

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**



**DIPARTIMENTO DI AGRARIA**

**DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA  
“INSECT SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY”**

**XXVI CICLO**

**TESI DI DOTTORATO**

**Analisi funzionale di un nuovo gene di  
*Drosophila melanogaster* coinvolto nella  
risposta immunitaria di incapsulamento**

**Coordinatore**

*Chiar.mo Prof.*

Francesco PENNACCHIO

**Tutor**

*Chiar.ma Dott.ssa*

Silvia GIGLIOTTI

**Candidata**

Valentina LASCO

**Anno accademico 2013-2014**

# INDICE

<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>Riassunto</b>	<b>4</b>
<b>1. Introduzione</b>	<b>7</b>
1.1 La risposta immunitaria di <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.2 Risposta umorale: produzione di peptidi antimicrobici	9
1.2.1 Riconoscimento dei patogeni	13
1.2.2 La via di segnalazione <i>Toll</i>	17
1.2.3 La via di segnalazione di <i>Imd</i>	21
1.2.4 La melanizzazione	25
1.2.5 La coagulazione	32
1.3 La risposta cellulare	37
1.3.1 L'ematopoiesi	39
1.3.2 La fagocitosi	45
1.3.3 L'incapsulamento	51
1.3.3.1 I parassitoidi	62
1.3.3.2 I tumori melanotici	68
1.4 La risposta immunitaria epiteliale	69
1.5 La proteina 102 di <i>Heliothis virescens</i>	78
<b>2. Materiali e Metodi</b>	<b>80</b>
2.1 Terreno di coltura per l'allevamento di <i>Drosophila melanogaster</i>	80
2.2 Mantenimento dei ceppi di <i>Drosophila melanogaster</i>	80
2.3 Mantenimento del ceppo di <i>Leptopilina boulardi</i> G486 (virulento G486)	81
2.4 Ceppi di <i>Drosophila melanogaster</i> utilizzati	81
2.5 Generazione di delezioni mediante la tecnica del <i>jump out</i>	87
2.6 Estrazione di DNA genomico da adulti di <i>Drosophila melanogaster</i>	85
2.7 Estrazione di RNA totale da emociti larvali	86
2.8 Trattamento delle preparazioni di RNA con DNasi I	87

2.9	Reazione di retrotrascrizione	87
2.10	Reazione di PCR (polymerase chain reaction)	88
2.11	Preparazione Gel di Agarosio	92
2.12	Estrazione da gel di agarosio e purificazione di prodotti di PCR	93
2.13	Clonaggi	94
2.14	Minipreparazione di DNA plasmidico	96
2.15	<i>Medium preparation</i> di DNA plasmidico	99
2.16	Preparazione di DNA stampo per la sintesi di sonde ad RNA specifiche per i geni <i>CG2145</i> e <i>CG3303</i>	100
2.17	Sintesi di sonde ad RNA marcate con digossigenina specifiche per i geni <i>CG2145</i> e <i>CG3303</i>	102
2.18	Raccolta e fissazione di embrioni di <i>Drosophila melanogaster</i>	105
2.19	Ibridazione <i>in situ</i> su embrioni di <i>Drosophila melanogaster</i>	106
2.20	Ibridazione <i>in situ</i> su emociti larvali circolanti	110
2.21	Generazione della proteina di fusione CG2145 Thioredoxin tag- His tag-S-tag	112
2.22	Preparazione di estratti proteici larvali	116
2.23	Determinazione della concentrazione proteica mediante il Metodo Bradford (micro-saggio)	116
2.24	Western Blot	117
2.25	Immunofluorescenza su emociti circolanti di <i>Drosophila melanogaster</i>	120
2.26	Analisi della vitalità	121
2.27	Saggi di incapsulamento	122
2.28	Saggi di infezione batterica	122
2.29	Saggio di attività fenolossidasi nell'emolinfa	123
<b>3.</b>	<b>Risultati</b>	<b>124</b>
3.1	Identificazione di potenziali ortologi del gene <i>102</i> di <i>Heliothis virescens</i> in <i>Drosophila melanogaster</i>	124
3.2	Determinazione del profilo di espressione del gene <i>CG2145</i> negli embrioni di <i>Drosophila melanogaster</i>	127
3.3	Localizzazione intracellulare della proteina CG2145	131

3.4 Isolamento di mutazioni per delezione di sequenze del gene <i>CG2145</i>	133
3.5 Il mutante <i>CG2145-9B</i> è un mutante nullo	139
3.6 Caratterizzazione fenotipica del mutante <i>CG2145-9B</i>	140
3.6.1 La sopravvivenza embrionale non è alterata in assenza della proteina <i>CG2145</i>	140
3.6.2 Il mutante <i>Def(1)BSC572/CG2145-9B</i> resiste alle infezioni microbiche	142
3.6.3 Il mutante <i>Def(1)BSC572/CG2145-9B</i> non mostra alterazioni dell'attività fenolossidasi	144
3.6.4 Il mutante <i>Def(1)BSC572/CG2145-9B</i> ha ridotta capacità di incapsulare le uova dei parassitoidi	146
3.7 Il gene <i>CG3303</i> è espresso negli emociti larvali	149
3.8 Determinazione del profilo di espressione del gene <i>CG3303</i> negli embrioni di <i>Drosophila melanogaster</i>	150
3.9 Isolamento di mutazioni per delezione di sequenze del gene <i>CG3303</i>	151
<b>4. Discussione</b>	<b>157</b>
<b>5. Bibliografia</b>	<b>162</b>
<b>Appendice</b>	<b>189</b>

## Abstract

The overall aim of my PhD thesis project was the functional characterization of a *Drosophila melanogaster* gene showing sequence homology with an immune gene of a Noctuid Lepidoptera species, *Heliothis virescens*.

