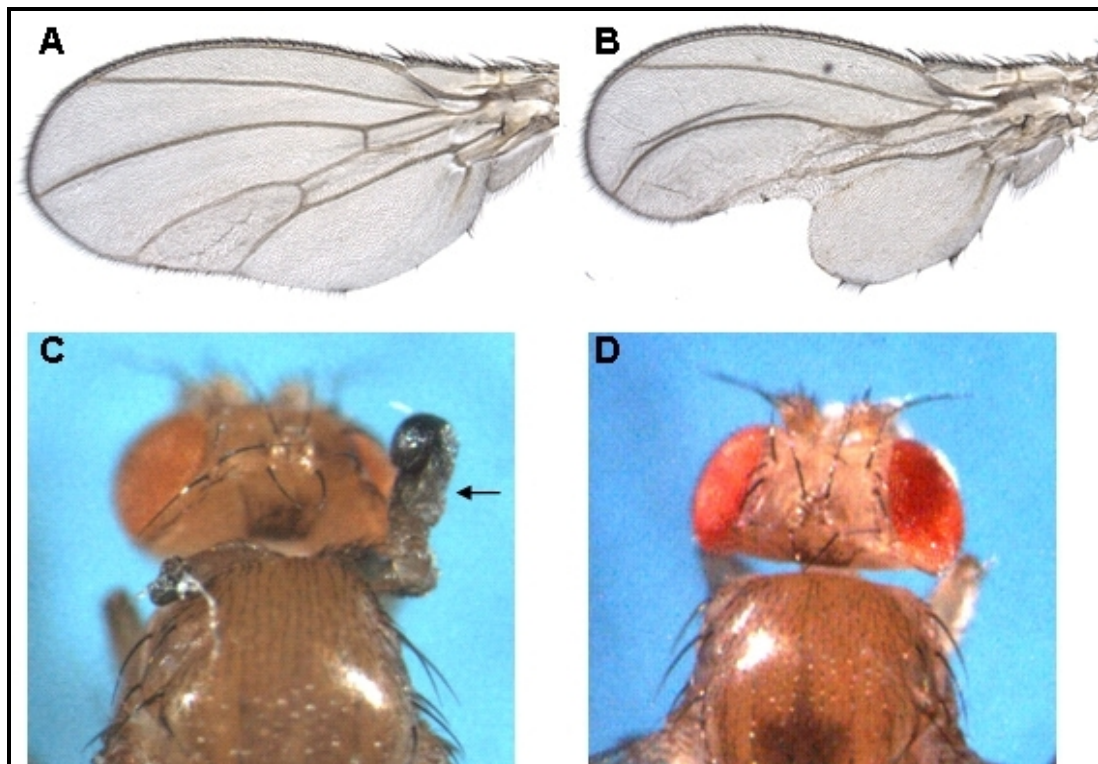


Fig. 30. Caratteri fenotipici dovuti al silenziamento del gene *minifly* con *engailed-GAL4*. L'RNAi localizzato nel profilo di espressione del gene *engailed* determina effetti sulle ali (A,B) e a livello del disco protoracico dorsale (C). Regione anteriore del protorace in moscerini *wild-type* (D).

Il silenziamento diretto dal driver *vg-GAL4* ha provocato interruzioni (notch) del margine D/V, sia nella regione anteriore che in quella posteriore (fig. 31a). L'enhancer [BE] del gene *vestigial* guida l'espressione di GAL4 lungo la sottile banda a ridosso del margine D/V; la ridotta espressione del gene *mfl* in questa regione impedisce quindi la corretta formazione del margine dell'ala, provocando effetti del tutto simili a quelli osservati nei mutanti *mfl¹*.

L'RNAi diretto dal driver *nub*-GAL4 ha provocato un irregolare sviluppo dell'intera lamina alare. Durante il terzo stadio larvale, l'enhancer del gene *nubbin* guida l'espressione dell'attivatore GAL4 in tutta la lamina alare ("wing-pouch"; Cifuentes and Garcia-Bellido, 1997). In accordo con il territorio d'espressione di quest'enhancer, le anomalie mostrate dai moscerini interferiti consistono in una notevole riduzione dell'intera superficie dell'ala, stimata intorno al 45%, e nella presenza di numerose vene ectopiche che attraversano l'ala (fig. 31b).

Infine, anche il silenziamento diretto dal driver MS1096, in cui l'espressione di Gal4 è diretta dall'enhancer del gene *Beadex* (*Bx*), ha evidenziato alterazioni nella formazione delle ali. Analogamente a *nubbin*, quest'enhancer dirige l'espressione di GAL4 nell'intera lamina, ma la sua espressione è più precoce. Di conseguenza, anche i moscerini silenziati presentano un fenotipo più severo, mostrando una disorganizzazione generale dell'ala, che tende ad incurvarsi dorsalmente, probabilmente a causa dalla presenza di "bolle" dovute alla mancata adesione tra l'epitelio dorsale e quello ventrale e/o a differenze di proliferazione tra i due foglietti, un fenotipo comunemente definito *blistered* dal nome del gene i cui mutanti mostrarono per primi questo difetto (Fristrom et al. 1994; fig. 31c-e).

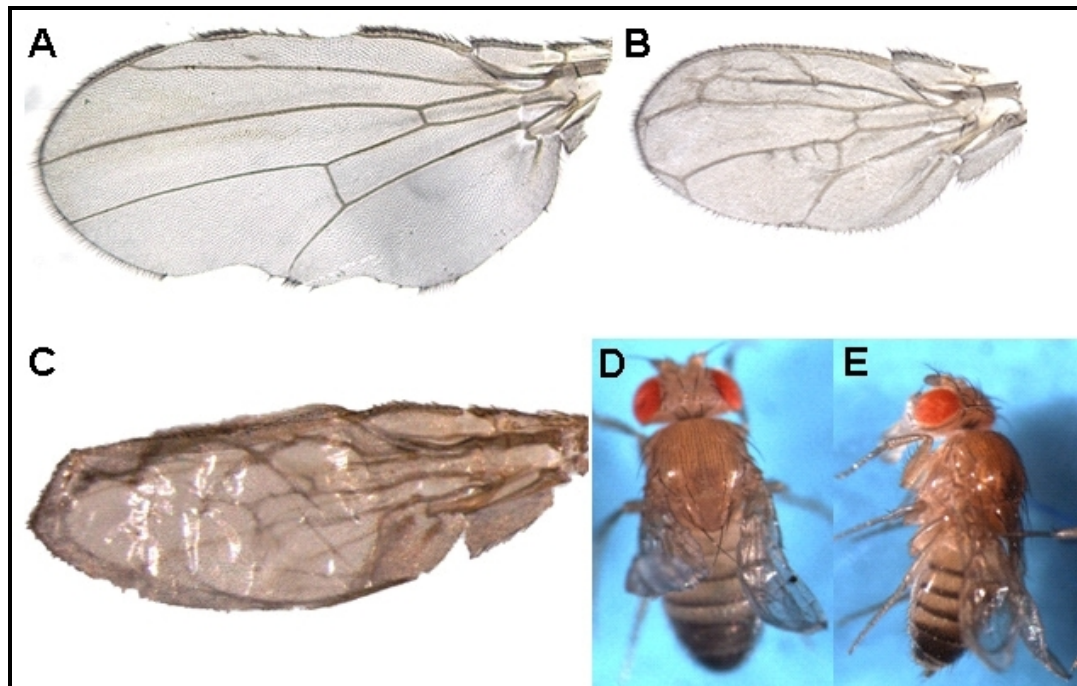


Fig. 31. Effetti del silenziamento localizzato del gene *minifly*. Silenziamento diretto dalla linea driver *vestigial-GAL4* (A); *nubbin-GAL4* (B); *MS1096-GAL4* (C,D,E).

Il silenziamento del gene minifly provoca una riduzione della proliferazione e della dimensione cellulare

Dopo una preliminare analisi fenotipica degli effetti provocati dal silenziamento del gene *mfl*, ho cercato di caratterizzare più in dettaglio i parametri cellulari alterati dalla sua ridotta espressione definendo nei moscerini silenziati tre parametri conformazionali:

- la superficie dell'ala, integrando misurazioni effettuate nei compartimenti anteriore/posteriore;
- la densità cellulare;
- la dimensione cellulare.

L'ala di *Drosophila*, è nota rappresentare un eccellente sistema modello per

analizzare variazioni di dimensione e forma mediante metodi geometrici denominati complessivamente “morfometrie geometriche” (Klingenberg and Zaklan, 2000). Questo organo può essere infatti suddiviso in distinte regioni che sono soggette, durante lo sviluppo, a differenti controlli genetici e che si comportano come distinte unità di selezione. Durante lo sviluppo, la divisione cellulare all'interno dei dischi imaginali di *Drosophila* usa infatti, come punti di riferimento specifici confini di restrizione, e ciò offre la possibilità di sviluppare un modello in cui le cellule, attraverso la proliferazione, generano spazi morfologici di forma e dimensione costanti, permettendo di integrare studi di genetica quantitativa e di sviluppo. Mi sono quindi ancora avvalso di quest'approccio per definire gli effetti del silenziamento del gene *mfl* nei diversi territori dell'ala. I moscerini in cui il silenziamento era diretto dai driver *MS1096* e *vg* presentavano dei fenotipi che, seppur interessanti, ne precludevano buone misurazioni morfometriche: i primi a causa della presenza di bolle e di una struttura eccessivamente disorganizzata, i secondi a causa dell'assenza di regioni più o meno ampie del margine. Pertanto le linee transgeniche attivatrici considerate per l'analisi sono state *en-GAL4* e *nub-GAL4*, che guidano l'espressione della proteina GAL4, rispettivamente, nelle regioni presuntive del compartimento posteriore e nell'intera lamina. I moscerini silenziati sono stati quindi raccolti e fissati in una soluzione etanolo-glicerolo; entrambe le ali sono state dissezionate, disidratate in etanolo e montate su vetrino in acido lattico/etanolo. In prima analisi è stata

misurata la superficie dell'ala, sia *in toto* che a livello dei compartimenti anteriore e posteriore. Tali misure sono state effettuate su un campione di dieci ali, selezionate a caso per ciascun genotipo da maschi adulti; le dimensioni di ciascuna area sono state determinate con il software Adobe Photoshop CS3 Extended v.10.0.1. Al fine di minimizzare eventuali variazioni dovute al background genetico delle linee driver, i dati sono stati confrontati con quelli ottenuti dagli individui di genotipo, rispettivamente *nub-GAL4/+* ed *en-GAL4/+*.

I dati ottenuti, mostrati in figura 32a, indicano che il silenziamento diretto dal driver *nub-GAL4* riduce drasticamente la superficie totale dell'ala (del 44,6%) e a quest'effetto contribuiscono in maniera pressoché simile sia il compartimento anteriore che quello posteriore. Ciò è confermato anche dal rapporto tra la superficie del compartimento anteriore e posteriore, che è pressappoco uguale all'unità, sia per le ali dei moscerini silenziati che per i controlli.

Totalmente diversi sono invece i risultati ottenuti con il driver *en-GAL4* (fig.32b). In questo caso la superficie totale dell'ala presenta una riduzione ben più modesta, circa del 21,3% ma, tale diminuzione è quasi esclusivamente a carico della regione posteriore, come dimostrato dall'aumento del rapporto A/P di circa il 65% nei moscerini interferiti rispetto al controllo.

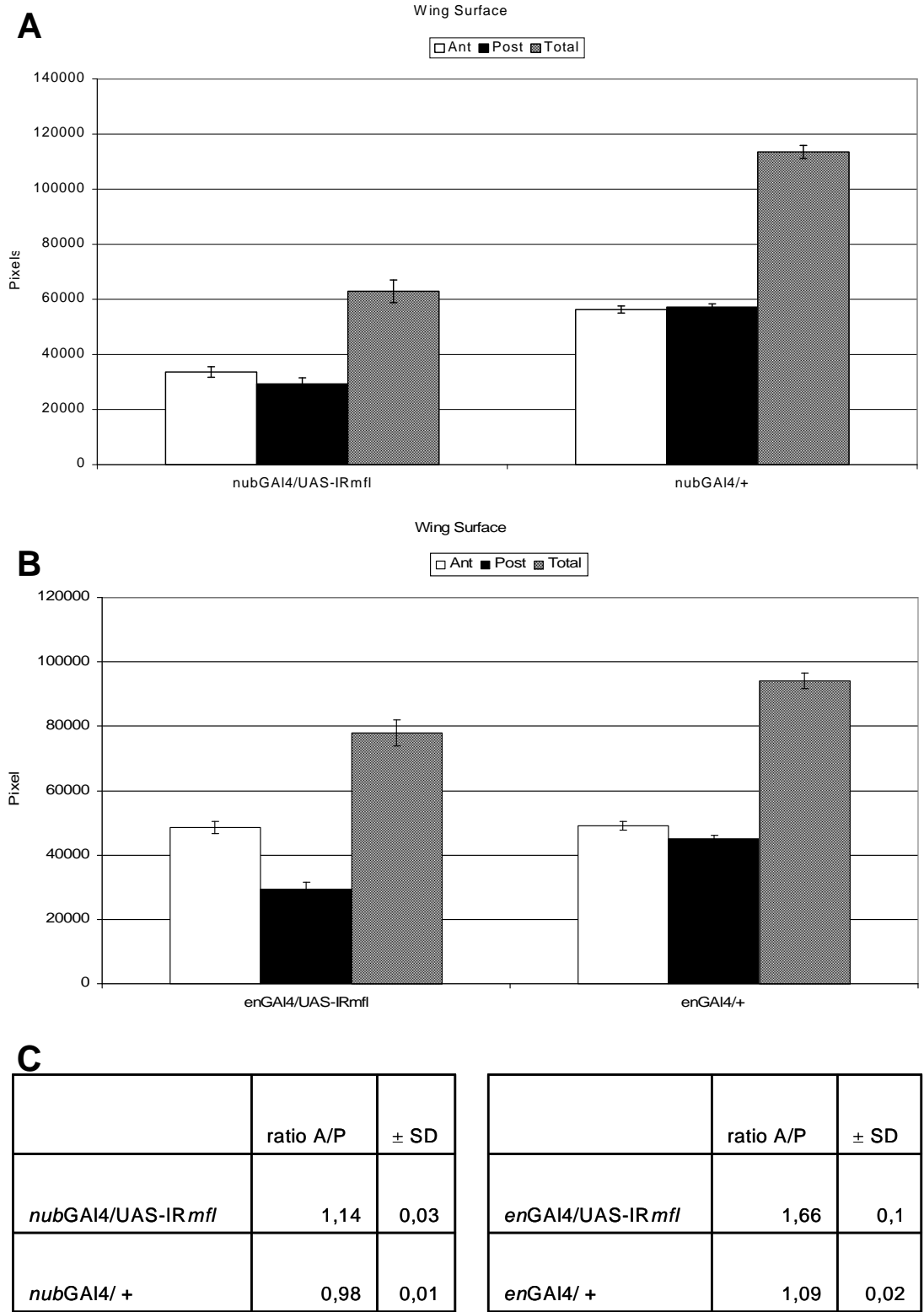


Fig. 32. Effetti del silenziamento del gene *mfl* nello sviluppo dell'ala. Gli istogrammi mostrano la riduzione delle dimensioni della superficie dell'ala a seguito del silenziamento diretto dai driver *nubGAL4* (A) ed *enGAL4* (B). Le misure si riferiscono all'ala *in toto* (grigio) ed ai singoli compartimenti, Anteriore (bianco) e Posteriore (nero). (C) In tabella sono riportati i rapporti tra le superfici dei compartimenti Anteriore e Posteriore e la relativa deviazione standard (SD).

Per comprendere se la risposta plastica dell'ala (intesa come variazione delle sue dimensioni in risposta ad un cambiamento delle condizioni di crescita, in questo caso il silenziamento del gene *mfl*), si fosse realizzata attraverso variazioni del numero di cellule (dovuta ad alterazioni della proliferazione e/o apoptosi) o delle dimensioni delle cellule (dovuta ad alterazioni della crescita), sono state effettuate valutazioni quantitative della densità cellulare, procedendo ad un'accurata conta cellulare all'interno di precise regioni dell'ala. Poiché ciascuna cellula che costituisce l'epitelio dell'ala possiede un singolo tricoma, il numero di cellule all'interno di una area ben definita può essere facilmente conteggiato, permettendo un preciso calcolo della densità cellulare. Per ridurre al minimo eventuali errori statistici di campionamento, la conta cellulare è sempre stata effettuata nella stessa posizione, cioè sulla pagina dorsale, nella regione intervena situata tra L5 e il margine posteriore, all'altezza della *posterior cross vein* (pcv) (fig. 33e); l'area considerata è stata fissata all'interno di un quadrato di ampiezza definita (10000 pxl). Il calcolo della densità cellulare ha rivelato che il driver *nub*-GAL4 provoca circa il raddoppio del numero di cellule/area, indicando inequivocamente che la ridotta dimensione dell'ala non è dovuta a problemi di natura proliferativa, ma piuttosto ad un "drastico" ridimensionamento della dimensione delle cellule che la compongono (tab. 2). Del tutto opposto è stato il risultato ottenuto per il driver *en*-GAL4: in questo caso infatti, la densità cellulare è risultata

praticamente invariata, sia rispetto alla stessa regione di controllo (*en-GAL4/+*), sia rispetto ad una regione di uguale ampiezza situata nel compartimento anteriore, e che quindi non risentiva del silenziamento.

	Cell density Posterior comp. (cell/cm ²)	± SD	Cell Area Posterior comp. (cm ²)	Cell density Anterior comp. (cell/cm ²)	± SD	Cell Area Anterior comp. (cm ²)
<i>enGAI4/UAS-IRmfl</i>	19,35	2,85	0,052	21,75	1,83	0,046
<i>enGAI4/+</i>	19,1	1,1	0,052	23,4	1,17	0,043
<i>nubGAI4/UAS-IRmfl</i>	36	2,94	0,028	//	//	//
<i>nubGAI4/+</i>	17,4	1,39	0,057	//	//	//

Tab. 2. Il silenziamento del gene *minifly* determina riduzione della dimensione cellulare (con *nub-GAL4*) e della proliferazione (con *en-GAL4*). La densità cellulare è stata valutata mediante conta cellulare all'interno di un quadrato di 1cm², e pertanto espressa come cell/cm². L'area cellulare è stata determinata come l'inverso della densità cellulare. Le unità di misura si riferiscono ad immagini acquisite con un ingrandimento 400X. (SD) Deviazione Standard.

La riduzione del comparto posteriore dell'ala nei moscerini silenziati con il driver *en-GAL4* è quindi attribuibile ad eventi di natura apoptotica e/o a riduzione dell'attività proliferativa. I dati ottenuti indicano quindi che il silenziamento del gene *mfl* può indurre una significativa riduzione sia della dimensione delle cellule che del loro numero (fig. 33).

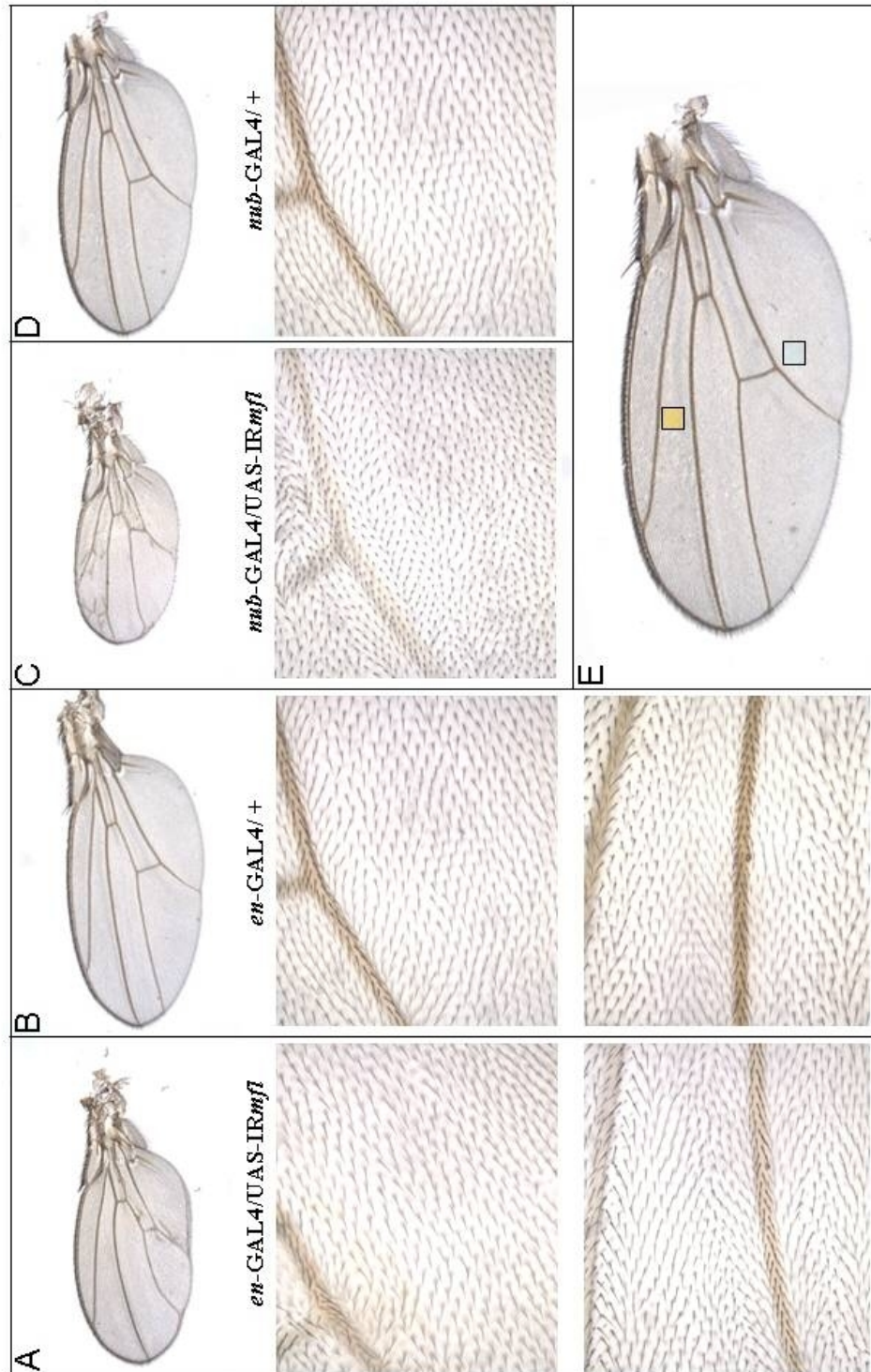


Fig. 33. Effetti del silenziamento del gene *mfl* sulla crescita cellulare. (A-D) Nei pannelli superiori è mostrata la morfologia delle ali dei moscerini in cui l'espressione del gene è stata silenziata con l'aiuto dei driver *en-Gal4* (A) e *nub-Gal4* (C), e i rispettivi controlli (B, D). Nei pannelli centrali è mostrata la regione del compartimento posteriore utilizzata per la valutazione della densità cellulare (ingrandimento 400X). Nei pannelli inferiori è mostrata la regione del compartimento anteriore (regione intervena L2-L3) utilizzata per determinare la densità cellulare nelle linee *en-Gal4*. (E) I quadrati indicano le regioni dell'ala che sono state considerate per la conta cellulare nel compartimento posteriore (azzurro) e in quello anteriore (arancione).

L'espressione ectopica del gene *d-myc* nella zona di formazione del margine D/V del disco dell'ala è sufficiente per recuperare il fenotipo selvatico nelle linee *vgGAL4, UAS-IRmfl*.

Come mostrato nel paragrafo precedente, il knock-down del gene *mfl* diretto dal driver *vg-GAL4* provoca la formazione di ampi “notches” lungo il margine D/V. Poiché numerosi dati presenti in letteratura indicano che il gene *mfl* è uno dei target più sensibili dell'induzione trascrizionale diretta dal gene *d-myc* (Grewal et al., 2005; Eisenman, 2006; Pierce et al., 2008), ho voluto saggiare la possibilità che l'espressione ectopica di questo oncogene nella zona di formazione del margine D/V all'interno del disco dell'ala potesse, almeno in parte, recuperare il fenotipo indotto dal silenziamento di *mfl*. Nella zona del margine D/V è infatti noto che l'espressione di *d-myc* è inibita dall'espressione del gene *wingless* che determina l'arresto del ciclo cellulare in G1; tale zona è stata infatti definita zona di non-proliferazione (ZNC; Johnston et al., 1999).

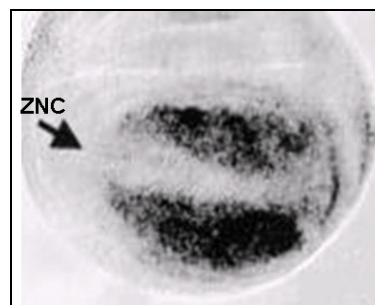


Fig. 34. Espressione di *d-myc* nel disco imaginale dell'ala. L'mRNA di *d-myc* è presente ad alti livelli nel wing-pouch, a bassi livelli nel resto del disco, mentre è assente nelle cellule del margine D/V (da Johnston et al., 1999).

Parallelamente è stato iper-espresso nella stessa zona il gene *p35* di baculovirus, noto inibire l'apoptosi tramite il blocco dell'attività di un'ampia

varietà di caspasi, in uno step a valle della loro attivazione proteolitica (Hay et al., 1994; Yoo et al., 2002), allo scopo di stabilire quanto i difetti di formazione del margine potessero essere spiegati da un aumento di morte per apoptosi. Questi esperimenti hanno richiesto la preparazione di un ceppo in cui il transgene *vg-GAL4* e quello *UAS-IR^{mfl}* sono stati portati, mediante ricombinazione, sullo stesso cromosoma (essendo i siti di inserzione di entrambi i transgeni sul secondo cromosoma; una volta ottenuto il ceppo stabile, esso è stato incrociato con le due linee transgeniche *UAS-d-myc* e *UAS-p35*, così che l'attività trascrizionale dell'oncogene *myc* e dell'inibitore *p35* sono state incrementate specificamente lungo il margine D/V, laddove è silenziato *mfl*. I risultati ottenuti, mostrati in fig. 35, indicano chiaramente che l'iperespressione del transgene *UAS-dmyc* è sufficiente per indurre un pieno recupero fenotipico nel 100% della popolazione, ripristinando la corretta formazione del margine D/V. Al contrario, l'attivazione del transgene *UAS-p35* ha consentito un recupero solo parziale, consistente in una riduzione nel numero e nell'ampiezza dei "notches". Questo risultato suggerisce che il blocco dell'apoptosi non è sufficiente per ripristinare il fenotipo selvatico, indicando che le alterazioni osservate potrebbero essere, almeno in parte, dovuti a difetti di proliferazione. Tuttavia, è bene ricordare che l'apoptosi non è basata esclusivamente sull'attività delle caspasi, ma che anche altre endopeptidasi possono essere attivate e innescare questo processo (es. calpaine/catepsine). Pertanto, pur in condizione di blocco dell'attività

caspasi (mediato da iper-espressione di p35), il perdurare delle alterazioni manifestate potrebbe essere attribuibile ad un processo di morte cellulare caspasi-indipendente (Mergliano and Minden, 2003). Un dato interessante che caratterizza i moscerini di genotipo UAS-p35;vgGAL4,UAS-IR*mfl* è poi dato dalla presenza della vena L5 tronca, che, nel 90% degli individui manca della porzione distale e non si congiunge correttamente al margine (fig. 35c).

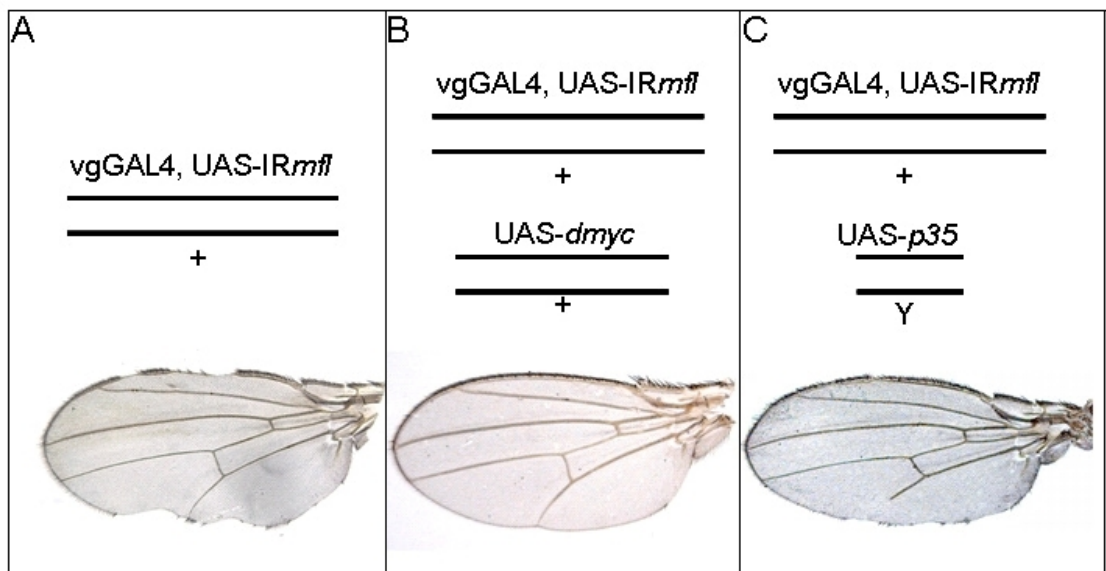


Fig. 35. Effetto dell'iper-espressione dei geni *d-myc* e *p35* nei moscerini in cui il gene *mfl* è silenziato dal driver *vgGAL4*. (A) Fenotipo dell'ala in individui di genotipo *vgGAL4,UAS-IRmfl*. (B) L'attivazione dell'oncogene *d-myc* consente un recupero pressoché completo del margine D/V. (C) L'iper-espressione del gene *p35* di baculovirus provoca un recupero solo parziale del margine D/V e, al contempo, determina un' incompleta formazione della vena L5.

Effetti provocati dal silenziamento del gene *mfl* nei dischi imaginali dell'ala

L'ampia varietà di alterazioni fenotipiche osservate nelle ali dei moscerini in cui era stata silenziata l'espressione del gene *mfl* mi ha spinto ad analizzare in maggior dettaglio gli stadi più precoci di sviluppo di quest'organo. Ho quindi seguito l'espressione dei principali geni regolatori che intervengono nella formazione degli assi di sviluppo (A/P e D/V) nei dischi dell'ala di larve in cui il gene *mfl* era stato silenziato in specifici compartimenti, utilizzando il driver *en-GAL4*, che dirige il silenziamento esclusivamente nel compartimento posteriore, *ap-GAL4*, che dirige il silenziamento unicamente nel compartimento dorsale, e *vg-GAL4*, che dirige il silenziamento esclusivamente nella zona che darà origine al margine D/V. Tutti i ceppi utilizzati in questi esperimenti portavano un terzo transgene, UAS-GFP, utilizzato come marcatore per evidenziare il dominio di espressione della proteina attivatrice GAL4. In ogni esperimento è stato poi utilizzato un anticorpo policlonale che riconosce specificamente la proteina MFL (Riccardo et al., 2007), la cui rivelazione mediante immunofluorescenza (IF) ha confermato sia l'efficienza che la precisa localizzazione del silenziamento.

Driver *en-GAL4*.

Il gene *engrailed* gioca un ruolo fondamentale nella determinazione dell'asse antero-posteriore; esso inizia ad essere espresso già allo stadio di blastoderma cellulare e codifica un fattore di trascrizione contenente un omeodominio. Nel

disco dell'ala la sua espressione è ristretta al compartimento posteriore per cui la linea driver utilizzata dirige quindi il silenziamento di *mfl* in tutto il compartimento posteriore. Come mostrato in fig. 36, il silenziamento del gene *mfl* nei dischi di larve di genotipo *en-GAL4,UAS-GFP/UAS-IRmfl* è molto efficiente e strettamente localizzato al compartimento posteriore del disco. La formazione del margine A/P appare fortemente irregolare e deformata; tuttavia, l'area del compartimento posteriore non appare sensibilmente ridotta, indicando che i fenomeni di ridotta proliferazione e/o aumentata apoptosi, responsabili del forte ridimensionamento della regione posteriore, già osservato nell'ala degli individui adulti, possa essere dovuto ad un effetto successivo, che si concentra probabilmente nei momenti di maggiore proliferazione del disco, durante il processo di metamorfosi. A questo punto ho controllato se la ridotta espressione della proteina MFL potesse alterare anche l'espressione del gene *wingless* (*wg*) la cui attività, congiuntamente all'azione di *Notch*, induce l'espressione della proteina nucleare *vestigial*, essenziale per il corretto sviluppo dell'ala. Nel disco dell'ala, la normale espressione di *wg* si localizza lungo tutto il margine D/V ed in due strisce, a foggia di anello, che circondano il margine stesso. Nelle larve di genotipo *en-GAL4,UAS-GFP/UAS-IRmfl*, la proteina *wg* si localizza correttamente al margine D/V, ma anche questo margine appare deformato ed irregolare (fig.36c).

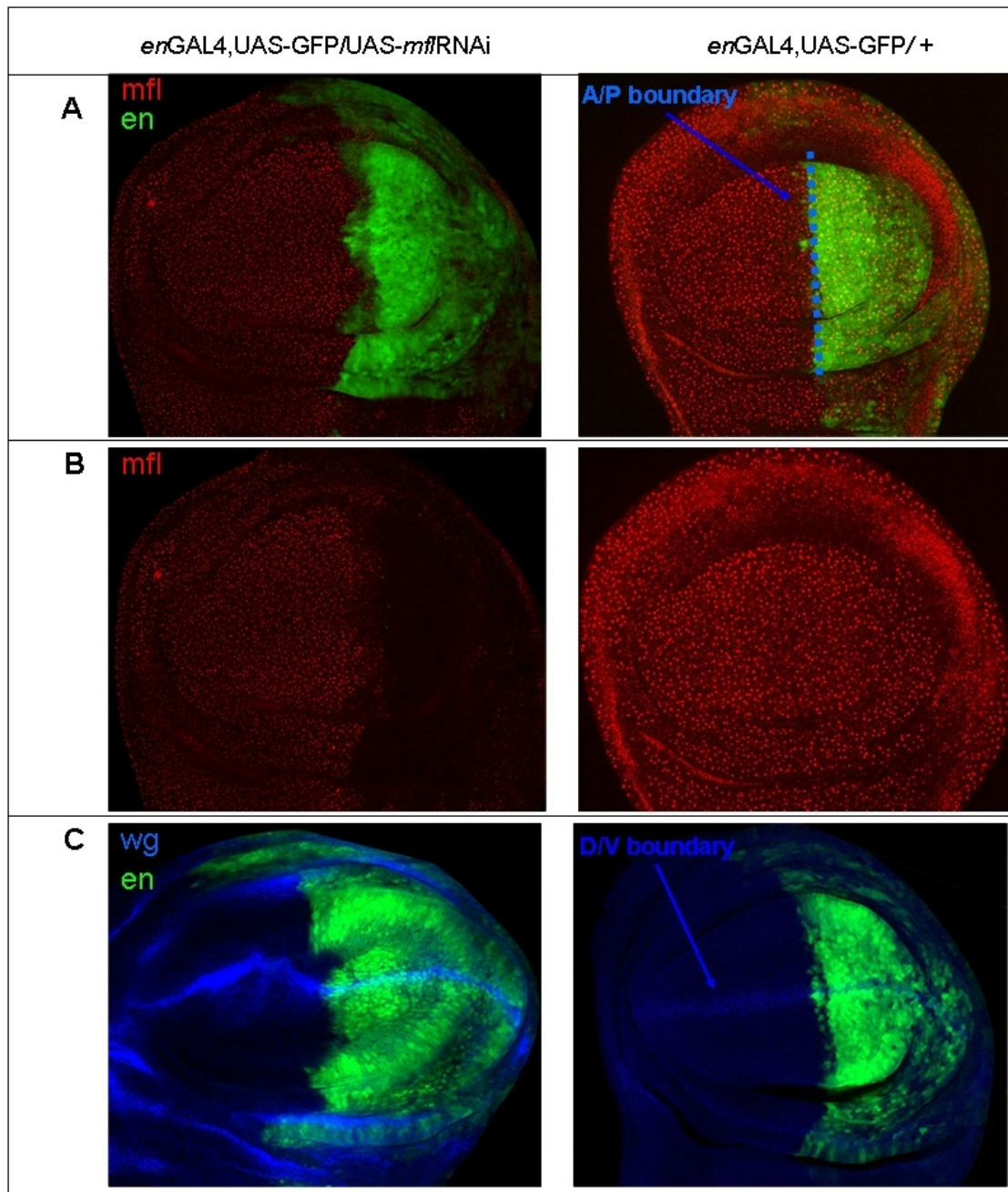


Fig. 36. Effetti del silenziamento del gene *mfl* nel disco dell'ala. Il silenziamento è diretto dal driver *enGAL4*. I dischi delle larve silenziate sono mostrate a sinistra; i dischi di controllo a destra. (A-B) Immunolocalizzazione della proteina MFL (in rosso), il dominio di espressione del gene *en* è marcato dall'espressione del transgene UAS-GFP (in verde); (C) Immunolocalizzazione della proteina *wg* (in blue) sovrapposta all'espressione del transgene UAS-GFP (verde).

Per meglio definire gli effetti provocati dal silenziamento del gene *mfl* nel compartimento posteriore, ho utilizzato anche il driver *hedgehog-GAL4* per dirigere il silenziamento. L'espressione di *hedgehog* (*hh*) è dovuta all'attività della proteina engrailed; pertanto anche *hh* è espresso in tutto il

compartimento posteriore. Tuttavia, la proteina prodotta da *hh* tende a diffondere leggermente lungo il margine A/P laddove, comportandosi da morfogeno, induce l'espressione di un altro importante morfogeno, *decapentaplegic (dpp)*. Il silenziamento con il driver *hh-GAL4* è risultato letale allo stadio larvale; in aggiunta, le dimensioni dei dischi sono risultate così fortemente ridotte da rendere impossibile la loro raccolta ed ogni possibile utilizzo sperimentale. Visto che l'espressione di *hh* è leggermente successiva a quella di *en*, in quanto dipendente da essa, i motivi di questa imprevista letalità potrebbero essere attribuibili alla "forza" con cui questo specifico enhancer dirige il silenziamento. Un'ipotesi alternativa è che questo driver sia in grado di compromettere fortemente la formazione di entrambi i margini A/P e D/V, disorganizzando completamente la struttura del disco e bloccandone lo sviluppo. E' comunque interessante notare che il silenziamento diretto dal driver *hh-Gal4* non sembra avere effetti solo nel compartimento posteriore ma, al contrario, riguarda l'intera struttura del disco.

Driver *ap-GAL4*.

Il gene *apterous (ap)* si esprime in tutto il compartimento dorsale, ed è essenziale per la formazione del margine D/V. Il silenziamento diretto dal driver *ap-Gal4* è risultato anch'esso letale allo stadio larvale; tuttavia, è stato possibile raccogliere ed esaminare i dischi dell'ala, la cui analisi ha rivelato la

presenza di evidenti e grossolane alterazioni sia nella morfologia che nelle dimensioni. L'analisi per IF ha confermato una riduzione pressoché totale della proteina MFL nella regione dorsale (fig. 37a), rivelando inoltre che il profilo d'espressione del gene *ap* nelle larve di genotipo *apGAL4,UAS-GFP/UAS-IRmfl* è anch'esso gravemente alterato. Infatti, nelle larve di controllo, di genotipo *apGAL4,UAS-GFP/+*, il dominio di espressione di *ap*, marcato dall'espressione della GFP, si arresta esattamente a livello dell'invalicabile confine di restrizione D/V. Il silenziamento del gene *mfl* provoca invece la formazione di un margine D/V irregolare, che mostra un profilo fortemente ondulatorio. L'espressione di *wg*, target di *Notch* e diretto responsabile della corretta formazione di tale margine, mostra anch'esso lo stesso profilo, seguendo in stretta sintonia l'andamento ondulatorio lungo il margine D/V che caratterizza il dominio di espressione di *ap* (fig. 37b).

Quest'osservazione indica che il silenziamento del gene *mfl* è in grado di interferire con la corretta formazione degli assi di sviluppo, sia probabilmente alterando il normale tasso di sintesi di importanti proteine regolatrici, sia alterando la regolare attività mitotica e/o innescando fenomeni apoptotici localizzati. Per controllare più in dettaglio questi due ultimi aspetti, cioè proliferazione ed apoptosi, ho inizialmente seguito l'attività mitotica nei dischi dell'ala mediante l'uso di un anticorpo specifico per il fosfoistone-3 (PH3). La fosforilazione di specifici residui dell'istone H3 (Ser10, Ser28 e Thr11) è strettamente correlata con la condensazione dei cromosomi durante

la mitosi e la meiosi. Pertanto, una IF condotta con lo specifico anticorpo anti-PH3 è in grado di rivelare eventuali alterazioni dell'attività mitotica (Goto et al., 1999). I dati ottenuti, mostrati in fig. 37c, suggeriscono una lieve riduzione dell'attività proliferativa nel compartimento dorsale (13,9%) dove si manifesta il silenziamento di *minifly*. Benché la riduzione sia lieve, è noto che anche piccole variazioni del tasso di proliferazione possono rappresentare difetti dello sviluppo, mediati soprattutto dal meccanismo della “cell competition” clonale dimostrando, in questo caso, che l'interferenza localizzata di *mfl* ne svantaggerebbe la proliferazione cellulare.

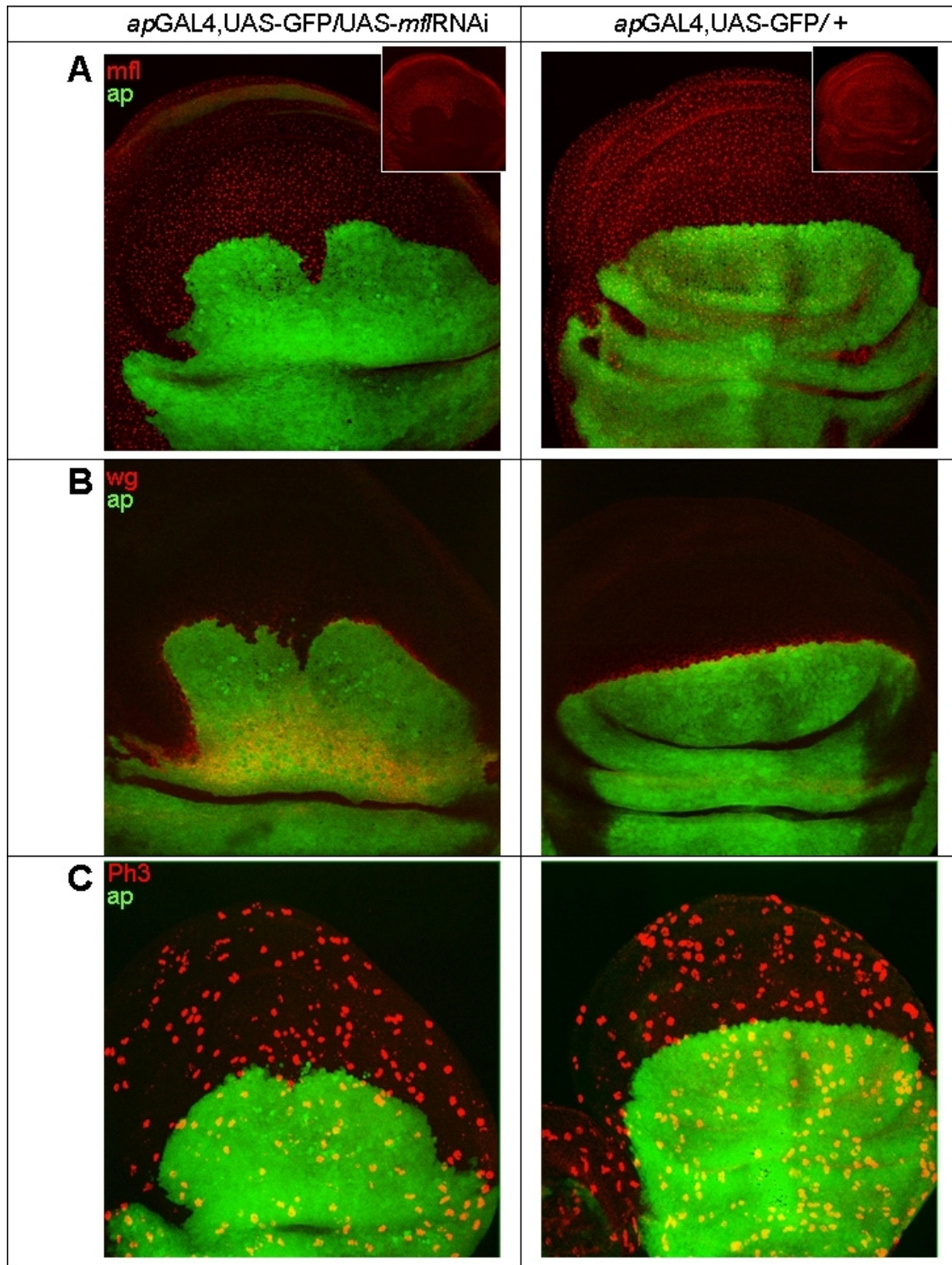


Fig. 37. Silenziamento del gene *mfl* diretto dal driver *ap*-GAL4. (A) Nel riquadro a destra, espressione della proteina MFL (in rosso) nei dischi dell'ala sottoposti a silenziamento (a sinistra) ed in quelli di controllo (a destra). Nella foto, sovrapposizione dell'espressione della proteina MFL e della GFP che marca il dominio di espressione di *ap* (in verde). (B) L'espressione di *wingless* (in rosso) marca il confine D/V, deformato nelle larve sottoposte a silenziamento e regolare nei controlli. (C) Immunostainig con anticorpo anti-PH3 (in rosso), che marca le cellule in mitosi.