The insect immune system relies on molecular mechanisms conserved throughout evolution and is divided into humoral and cellular responses. Antimicrobial peptides (AMPs), produced by fat body and released into the hemolymph, are the major humoral immune effectors; the humoral immune response also entails melanization and coagulation reactions triggered by tissue wounds. The cellular immune response is mediated by blood cells, named hemocytes, freely circulating into the hemocoel. In *Drosophila melanogaster*, blood cells are classified into *plasmatocytes* that are involved in phagocytosis and killing of invading microbes; *crystal cells* containing cytoplasmic inclusions where precursors of the phenoloxidase enzyme, involved in melanization reactions, are localized; and *lamellocytes* that appear in the circulation only when large foreign intruders, such as parasitoid eggs, enter the haemocoel and are involved in the formation of immune capsules.

Recently, the laboratories where I carried out my experimental work demonstrated that, in *Heliothis virescens*, a gene named *102* codes for a protein involved in the formation of amyloids fibrils. After immune challenge, these fibrils, localized in the cisternae of the rough endoplasmic reticulum, are released to coat foreign intruders forming an immune capsule. The coating layer formed by fibrils is the site where dangerous reactions like melanization occur.

To further extend our studies on the *102* gene and shed light on the molecular mechanisms underlying its function(s), we decided to look for potential orthologues in *Drosophila melanogaster*. Actually, this insect model system offers a wide variety of genetic and molecular tools, which are not available in *Heliothis virescens*.

BLAST analyses identified in the *Drosophila melanogaster* genome two genes displaying sequence homology with the *102 Heliothis virescens* gene: the *CG2145* and the *CG3303* genes. In the first part of my PhD thesis work I focused on the

characterization of the first gene, which is more related than the latter to the *Heliothis virescens 102* gene and also shares with it a high expression level in hemocytes. First of all, I characterized the spatio-temporal expression pattern of this gene during development and showed a complex, dynamic picture. Since the first embryonic stages, the gene is expressed in all embryonic anlagen where major morphogenetic movements take place and its transcripts are detected in migrating cells, such as ventral cells that invaginate to give rise to the mesoderm layer during gastrulation. However, at the end of embryogenesis the expression profile of the *CG2145* gene becomes more restricted and its transcripts are virtually present only in the immune tissues: haemocytes and fat body. Interestingly, these immune tissues actively transcribe the *CG2145* gene also in larval stages. By using a polyclonal antibody directed against a *GC2145* fusion protein I generated, I defined the intracellular distribution pattern of the *CG2145* protein. This protein shows polarized localization in the cytoplasm of the hemocytes and accumulates in peculiar vesicles that detach from the cell surface, to be likely secreted and released into the extracellular environment.

To start the functional analysis of the *CG2145* gene I generated, by mobilization of a P element, a set of deletions spanning the genomic region where the gene is located. Out of 14 different mutants I obtained, 9 display a molecular lesion confined to the *CG2145* gene. I focused on the largest one, named *CG2145-9B*, which lacks the entire coding sequence and is a null allele, as confirmed by Western Blot analyses. Homozygous individuals are viable, fertile and do not show any evident morphological defects. Then I set up specific functional assays to test their ability to react to immune challenge. Antimicrobial response and hemolymph melanization are not compromised in the *CG2145* null mutant. However, I found that the encapsulation response is impaired.

In the last part of my PhD thesis work I started the characterization of the *CG3303* gene, which is also expressed, at low levels, in larval *Drosophila* hemocytes. This gene might share with the *CG2145* gene part of its functions. Indeed, while silencing of the *102* gene in Lepidoptera blocks the encapsulation response, this immune reaction is not fully inhibited in the *CG2145-9B* mutant.

The *CG3303* gene shows a spatio-temporal expression pattern during development different from the *CG2145* gene. Its transcripts appear only in late

embryogenesis and only in two organs, the tracheal tree and the salivary glands. I set up a strategy to obtain *CG3303* mutant alleles, similar to that I used before for generating *CG2145* mutants. This strategy allowed me to isolate two deletion mutants, which are viable and fertile and apparently lack morphological defects. Phenotypic analyses to test the immune performance of these mutants are currently in progress.

In conclusion, the obtained data demonstrate that the *Drosophila melanogaster* *CG2145* gene, just like its *Heliothis virescens* counterpart, codes for a protein that is secreted by the hemocytes and is involved in the encapsulation response. This insect immune reaction comprises several steps, including recognition of foreign intruders, activation and differentiation of immune cells as well as cell-cell interactions, all of which are poorly understood. In addition, capsule formation is often associated with the localized synthesis of melanin. The *CG2145* mutant I generated is a very useful tool to investigate the conserved molecular mechanisms underlying these complex processes in Lepidoptera and Diptera and, possibly, in all insects.

## Riassunto

L'obiettivo del mio progetto di tesi di dottorato è stato la caratterizzazione funzionale di un gene di *Drosophila melanogaster* che presenta omologia di sequenza con un gene immunitario del Lepidottero Nottuide *Heliothis virescens*.

Il sistema immunitario degli insetti si avvale di due tipi di difesa, umorale e cellulare, basati su meccanismi molecolari conservati attraverso l'evoluzione. I peptidi antimicrobici, prodotti dai corpi grassi e rilasciati nell'emolinfia, rappresentano i maggiori effettori della risposta immunitaria umorale; quest'ultima prevede anche processi di melanizzazione e di coagulazione, innescati dalla formazione di ferite. La risposta immunitaria cellulare si basa sulle funzioni degli emociti, cellule immunitarie liberamente circolanti nell'emocele. In *Drosophila melanogaster* gli emociti si dividono in plasmaticociti, cellule deputate alla fagocitosi dei microbi; "crystal cells", contenenti inclusioni citoplasmatiche all'interno delle quali sono presenti i precursori della fenolossidasi, enzima chiave dei processi melanizzazione; e i lamellociti, che appaiono in circolo solo in presenza di corpi estranei di dimensioni consistenti come le uova dei parassitoidi, e sono coinvolti nella formazione delle capsule immunitarie che servono ad intrappolarli.

Recentemente i laboratori presso cui ho svolto la mia attività sperimentale hanno dimostrato che un gene di *Heliothis virescens*, chiamato *102*, codifica per una proteina coinvolta nella formazione di fibrille amiloidi. In seguito all'ingresso di corpi estranei all'interno dell'emocele dell'insetto, queste fibrille, localizzate all'interno di cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso, vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare e prendono parte ai processi di formazione della capsula emocitaria e produzione localizzata di melanina.

Per estendere i nostri studi sul gene *102* e chiarire i meccanismi molecolari attraverso i quali esso esplica le proprie funzioni, abbiamo deciso di ricercare potenziali ortologhi in *Drosophila melanogaster*. A differenza di *Heliothis virescens*, questo organismo modello offre infatti un'ampia gamma di strumenti di indagine genetica e molecolare.



Attraverso analisi BLAST abbiamo identificato nel genoma di *Drosophila melanogaster* due geni che presentano omologia di sequenza con il gene *102* di *Heliothis virescens*, il gene *CG2145* ed il gene *CG3303*. Nella prima parte del mio lavoro di tesi mi sono dedicata alla caratterizzazione del primo di questi geni che oltre a mostrare una maggiore omologia di sequenza con il gene del Lepidottero è come questo abbondantemente espresso negli emociti. Innanzitutto ho caratterizzato il profilo di espressione spazio-temporale di questo gene durante lo sviluppo di *Drosophila melanogaster*, evidenziando un quadro piuttosto complesso e dinamico. Sin dalle prime fasi dell'embriogenesi il gene si esprime infatti in tutti quei distretti embrionali in cui hanno luogo importanti movimenti morfogenetici, nelle cellule che vanno incontro a migrazione cellulare, come ad esempio nelle cellule del solco ventrale che si invagina per dare origine al mesoderma durante la gastrulazione. Negli stadi finali dell'embriogenesi, però, l'espressione del gene si fa molto più localizzata e i suoi trascritti sono presenti quasi esclusivamente nei tessuti immunitari, gli emociti e i corpi grassi. Molto interessante è il fatto che l'espressione del gene in tali tessuti immunitari continua anche, durante gli stadi di sviluppo larvale. Grazie ad un anticorpo policlonale, diretto contro una proteina di fusione da me generata, ho dimostrato che la proteina *CG2145* ha una distribuzione polarizzata nel citoplasma degli emociti e va ad accumularsi in strutture vescicolari che si distaccano dalla superficie di queste cellule, per essere probabilmente secreta nell'ambiente extracellulare.

Allo scopo di intraprendere l'analisi funzionale del gene *CG2145* ho generato una serie di delezioni della regione genomica in cui esso mappa, attraverso mobilizzazione di un elemento trasponibile P. Delle 14 delezioni ottenute, 9 interessano sequenze situate esclusivamente all'interno del gene *CG2145* e la più estesa copre l'intera regione codificante. L'allele mutante portatore di tale delezione (*CG2145-9B*) è dunque un allele nullo, come ho confermato attraverso analisi di Western Blot. Individui omozigoti per questa mutazione sono vitali e fertili e non manifestano difetti morfologici evidenti. Questi individui sono stati sottoposti ad una serie di saggi funzionali specificamente volti a valutare tutti gli aspetti della risposta immunitaria. Essi rispondono in maniera efficiente alle infezioni microbiche con batteri Gram positivi e Gram negativi e sono in grado di attivare una corretta reazione di melanizzazione, ma presentano una ridotta abilità di incapsulare le uova del ceppo avirulento G486 del parassitoide *L. boulardi*.