Per seguire specificamente l'insorgenza di eventuali fenomeni apoptotici, gli stessi dischi sono stati trattati con un anticorpo in grado di riconoscere specificamente la caspasi-3 attivata. La caspasi-3 rappresenta l'esecutore finale del processo di apoptosi, in quanto è parzialmente o totalmente responsabile dei tagli proteolitici di molte proteine essenziali, come l'enzima nucleare poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP). Quest'analisi ha rivelato in molti dischi la presenza di un'anomala attività apoptotica (fig. 38); infatti, nei dischi imaginali *wild type* l'apoptosi è generalmente molto bassa. I risultati mostrano un dato estremamente interessante visto che è stata rilevata un'intensa attività apoptotica localizzata sia nel compartimento dorsale che in quello ventrale. In particolar modo è risultato che l'apoptosi colpisce specificamente gruppi di cellule che, pur esprimendo il gene *ap*, non rimangono correttamente posizionate nel compartimento dorsale e superano il confine D/V. Questo dato suggerisce che il silenziamento del gene *mfl* può quindi causare deviazioni dal normale programma di sviluppo e perdita della specifica identità cellulare consentendo, in questo caso, di oltrepassare il margine in questione.

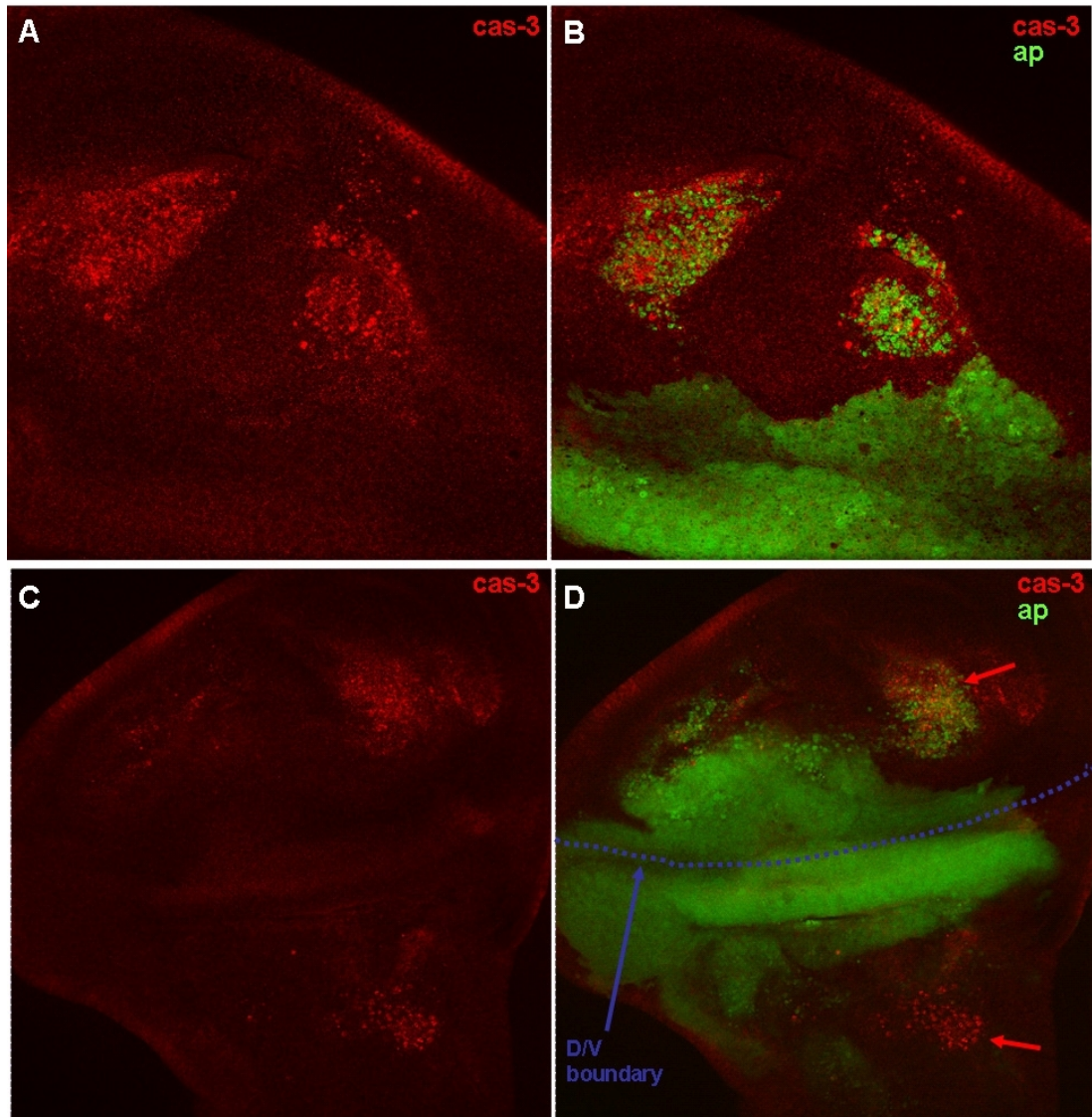


Fig. 38. Il silenziamento del gene *mfl* diretto dal driver *ap*-GAL4 induce perdita dell'identità cellulare ed apoptosi. (A-C) Espressione della caspasi-3 attivata (in rosso); (B-D) L'espressione della caspasi -3 attivata è sovrapposta all'espressione della GFP (in verde), che marca il dominio di espressione di *ap*. In blu è indicato il margine D/V.

Driver *vg*-GAL4

Durante lo sviluppo dell'ala, al terzo stadio larvale, l'azione coordinata dei geni *wg* e *Notch* induce l'espressione del regolatore trascrizionale *vestigial* (*vg*) lungo il margine D/V. Poiché le ali dei moscerini adulti di genotipo *vg*GAL4,UAS-GFP/UAS-*IRmfl* presentavano evidenti alterazioni del margine D/V, ho voluto determinare in dettaglio gli effetti indotti dal silenziamento nei dischi immaginali. Come mostrato in fig. 39, l'espressione del gene *wg* nei dischi delle larve sottoposte a silenziamento risulta essere discontinua lungo il margine D/V, ed in alcuni casi del tutto assente. Come atteso, l'espressione di *wg* è ridotta, discontinua e/o assente esclusivamente lungo il margine D/V, mentre lungo i due anelli concentrici (anello interno: IR; anello esterno:OR) che circondano la regione che darà origine alla lamina alare e che non sono coinvolti nel silenziamento, essa appare del tutto regolare. Questi dati sono in perfetto accordo con il fenotipo mostrato dai moscerini adulti dello stesso genotipo, in cui è stata osservata una difettiva formazione del margine D/V.

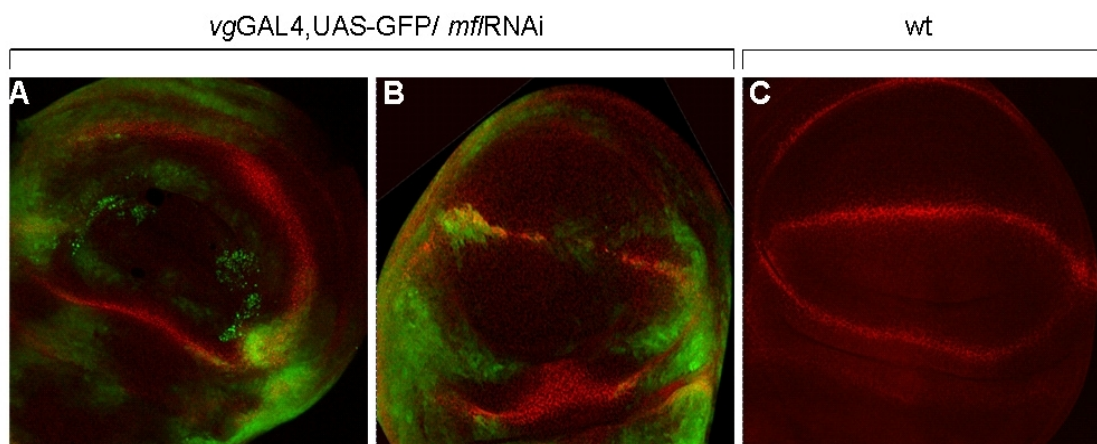


Fig. 39. Espressione del gene *wg* nei dischi immaginali di larve di genotipo *vg*GAL4,UAS-GFP/UAS-*IRmfl*. L'espressione di *wg* (in rosso) nei dischi sottoposti a silenziamento appare essere o assente (A) o discontinua (B) lungo il margine D/V. In (C) espressione di *wg* in dischi wt.

L'insieme delle caratteristiche fenotipiche osservate in adulti e nei dischi imaginali delle ali sono schematicamente riportati in Tab. 3.

Driver	Letalità	Principali effetti fenotipici
Actina-Gal4	+	Presenza tumori melanotici in LIII. Sviluppo larvale ritardato di 5-6gg.
Apterous-Gal4	+	Alterazione del margine D/V nei dischi imaginali dell'ala; apoptosi
Hedgehog-Gal4	+	Dischi imaginali sottosviluppati
Engrailed-Gal4	-	Riduzione del compartimento posteriore dell'ala; insorgenza di strutture ectopiche nella regione del protorace. Alterazione dei margini D/V e A/P nei dischi imaginali dell'ala
Vestigial-Gal4	-	Presenza diffusa di "notches" lungo il del margine D/V dell'ala. Alterazione del margine D/V nei dischi imaginali.
Nubbin-Gal4	-	Riduzione delle dimensioni dell'ala; presenza di vene ectopiche. Dimensione cellulare ridotta osservata nei dischi imaginali dell'ala
MS-1096-Gal4	-	Riduzione delle dimensioni dell'ala; le ali tendono a curvarsi dorsalmente; presenza di bolle persistenti nella lamina alare.
Dpp-Gal4	-	//

Tab. 3. In tabella sono riportati i driver utilizzati per l'RNAi e gli effetti fenotipici osservati per ciascuna delle linee impiegate.

Analisi di cloni mitotici omozigoti per la mutazione letale mfl^{05} nei dischi imaginali dell'ala

La descrizione della formazione dei compartimenti rappresenta da oltre 30 anni un perno fondamentale per gli studi di genetica dello sviluppo (Garcia-Bellido et al., 1973). L'analisi dei cloni cellulari generati dalla ricombinazione mitotica è ancora oggi uno strumento fondamentale per questo tipo di studi. L'analisi clonale consente, infatti, l'analisi dei fenotipi manifestati tardivamente da mutazioni che sono letali durante lo sviluppo embrionale. Poiché una mutazione che blocca lo sviluppo dell'intero embrione spesso non è letale a livello cellulare, la formazione, a seguito di ricombinazione mitotica, di un clone omozigote per la mutazione stessa all'interno di un individuo eterozigote consente di osservare e descrivere effetti fenotipici e molecolari che altrimenti non potrebbero essere analizzati. L'analisi clonale consente, inoltre, di seguire e delineare la discendenza, o *lineage*, di una singola cellula marcata durante lo sviluppo. La ricombinazione mitotica oggi si avvale dell'utilizzo del sistema di ricombinazione sito specifica FRT-flp, accoppiato al sistema GAL4/UAS (Golic, 1991; Brand and Perrimon 1993). Questa strategia consente di aggirare il problema dovuto alla letalità, creando sottopopolazioni di cellule omozigoti per la mutazione letale in stadi tardivi di sviluppo, all'interno di un organismo eterozigote per il gene d'interesse e quindi vitale. Nello stadio dello sviluppo in cui viene indotta la ricombinazione mitotica, mediante l'attivazione della ricombinasi di

lievito (*flippase*) posta sotto il controllo di un promotore inducibile heat-shock, si otterrà la formazione di due cloni gemelli: uno sarà *wild-type* ed uno porterà in omozigosi la mutazione mfl^{05} che, in seguito a proliferazione clonale, darà origine a delle regioni che manifesteranno un fenotipo mutante (vedi Mat. e Met.).

Nel corso dei miei studi tesi a definire il ruolo del gene *mfl* nello sviluppo, ho ritenuto opportuno iniziare questo tipo di esperimenti perché essenziali per stabilire se le cellule in cui si riduce l'espressione di *minifly* possono essere svantaggiate dalla competizione clonale, che fra l'altro è tipica di cellule che mostrano una ridotta espressione dell'oncogene *myc* o di geni coinvolti nella sintesi proteica. Per effettuare questi esperimenti, è stato necessario preparare un ceppo in cui la mutazione letale mfl^{05} fosse trasportata, mediante ricombinazione, su un cromosoma che portava il sito di ricombinazione FRT inserito nella regione politenica 42D. Lo schema degli incroci seguiti e delle successive selezioni necessarie per ottenere il ceppo ricombinante di genotipo $frt42, hs-R^{neo}, mfl^{05}/CyO$ è mostrato in fig. 40.

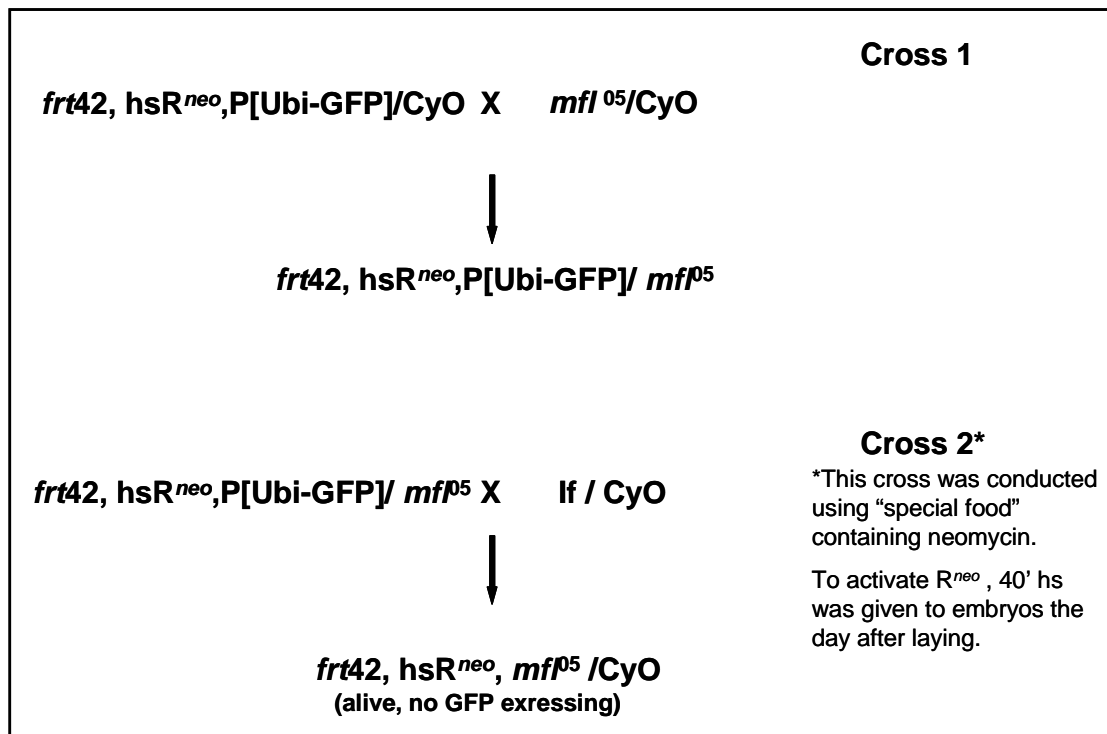


Fig. 40. Rappresentazione schematica degli incroci eseguiti per generare il ceppo ricombinante di genotipo *frt42, hs-R^{neo}, mfl⁰⁵/CyO* utilizzato per l'analisi dei cloni mitotici.

Per ottenere i cloni mitotici, il ceppo ricombinante così ottenuto è stato incrociato con un'altra linea che presentava un identico sito di ricombinazione (*frt42*) ma che esprimeva, sotto controllo di un promotore inducibile, un transgene inserito su un cromosoma diverso dal secondo, capace di innescare la sintesi dell'enzima *flippasi*, necessario per dirigere la ricombinazione tra i due siti *frt*. Per questo scopo ho utilizzato il ceppo *hs-flp; frt42, armLacZ, M(2)l2/CyO*. Questa linea presenta sul primo cromosoma il transgene in grado di esprimere la *flippasi* sotto controllo di un promotore heat-shock; sul secondo cromosoma possiede, oltre al sito *frt42*, un transgene in grado di dirigere la sintesi di LacZ nel dominio di espressione del gene *armadillo* (in tutte le cellule a livello citoplasmatico), ed una mutazione *Minute M(2)l2* che

è invece letale cellulare. Sebbene la presenza di una mutazione *Minute* non consenta la formazione di un clone gemello, essa offre il vantaggio di non sfavorire i cloni mutanti mfl^{05}/mfl^{05} , rendendo quindi più probabile la loro eventuale presenza e la possibilità di raggiungere dimensioni relativamente considerevoli.

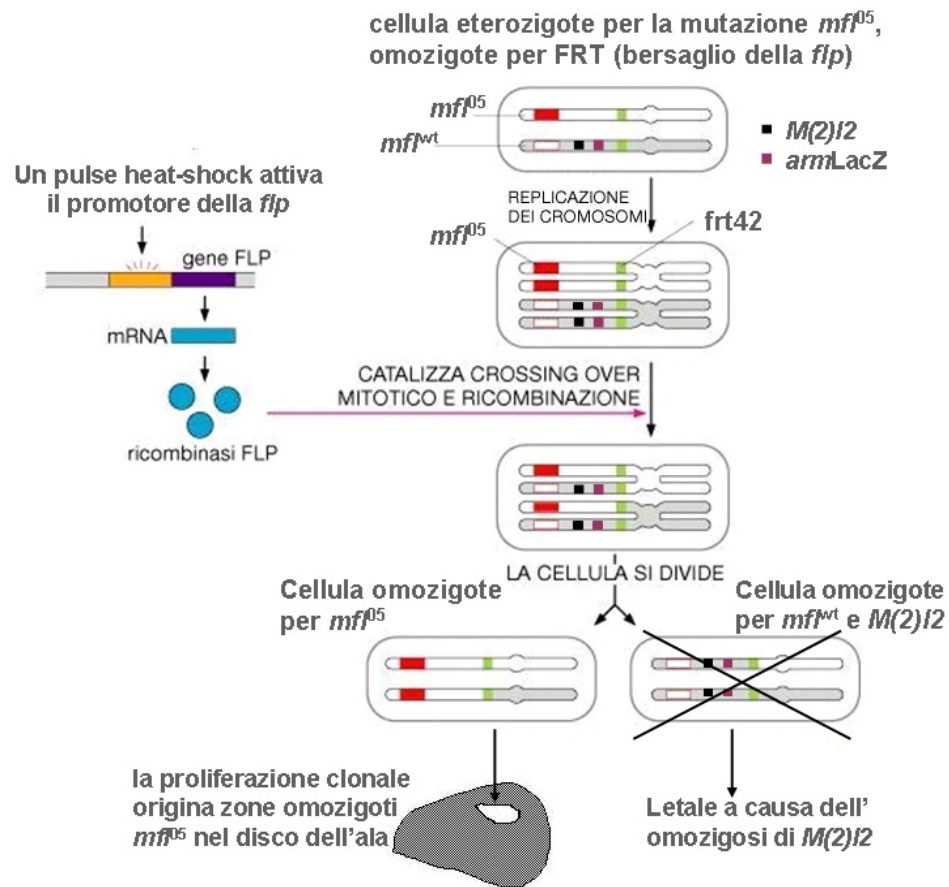


Fig. 41. Rappresentazione schematica che illustra la strategia utilizzata per l'induzione di cloni mitotici mfl^{05} in un background eterozigote per la mutazione $M(2)12$.

Era infatti plausibile supporre che, in un background genetico wild-type, i cloni omozigoti per la mutazione mfl^{05} potessero risultare particolarmente sfavoriti dalla competizione cellulare. Dopo aver effettuato l'incrocio tra i ceppi *frt42*, *hs-R^{neo}*, mfl^{05}/CyO e *hs-flp*; *frt42*, *armLacZ*, $M(2)12/CyO$, la

sintesi di *flippasi* è stata stimolata nelle larve della progenie a 60hr (± 12 hr) dalla deposizione, mediante trattamento heat-shock a 37°C per 1h. Successivamente, le larve di terzo stadio sono state raccolte, sezionate, ed i dischi trattati con l'anticorpo anti- Gal, che consente di riconoscere i cloni *mfl*⁰⁵/*mfl*⁰⁵ in base all'assenza della proteina, e l'anticorpo anti-*wingless*, per controllare se il profilo d'espressione di questo gene potesse essere alterato dalla presenza dei cloni omozigoti per la mutazione. L'analisi dei cloni ottenuti nelle larve di genotipo *hs-flp; frt42, armLacZ, M(2)12/ frt42, hs-R^{neo}, mfl*⁰⁵, mostrata in fig. 42, ha innanzitutto dimostrato che la mutazione *mfl*⁰⁵ non è letale cellulare, sebbene essa provochi letalità durante lo sviluppo larvale. Ciò non era affatto scontato, considerato il ruolo attribuito alla proteina MFL nel processo di maturazione e modificazione dell'rRNA.

L'area dei cloni è inoltre apparsa essere piuttosto ampia, suggerendo che, in background genetico eterozigote per la mutazione *Minute*, le cellule omozigoti *mfl*⁰⁵ non sono particolarmente sfavorite dalla competizione cellulare. La *cell competition* è un fenomeno non-autonomo che colpisce le cellule che si trovano immerse in un contesto ad esse non omogeneo e che agisce come "fonte di competitività" (de la Cova et al., 2004); la prima conseguenza della competizione cellulare è che le cellule svantaggiate vanno incontro ad apoptosi. Negli esperimenti da me effettuati, il background eterozigote per la mutazione *Minute* che circonda il clone, riduce il potenziale proliferativo delle cellule circostanti, consentendo ai cloni di raggiungere le

dimensioni osservate. Come già accennato, la presenza di una mutazione *M* sfavorisce la proliferazione cellulare e, quando le cellule *M/M⁺* si trovano in un contesto di cellule *wt*, esse vengono eliminate per apoptosi (Morata and Ripoll, 1975). Pertanto, le notevoli dimensioni raggiunte dai cloni omozigoti *mfl⁰⁵* indicano che essi non risentono in maniera significativa della *cell competition*, suggerendo che la loro capacità proliferativa è almeno paragonabile a quella delle cellule circostanti eterozigoti per la mutazione *Minute M(2)l2*. Alcuni cloni di grosse dimensioni attraversano il confine D/V, indicando che la loro origine è precoce e precede la formazione di questo margine. E' interessante notare che all'interno di questi cloni l'espressione di *wg* lungo il margine D/V non appare essere né ridotta né alterata, suggerendo che le alterazioni nella formazione di questo confine osservate nei precedenti esperimenti di silenziamento sono probabilmente causate da fenomeni di competizione cellulare. La definizione dell'asse D/V comincia con l'espressione del gene *ap* all'inizio del secondo stadio larvale (48h dopo la deposizione). Il trattamento heat-shock che attiva la *flippase* è stato effettuato sulle larve di 48-72hr; pertanto, il tempo che intercorre dal momento in cui si esprime *ap* a quello in cui si crea l'invalidabile confine dorso-ventrale delimitato da *wg*, evidentemente è stato sufficiente affinché il clone, originatosi in prossimità del futuro margine, potesse distribuirsi nei due compartimenti. Tenendo conto che i dischi presentano un tasso replicativo piuttosto incalzante (una divisione cellulare ogni ~9hr) e che le larve sono

state raccolte e dissezionate 120 hr dopo la deposizione, si può stimare che siano intercorsi circa otto cicli di divisione cellulare dall'attivazione della *flippasi*; la precoce formazione di questi cloni spiega anche le ragguardevoli dimensioni degli stessi.