Nella parte terminale del mio lavoro di tesi ho iniziato la caratterizzazione del gene *CG3303*, espresso anch'esso, a bassi livelli, negli emociti larvali di *Drosophila*. Tale gene potrebbe condividere con il gene *CG2145* parte delle sue funzioni. Infatti, mentre nei Lepidotteri il silenziamento del gene *102* blocca la risposta d'incapsulamento, questa reazione immunitaria non è inibita del tutto nel mutante *CG2145-9B*.

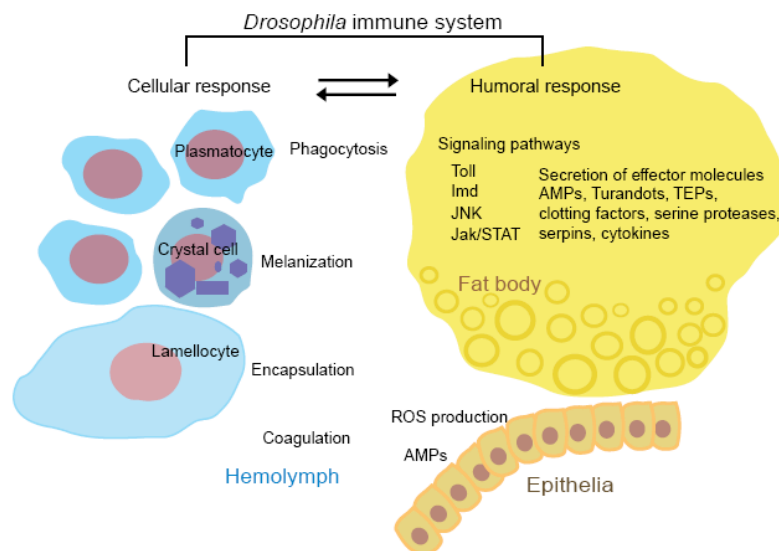
Il gene *CG3303* presenta nel corso dello sviluppo un profilo di espressione diverso da quello del gene *CG2145*. I suoi trascritti compaiono solo negli stadi tardivi dell'embriogenesi e solo in due organi, trachee e ghiandole salivari. Attraverso la mobilizzazione di un elemento trasponibile P ho ottenuto due ceppi mutanti che sono vitali, fertili e apparentemente privi di difetti morfologici. Sono attualmente in corso analisi fenotipiche per saggiare la risposta immunitaria di tali mutanti.

In conclusione, i dati da me ottenuti dimostrano che, come il gene *102* di *Heliothis virescens*, anche il gene *CG2145* di *Drosophila melanogaster* codifica per una proteina secreta dagli emociti, coinvolta nella risposta d'incapsulamento. In questa reazione immunitaria degli insetti entrano in gioco processi di riconoscimento, attivazione, differenziamento, interazione cellulare di cui si conosce veramente poco. Alla formazione della capsula immunitaria è inoltre generalmente associata la sintesi di melanina, deposta in maniera localizzata all'interno di questa struttura. Il mutante del gene *CG2145* da me generato rappresenta una preziosa chiave di accesso ai meccanismi molecolari quasi del tutto inesplorati che sono alla base di questi complessi ed articolati fenomeni in Lepidotteri e Ditteri e, più in generale, in tutti gli insetti.

# 1 Introduzione

## 1.1 La risposta immunitaria di *Drosophila melanogaster*

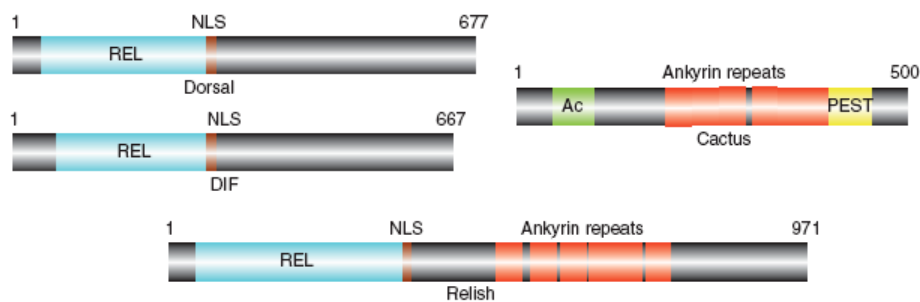
Per combattere le infezioni, il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster* si affida a molteplici reazioni di difesa immunitaria innata, molte delle quali sono condivise con organismi di più alto livello evolutivo come l'uomo (Hoffmann J.A. 2003.). La risposta immunitaria innata in *Drosophila melanogaster* si può dividere in risposta umorale, cellulare ed epiteliale (Fig. 1).



**Fig. 1.** Meccanismi di difesa in *Drosophila melanogaster*.

La risposta umorale include la produzione sistemica di peptidi antimicrobici (AMPs) (Lemaitre 1995a) e componenti molecolari dei processi di melanizzazione e coagulazione dell'emolinfa (Nappi e Vass 1993), nonché la sintesi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (Nappi et al. 2000). La risposta cellulare è mediata dagli emociti, deputati alla fagocitosi e all'incapsulamento di microrganismi e corpi estranei, inclusi i parassiti multicellulari (Meister 2004). Infine, le barriere epiteliali come la cuticola, le trachee e il canale alimentare, che sono costantemente a contatto con l'ambiente esterno e dunque con i microrganismi responsabili delle infezioni naturali, danno un contributo alla protezione di *Drosophila* mediante la produzione locale di

peptidi antimicrobici e specie reattive dell'ossigeno (Tzou et al. 2000). Nel loro insieme, le risposte immunitarie su elencate vengono orchestrate attraverso meccanismi di segnalazione intracellulare che, innescati dal riconoscimento dei patogeni portano all'attivazione di fattori di trascrizione responsabili dell'induzione dei geni di difesa. Un ruolo estremamente importante è in particolare svolto dai fattori trascrizionali NF- $\kappa$ B/Rel, appartenenti ad una famiglia genica conservata in tutti i metazoi. Elemento distintivo di questa famiglia genica è un dominio di dimerizzazione e legame al DNA chiamato Rel homology domain (RHD) (Hetru Hoffmann 2011). Il genoma di *Drosophila* codifica per 3 membri della famiglia NF- $\kappa$ B/Rel: Dorsal, DIF (*dorsal related immunity factor*), Relish (Fig. 2).



**Fig. 2.** Proteine NF- $\kappa$ B/Rel e I $\kappa$ B di *Drosophila melanogaster*. La dimensione di ciascuna proteina lunghezza è indicata in numero di amminoacidi, REL indica il Rel homology domain, NLS indica la sequenza di localizzazione nucleare, PEST indica il segmento ricco di prolina, acido glutammico, serina e treonina, Ac sta per dominio acidico. Immagine estratta da Hetru Hoffmann 2009 *NF- $\kappa$ B in the Immune Response of Drosophila*.

Dorsal e DIF sono proteine di 70 kDa, caratterizzate dalla presenza di un tipico Rel homology domain nella porzione N-terminale, che ha il 45% di identità con quello presente nelle proteine c-Rel, Rel A e Rel B dei mammiferi. I geni *dorsal* e *DIF* si trovano a 10 Kb di distanza sul secondo cromosoma e probabilmente hanno avuto origine da un recente evento di duplicazione genica (Meng et al. 1999). Le proteine codificate da questi geni interagiscono con una stessa proteina inibitrice di 54 kDa, la proteina Cactus, omologa delle proteine I $\kappa$ B dei mammiferi, anch'esse responsabili del controllo negativo di fattori trascrizionali

NF- $\kappa$ B (Geisler et al. 1992). In particolare, il gene *Cactus* risulta maggiormente correlato al gene I $\kappa$ B $\alpha$  dei mammiferi (Huguet et al. 1997). Per esercitare la loro funzione di controllo della trascrizione di geni bersaglio, Dorsal e DIF devono essere traslocati dal citoplasma nel nucleo e ciò avviene solo in seguito alla degradazione dell'inibitore *Cactus*, indotta da stimolo immunitario.

Il terzo membro della famiglia NF- $\kappa$ B/Rel in *Drosophila* è Relish, una proteina di 100 kDa dotata di un dominio Rel nella porzione N-terminale ed una estensione al C-terminale composta da ripetizioni di anchirina, presenti anche nell'inibitore *Cactus* e nelle proteine I $\kappa$ B dei mammiferi. Relish mostra similarità con le proteine p100 e p105 dei mammiferi e, come queste ultime, viene attivata mediante taglio proteolitico, cui fa seguito la traslocazione nucleare del dominio Rel presente all'N- terminale (Hultmark 2003).

La degradazione della proteina inibitrice *Cactus*, con concomitante rilascio di Dorsal e DIF, avviene durante le infezioni provocate da batteri Gram positivi e le infezioni fungine ed è mediata dalla via di segnalazione Toll. Al contrario, il taglio proteolitico di Relish, con concomitante traslocazione nel nucleo del suo dominio Rel N-terminale, è il segno distintivo di infezioni provocate da batteri Gram negativi, responsabili dell'attivazione della via di segnalazione Imd (Hetru Hoffmann 2011). Rimane ancora aperta la questione se queste due vie di segnalazione intracellulare, Toll e Imd, possano essere coinvolte anche nella difesa contro i virus (Zambon et al. 2005).

## **1.2 Risposta umorale: produzione di peptidi antimicrobici**

L'iniezione di batteri nella cavità emocelica induce la comparsa di attività antimicrobica nell'emolinfa di *Drosophila*. Questa attività è riconducibile a piccole molecole di natura peptidica che possono raggiungere valori di concentrazione molto elevati, fino a 300  $\mu$ M, e persistere per diversi giorni conferendo protezione anche contro un secondo stimolo immunitario (Meister et al. 2000). I peptidi antimicrobici sono prodotti e secreti dai cosiddetti corpi grassi, l'equivalente funzionale del fegato nei mammiferi. Tali organi si originano dal

mesoderma durante l'embriogenesi e acquisiscono la loro abilità immunitaria al momento della comparsa del primo stadio larvale.