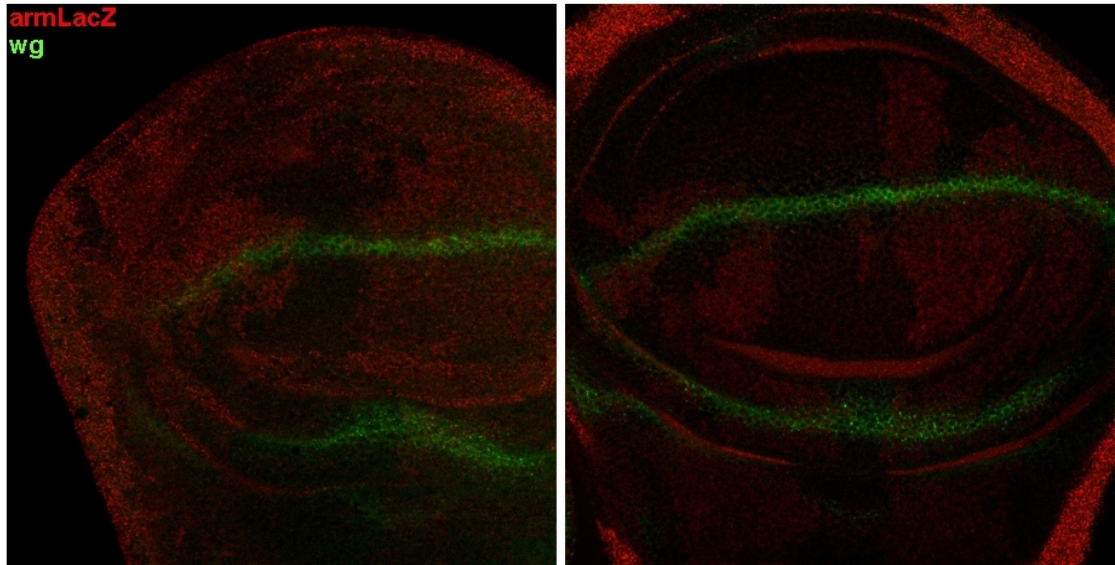


Fig. 42. Analisi dei cloni mitotici omozigoti per la mutazione letale mfl^{05} in background genetico eterozigote per la mutazione *Minute M(2)12*. La mancata espressione della proteina LacZ (in rosso) consente di riconoscere i cloni omozigoti mfl^{05}/mfl^{05} . I cloni mostrati sono di dimensioni notevoli, indicando che le cellule omozigoti per la mutazione non sono sfavorite rispetto a quelle circostanti eterozigoti per la mutazione *Minute*. Alcuni cloni attraversano il margine D/V, indicando un'origine precoce. In questi cloni, l'espressione di *wingless* (in verde) non risulta significativamente alterata.

Strategia di espressione del gene *mfl*

Come precedentemente descritto, il gene *mfl* produce un trascritto costitutivo da 1.8kb e due trascritti lunghi rispettivamente 2.0 e 2.2 kb che mostrano un livello di espressione più elevato nelle femmine. La produzione di tre trascritti che presentano la stessa capacità codificante e differiscono solo a livello delle regioni 3'UTR costituisce una caratteristica abbastanza insolita e suggerisce la possibilità che questi messaggeri possano essere soggetti a differenti meccanismi di regolazione. Inoltre, poiché i trascritti primari da cui originano i tre messaggeri sono in grado di produrre, oltre all'mRNA maturo, anche differenti set di ncRNA intronici, è possibile che le tre isoforme possano essere differenzialmente espresse in relazione al fabbisogno cellulare di tali piccoli ncRNA. Come passo preliminare per comprendere meglio quest'aspetto ho voluto determinare, mediante esperimenti di Real-Time RT-PCR, lo specifico livello di accumulo di ciascuno dei tre trascritti nel ceppo selvatico di riferimento ed in quello mutante *mfl*¹. Successivamente, considerato il ruolo regolativo svolto dal gene *d-myc* sull'espressione del gene *mfl*, ho voluto controllare la possibilità che la produzione dei tre trascritti potesse essere regolata in maniera differente in risposta all'induzione trascrizionale esercitata da quest'oncogene.

Quantizzazione dei trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb in adulti dei due sessi

Lo schema sperimentale per determinare i livelli di accumulo dei tre trascritti di 1.8, 2.0 e 2.2 kb si presentava abbastanza complicato, dato che essi differivano solo per la diversa lunghezza delle loro regioni 3'UTR. Di conseguenza, nessuna coppia di primer poteva amplificare specificamente i trascritti più corti, da 1.8 kb o quello da 2.0 kb, mentre l'unico trascritto che poteva essere selettivamente amplificato era quello lungo 2.2 kb. La quantizzazione di ciascun trascritto ha quindi dovuto seguire una strategia sottrattiva. La prima coppia di primer che ho utilizzato nei miei esperimenti era formata da un "forward primer" (chiamato Ex5/6f), che riconosceva una sequenza a cavallo tra gli esoni 5/6, ed un "reverse primer" (detto Ex6r) che riconosceva una regione interna all'esone 6. Poiché le regioni riconosciute da questa coppia di primer sono comuni a tutti e tre i trascritti, questa coppia ha portato a definirne l'accumulo complessivo di tutti gli mRNA. La seconda coppia, costituita da un "forward primer" (chiamato Ex7f) in grado di appaiarsi con una regione interna dell'esone 7 ed un "reverse primer" (detto Ex8r) che riconosce una regione interna dell'esone 8, mi ha invece permesso di definire l'accumulo complessivo dei due trascritti più lunghi, da 2.0 e 2.2 kb. Infine, l'utilizzo di una terza coppia formata da un "forward primer" (detto Ex11/12f) che riconosce una sequenza a cavallo tra gli esoni 11/12 ed un "reverse primer" (chiamato Ex12r), che riconosce una sequenza interna all'esone 12, mi ha permesso di definire specificamente l'accumulo del

trascritto da 2.2 kb (fig. 43). In accordo con questo schema, la specifica quantità dei due trascritti più corti è stata quindi ottenibile per differenza.

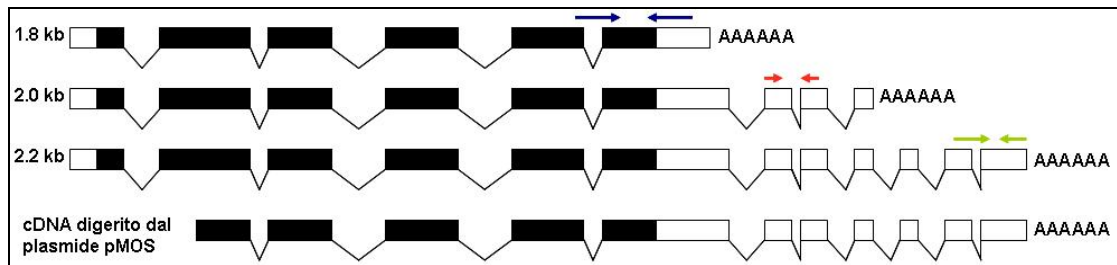


Fig. 43. Schema sperimentale seguito per la quantizzazione dei trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb. Utilizzando la coppia di primer Ex5/6-Ex6 (in blu) si ottiene l'accumulo complessivo dei trascritti del gene *mfl*; la coppia di primer Ex7-Ex8 (rosso) fornisce l'accumulo dei trascritti di 2.0 e 2.2 kb; la coppia di primer Ex11/12-Ex12 (verde) fornisce l'accumulo del solo trascritto di 2.2kb. Per ultimo è mostrato inoltre il frammento di cDNA utilizzato per le curve di standardizzazione.

Utilizzando le coppie di primer appena descritte ho effettuato esperimenti di Real-Time RT-PCR assoluta, definendo l'efficienza di amplificazione di ciascuna delle diverse coppie di primer utilizzate. Quest'approccio presenta il vantaggio di poter confrontare in modo più accurato l'accumulo dei trascritti che vengono amplificati con coppie di primer diverse, nonché di poter determinare la quantità assoluta (espressa in numero di copie) di ciascun trascritto presente in un dato campione, estrapolandola da una retta di standardizzazione che viene costruita amplificando diluizioni seriali, a concentrazione nota, di una quantità nota di DNA utilizzata come "standard" di riferimento. Il DNA utilizzato come standard di riferimento è stato quello di un clone di cDNA incompleto, già disponibile in laboratorio, la cui sequenza era stata clonata nel vettore plasmidico pMOS. Questo clone, per quanto incompleto, conteneva la regione compresa tra l'esone 2 e l'esone 12, e quindi è stato utilizzato come riferimento per tutte e tre le coppie di primer

utilizzate. Il frammento d'interesse è stato escisso dal vettore mediante digestione enzimatica, separato da esso su gel preparativo di agarosio, eluito e purificato (vedi Mat. e Met.); la sua concentrazione è stata valutata spettrofotometricamente e ne sono state preparate 5 diluizioni seriali (1:10), utilizzate come "standard" di riferimento (corrispondenti a 1ng/μl, 100pg/μl, 10pg/μl, 1pg/μl e 100fg/μl) nella costruzione delle tre rette di taratura. Ogni diluizione è stata utilizzata in esperimenti di Real-Time RT-PCR in cui il DNA di riferimento e preparazioni di cDNA ottenute da RNA polyA⁺ estratto da maschi e femmine *wild-type*, sono state amplificate in parallelo con ciascuna coppia di primer.

I valori di Ct (vedi materiali e metodi) mi hanno permesso di ricavare, dalle funzioni lineari ottenute dalla Real Time, le quantità assolute dei trascritti di *mfl* in ciascun campione. Infine, i dati così ottenuti sono stati normalizzati usando come controllo il gene della *-tubulina84B* che è espresso in maniera costitutiva in entrambi i sessi. Il sistema utilizzato per la PCR quantitativa consente di seguire l'amplificazione in tempo reale grazie alla fluorescenza emanata dal Syber Green, un composto che si intercala tra le molecole di DNA, la cui intensità viene captata da un rilevatore e tradotta in valori quantitativi.

I dati ottenuti confermano che l'accumulo complessivo dei trascritti derivati dal gene *mfl* è di circa 7,6 volte inferiore nei maschi rispetto alle femmine (fig. 44a), in accordo con i precedenti esperimenti di Northern blot che

avevano rivelato un'espressione differenziale nei due sessi (Giordano et al., 1999). Analizzando poi in dettaglio l'accumulo di ciascuno dei tre trascritti, è risultato poi evidente che il sito di poliadenilazione meno utilizzato è quello intermedio, e che la ridotta espressione del gene *mfl* nei maschi appare essere a carico di tutti e tre i trascritti. In particolare, la forte riduzione a carico del trascritto più raro (da 2.0 kb) lo rende pressoché assente in questo sesso (fig. 44b).

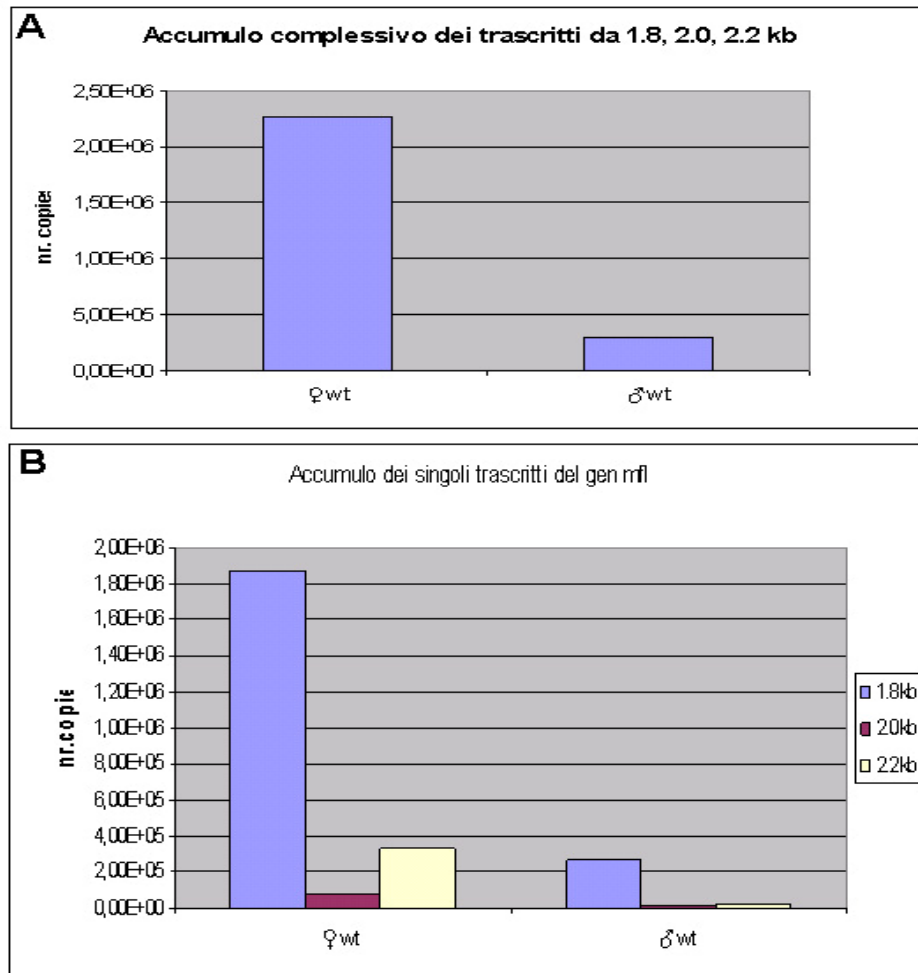
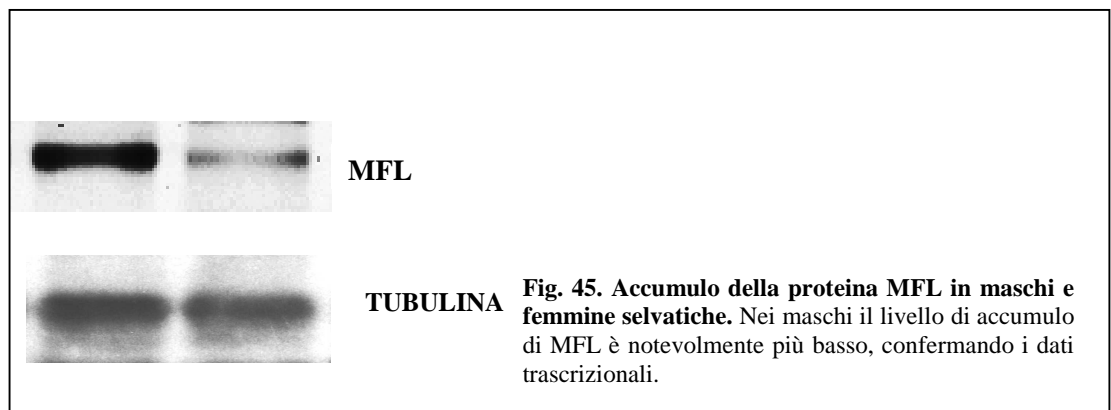


Fig. 44. Accumulo dei trascritti del gene *mfl* in maschi e femmine wt. (A) L'accumulo complessivo dei tre trascritti è di oltre sette volte inferiore nei maschi rispetto alla femmine wt. (B) Dalla quantizzazione dei singoli trascritti si evince che il sito di poliadenilazione meno usato è quello corrispondente al trascritto da 2.0 kb; è evidente una generale riduzione nei maschi di tutte le isoforme. I valori sono espressi in numero di copie.

Allo scopo di verificare se l'effettivo accumulo *in vivo* della proteina MFL rispecchiasse il tasso complessivo di trascrizione del gene *mfl* ho poi eseguito un esperimento di Western Blot, condotto utilizzando estratti proteici ottenuti da adulti di entrambi i sessi ed un anticorpo policlonale prodotto in coniglio, indirizzato contro una porzione peptidica C-terminale della proteina MFL (vedi Mat. e Met.). Anche in questo caso la normalizzazione è stata effettuata utilizzando come controllo l'accumulo della proteina TUB84B, espressa in maniera costitutiva in entrambi i sessi. Come mostrato in fig. 45, l'accumulo della proteina MFL, valutato mediante il software Quantity One (Bio-Rad), che consente di misurare l'intensità del segnale emesso, appare essere in buon accordo con i dati trascrizionali sopra descritti.



Quantizzazione dei trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb nei mutanti *mfl*^l

L'espressione preferenziale di *mfl* in femmine potrebbe essere una conseguenza dell'elevata espressione del gene *mfl* negli ovari (Giordano et al. 1999), che nelle femmine adulte possono rappresentare più della metà del peso corporeo. Considerati i risultati ottenuti, sono andato a valutare il livello

di trascrizione globale del gene *mfl* e l'accumulo dei singoli trascritti anche in femmine mutanti *mfl*^l, eseguendo ulteriori esperimenti di Real Time PCR assoluta in cui ho utilizzato preparazioni di cDNA ottenuto da RNA polyA⁺ estratto da femmine selvatiche e mutanti. I campioni standard di riferimento, le coppie di oligo utilizzate ed il gene considerato per la normalizzazione sono stati già descritti nel paragrafo precedente. La trascrizione complessiva, già nota essere ridotta a causa dell'inserimento dell'elemento trasponibile P nella regione 5' del gene, è risultata essere più che dimezzata nelle femmine mutanti (si è passati dalle 22,8x10⁵ copie osservate nelle femmine wt alle 9,2x10⁵ riscontrate nei mutanti; fig. 46a). Esaminando più in dettaglio l'accumulo di ciascun trascritto, è stato possibile osservare che il messaggero da 1.8 kb risulta più che dimezzato, mentre è quello da 2.2 kb a risentire di una maggiore riduzione, risultando essere circa quattro volte meno abbondante nelle femmine mutanti. L'espressione della forma da 2.0 kb rimane invece pressoché invariata (fig. 46b).

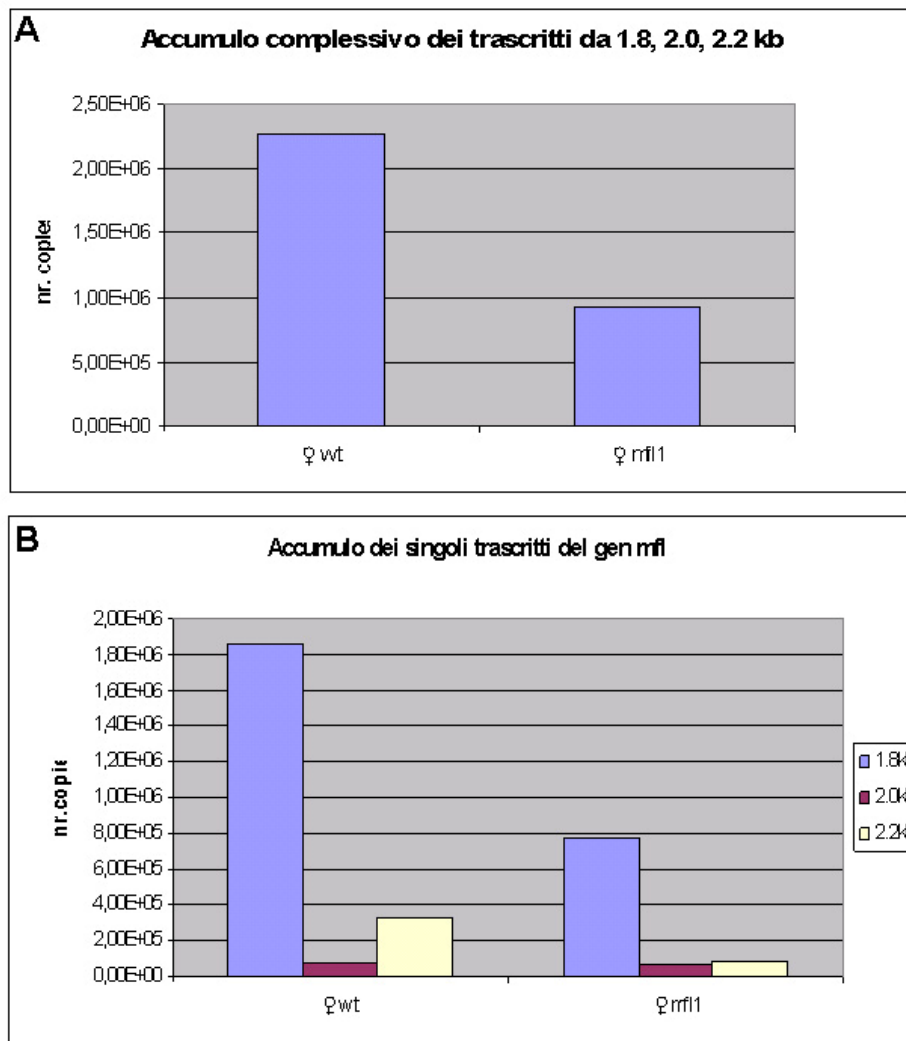
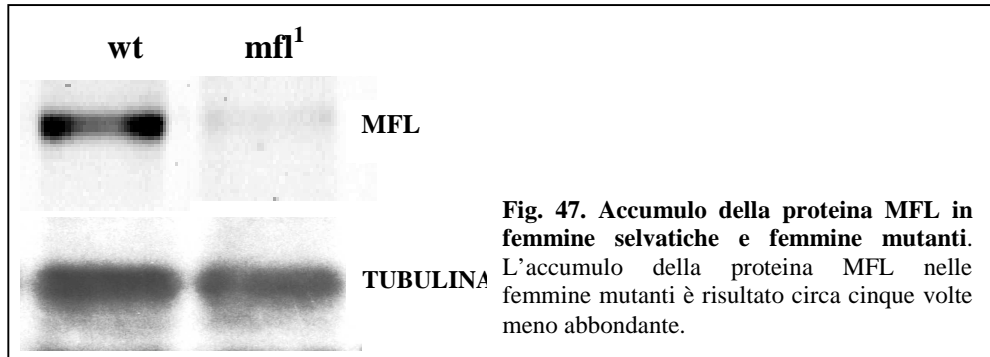


Fig. 46. Accumulo complessivo dei trascritti del gene *mfl* in femmine selvatiche e mutanti *mfl*¹. (A) La trascrizione globale è dimezzata nelle femmine mutanti rispetto al wt. (B) Tutti i trascritti presentano una riduzione d'espressione; in particolare la forma da 2.2kb risulta essere di circa quattro volte meno rappresentata. I valori sono espressi in numero di copie.