I peptidi antimicrobici sono molecole effettrici della risposta immunitaria presenti in tutti gli organismi e conservate da un punto di vista evolutivo (Yeaman 2003). Negli insetti sono stati identificati più di 170 peptidi antimicrobici che condividono varie caratteristiche come il basso peso molecolare, al di sotto di 5 kDa, la carica netta positiva che varia da +2 a +9 a pH fisiologico, la struttura costituita da alfa eliche amfipatiche o foglietti  $\beta$  "hairpin-like" o da un misto dei due. Sulla base di sequenze e caratteristiche strutturali, i peptidi antimicrobici possono essere raggruppati in tre ampie classi:

- Peptidi lineari che formano alfa eliche e sono privi di residui di cisteina.
- Peptidi ciclici contenenti residui di cisteina.
- Peptidi ricchi di residui di prolina e/o glicina.

In funzione del bersaglio microbico, i peptidi antimicrobici si possono poi dividere in tre gruppi: AMPs antifungini (drosomicina e metchnikowin), AMPs anti-batteri Gram-negativi (attacina, cecropina, diptericina, drosocina) e AMPs anti-batteri Gram-positivi (defensina) (Martinelli et al. 2005) (Fig.3).

Le defensine sono membri di una famiglia di peptidi antimicrobici ampiamente distribuiti, caratterizzati da 6 cisteine e 3 ponti disolfuro. Tutte le defensine degli insetti presentano lo stesso accoppiamento di cisteine: Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 e Cys3-Cys6. Sono costituite da 36-46 amminoacidi e sono state rinvenute nei Ditteri, negli Imenotteri, nei Coleotteri, nei Tricotteri, negli Emitteri e negli Odonati. Sono attive contro un ampio spettro di batteri Gram positivi sui quali hanno un potente effetto litico.

Alla classe dei peptidi antimicrobici ricchi in cisteine appartiene anche la drosomicina, che è stato il primo peptide antifungino ad essere isolato. La sua presenza è stata riportata solo in *Drosophila melanogaster*. Si compone di 44 residui amminoacidici di cui 8 sono cisteine coinvolte nella formazione di 4 ponti disolfuro: Cys1-Cys8, Cys2-Cys5; Cys3-Cys6, Cys4-Cys7. La presenza di un quarto ponte disolfuro, rispetto ai tre presenti nelle defensine, rende la drosomicina una molecola dalla struttura altamente compatta. La sua azione

antifungina si compie mediante inibizione della germinazione delle spore ad alte concentrazioni, e ritardo della crescita delle ife a concentrazioni più basse. L'importanza della Drosomicina nell'immunità innata di *Drosophila* è comprovata dalla dimostrazione che individui mutanti incapaci di attivare l'espressione di questo gene presentano in seguito ad infezione di un fungo patogeno un grado di sopravvivenza inferiore rispetto ad individui selvatici (Lemaitre et al. 1996).

La Drosocina e la metchnikowin, entrambe identificate in *Drosophila*, appartengono alla classe dei peptidi antimicrobici ricchi di prolina, che sono stati isolati da Imenotteri, Emitteri e Ditteri. Le dimensioni di questi peptidi antimicrobici variano da 15 a 39 residui amminoacidici. I residui di prolina (più del 25% della composizione di amminoacidi) sono spesso associati a doppiette e triplette con residui basici (arginina e lisina). Questa classe di peptidi antimicrobici è suddivisa in due gruppi:

- Peptidi che vanno incontro a O-glicosilazione
- Peptidi che non subiscono modificazioni

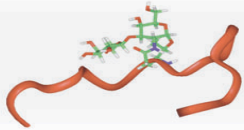

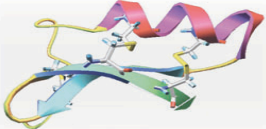
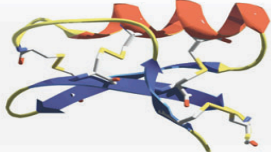
Il prototipo di peptide antimicrobico appartenente al primo gruppo è rappresentato dalla drosocina, costituita da 19 residui amminoacidici fra cui 6 proline e 4 arginine incorporate in tre triplette ripetute Pro-Arg-Pro. Questo peptide porta una modificazione post-traduzionale su di un residuo di treonina in posizione 11 che è *O-glicosilato* da un disaccaride composto da N-acetilgalattocosammina e galattosio.

A differenza della drosocina, la metchnikowin non subisce modificazioni post-traduzionali. Essa è costituita da 26 aminoacidi tra cui 7 proline e contiene anch'essa la tripletta Pro-Arg-Pro, caratteristica comune nella classe dei peptidi antimicrobici ricchi di prolina.

Peptidi antimicrobici ricchi di glicina, fra cui l'attacina e la diptericina, sono stati isolati da Ditteri, Lepidotteri, Imenotteri, Coleotteri ed Emitteri. Le loro dimensioni variano da 8 kDa a 30 kDa e possono essere *O-glicosilati*. Sono peptidi attivi contro batteri Gram negativi ed inattivi contro batteri Gram positivi e lieviti.

Sebbene presentino diversa composizione amminoacidica e diverse strutture, i peptidi antimicrobici sono molecole tipicamente cationiche e anfipatiche, caratteristiche che permettono loro di interagire con la superficie microbica anionica e di inserirsi nel doppio strato fosfolipidico della membrana citoplasmatica. Tale azione può portare alla distruzione dell'integrità della membrana, stessa, compromettendone le funzioni. Queste includono controllo della permeabilità cellulare e mantenimento dei gradienti di ioni e metaboliti, respirazione, sintesi e cross-linking di peptidoglicani, chitina ed altri polimeri, motilità, processamento e presentazione di determinanti di virulenza. Plausibilmente, una disfunzione della membrana causata dalla presenza di peptidi antimicrobici può interferire con una o più di queste funzioni, causando morte cellulare diretta o indiretta. Numerose evidenze sperimentali supportano però anche l'esistenza di meccanismi di azione dei peptidi antimicrobici aggiuntivi o complementari a quelli legati alla permeabilizzazione delle membrane. E' stato infatti messo in evidenza che i peptidi antimicrobici possono perturbare le funzioni intracellulari dei patogeni microbici (Lehrer et al. 1989; Park et al. 1998; Sharma et al. 1999). Kragol et al. 2001 hanno ad esempio mostrato che la drosocina inibisce la sintesi della proteina "heat shock" DnaK, e tale inibizione è associata a morte cellulare. Alcuni peptidi antimicrobici inibiscono poi la sintesi di DNA andando a colpire la DNA girasi. I peptidi antimicrobici, inoltre, possono provocare apoptosi di patogeni fungini prendendo come bersaglio gli organelli intracellulari in particolare i mitocondri.



Peptides	# of genes	Main activity	Concentration	3-D structure
Diptericin	2	Gram-negative bacteria	0.5 $\mu$ M	nd
Attacin	4	Gram-negative bacteria	nd	nd
Drosocin	1	Gram-negative bacteria	40 $\mu$ M	
Cecropin	4	Gram-negative bacteria	20 $\mu$ M	
Defensin	1	Gram-positive bacteria	1 $\mu$ M	
Drosomycin	7	Fungi	100 $\mu$ M	
Metchnikowin	1	Fungi	10 $\mu$ M	nd

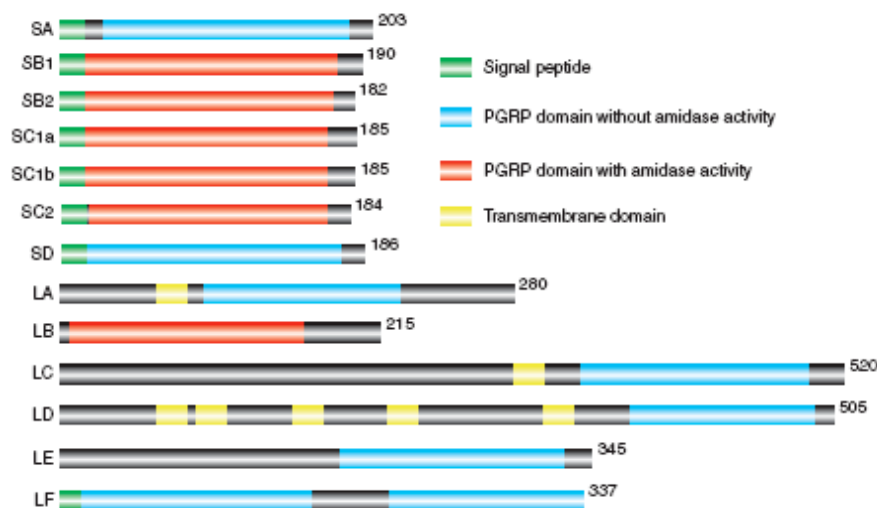
**Fig 3.** Peptidi antimicrobici in *Drosophila*. Nome, numero di geni nel genoma, attività antimicrobica, concentrazione stimata nell'emolinfa dopo l'iniezione batterica, e la struttura 3D ( nd non determinato). Immagine estratta da Lemaitre Hoffmann 2007 *The Host Defense of Drosophila melanogaster*.

### 1.2.1 Riconoscimento dei patogeni

La risposta antimicrobica umorale di *Drosophila* non è aspecifica, ma discrimina tra varie classi di microrganismi, e attraverso l'attivazione di distinte vie di segnalazione programma una risposta adatta all'infezione. Nel riconoscimento dei microrganismi, un ruolo chiave è esercitato dai Pattern Recognition Receptors (PRRs), proteine immunitarie che riconoscono intere classi di motivi molecolari associati ai patogeni, definite Pathogen Associated Molecular patterns (PAMPs), quali lipopolisaccaridi (LPS), peptidoglicani (PGN) e beta-1,3 glicani.