Dall'insieme dei dati ottenuti, risulta chiaramente che l'accumulo della proteina MFL nelle femmine mutanti è drasticamente più ridotto di quanto atteso sulla base dei dati trascrizionali (fig. 47). Infatti, da esperimenti di Western blot è emerso che l'accumulo della proteina MFL nelle femmine mutanti è cinque volte inferiore rispetto alle femmine selvatiche. Questo dato potrebbe essere compatibile con l'insorgenza di difetti a carico dell'efficienza della traduzione, probabilmente dovute alla presenza dell'elemento

trasponibile P nella regione 5'UTR del gene *mfl* nei mutanti.



Regolazione esercitata dall'oncogene d-myc sull'espressione di mfl

Studi recenti indicano che l'espressione del gene *mfl* è regolata positivamente dall'oncogene *myc* (Grewal et al., 2005; Pierce et al., 2008); tale regolazione appare essere piuttosto conservata lungo la scala evolutiva, essendo stata osservata anche per il gene ortologo *Dkcl* nei mammiferi (Oskarsson and Trump, 2005; Alawi and Lee, 2007).

La famiglia dei geni *myc* è strettamente coinvolta nella regolazione della crescita e del differenziamento cellulare, nonché nell'apoptosi e nello sviluppo di tumori (Donaldson and Duronio, 2004; Moreno and Basler, 2004; de la Cova et al., 2004; Moreno, 2008). Le proteine Myc agiscono da fattori di trascrizione, modulando l'espressione di geni che promuovono la crescita cellulare, controllando il biometabolismo e stimolando la sintesi proteica. E' stato dimostrato che *myc* controlla diversi aspetti della biogenesi dei ribosomi sia in cellule di *Drosophila* che di mammifero, regolando la trascrizione da parte di tutte e tre le RNA polimerasi (Oskarsson and Trump,

2005; Orian et al., 2003, 2005; Grewal et al., 2005). In particolare, nei mammiferi *c-myc* influenza direttamente la sintesi dell'rRNA e la maturazione del pre-rRNA, mentre in cellule di *Drosophila* il controllo della sintesi dell'rRNA sembra avvenire in modo più indiretto. Mediante esperimenti basati sull'uso di microarray, Grewal et al. (2005) hanno mostrato che un gran numero di geni di *Drosophila* coinvolti nella biogenesi dei ribosomi, tra cui anche il gene *minifly*, sono regolati da *d-myc*. E' interessante notare che in *Drosophila*, i mutanti ipomorfi di *d-myc* presentano sterilità femminile, ridotta taglia corporea, ritardo nella crescita e riduzione nel numero delle setole (Schreiber-Agus et al., 1997); l'insieme di queste caratteristiche fenotipiche è pressappoco identico a quello causato dalla mutazione ipomorfa del gene *mfl*, un dato che rafforza e sottolinea la correlazione funzionale esistente tra questi due geni.

I risultati ottenuti da Grewal dimostrano che la sovrpressione di *d-myc* nei dischi imaginali dell'ala provoca un incremento della trascrizione del gene *mfl* pari a 4,63 volte dopo 7h, e a di 5,56 volte dopo 14h. Ho quindi voluto definire ulteriormente l'effetto dell'induzione di *myc* sulla espressione del gene *mfl* utilizzando cellule della linea S2 trasfettate stabilmente con un vettore contenente la sequenza del gene *d-myc* sotto il controllo di un promotore heat-shock (Bellosta et al., 2005). L'effetto esercitato dall'induzione di *d-myc* è stato saggiato sull'insieme dei trascritti derivati dal gene *mfl*, sia coding che non-coding. Cellule della linea S2 sono state

trasferite per 1h alla temperatura di 37°C e l'RNA estratto a 0h, 2h, 4h, 10h e 14h dopo l'induzione; ciascuna preparazione di RNA è stata quindi retrotrascritta in cDNA e saggiata mediante Real-Time RT-PCR. I risultati ottenuti hanno innanzitutto confermato l'effettivo incremento del livello di *d-myc*, la cui espressione aumenta di circa 14 volte a distanza di due ore dall'induzione e decresce lentamente assestandosi ad un livello considerevole anche dopo 14h dal trattamento heat-shock (fig. 48).

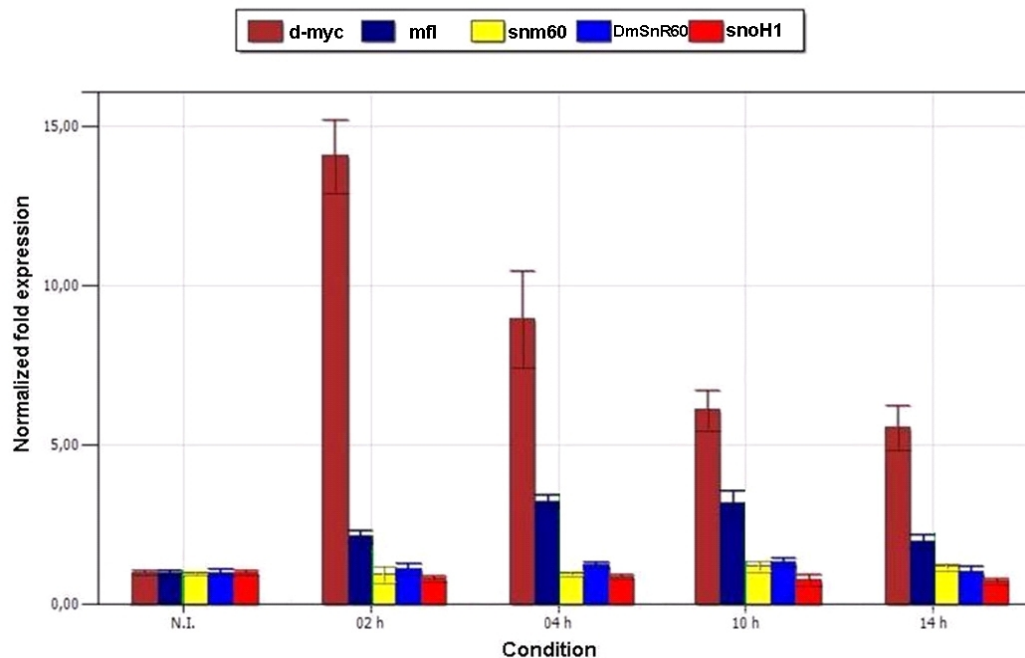


Fig. 48. Induzione della trascrizione del gene *mfl* da parte di *d-myc*. La trascrizione del gene *mfl* raggiunge un massimo a 4h dall'induzione di *d-myc* in seguito a heat-shock. I piccoli ncRNA intronici non risentono invece significativamente dell'induzione.

Come atteso, l'induzione di *d-myc* determina un aumento della trascrizione complessiva del gene *mfl*, saggiata con la coppia di oligo Ex5/6f-Ex6r, in grado di riconoscere l'insieme dei tre trascritti codificanti la proteina MFL.

Il livello di espressione di *mfl* raddoppia già a due ore dalla stimolazione heat-shock, raggiungendo un massimo a quattro ore, quando la quantità dei

trascritti risulta triplicata. L'accumulo complessivo dei tre messaggeri del gene rimane sostenuto anche a distanza di 10h dall'attivazione di *d-myc*, e solo dopo 14h comincia a mostrare un'evidente riduzione, benché il livello resti ancora al di sopra di quello fisiologico. Al contrario, i piccoli ncRNA intronici non risultano essere significativamente indotti; le variazioni della loro espressione appaiono minime, suggerendo che la loro produzione possa essere disaccoppiata da quella dei tre trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb.

Considerato l'effettivo incremento dell'espressione di *mfl* in seguito ad iperespressione di *d-myc*, sono andato a valutare se, i differenti messaggeri di *minifly*, rispondono in maniera uniforme all'attività esercitata da questo regolatore trascrizionale. Visto che il maggior incremento di *mfl* è stato osservato a 4h dall'induzione, sono andato a quantizzare mediante Real-Time RT-PCR assoluta, i differenti livelli di espressione dei tre trascritti da 1.8, 2.0 e 2.2 kb solo in preparazioni di RNA estratte in cellule non indotte (0h) e a 4h dall'induzione, secondo lo schema sperimentale precedentemente descritto. I risultati ottenuti, mostrati in fig. 49, dimostrano che l'effetto esercitato dall'over-espressione di *d-myc* sul gene *mfl* condiziona ciascuno dei tre trascritti considerati in maniera piuttosto omogenea.

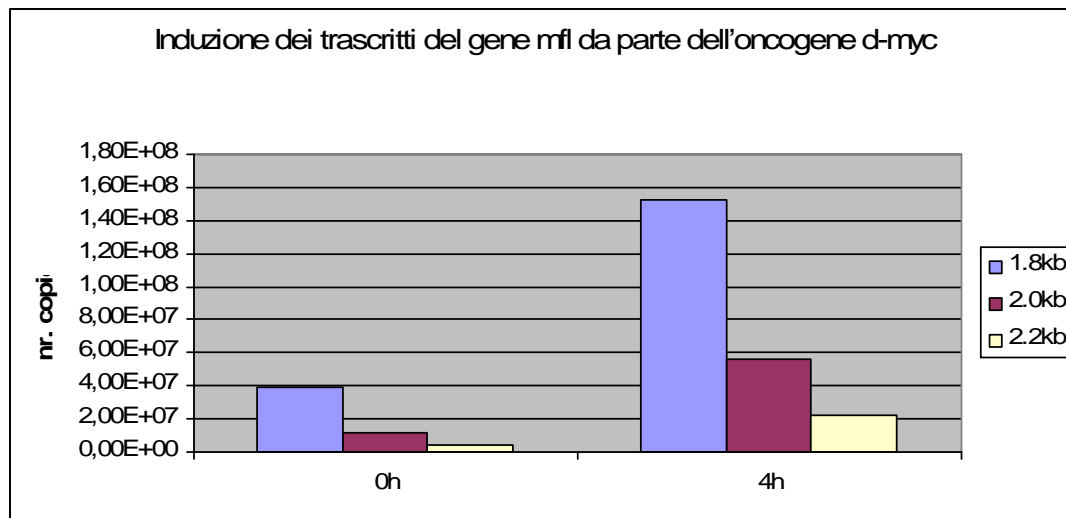


Fig. 49. Aumento della trascrizione del gene *mfl* indotto da *d-myc*. Dopo 4h dall'heat-shock la trascrizione del gene *mfl* aumenta in maniera consistente; i messaggeri considerati presentano un incremento uniforme della loro espressione.

Sulla base dei dati ottenuti, mi è sembrato interessante verificare se una diminuzione dell'espressione di *d-myc* potesse influenzare negativamente l'espressione del gene *mfl* e dei piccoli nc-RNA intronici. Considerato che molti degli studi finalizzati per stabilire una connessione funzionale tra *myc* e *mfl* sono stati eseguiti utilizzando modelli cellulari, dischi imaginali (Grewal et al., 2005) o larve (Pierce et al., 2008), ho voluto analizzare l'accumulo complessivo di *mfl* in vivo, in moscerini adulti del ceppo mutante *d-myc^{P0}*, caratterizzato da una mutazione ipomorfa del gene *myc* che comporta una drastica riduzione della sua trascrizione (Johnston et al., 1999). I risultati ottenuti confermano che la trascrizione globale del gene *mfl* è per gran parte sostenuta dall'attività di *myc*. Infatti, la ridotta espressione di *d-myc* influenza in maniera consistente l'attività trascrizionale di *mfl* riducendola a poco più del 10% rispetto al ceppo selvatico (fig. 50). Questa osservazione potrebbe suggerire che il fenotipo mostrato dai moscerini *d-myc^{P0}*, molto simile a

quello mostrato dai mutanti *mfl*^l possa in realtà essere spiegato dalla significativa riduzione di espressione del gene *mfl* che si verifica in questo ceppo mutante. E' interessante notare che nel mutante *d-myc*^{P0} anche l'accumulo dei piccoli nc-RNA intronici è risultato sensibilmente ridotto. La riduzione più sensibile è stata osservata a carico dello snoRNA H1, la cui espressione è risultata ridotta di oltre il 60%. Poiché questo snoRNA appartiene alla sottofamiglia degli snoRNA di tipo H/ACA, quest'effetto è presumibilmente da attribuire alla riduzione della proteina MFL, la cui presenza è necessaria per la formazione e la stabilità dei complessi ribonucleoproteici (snoRNP) di tipo H/ACA.

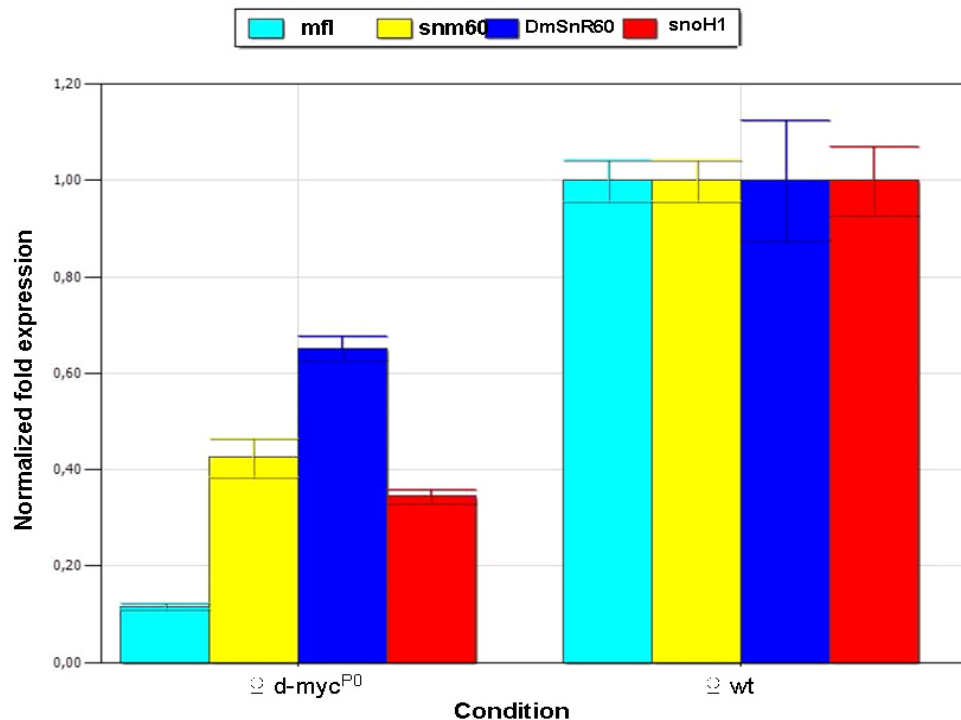


Fig. 50. Espressione del gene *mfl* e dei piccoli ncRNA intronici nel ceppo mutante *d-myc*^{P0}. Il livello d'espressione del gene *mfl* risente sensibilmente della carenza del fattore trascrizionale *d-myc*. Anche l'espressione dei piccoli nc-RNA intronici sembra necessitare dell'attività regolativa di quest'oncogene.

Discussione

Considerando le molteplici ed importanti funzioni biologiche svolte dai membri della famiglia genica *Cbf5/mfl/DKC1*, non è stato sorprendente osservare che l'unica mutazione ipomorfa e vitale del gene *mfl*, la mutazione *mfl¹*, presentava un ampio e complesso insieme di manifestazioni fenotipiche. Solo una parte di queste manifestazioni era stata precedentemente descritta in maniera dettagliata, soprattutto perché la maggior parte degli sforzi era stata inizialmente concentrata sulla definizione dei difetti molecolari alla base della sterilità maschile (Kauffman et al., 2003) e femminile (Giordano et al., 1999) e dell'inefficiente maturazione dell'RNA ribosomiale, cosicché lo spettro delle alterazioni descritte risultava molto simile a quelle provocate in *Drosophila* da altri geni coinvolti nella biogenesi del ribosoma, quali i loci *Minute* (Lambertsson et al. 1998; Marygold et al., 2007) o le mutazioni ipomorfe del gene *d-myc* (Schreiber-Agus et al., 1997) o le alterazioni del sistema insulina/IGF e TOR (Oldham and Hafen, 2003). L'aver potuto affiancare al classico approccio della caratterizzazione dei mutanti quello dell'analisi di linee transgeniche in grado di dirigere il silenziamento del gene in maniera localizzata mi ha permesso di ampliare e definire la descrizione dei processi biologici in cui è coinvolto il gene *mfl*, stabilendo che esso svolge un ruolo importante nella crescita e nella proliferazione cellulare, nonché nei processi di sviluppo, influenzando l'attivazione del pathway regolato dal gene *Notch*.

Estremamente vantaggiosa per questo studio è risultata l'analisi degli effetti determinati dal silenziamento del gene nell'ala, sia durante lo sviluppo che negli individui adulti, non solo perché lo sviluppo di quest'organo rappresenta un sistema ideale di sperimentazione, ma perché in esso il pathway di attivazione di *Notch* è ben noto e caratterizzato. La morfogenesi dell'ala di *Drosophila* è infatti strettamente dipendente dal *signaling* Delta/Notch e dalle proteine di adesione tra i due epiteli (integrine). La ridotta espressione di Notch, Delta e delle proteine di adesione, causata da una riduzione della sintesi e/o funzione ribosomale, potrebbe spiegare gli anomali fenotipi associati alla mutazione *mfl*¹ o al silenziamento del gene. La ridotta sintesi della proteina MFL potrebbe infatti influenzare in maniera localizzata alcuni importanti pathway di segnalazione (*Notch* e *dpp* pathway) che, attraverso la sintesi di morfogeni consentono, in condizioni normali, il corretto e coordinato sviluppo dell'ala. In particolare, i dati ottenuti sottolineano una stretta dipendenza del pathway di segnalazione di *Notch* (*N*) dal livello di espressione della proteina MFL. Ciò risulta particolarmente interessante, soprattutto considerando che questo pathway di segnalazione è anch'esso evolutivamente molto ben conservato ed implicato nella regolazione di molteplici ed importanti processi cellulari. Mentre nel disco dell'ala l'attività del gene *Notch* è essenziale per garantire la corretta espressione del gene *wingless* e, di conseguenza, la regolare formazione del margine D/V, è ben noto che alterazioni di questo pathway (es. *TGFB*, *Wnt*, *N*) sono

frequentemente causa dell'insorgenza di neoplasie (Wilson and Radtke, 2006; Colaluca et al. 2008). A questo riguardo, è interessante notare che *N* svolge nello sviluppo dei tumori un duplice ruolo, in quanto può comportarsi da oncogene o da onco-soppressore. Sebbene il meccanismo di fondo di questa doppia funzione non sia ancora ben chiaro, il risultato dell'attività di *signaling* coordinato da questo gene dipende da più fattori, come l'intensità del segnale, il momento in cui esso viene attivato, il tipo cellulare e, più in generale, il contesto in cui si trova ad agire (Maillard and Pear, 2003). Le conseguenze causate da alterazioni del pathway di *Notch* dipendono dalla normale funzione svolta dal gene in quel dato tessuto; pertanto, mutazioni di *N* potrebbero promuovere la formazione di tumori, se la normale funzione del gene è quella di determinare il "comportamento differenziativo" delle cellule staminali o di regolare il destino delle cellule progenitrici, al contrario, potrebbero agire da onco-soppressore se la normale funzione è quella di dirigere gli eventi terminali del differenziamento (Radtke and Raj, 2003).

Il ruolo di Notch nel dirigere la formazione di tumori è strettamente legato alla sua funzione di mantenimento del comparto delle cellule staminali e della definizione del destino cellulare. In particolare la funzione *N*, in questo contesto, è stata collegata alla sua abilità di legare e agire da antagonista della proteina *Numb*. Sia in *Drosophila* che in mammifero, *Numb* agisce anch'essa come determinante del *cell fate*, distribuendosi in maniera asimmetrica durante la divisione mitotica. L'asimmetrica distribuzione di *Numb* durante la

divisione cellulare determina una situazione di sbilancio omeostatico che definisce alternativi destini di sviluppo nelle cellule figlie; viceversa, l'alterazione di questa asimmetria fa sì che le cellule sorelle acquisiscano la stessa identità. Le cellule che ricevono Numb sono rese refrattarie e non rispondono al *signaling* di Notch mentre le cellule negative per Numb mantengono la loro sensibilità al pathway ed adottano il destino che consegue alla sua attivazione (Santolini et al., 2000). E' stata frequentemente riscontrata la perdita di espressione di Numb in tessuti tumorali, un'osservazione che suggerisce per questo gene anche l'importante ruolo di onco-soppressore (Colaluca et al., 2008). Dati recenti indicano che Numb formerebbe un complesso con p53, impedendone la degradazione; ciò consentirebbe di mantenere alti i livelli di p53 e la sua attività anti-tumorale. La mancata espressione di Numb determina quindi l'attivazione costitutiva di Notch e la concomitante riduzione dell'oncosoppressore p53 (Colaluca et al., 2008). Questi dati indicano con chiarezza quanto sia importante il ruolo del pathway di Notch nello sviluppo e nel differenziamento, nonché nell'omeostasi del compartimento di cellule staminali e nella cancerogenesi, evidenziando fra l'altro come il corretto funzionamento di tutti questi processi sia strettamente correlato ed interdipendente.

L'analisi condotta in questo studio ha mostrato un evidente coinvolgimento del gene *mfl* nello sviluppo e nella morfogenesi di varie strutture corporee, sottolineando fra l'altro che un adeguato livello di espressione di questo gene

è essenziale per il corretto stabilirsi della *planar cell polarity* (PCP), un processo a sua volta essenziale per il verificarsi della divisione asimmetrica, da cui dipendono sia i processi differenziativi che il mantenimento del comparto delle cellule staminali.

L'orientamento della proliferazione cellulare nell'ala dipende dall'orientamento delle divisioni mitotiche e dal fatto che, dopo ciascuna divisione, le cellule mantengono la loro posizione (Baena-Lopez et al., 2005).

La perdita della polarità cellulare nelle ali, la perdita della simmetria bilaterale osservata soprattutto nello sviluppo della cuticola addominale e gli altri difetti diffusi un po' dappertutto nelle varie strutture corporee e spesso in maniera asimmetrica suggeriscono che il gene *mfl* alteri, nel complesso, il meccanismo con il quale si esplica la *cell polarity*, che è premessa per la divisione asimmetrica. A sua volta, questa asimmetria è necessaria sia per il corretto mantenimento del comparto delle *stem cell* (le quali si differenziano per divisioni asimmetriche), sia per la corretta formazione delle cellule progenitrici da cui dipenderà il regolare differenziamento. Pertanto *mfl* potrebbe agire da modificatore del destino cellulare i cui effetti possono essere potenzialmente a carico dello sviluppo di tutte le parti del corpo.

Molte delle anomalie osservate a seguito della ridotta funzione della proteina MFL in *Drosophila* (tumori, ritardo dello sviluppo, difetti di differenziamento, assenza del margine D/V e perdita di adesione tra epitelio dorsale e ventrale nell'ala) e della discherina in topo e uomo (insufficienza

midollare, predisposizione all'insorgenza di tumori), sembrano convergere nell'indicare che il livello di attivazione del pathway di *Notch* potrebbe rappresentare il "sensore" del livello d'espressione dei geni *mfl/DKCl*, reagendo in maniera dose-dipendente, con conseguenze importanti sul normale processo di sviluppo e differenziamento. Negli esperimenti che ho condotto, l'attività del pathway di Notch è stata seguita nei dischi imaginali dell'ala attraverso l'attivazione di uno dei suoi principali target, il gene *wingless*, la cui espressione è anch'essa essenziale per la corretta formazione del margine D/V. Nei dischi in cui il silenziamento del gene *mfl* era guidato dai driver *ap-*, *en-* e *vg-GAL4*, il profilo di espressione del *wg* è risultato sempre difettivo, discontinuo e/o alterato, indicando una netta riduzione dell'efficienza del pathway di *N*. Un dato particolarmente interessante è stato ottenuto nei dischi delle larve di genotipo *apGAL4,UAS-GFP/UAS-IRmfl*, in cui è stata osservata un'intensa attività apoptotica localizzata sia nel compartimento dorsale che in quello ventrale, in corrispondenza di gruppi di cellule che, pur esprimendo attivamente *apterous*, oltrepassano il confine D/V. Questo dato indica che il silenziamento del gene *mfl* determina deviazioni dal normale programma di sviluppo e perdita della specifica identità cellulare, suggerendo che l'estrema disorganizzazione dell'ala osservata a seguito del silenziamento di *mfl* possa dipendere non solo genericamente da una riduzione della sintesi proteica, ma più specificamente

da una ridotta e/o anomala attività del gene chiave dello sviluppo alare, il gene *Notch*.

Un altro aspetto particolarmente interessante, è che gli stessi dischi mostravano anche una lieve riduzione dell'attività proliferativa nel compartimento dorsale (del 13,9%), dove era attivato il silenziamento di *mfl*, suggerendo che l'interferenza localizzata di questo gene potrebbe determinare i difetti di sviluppo osservati sia mediante l'insorgenza di focolai apoptotici, sia svantaggiando la proliferazione cellulare attraverso il meccanismo della "cell competition". Tuttavia, il disco imaginale appariva, per forma e dimensioni, del tutto regolare, una situazione già descritta anche in mutanti di geni coinvolti nel ciclo cellulare, che alterano la crescita cellulare senza però influenzare le dimensioni finali e la forma del disco. Infatti, Weigman e collaboratori nel 1997, bloccarono specificamente la mitosi nel compartimento anteriore del disco inattivando la CDC2 chinasi, un promotore chiave della mitosi. I risultati mostrarono che i dischi imaginali avevano dimensioni e forma normali, raggiungendo un equilibrio omeostatico attraverso un meccanismo compensatorio per cui il compartimento anteriore risultava composto da un numero inferiore di cellule di dimensioni però molto maggiori.

L'analisi degli effetti del silenziamento di *mfl* mediato dalle linee driver *en*, *nub*, *MS1096* e *vg* nella formazione dell'ala ha portato a definire, nel caso della linea driver *en-Gal4*, una significativa riduzione del compartimento

posteriore dell'ala; nel caso della linea driver *nub-Gal4*, una notevole riduzione della dimensione complessiva dell'ala; nel caso della linea driver *MS1096-Gal4*, la riduzione e completa disorganizzazione della lamina alare, con evidenti difetti di adesione tra epitelio D/V; nel caso della linea driver *vg-Gal4*, una diffusa presenza di notches lungo il margine D/V. E' stato possibile effettuare misurazioni morfometriche, volte all'analisi dei diversi territori dell'ala, solo nelle linee interferite con *en-* e *nub-Gal4* in quanto, nelle linee silenziate con i driver *MS1096* e *vg*, le ali presentavano fenotipi eccessivamente irregolari, che ne hanno precluso un'appropriata analisi. La riduzione delle dimensioni delle ali interferite con i driver *nub-GAL* ed *en-GAL4* è stata quindi dettagliatamente analizzata mediante valutazioni quantitative della densità cellulare, per capire se la risposta plastica durante lo sviluppo dell'ala venisse realizzata attraverso variazioni del numero o delle dimensioni cellulari. I risultati hanno mostrato che nelle ali in cui il silenziamento era stato attivato dal driver *nub-GAL4* nell'intera struttura alare, il numero di cellule/area è quasi duplicato, indicando chiaramente che la ridotta dimensione dell'ala (del 44,6%) non è dovuta a problemi di natura proliferativa, quanto piuttosto ad un drastico effetto di ridimensionamento della superficie delle cellule che la compongono. Al contrario, il silenziamento attivato dal driver *en-GAL4* mantiene la densità cellulare praticamente invariata; pertanto, la riduzione del compartimento posteriore dell'ala (del 35%) è essenzialmente attribuibile ad eventi di natura apoptotica

e/o a riduzione dell'attività proliferativa. Appare quindi chiaro che la ridotta espressione di *mfl* può influenzare la dimensione corporea sia regolando la superficie che il numero delle cellule. In quest'ottica, il ruolo regolativo svolto dall'oncogene gene *d-myc* sull'espressione di *mfl* è quanto mai interessante. Nei miei esperimenti, tale funzione è stata sottolineata *in vivo*, mediante l'espressione ectopica di *d-myc* nella zona di formazione del margine D/V del disco dell'ala. Questa attività è risultata sufficiente per recuperare la normale morfologia dell'ala nelle linee silenziate con il driver *vg-GAL4*, mentre il medesimo effetto non è stato osservato attraverso l'arresto dell'attività caspatica. Queste osservazioni indicano che il fenotipo mostrato da moscerini di genotipo *vg-GAL4,UAS-GFP/UAS-IRmfl* potrebbe essere in parte, dovuto a difetti di proliferazione e, in parte attribuibile ad un processo di morte cellulare caspase-indipendente.

Data la complessa organizzazione di *minifly*, l'analisi dell'espressione di questo gene è stata parallelamente estesa anche a livello molecolare. Infatti, è sembrato interessante definire più in dettaglio le modalità di espressione e stabilire con precisione i rapporti quantitativi con cui si accumulano i trascritti di 1.8, 2.0 e 2.2 kb, caratterizzati da una stessa regione codificante ma da regioni 3'UTR di differente lunghezza, per stabilire se questi tre trascritti potessero essere oggetto di diverse regolazioni post-trascrizionali; quest'aspetto è particolarmente interessante anche perché alla loro produzione è associata quella di differenti subset di piccoli ncRNA localizzati negli

introni al 3' del gene. Un'analisi quantitativa effettuata mediante esperimenti di RT-PCR ha inizialmente portato a stabilire che nel ceppo selvatico di riferimento il livello di accumulo complessivo dei tre trascritti è di circa 7,6 volte inferiore nei maschi rispetto alle femmine. Questa forte riduzione, che appare essere a carico di tutti e tre i trascritti, fa sì che quello più raro (2.0 kb) risulti quasi del tutto assente nei maschi. In accordo con i dati trascrizionali, anche gli esperimenti di Western blot hanno confermato un accumulo significativamente maggiore della proteina MFL nelle femmine, un dato probabilmente legato all'elevato tasso di sintesi proteica richiesto durante l'oogenesi. Nelle femmine mutanti *mfl*^l, l'analisi quantitativa ha poi stabilito che l'accumulo complessivo dei tre trascritti è poco più che dimezzato; la riduzione appare però sensibilmente più marcata per il trascritto più lungo (2.2 kb), il cui livello risulta diminuito di almeno tre volte rispetto al controllo. Tuttavia, sebbene l'accumulo complessivo dei trascritti risulti all'incirca dimezzato, l'accumulo *in vivo* della proteina MFL nelle femmine mutanti è invece sensibilmente più ridotto (a circa un quinto). Questa discrepanza suggerisce un difetto non solo di trascrizione e/o stabilità dei trascritti mutanti, ma anche la possibilità che la loro traduzione possa essere inefficiente, probabilmente a causa dell'inserzione dell'elemento trasponibile P nella regione 5'UTR.

Considerato che la regolazione esercitata dall'oncogene *myc* sull'espressione del gene *mfl* appare essere conservata lungo la scala evolutiva, essendo stata

descritta e osservata anche per il gene ortologo *Dkc1* nei mammiferi (Alawi et al., 2007), ho voluto definire il ruolo regolativo svolto del gene *d-myc* sull'espressione di ciascuno dei trascritti del gene *mfl*. L'over-espressione inducibile del gene *d-myc* in cellule S2 stabilmente trasformate ha provocato un sensibile incremento del livello di accumulo di tutti e tre i trascritti, indicando che *d-myc* non influenza in maniera differenziale la loro espressione, che risulta infatti similmente incrementata.

L'osservazione che il fenotipo mostrato dai mutanti ipomorfi *d-myc^{P0}* è pressoché identico a quello manifestato dai mutanti *mfl¹* suggerisce che *mfl* possa giocare un ruolo fondamentale nel pathway attraverso cui *myc* regola la crescita cellulare. Ciò appare anche confermato dall'osservazione che l'accumulo complessivo dei tre trascritti nei mutanti *d-myc^{P0}* si riduce di circa l'85% rispetto al livello d'espressione misurato nel ceppo selvatico. Quest'osservazione è compatibile con l'ipotesi che il fenotipo mostrato dai moscerini *d-myc^{P0}* possa, in realtà, essere dovuto alla significativa riduzione di espressione del gene *mfl* che si verifica in questo ceppo mutante. Un eventuale recupero del fenotipo selvatico mediato dall'iper-espressione del gene *mfl* nel ceppo mutante *d-myc^{P0}* potrebbe confermare la validità di quest'ipotesi.

Infine, l'analisi di cloni mitotici omozigoti per la mutazione letale *mfl⁰⁵* nei dischi imaginali dell'ala ha fornito altre informazioni importanti per comprendere la funzione del gene *mfl*. Infatti, i cloni mutanti sono risultati

vitali a livello cellulare in background genetico eterozigote per la mutazione *Minute*; questi cloni non sono risultati particolarmente sfavoriti dalla competizione cellulare, suggerendo che la loro capacità proliferativa è almeno paragonabile a quella delle cellule circostanti *M(2)l2/+*.

In conclusione, sulla base dell'insieme dei dati ottenuti nel corso dello svolgimento della mia tesi ritengo importante sottolineare che il livello di espressione del gene *mfl* appare modulare l'attivazione del pathway di Notch. Gli effetti dell'attivazione di questo pathway sono strettamente contesto-dipendenti, essendo diversi in ciascun specifico tipo cellulare, e risultano rigorosamente correlati alla intensità del segnale ed al suo momento d'espressione. Pertanto, la comprensione di come Notch integri le informazioni delle altre vie di segnalazione per definire una modalità d'azione contesto-specifica costituirà sempre più un aspetto importante per la comprensione dei meccanismi molecolari alla base di molti importanti processi coinvolti nello sviluppo, nel differenziamento, nel mantenimento del comparto di cellule staminali e nella cancerogenesi.

Materiali e Metodi

Ciclo vitale di *Drosophila melanogaster* a 25°C

STADIO	ORE	GIORNI
Embrione	0-24	0-1
Larva 1° stadio	24-48	1-2
Larva 2° stadio	48-72	2-3
Larva 3° stadio	72-120	3-5
Prepupa	120-132	5-5.5
Pupa	132-216	5.5-9
Adulto	216	9-10

Terreno di coltura per l'allevamento di *Drosophila*

I ceppi di *Drosophila melanogaster* utilizzati sono stati allevati su un terreno a base di farina di mais, zucchero e lievito. Il tutto era già premiscelato nelle opportune quantità in un prodotto commerciale (Instant *Drosophila* medium) fornito dalla Sigma-Aldrich. Per la preparazione di 1 lt di terreno di coltura vengono aggiunti ad un litro di acqua, 300 gr. di Instant *Drosophila* medium, 10 gr. di agar e il tutto viene portato ad ebollizione; si lascia bollire per 5' e si aggiungono successivamente 2.5 gr. nipagina, un antimicotico, precedentemente sciolti in 10 ml di alcool etilico al 95%. Il terreno viene quindi versato negli opportuni recipienti e lasciato raffreddare; una volta asciutto, si tappano i barattoli con del cotone da batteriologia.

Mantenimento dei ceppi

I ceppi vengono fatti crescere in camere termostatate ad una temperatura di 25°C in barattoli contenenti il terreno suddetto e vengono trasferiti su terreno fresco ogni 14/15 giorni. Il trasferimento viene operato previa analisi al microscopio del fenotipo dei moscerini per accertarsi che nessun individuo con caratteristiche differenti da quelle corrispondenti al ceppo in esame sia presente nel barattolo. Si selezionano poi una trentina di individui di ciascun sesso e si trasferiscono in un nuovo barattolo. Il numero di individui da trasferire non è fisso ma dipende dal genotipo dei moscerini e un numero maggiore è richiesto se essi sono caratterizzati da bassa fertilità.

Ceppi di *Drosophila* utilizzati

- Ceppo selvatico di *Drosophila melanogaster* Canton S;
- *mfl¹/CyO*; *ry506* mutante ipomorfo *mfl*;
- *mfl⁰⁵/CyO* mutante letale *mfl*;
- *d-myc^{P0}* mutante ipomorfo *d-myc*;
- *vgGAL4, UAS-GFP/CyO* linea driver;
- *enGAL4, UAS-GFP/CyO* linea driver;
- *nubGAL4/GlaBc; UAS-GFP/TM6b* linea driver;
- *MS1096-GAL4* linea driver;
- *Act5C-GAL4/CyO* linea driver;
- *apt-GAL4/CyO* linea driver;
- *UAS-GFP; hh-GAL4/TM3* linea driver;
- *dpp-GAL4* linea driver;
- *P[UAS-p35]* linea UAS;
- *P[UAS-HA-d-myc]* linea UAS;
- *iMfl³⁴⁵⁹⁷* linea UAS-IR*mfl*;
- *iMfl³⁴⁵⁹⁸* linea UAS-IR*mfl*;
- *iMfl⁴⁶²⁷⁹* linea UAS-IR*mfl*;
- *iMfl⁴⁶²⁸²* linea UAS-IR*mfl*;
- *frt42D, hs-R^{neo}, P[Ubi-GFP]/CyO* linea FRT;
- *frt42D, hs-R^{neo}, mfl⁰⁵/CyO* linea FRT;
- *hs-flp1.22; frt42D, armLacZ, M(2)l2/CyO* linea FRT, flp.

Fatta eccezione per l'incrocio *mfl¹ x mfl¹* tutti gli incroci sono stati condotti a 25°C.

Estrazione di RNA totale con TriReagent (SIGMA)

E' stato estratto l'RNA totale da maschi e femmine selvatici, da femmine mutanti *mfl¹*, da femmine mutanti *d-myc^{P0}* e da cellule S2 trasfettate con un vettore comprendente il gene *myc* sotto il controllo di un promotore heat-shock. Tutta la procedura di estrazione va eseguita rigorosamente utilizzando provette, puntali e soluzioni RNasi-free. Si raccolgono in un tubo Eppendorf sterile da 1.5 ml circa 15-20 moscerini e si pesano. Si aggiunge il Tri Reagent (1ml di Tri Reagent per 50-100 mg di campione) e si pesta il campione per omogeneizzarlo. Si centrifuga a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C. Si trasferisce il surnatante

in un nuovo tubo Eppendorf sterile. Si lascia il campione per 5 minuti a temperatura ambiente. A questo punto va aggiunto una opportuna quantità di cloroformio (0.2ml per ml di Tri Reagent usato). Si agita vigorosamente per 15'' e si tiene a temperatura ambiente per 5 minuti. Il campione va centrifugato a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C in modo da ottenere separate le tre fasi contenenti RNA, DNA e proteine. Si trasferisce la fase acquosa contenente l'RNA, in una nuova provetta sterile e si aggiunge isopropanolo (0.5ml per ml di Tri Reagent usato). Si agita per inversione e si lascia a temperatura ambiente per 5 minuti. Si centrifuga per altri 10 minuti a 14.000 rpm a 4°C consentendo la precipitazione dell'RNA. Si rimuove il supernatante e si aggiunge al pellet etanolo 70% (1ml di etanolo per ml di Tri Reagent usato). Si centrifuga per 5 minuti a 4°C a 14.000rpm. Si rimuove il supernatante e si lascia asciugare il pellet (RNA). Si risospende l'RNA in H₂O DEPC sterile e si conserva il campione di RNA a -80°C.

Analisi dell'RNA mediante elettroforesi su gel di agarosio e quantizzazione mediante spettrofotometria UV

Si è fatto ricorso alla corsa elettroforetica su gel di agarosio all' 1% -1,5% in tutti i casi in cui è stato necessario verificare la completezza di una digestione, valutare la purezza di un DNA estratto, stimare la concentrazione o la lunghezza in paia di basi del DNA nelle varie preparazioni, controllare l'integrità dell'RNA estratto.

Si corre il campione in un gel di agarosio in presenza di Bromuro di etidio e di adeguati marker di lunghezza e concentrazione noti.

L'RNA estratto è considerato integro se risultano visibili le principali tre bande corrispondenti all'rRNA ribosomiale 5,8S, 18S e 28S.

È importante prima della preparazione del gel pulire il lettino, il pettine e la tanica elettroforetica con H₂O DEPC attiva 0,1% per eliminare eventuali contaminazioni da RNAsi che potrebbero degradare l'RNA durante la corsa.

Per quantizzare l'RNA estratto è necessario tarare lo spettrofotometro effettuando una misurazione del bianco con 750 µl di acqua bi distillata milliQ (Millipore). I campioni da misurare vengono preparati diluendo 3 µl dell'RNA estratto in 750 µl di acqua milliQ; utilizzando una cuvetta di quarzo, si è quindi misurata l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm. La concentrazione incognita del campione è poi stata ottenuta mediante l'utilizzo della seguente relazione che esprime la concentrazione di RNA in µg/µl:

$$[\text{concentrazione RNA}] = \frac{\text{O.D} \times \text{Fattore diluizione} \times 40}{1000}$$

Protocollo per la purificazione degli mRNA (polyA+) mediante “GENELUTE mRNA MINIPREP KIT” (SIGMA)

Tutti i passaggi sono in accordo con quanto suggerito nel protocollo di accompagnamento del kit: si raccoglie in un tubo Eppendorf sterile da 5 a 500 µg di RNA totale (nei miei esperimenti ho utilizzato 250 ng di RNA totale per ciascun campione), si porta il volume a 250µl aggiungendo H₂O RNase-free. Aggiungere 250 µl di “Binding solution 2X”, aggiungere in seguito 15 µl di “oligo(dT) polystyrene beads” e vortexare intensamente.

Incubare 3 min a 70°C e trascorso questo tempo porre il tubo a temperatura ambiente per 10min. Centrifugare 2 min 14000g, rimuovere il surnatante. Risospendere il pellet dei complessi mRNA-oligo(dT) beads in 500 µl di “Wash solution” e trasferire la risospensione in una colonnina microSpin provvista di filtro. Centrifugare 2 min 14000g, rimuovere il surnatante. Aggiungere altri 500 µl di “Wash solution” e centrifugare 2 min 14000g. Trasferire la colonnina in un tubo di raccolta (incluso nel kit) e aggiungere al centro del filtro 50µl di “Elution Buffer” preriscaldato a 70°C. Incubare per 5min a 70°C e centrifugare 1min 14000g. Ripetere l’eluizione una seconda volta come descritto.

Trascrizione inversa di una preparazione di RNA mediante “QUANTITECT REVERSE TRANSCRIPTION KIT” (QIAGEN)

E’ stata effettuata una reazione di retrotrascrizione per la sintesi di cDNA partendo dalle varie preparazioni di RNA poly(A)+. Sono stati retrotrascritti 250 ng di ciascun campione in un volume finale di reazione di 20 µl. Inoltre è stata utilizzata la stessa quantità di RNA di ciascun campione per preparare i controlli (no-RT). Come primo passaggio si effettua una digestione per eliminare il DNA genomico (gDNA) sia nei campioni che nei controlli, secondo il seguente protocollo:

- gDNA Wipeout Buffer 7X 2 µl
- template RNA variabile
- RNasi-free water fino a un volume di 14 µl

Successivamente la soluzione è incubata per 3 min e 30 sec a 42°C per consentire la digestione del gDNA; in seguito la reazione viene interrotta spostando il tubo immediatamente in ghiaccio, in quanto l’RNA è estremamente suscettibile alla degradazione. Si è quindi avviata la reazione di retrotrascrizione secondo il seguente protocollo:

- Trascrittasi inversa quantiscript 1 µl
- Quantiscript RT buffer 5X 4 µl

- RT primer mix (contenente esameri random) 1 μ l
- RNA stampo (l'intera reazione di eliminazione del gDNA) 14 μ l

raggiungendo così un volume finale di 20 μ l.

Nei controlli no-RT è stato inserito 1 μ l di H₂O RNasi-free in sostituzione della trascrittasi inversa. Le reazioni sono state quindi incubate per 15 min a 42°C e successivamente per altri 3 min a 95°C per inattivare la trascrittasi inversa Quantiscript. Ciascun campione di cDNA e i rispettivi controlli sono stati diluiti 1: 2 aggiungendo ai 20 μ l del volume di reazione 20 μ l di H₂O *Nuclease-free*. Così la concentrazione dei campioni e dei controlli è stata portata a 6,25 ng/ μ l.

Amplificazione di molecole di cDNA mediante la reazione a catena della *Taq* polimerasi (PCR)

La tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction) è stata utilizzata come controllo preliminare per verificare che le reazioni di retrotrascrizione abbiano avuto esito positivo e per verificare che non vi sia contaminazione di gDNA nelle preparazioni di cDNA.

A tale scopo è stato utilizzato un “forward primer” disegnato all’interno dell’esone 2 del gene G6PDH in coppia con un “reverse primer” disegnato all’interno dell’esone 4. La GoTaq polimerasi utilizzata è fornita dall’azienda PROMEGA e contiene al suo interno un colorante ed una adeguata quantità di glicerolo che ne consente direttamente il caricamento. La miscela di reazione utilizzata per la PCR è composta da: 5 μ l di Buffer PCR 10X (Tris-HCl 100mM pH 8.3; 500mM KCl; 15mM MgCl₂) ; 0,5 μ l dNTP 10mM; 2 μ l Primer forward 5 μ mol/ μ l; 2 μ l Primer reverse 5 μ mol/ μ l; 1 μ l cDNA 6,25ng/ μ l; 0,2 μ l Taq polimerasi 10U/ μ l e dd H₂O sterile per un volume finale di 25 μ l.

Considerando la lunghezza e composizione dei primer e la lunghezza del frammento da amplificare, il programma dei cicli è stato il seguente:

5 min a 95°C	denaturazione iniziale	Per 35 cicli
35 sec a 95°C	denaturazione	
35 sec a 59°C	annealing	
45 sec a 72°C	polimerizzazione	
4 min a 72°C	polimerizzazione finale	

La T (°C) di *annealing* deve essere di circa 4-6°C inferiore alla T_m oligonucleotidi del frammento da amplificare.

La mancanza di contaminazione di DNA genomico e la presenza di un buon prodotto di amplificazione evidenzia la buona riuscita della reazione di retrotrascrizione.

Digestione enzimatica di DNA plasmidico

La preparazione degli standard utilizzati negli esperimenti di Real Time RT-PCR ha previsto la digestione di un clone plasmidico al cui interno era stato inserito un cDNA derivato dal gene *mfl* di *Drosophila* che comprendeva la regione compresa dall'esone 2 all'esone 12. La digestione aveva lo scopo di escindere il frammento di interesse da utilizzare per la costruzione delle rette di standardizzazione. L'escissione del frammento era necessaria per minimizzare l'interferenza dovuta alla capacità del SYBR Green (colorante che si lega al DNA) di intercalarsi in qualunque molecola di DNA a doppia elica (dsDNA). L'uso dell'intera molecola di DNA plasmidico negli esperimenti di quantizzazione mediante Real-Time PCR avrebbe provocato l'aumento di un segnale di fondo aspecifico, rendendo meno precisa l'analisi quantitativa (descritta in seguito).

Per la digestione del DNA plasmidico sono stati utilizzati 8 µg di DNA plasmidico, 6 µl di buffer di digestione 10X, 48,8 µl di ddH₂O, 8 unità dell'enzima XbaI (10 U/µl) e 8 unità dell'enzima SmaI (10 U/µl). La miscela di reazione è stata poi incubata a 37°C per 2 h.

Eluizione da gel e purificazione del frammento di cDNA mediante NUCLEOSPIN Extract II (Machery-Naigel)

Per separare il frammento d'interesse dal *backbone* del plasmide, il prodotto di digestione è stato caricato su un gel di agarosio 1%. A questo punto è stata avviata la corsa elettroforetica (100 V per 30 minuti). Terminata la corsa, il gel è stato osservato sotto lampada UV e grazie al bromuro di etidio, che emette fluorescenza, è stato possibile osservare le bande che corrispondono ai frammenti di DNA di diversa lunghezza. Quindi, con un bisturi sterile è stata raccolta la parte di gel contenente il frammento di interesse; ad essa sono stati aggiunti 200 µl della soluzione NT del kit NUCLEOSPIN Extra II (Machery-Naigel) per ogni 100 mg di gel ed è stata effettuata un'incubazione a 50°C per 5-10 min finché il gel non si è completamente disciolto. A questo punto il tutto è stato trasferito nell'apposita colonnina per purificare il frammento mediante filtrazione. Si è centrifugato quindi per 1 min a 11,000 g per rimuovere l'eluato. Successivamente sono stati aggiunti 600 µl della soluzione NT3 del kit per lavare la membrana e si è centrifugato di nuovo per 1 min a 11,000 g. Dopo aver scartato l'eluato, si è ricentrifugato per 2 min a 11,000g per asciugare la membrana. La colonnina è stata poi trasferita in un nuovo tubo Eppendorf sterile, dove sono stati aggiunti 15 µl di buffer di eluizione (NE), e lasciata 1 min a temperatura ambiente. Si è centrifugato infine per 1 min a 11,000 g affinché il frammento di DNA venisse eluito dalla membrana e raccolto nell'Eppendorf.

Quantizzazione del frammento di cDNA eluito dal gel mediante spettrofotometria UV

Per ottenere una buona quantizzazione durante gli esperimenti di Real Time PCR è necessario che le rette di taratura siano ottenute con estrema accuratezza, per cui il frammento usato come riferimento standard è stato accuratamente quantizzato allo spettrofotometro. Per cominciare è stato necessario tarare lo strumento effettuando una misurazione con 600 µl di acqua milliQ (bianco). Quindi, sono stati diluiti 3 µl del frammento purificato in 600 µl di acqua milliQ e, utilizzando una cuvetta di quarzo, si è misurato l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm.

La concentrazione del nostro campione è stata ottenuta mediante l'utilizzo della seguente relazione che esprime la concentrazione di DNA in µg/µl:

$$[\text{concentrazione DNA}] = \frac{\text{O.D} \times \text{Fattore diluizione} \times 50}{1000}$$

Analisi quantitativa di molecole di cDNA mediante Real Time RT-PCR

La Real Time PCR è un metodo di amplificazione di frammenti di Dna che consente di seguire in tempo reale l'aumento esponenziale delle molecole sintetizzate, attraverso la rilevazione della fluorescenza emessa da un colorante intercalato tra le basi del dsDNA. La quantizzazione relativa, mediante Real Time PCR, viene ottenuta con una comparazione delle concentrazioni relative dei trascritti del gene di interesse tra i campioni in esame. Essa è normalizzata rispetto ad un gene di riferimento (normalizzatore), la cui espressione non viene influenzata (indotta o soppressa) da modifiche delle condizioni sperimentali. Questa normalizzazione elimina le differenze dovute all'isolamento dell'RNA ed all'efficienza della reazione di retrotrascrizione, che scaturiscono da campione a campione e da esperimento ad esperimento.

Per valutare l'efficienza delle diverse coppie di primer capaci di identificare i vari siti di poliadenilazione alternativi e per misurare l'accumulo effettivo dei singoli trascritti del gene *mfl* nella reazione della Real-time PCR sono state utilizzate come standard diluizioni seriali del segmento di cDNA purificato precedentemente, che conteneva una regione di cDNA rappresentativa del trascritto da 2,2 kb. Gli standard sono serviti alla costruzione di una retta di taratura per ciascuna coppia di primer, dalle quali si estrapola la quantità assoluta di ciascun trascritto. A tale scopo sono stati utilizzati 5 standard alle seguenti concentrazioni: 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl, 100 fg/µl.

La reazione di Real-Time PCR è stata condotta impiegando il kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad), utilizzando le piastre *optical reaction plate* (Corning), formate da 96 pozzetti da

200 µl ciascuno. Il volume di reazione caricato in ciascun pozzetto corrisponde a 15 µl. Per minimizzare gli errori dovuti alla variabilità degli strumenti, le reazioni per ogni campione sono state eseguite in triplicato. Inoltre è stata allestita una mix di partenza comune ad ogni campione, costituita da :

- 8 µl 2X Green Supermix
- 1 µl oligo *FORWARD* (5 pmol/µl)
- 1 µl oligo *REVERSE* (5 pmol/µl)

Il protocollo di amplificazione prevede 40 cicli composti da :

fase di denaturazione : 95°C per 15 secondi

fase di annealing e di estensione : 60°C per 1 min

Per attivare la *iTaq DNA polymerase* all'inizio della reazione è stato effettuato uno step a 95°C per 10 min. Le reazioni sono state condotte in un sistema iCycler iQ della Bio-Rad.

Il sistema utilizzato per questa analisi è in grado di rilevare la variazione progressiva della fluorescenza emessa da un agente intercalante tra le basi di dsDna, quale il SYBER Green, presente nel kit iQ SYBER Green Supermix (Bio-Rad) utilizzato. Questo colorante, quando è libero in soluzione, mostra una fluorescenza relativamente bassa mentre legato al dsDNA, il suo grado di fluorescenza aumenta di circa 1000 volte. L'aumento della fluorescenza è dunque proporzionale all'aumento della concentrazione di DNA sintetizzato per amplificazione. In un esperimento di Real Time PCR la fluorescenza viene misurata nella fase esponenziale di amplificazione del DNA, in quanto rappresenta la fase della reazione in cui l'efficienza dell'amplificazione non è alterata dalla riduzione dei reagenti, dall'accumulo degli inibitori e dall'inattivazione della polimerasi. Il primo ciclo al quale lo strumento riesce a discriminare il valore di fluorescenza prodotta e a rilevarne il livello al di sopra di un valore (background) è definito "Ct" o ciclo soglia. Esso risulta essere inversamente proporzionale al numero di copie di templatò iniziale; maggiore sarà la concentrazione iniziale del templatò, minore sarà il valore di Ct. Il valore di background è rappresentato dal segnale fluorescente, raccolto dalla macchina, di un colorante di riferimento (nel nostro caso rappresentato dalla fluoresceina) che mantiene il suo segnale di fluorescenza inalterato durante la fase di amplificazione. Il valore della fluorescenza associata a questo "reporter" è definito "well factor" e viene rilevato automaticamente dalla macchina prima di cominciare la fase di amplificazione. La fluorescenza emessa dalla fluoresceina sarà dunque in grado di annullare le differenze associate alle diverse quantità di miscela di reazione presenti nei differenti pozzetti, causate dagli eventuali errori commessi dallo sperimentatore. Questo colorante è già presente nella iQ SYBER Green Supermix.

Poiché il SYBER Green I è in grado di legarsi a qualsiasi dsDNA, la specificità di reazione deve essere garantita da una corretta scelta dei primer, che non sempre è associata all'amplificazione del solo frammento di interesse. Può capitare infatti che i primer possano legarsi aspecificamente a frammenti di DNA presenti nella miscela di reazione, avviando così reazioni di amplificazione indesiderate. Per ovviare a questo problema la macchina è in grado di elaborare una curva di dissociazione (melting curve) consentendo di visualizzare graficamente la presenza di eventuali amplificati non-specifici. Infatti, ogni frammento di dsDNA possiede infatti una temperatura di dissociazione caratteristica (temperatura di Melting, T_m), dipendente dalla lunghezza del frammento e dalla sua composizione in basi. Se lo strumento registra valori di T_m identici per i frammenti di DNA amplificati presenti nella miscela di reazione, allora la reazione sarà avvenuta in modo altamente specifico. Nel caso in cui i valori di T_m registrati dalla macchina non dovessero coincidere, è possibile concludere che la reazione ha coinvolto più di un amplicone.

Tutti i primer utilizzati in questo tipo di analisi sono stati progettati utilizzando il programma Primer Express 2.0 software (Applied Biosystem). In tutti gli esperimenti i dati sono stati normalizzati per l'espressione del gene housekeeping di *Drosophila Tub84B*. tre differenti preparazioni di RNA sono state testate per ciascun campione e ciascuna reazione è stata condotta in triplicato.

Estrazione di proteine

Sono state effettuate estrazioni di proteine da maschi e femmine selvatiche, da femmine mutanti *mfl¹* e da femmine mutanti *d-myc^{PO}*. Si raccolgono in un tubo Eppendorf sterile da 1.5 ml circa 15-20 moscerini. Si aggiunge ai campioni 500µl di Buffer di lisi (RIPA buffer + inibitori proteasi + PMSF) e si omogeneizza il tutto con un pestello. I campioni vengono tenuti 45min in ghiaccio per far avvenire la lisi e, trascorso questo tempo, vengono centrifugati per 15' a 13200 rpm a 4°C. Si preleva il surnatante e viene effettuata la quantizzazione tramite saggio di Bradford.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Questa tecnica permette di separare le proteine sulla base del loro peso molecolare. L'SDS è un detergente carico negativamente che si lega alle regioni idrofobiche delle proteine, sopraffaccendone la carica intrinseca e provocandone lo svolgimento in catene polipeptidiche estese. Inoltre, l'aggiunta di -mercaptoetanolo permette la riduzione dei ponti disolfuro, contribuendo a separare le proteine da eventuali associazioni dovute a tale legame: in questo

modo la proteina denaturata, quando sottoposta a campo elettrico, migrerà al polo positivo in maniera esclusivamente dipendente dalle sue dimensioni. Il gel di poliacrilammide viene versato tra due lastre di vetro sovrapposte e separate da uno spessore di 0,75 mm. Si versa per primo il “running gel” ad una concentrazione del 10% di acrilammide fino a circa 2/3 della superficie. Una volta polimerizzato si versa lo “stacking gel” ad una concentrazione del 5% di acrilamide, all’interno del quale viene disposto un apposito pettine per la formazione dei pozzetti di caricamento. Terminata la polimerizzazione in ciascun pozzetto sono stati caricati 70µg di estratto proteico precedentemente diluito in loading buffer denaturante e riscaldati a 95°C per 5min. La corsa elettroforetica è condotta ad Amperaggio costante (20mA) ed il tempo necessario per la separazione è stato stimato seguendo la separazione delle bande del marker.

Trasferimento in Wet delle proteine su membrana di nitrocellulosa

Si ritaglia un rettangolo della membrana di nitrocellulosa della stessa dimensione del gel e 4 fogli di carta 3MM. Finita la corsa si smonta il gel e si elimina il lato stacking. E’ opportuno equilibrare il gel, due spugnette, i fogli di carta 3MM e la membrana di nitrocellulosa nel buffer di trasferimento. Si assembla il tutto nell’apparato di trasferimento e si avvia il trasferimento mantenendo 200 mA costanti per 2h a 4°C.

Terminato il trasferimento si colora la membrana con il rosso Ponceau, per valutare la bontà del trasferimento e si sciacqua con tTBS fino a rimozione completa del colorante; si blocca il filtro in tTBS+10% milk per 2h in agitazione. Il filtro si incuba per almeno 2h con l’anticorpo primario diluito in tTBS-5% milk, dopodiché si sciacqua 3 volte per 15 min in tTBS. Successivamente si incuba per 1h con l’anticorpo secondario diluito in tTBS-5% milk ed in seguito si sciacqua per altre 3 volte con tTBS. Per la rivelazione è stato usato il Kit ECL-Advance Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) in accordo con le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

Analisi fenotipica

Nell’analisi fenotipica, tutti i ceppi sono stati mantenuti in condizioni di ipoaffollamento ed a temperatura costante di 25°C in condizioni di alimentazione standard; in ogni incrocio sono state impiegate dieci femmine vergini, che sono state lasciate accoppiare e deporre uova per periodi non superiori le 24 ore. Sono state esaminate dieci vial per ciascun incrocio e, da ognuna di esse, ho ottenuto una progenie di 50-70 individui adulti indicando che la densità di larve era ottimale e comparabile fra i diversi incroci.

Montaggio delle ali

Per il montaggio delle ali dei moscerini adulti è conveniente porre gli insetti per almeno 24 ore in soluzione SH (Glicerina/Etanolo 30:70). Prelevo l'insetto dalla soluzione SH e lo pongo in un pozzetto contenente H₂O. A questo punto raccolgo le ali e faccio due sciacqui in etanolo assoluto per disidratarle. Aspiro l'etanolo ed aggiungo alle ali il mezzo di montaggio (Acido lattico/Etanolo 6:5). Infine monto le ali su un vetrino, sul quale ho messo una goccia di mezzo di montaggio; aggiungo il coprioggetto e sigillo il tutto con smalto trasparente.

Immunofluorescenza

Le larve di terzo stadio sono state raccolte dai terreni di coltura e disettate in PBS. Sono state successivamente fissate in PFA 4% per 20' e sciacquate in PBS per 5'. Per la permeabilizzazione sono stati effettuati tre passaggi da 10' in PBT (triton 0,3%) ed altri tre passaggi in PBT-BSA da 10' ciascuno. Si è quindi aggiunto l'anticorpo primario opportunamente diluito in PBT-BSA ed incubato O.N. a 4°C. Sono stati effettuati tre lavaggi da 15' in PBT-BSA per rimuovere l'eccesso di anticorpo ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario diluito in PBT-BSA secondo quanto stabilito dalla casa fornitrice. Sono stati effettuati altri tre lavaggi da 15' in PBT-BSA per rimuovere l'eccesso di anticorpo. Quindi, sono stati raccolti i dischi e montati in VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Labs).

Le immagini sono state successivamente acquisite al microscopio confocale LMS510 vertical (LEICA).

Anticorpi

Gli anticorpi primari utilizzati nei diversi esperimenti di immunolocalizzazione condotti sono:

- anticorpo policlonale anti-MFL ottenuto in coniglio e diretto contro un epitopo localizzato estremità C-terminale della proteina MFL (SIGMA; dil. 1:120);
- anticorpo monoclonale anti-wg ottenuto in topo (Hybridoma Bank; dil. 1:50);
- anticorpo policlonale anti-Ph3 ottenuto in coniglio (Cell Signalling Solutions; dil. 1:200);
- anticorpo policlonale anti-cas3 ottenuto in coniglio (Cell Signalling Solutions; dil. 1:50);
- anticorpo policlonale anti- gal ottenuto in coniglio (Cappel; dil. 1:100);

- anticorpo policlonale anti- tub ottenuto in capra (Santa Cruz Biotechnology; dil. 1:500).

Gli anticorpi secondari utilizzati sono prodotti dalla Jackson Immunological laboratories ed utilizzati ad una diluizione di 1:200.

GAL4/UAS

Il sistema binario GAL4/UAS permette, in drosophila, di studiare gli effetti dovuti all'espressione ectopica del gene d'interesse. GAL4 è un potente attivatore trascrizionale di *Saccharomyces cerevisiae* che riconosce e lega una specifica sequenza regolatoria chiamata UAS (Upstream Activating Sequences). Questo sistema, pertanto, utilizza il gene che codifica per la proteina GAL4 per attivare il gene bersaglio, che viene a sua volta clonato a valle della sequenza UAS. I due transgeni, quello "attivatore" e quello "bersaglio" sono portati da linee distinte e solo l'avvio di opportuni incroci innesca l'attivazione ectopica del gene d'interesse nella progenie (Brand and Perrimon, 1993).

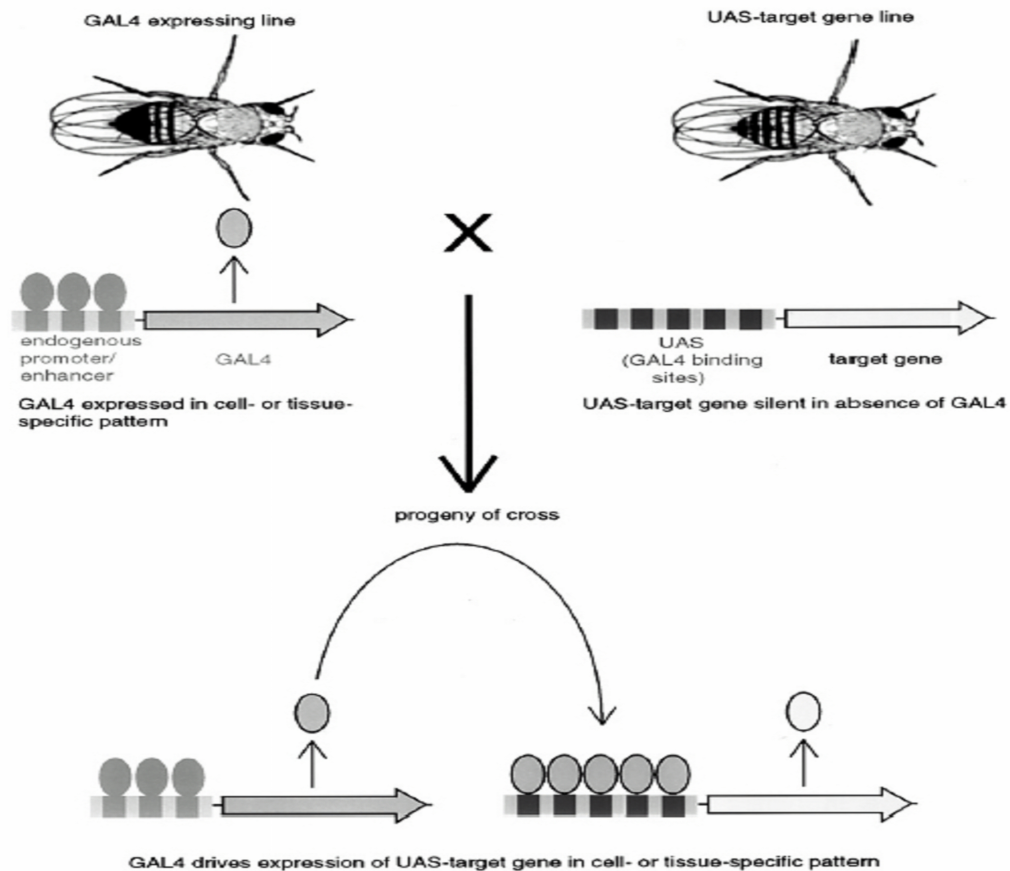


Fig. 51. Il sistema binario GAL4-UAS per l'espressione ectopica dei geni d'interesse.

FLP/FRT

In drosophila è ampiamente utilizzato il sistema binario di lievito FRT-flp, che consente di ottenere ricombinazione sito-specifica. La flippase (flp) è una ricombinasi che guida la ricombinazione al livello di specifiche sequenze chiamate FRT (Flippase Recognition Targets). Questo sistema viene generalmente usato per creare mosaici genetici molto utili per lo studio di mutazioni da perdita di funzione. Sono attualmente disponibili molte linee FRT ciascuna delle quali presenta su un braccio cromosomico un elemento FRT posizionato in prossimità del centromero; questo permetterà lo scambio dell'intero braccio cromosomico per ricombinazione mitotica, operata dall'enzima flippase (Xu and Rubin, 1993).

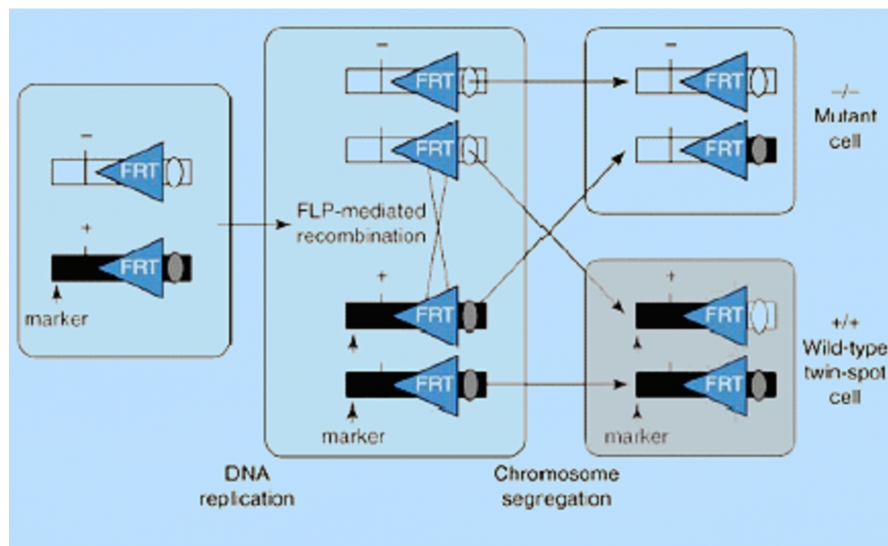


Fig. 52. Il sistema binario FLP/FRT utilizzato per ottenere ricombinazione sito-specifica

Elenco delle soluzioni

<i>TAE 50X :</i>	2M Tris-acetato; 0.05M EDTA pH 8.0
<i>RIPA Buffer:</i>	50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% NP40, 1mM PMSF, 1X cocktail inibitori proteasi.
<i>Running gel:</i>	10% Acrilammide-BisAcrilammide, 0,375M Tris-HCl pH 8.8, SDS 0,1% (per la polimerizzazione in 10ml 100µl di APS 10% ed 10µl di TEMED)
<i>Composizione Stacking gel:</i>	5% Acrilammide-BisAcrilammide, 0,125M Tris-HCl pH 6.8, SDS 0,1% (per la polimerizzazione in 5ml 50µl di APS 10% ed 5µl di TEMED)
<i>Running Buffer:</i>	Tris Glicina 1%, 0,1% SDS
<i>Wet Transfer Buffer:</i>	Tris-Glicina 1X, 20% Metanolo
<i>TBS:</i>	100mM Tris-HCl pH8, 1,5M NaCl
<i>iTBS:</i>	1X TBS; 0,1% Tween 20
<i>PBS:</i>	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 2mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4.
<i>PBT-BSA</i>	100mlPBS, 1gr BSA, 300µl Triton, 1,48gr. NaCl.

Elenco degli oligonucleotidi utilizzati negli esperimenti di Real Time RT-PCR:

a-Tub84B-F:	5'-GTGAAACACTTCCAATAAAAACTCAATATG-3'
a-Tub84B-R:	5'-CCAGCAGGCGTTTCCAAT-3'
d-Myc Ex2 F:	5'-ACACGCGCTGCAACGATA-3'
d-Myc Ex3 R:	5'-CGTATATGAAACGACATCGATTTC-3'
mfl Ex5/6 F-new:	5'-GAACCCAGCAAACGCAAGTT-3'
mfl Ex6 R – new:	5'-CTTGGAAGGAGTCTCCTCGGATA-3'
mfl Ex7 F:	5'-GGAATACTGCTCAGAGGACAAAGC-3'
mfl-Ex8-bis-R:	5'-TTATTCGAAGCACGTTTTTAGTTTTTC-3'
mfl Ex11/12 F:	5'-GCGTTGAGTAAACAAGATGTGCTT-3'
mfl Ex12 R:	5'-CCTAAAAAAGGGCATAAAATGGAA-3'

Bibliografia

- Accardo MC, Giordano E, Riccardo S, Digilio FA, Iazzetti G, Calogero RA, Furia M. (2004) A computational search for box C/D snoRNA genes in the *Drosophila melanogaster* genome. *Bioinformatics* 12;20(18):3293-301.
- Alawi F., Lee M.N. (2007) DKC1 is a direct and conserved transcriptional target of c-MYC. *Biochemical and biophysical research communications* 2007;362(4):893-8.
- Amaldi F, Pierandrei-Amaldi P. (1997). TOP genes: a translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins. *Prog Mol Subcell Biol.*;18:1-17.
- Armanios M., Chen J.L., Chang Y.P. (2005). Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (44): 15960–15964.
- Averof M, Cohen SM (1997) Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature*.385:627-630.
- Bachellerie J.P., Cavaillé J., Hüttenhofer A.(2002). The expanding snoRNA world. *Biochimie*, 84:775-790.
- Baena-Lopez LA., Baonza A., Garcia-Bellido A. (2005) The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Curr.Biol.*, 15:1640-1644.
- Baena-Lopez LA., Garcia-Bellido A. (2006) Control of growth and positional information by the graded vestigial expression in wing of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 103:13734-13739.
- Baonza A., Roch F., and Martìn-Blanco E. (2000) DER signaling restricts the boundaries of the wing field during *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 7331–7335.
- Bate C.M., Martinez-Arias A. (1991). The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Development* 112:755–761.
- Bellosta P, Hulf T, Diop SB, Usseglio F, Pradel J, Aragnol D, and Gallant P. (2005). Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. *PNAS* vol. 102 no. 33 11799-11804.

Biessmann H., Valgeirsdottir K., Lofsky A. et al. (1992). HeT-A, a transposable element specifically involved in “healing” broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 12: 3910–3918.

Blair S.S. (1993) Mechanisms of compartment formation: evidence that non proliferating cells do not play a critical role in defining the D/V lineage restriction in the developing wing of *Drosophila*. *Development* 119: 339-352.

Boldòs V, Grego-Bessa J, and de la Pompa JL (2007). Notch Signaling in Development and Cancer. *Endocrine Reviews* 28(3):339–363.

Boube M., Llimargas M. and Casanova J. (2000). Cross-regulatory interactions among tracheal genes support a co-operative model for the induction of tracheal fates in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev.* 91, 271-278.

Brand A. H., and Perrimon N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–415.

Bryant P. J. (1975). Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*: fate map, regeneration and duplication. *exp. Zool.* 193, 49-78.

Bryant PJ (1978). Pattern formation in imaginal discs. In “The genetics and biology of *Drosophila*”, vol. 2c (ed. M.Ashburner and T.R.F. Wright), pp. 230-336, Academic Press, New York.

Cadwell C., Yoon HJ., Zebajadian Y., Carbon J. (1997),. The yeast nucleolar protein Cbf5p is involved in rRNA biosynthesis and interacts with the RNA polymerase I transcription factor RRN3. *Mol Cell Biol*, 17:6175-6183.

Calleja M., Moreno E., Pelaz S., Morata G., (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* 274, 252–255.

Capdevila J., and Guerrero I. (1994). Targeted expression of the signalling molecule decapentaplegic induces pattern duplications and growth alterations in *Drosophila* wings. *EMBO J.* 13: 4459–4468.

Cho E., Irvine K.D. (2004). Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development*.131:4489-500.

Cohen S.M. (1990). Specification of limb development in the *Drosophila* embryo by positional cues from segmentation genes. *Nature* 343: 173-177.

Cohen S.M. (1993). Imaginal disc development. In *Drosophila Development*, A. Martinez-Arias and M. Bate, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press), pp. 747-841.

Cohen B., Amanda A. Simcox and Stephen M. Cohen (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117, 597-608.

Cohen S.B., Graham M.E., Lovrecz G.O., Bache N., Robinson P.J., Reddel R.R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*, 315:1850-1853.

Colaluca I.N, Tosoni D., Nuciforo P., Senic-Matuglia F., Galimberti V, Viale G., Pece S. & Di Fiore P.P. (2008). NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature Letters* Vol 451.

Couso J.P., Bate M., Martinez-Arias A. (1993). A wingless dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science* 259: 484-489.

Couso JP, Knust E, Martinez Arias A (1995). Serrate and wingless cooperate to induce vestigial gene expression and wing formation in *Drosophila*. *Curr.Biol.* 5: 1437-1448.

Curtiss J., Heilig J.S. (1995). Establishment of *Drosophila* imaginal precursor cells is controlled by the Arrowhead gene. *Development*. Nov;121(11):3819-28.

Day S. J. and Lawrence P. A. (2000). Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* 127, 2977-2987.

de Celis (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. *BioEssays* 25:443–451.

de Celis JF, Garcia-Bellido A, Bray SJ (1996). Activation and function of Notch at the dorsalventral boundary of the wing imaginal disc. *Development* 122: 359-369.

de la Cova C., Abril M., Bellosta P., Gallant P., Johnston L.A. (2004). *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell*. 117: 107-116.

Diaz-Benjumea F. & Cohen S. M. (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila* *Cell* 75, 741–752.

Dietzl G., Chen D., Schnorrer F., Su K.C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oettel S., Scheiblauer S., Couto A., Marra V., Keleman K., Dickson B.J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448(7150):151-6.

DiNardo S., Kuner J.M., Theis J., O'Farrell P.H. (1985). Development of embryonic pattern in *D.melanogaster* as revealed by accumulation of the nuclear engrailed protein. *Cell* 43: 59-69.

Donaldson TD and Duronio RJ (2004) *Cancer Cell Biology: Myc Wins the Competition*. *Current Biology*, Vol. 14, R425–R427.

Duffy J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34, 1–15.

Eisenman R.E., (2006). *The Myc/Max/Mad Transcription Factor Network*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Fristrom D., Gotwals P., Eaton S., Kornberg T.B., Sturtevant M., Bier E., Fristrom J.W. (1994). Blistered: a gene required for vein/intervein formation in wings of *Drosophila*. *Development*. Sep;120(9):2661-71.

Garcia-Bellido A, Ripoll P, Morata G (1973) Developmental compartmentalisation of the wing disk in *Drosophila*. *Nature New Biol.* 245: 251-253.

García-Bellido A. and Merriam J. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 24, 61-87.

Giordano E., Peluso I., Senger S., Furia M. (1999). Minifly, a *Drosophila* gene required for ribosome biogenesis. *J Cell Biol*, 144:1123-1113.

Giordano E., Rendina R., Peluso I., Furia M. (2001). RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 160(2):637-48.

Golic, K. G. (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science* 252: 958–961.

Gomez-Roman, N. et al. (2006). Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III. *Biochem. Soc. Symp.* 73, 141–154.

Goto H., Tomono Y., Ajiro K., Kosako H., Fujita M., Sakurai M. et al. (1999). Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem* 274:25543–9.

Goto S, Hayashi S. (1997). Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development*; 124:125–132.

Grewal S.S., Li L., Orian A., Eisenman R.N., Edgar B.A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nat Cell Biol.* 7(3):295-302.

Gu BW, Bessler M, Mason PJ, (2008). A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates DNA damage response independent of telomere length in mice. *PNAS* 105, 29:10173-10178.

Hamma T., Reichow S.L., Varani G., Ferre-D'Amare A.R. (2005). The Cbf5-Nop10 complex is a molecular bracket that organizes box H/ACA RNPs. *Nat Struct Mol Biol*, 12:1101-7.

Hay B. A., Wolff, T. & Rubin G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 120, 2121–2129.

He J., Navarrete S., Jasinski M., Vulliamy T., Bessler M., Mason P.J. (2002). Targeted disruption of *DKC1*, the gene mutated in X-linked dyskeratosis congenita, causes embryonic lethality in mice. *Oncogene*, 21:7740-4.

Heiss N. S., Knight S. W., Vulliamy T. J., Klauck S. M., Wiemann S., Mason, P.J., Poustka A., and Dokal I. (1998) . X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet.* 19: 32-8.

Huang ZP, Zhou H, He HL, Chen CL, Liang D, Qu LH. (2005) Genome-wide analyses of two families of snoRNA genes from *Drosophila melanogaster*, demonstrating the extensive utilization of introns for coding of snoRNAs. *RNA.* 11(8):1303-16.

Ingham P.W. (1985). A clonal analysis of the requirement for the tritorax gene in the diversification of segments in *Drosophila*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 89: 349-365.

Irvine K., Wieschaus E .(1994). Fringe, a boundary specific signalling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development. *Cell* 79: 595-606.

Johnston LA, Gallant P (2002). Control of growth and organ size in *Drosophila*. *Bioessays* 24: 54-64.

Johnston LA, Prober DA, Edgar BA, Eisenman RN, and Gallant P. (1999). *Drosophila myc* Regulates Cellular Growth during Development. *Cell*, Vol. 98, 779–790.

Kauffman T, Tran J, DiNardo S. (2003). Mutations in Nop60B, the *Drosophila* homolog of human dyskeratosis congenita 1, affect the maintenance of the germ-line stem cell lineage during spermatogenesis. *Dev. Biol.* 253:189-199.

Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. (2000). Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotechnol.* 18, 896–898 .

Kim J., Sebring A., Esch J.J., Kraus M.E., Vorwerk K., Magee J., Carroll S.B. (1996). Integration of positional signals and regulation of wing formation and identity by vestigial gene. *Nature.* 382: 133-138.

Kirwan M., Dokal I. (2008). Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces. *Clin Genet:* 73: 103–112.

Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Kiss T. (1998). Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA. *EMBO J.* Feb 2;17(3):797-807.

Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell Jun* 28;85(7):1077-88.

Kiss T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell.* 19: 145-8.

Kiss T. (2006). SnoRNP biogenesis meets Pre-mRNA splicing. *Mol Cell.* Sep 15;23(6):775-6.

Klein T. (2001). Wing disc development in the fly: the early stages. *Curr.Opin. Genet.Dev.* 11: 470-475.

Klein T., Martinez-Arias A. (1998). Different spatial and temporal interactions between Notch, wingless and vestigial specify proximal and distal pattern elements of the wing in *Drosophila*. *Dev. Biol.*194: 196-212.

Klingenberg C. P., and Zaklan S. D. (2000). Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution* 54: 1273–1285.

Knight S. W., Vulliamy T. J., Morgan B., Devriendt K., Mason P. J., Dokal, I. (2001). Identification of novel DKC1 mutations in patients with dyskeratosis congenita: implications for pathophysiology and diagnosis *Hum. Genet.* 108:299-303.

Koelle M. R., Talbot W. S., Segraves W. A., Bender M. T., Cherbas P. and Hogness D. S. (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67,59 -77.

Koonin E.V. (1996). Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases. *Nucleic Acids Res.* 15;24(12):2411-5.

Kornberg T. (1981a). Engrailed: A gene controlling compartment and segment formation in *Drosophila*. *PNAS* 78: 1095-1099.

Kornberg T. (1981b). Compartments in abdomen of *Drosophila* and the role of engrailed locus. *Dev. Biol.* 85: 363-372.

Kornberg T., Siden I., O'Farrell P., Simon M. (1985). The engrailed locus of *Drosophila*: in situ localisation of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* 40: 45-53.

Lafontaine DL, Bousquet-Antonelli C, Henry Y, Caizergues-Ferrer M, Tollervey D. (1998) The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev.* 1998 Feb 15;12(4):527-37.

Lam G. and Thummel C. S. (2000). Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 10, 957–963.

Lambertsson A., (1998). The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Adv. Genet.* 38: 69–134.

Lawrence P. A. and Morata G. (1977). The early development of mesothoracic compartments in *Drosophila*. An analysis of cell lineage and fate mapping and an assessment of methods. *Dev. Biol.* 56, 40-51.

Lecuit T. and Le Goff L. (2007). Orchestrating size and shape during morphogenesis *Progress Nature* 450, 189-192.

Ledda M., Di Croce M., Bedini B., Wannenes F., Corvaro M., Boyl PP., Caldarola S., Loreni F., Amaldi F. (2005). Effect of 3'UTR length on the translational regulation of 5'-terminal oligopyrimidine mRNAs. *Gene*. 344: 213-20.

Li Y., Wang F., Lee J.A., and Gao F.B. (2006). MicroRNA-9a ensures the precise specification of sensory organ precursors in *Drosophila*. *GENES & DEVELOPMENT* 20:2793–2805.

Maillard I, Pear WS (2003). Notch and cancer: best to avoid the ups and downs. *Cancer Cell* 3:203–205.

Marrone A., Dokal I. (2006). Dyskeratosis congenita: a disorder of telomerase deficiency and its relationship to other diseases. *Expert Rev Dermatol*: 1 (3): 17.

Marrone A., Walne A., Dokal I. (2005). Dyskeratosis congenita: telomerase, telomers and anticipation *Current Opinion in Genetics & Development*, 15:249-257.

Martin F. A., Perez-Garijo A., Moreno E. and Morata G. (2004). The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*. *Development* 131, 4921-4930.

Martín-Castellanos C. and Edgar B. A. (2002). A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development* 129, 1003-1013.

Marygold SJ, Roote J, Reuter G, Lambertsson A, Ashburner M, Millburn GH, Harrison PM, Yu Z, Kenmochi N, Kaufman TC, Leever SJ, and Cook KR (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol*. 8(10): R216.

Milán M., Cohen S.M. (2000). Temporal regulation of apterous activity during development of the *Drosophila* wing. *Development*. 127:3069-3078.

Milán M., Weihe U., Tiong S., Bender W., Cohen S.M. (2001). Msh specifies dorsal cell fate in the *Drosophila* wing. *Development* 128, 3263-3268.

Milán M., Campuzano, S. and García-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the *Drosophila* wing during metamorphosis. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11687-11692.

Mitchell J.R., Wood E., and Collins K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita *Nature*, 402: 551–555.

Mochizuki Y., He J., Kulkarni S., Bessler M., and Mason P.J. (2004). Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* . 101:10756-61.

Morata G., Lawrence P.A. (1977). The development of wingless, a homeotic mutation of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 56: 227-240.

Morata G., Ripoll P. (1975). Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* 42: 211-221.

Moreno E., Basler K. (2004). *dMyc* transforms cell into super-competitors. *Cell.* 117: 117-129.

Moreno E. (2008). Is cell competition relevant to cancer? *Nat.Rev.Cancer.* 8:141-147.

Ng M., Diaz-Benjumea F.J., Vincent J.P., Wu J., Cohen S.M. (1996). Specification of the wing by localized expression of wingless protein. *Nature* 371: 609-612.

Ninov N., Chiarelli D.A. and Martín-Blanco E. (2007). Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 134, 367-379.

Nolo, R., Abbott, L.A., and Bellen, H.J. (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102: 349–362.

Oldham S. and Hafen E. (2003). Insulin/IGF and target of rapamycin signaling: a TOR de force in growth control. *Trends Cell Biol.* 13, 79-85.

Orian A, van Steensel B, Delrow J, Bussemaker HJ, Li L, Sawado T, Williams E, Loo LW, Cowley SM, Yost C, Pierce S, Edgar BA, Parkhurst SM, Eisenman RN. (2003). Genomic binding by the *Drosophila* Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev.* 17, 1101–1114.

Orian A, Grewal SS, Knoepfler PS, Edgar BA, Parkhurst SM, Eisenman RN., (2005). Genomic binding and transcriptional regulation by the *Drosophila* Myc and Mnt transcription factors. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 70, 1–10.

Oskarsson T, Trumpp A. (2005) The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nat Cell Biol.* Mar;7(3):215-7.

Pankratz M.J., Jackle H. (1993). *Blastoderm segmentation*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol 1: p 467–516.

Pierce S.B, Yost C., Anderson S.A., Flynn E.M., Delrow J., Eisenman R.N. (2008). *Drosophila* growth and development in the absence of dMyc and dMnt. *Developmental Biology* 315 303–316.

Radtke F, Raj K (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3:756–767.

Rebay I., Fleming R.J., Fehon R.G., Cherbas L., Cherbas P., Artavanis-Tsakonas S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67: 687-699.

Riccardo S, Tortoriello G., Giordano E., Turano M., Furia M. (2007). The coding/non-coding overlapping architecture of the gene encoding *Drosophila* pseudouridine syntase *BMC Mol. Biol.* 2007, 8:15

Roignant J. Y. et al. (2003). Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA* 9, 299–308.

Ronshaugen M., Biemar F., Piel J., Levine M., Lai E.C. (2005). The *Drosophila* microRNA *iab-4* causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. *Genes Dev.* 15;19(24):2947-52.

Roseland C. R. and Schneiderman H. A. (1979). Regulation and metamorphosis of the abdominal histoblasts of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.* 186,235 -265.

Ruggero D., Grisendi S., Piazza F., Rego E., Mari F., Rao PH., Cordon-Cardo C., and Pandolfi P.P. (2003). Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science.* 299: 259-62.

Santolini E, Puri C, Salcini AE, Gagliani MC, Pelicci PG, Tacchetti C, Di Fiore PP. (2000) Numb is an endocytic protein. *J. Cell Biol.* 151, 1345–1352.

Savraj S. Grewal, Ling Li, Amir Orian, Robert N. Eisenman & Bruce A. Edgar. (2005) Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nature Cell Biology* 7, 295-302.

Schreiber-Agus N., Stein D., Chen K., Goltz J.S., Stevens L., DePinho R.A. (1997). *Drosophila* Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(4): 1235-1240.

Simmonds A. J., Brook W. J., Cohen S. M., and Bell J. B. (1995). Distinguishable functions for engrailed and invected in the Anterior–Posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* 376: 424–426.

Sparrow J. C. (1978). Melanotic “tumours.” In: *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 2b, ed. M. Ashburner and T.R.F. Wright, New York: Academic Press, 277–313.

Spencer F., Hoffman F. and Gelbart W. (1982). Decapentaplegic: a gene complex affecting morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 28, 451-561.

Staehling-Hampton K., Jackson P. D., Clark M. J., Brand A. H., and Hoffmann F. M. (1994). Specificity of bone morphogenetic protein-related factors: cell fate and gene expression changes in *Drosophila* embryos induced by decapentaplegic but not 60A. *Cell Growth Differ.* 5: 585–593.

Tabata T., Kornberg T.B. (1994). Hedgehog is a signalling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal disk. *Cell* 76: 89-102.

Tanimoto H., Itoh S., ten Dijke P., Tabata T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Molec. Cell* 5(1): 59-71.

Teleman A. and Cohen S. (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* 103, 971-980.

Trotta V., Garoia F., Guerra D., Pezzoli M.C., Grifoni D., and Cavicchi S., (2005). Developmental instability of the *Drosophila* wing as an index of genomic perturbation and altered cell proliferation. *Evolution & Development* 7:3, 234–243.

Tycowski K.T., Shu MD, Steitz JA. (1996). A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. *Nature* 379(6564):464-6.

Tycowski K.T., You Z.H., Graham P.J., Steitz J.A. (1998). Modification of U6 spliceosomal RNA is guided by other small RNAs. *Mol Cell*.2(5):629-38.

Van Roessel P., Hayward N. M., Barros C. S. & Brand A. H. (2002). Two-color GFP imaging demonstrates cell-autonomy of GAL4-driven RNA interference in *Drosophila*. *Genesis* 34, 170–173.

Venteicher A.S., Meng Z., Mason P.J., Veenstra T.D. and Artandi S.E. (2008). Identification of ATPases Pontin and Reptin as Telomerase Components Essential for Holoenzyme Assembly. *Cell* Volume 132, Issue 6, Pages 945-957.

Villasante A, de Pablos B, Méndez-Lago M, Abad JP. (2008) Telomere maintenance in *Drosophila*: rapid transposon evolution at chromosome ends. *Cell Cycle*, 7(14):2134-8.

Vulliamy T., Marrone A., Goldman F. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*: 413 (6854): 432–435.

Vulliamy T.J., Walne A., Baskaradas A. (2005). Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure. *Blood Cells Mol Dis*: 34 (3): 257–263.

Walne A., Vulliamy T., Marrone A. (2007). Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase associated protein NOP10. *Hum Mol Genet*: 16 (13):1619–1629.

Wang S.H., Simcox A., Campbell G. (2000). Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev*. 14:2271-2276.

Weigmann K., Cohen S.M., Lehner C.F. (1997). Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase. *Development* 124: 3555-3563.

Williams J.A., Paddock S.W., Carroll S.B. (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* 117:571–584.

Wilson A, Radtke F (2006). Multiple functions of Notch signaling in self-renewing organs and cancer. *FEBS Lett* 580:2860–2868.

Wolpert L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J.Theor. Biol.* 25: 1-47.

Wolpert L. (1971). Positional information and pattern formation. *Curr.Top.Dev.Biol.* 6: 183.

Wu J., Cohen S.M. (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* 129(10): 2411-2418.

Wu MYW, Cully M, Andersen D, Leivers SJ (2007). Insulin delays the progression of *Drosophila* cells through G2/M by activating the dTOR/dRaptor complex. *EMBO Journal* 26, 371-379.

Xu T., and Rubin G. M., (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117: 1223–1237.

Yaghai R., Kimyai-Asadi A., Rostamiani K. (2000). Overlap of dyskeratosis congenita with the Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *J Pediatr*: 136 (3): 390–393.

Yao T. P., Segraves W. A., Oro A. E., McKeown M. and Evans R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71, 63-72.

Yoo S. J., Huh J. R., Muro I., Yu H., Wang L., Wang S. L., Feldman R. M., Clem, R. J., Muller H. A. & Hay B. A. (2002) . Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol.* 4(6):416-24.

Yoon A., Peng G., Brandenburger Y. et al. (2006). Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science*: 312 (5775): 902–906.

Zecca M., Struhl G. (2002a). Control of growth and patterning of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129: 1369-1376.

Zecca M., Struhl G. (2002b). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129: 1357-1368.

Zecca M., Basler K., and Struhl G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* 121, 2265-2278.