I peptidoglicani sono costituiti da lunghe catene di zuccheri in cui si alternano residui di N-acetilglucosamina e acido N-acetilmuramico, connesse da corti ponti peptidici. Il loro riconoscimento avviene ad opera di PRRs definiti Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs), molecole altamente conservate dagli insetti ai mammiferi che condividono un dominio di 160 amminoacidi (*PGRP domain*) (Royet et al. 2005) e sono molto simili al lisozima del batteriofago T3.

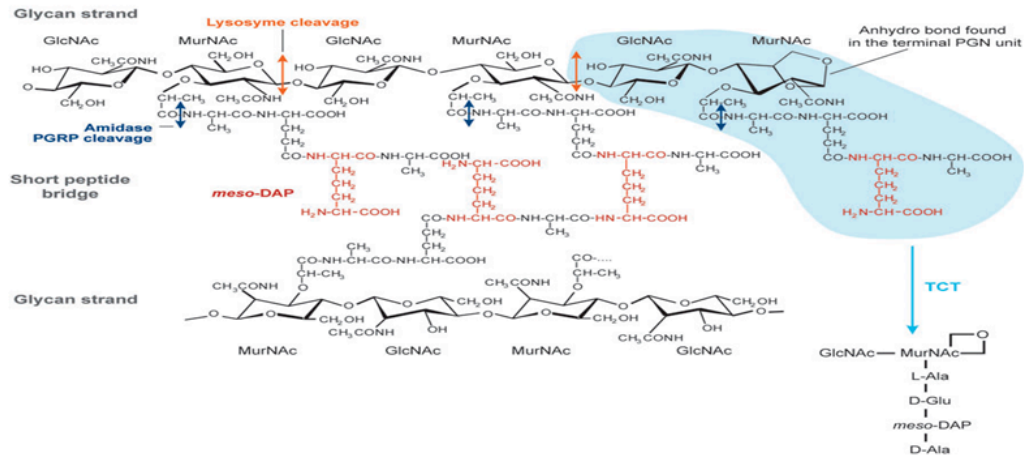
Il genoma di *Drosophila* contiene 13 geni codificanti per membri di questa famiglia di recettori (Fig. 4) e tali geni danno origine a 19 trascritti (Warner et al. 2000). Le PGRPs possono esibire proprietà enzimatiche o semplicemente possedere proprietà di riconoscimento. Le prime, dette PGRP catalitiche (PGRP-SB1, SB2, SC1a, SC1b, SC2, LB), hanno attività amidasica zinco-dipendente: mediante la rimozione di peptidi dalla catena di glicani, esse convertono il peptidoglicano in un frammento non immunostimolatorio e dunque fungono da regolatori negativi della risposta immunitaria (Zaidman-Remy et al. 2006). Le PGRPs dotate unicamente di capacità di riconoscimento (PGRP-SA, SD, LA, LC, LD, LE, LF) si legano invece fortemente al peptidoglicano e sono implicate nell'attivazione di specifiche vie di segnalazione intracellulare.



**Fig. 4.** Le 13 PGRPs presenti in *Drosophila melanogaster*. Immagine estratta da Hetru Hoffmann 2009 *NF- $\kappa$ B in the Immune Response of Drosophila*.

Le PGRPs possono discriminare tra il peptidoglicano dei batteri Gram-positivi, caratterizzato da un residuo di lisina in posizione 3 della catena peptidica, ed il peptidoglicano dei batteri Gram-negativi, il quale porta, in questa stessa posizione, un residuo di acido diaminopimelico (DAP) (Fig. 5) (Leulier et al. 2003). È straordinario che questa piccola differenza, ovvero l'aggiunta in DAP-PNG di un carbossile in posizione  $\alpha$  al posto di un'ammina della lisina, è

sufficiente a discriminare tra due grandi gruppi di patogeni e ad innescare distinte cascate di segnalazione e distinti programmi di espressione genica.



**Fig. 5** Struttura del PGN di *E. coli*. Il PGN è un complesso eteropolimerico che consiste di lunghe catene di residui alternati di *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) e acido *N*-acetilmuramico (MurNAc) connessi da piccoli ponti peptidici. Immagine estratta e modificata da Lemaitre Hoffmann 2007 *The Host Defense of Drosophila melanogaster*.

Il riconoscimento del peptidoglicano dei batteri Gram-negativi (DAP-type PNG) è affidato principalmente alla proteina transmembrana PGRP-LC che rappresenta il più importante recettore della via di segnalazione Imd (vedi sotto) (Gottar et al 2002). La proteina PGRP-LC ha un peso molecolare di 55 kDa e consiste di una porzione extra-citoplasmatica corrispondente al dominio di riconoscimento del peptidoglicano, un breve dominio transmembrana di 22 aminoacidi, e un dominio di segnalazione intra-citoplasmatico. Attraverso meccanismi di *splicing* alternativo, un unico gene *PGRP-LC* presente nel genoma della *Drosophila* può generare tre isoforme proteiche, LCa, LCx, LCy, che condividono stessi domini intracellulare e transmembrana ma hanno diversi domini extracellulari (Werner et al. 2000). Omodimeri PGRP-LCx legano molecole polimeriche di peptidoglicano mentre eterodimeri PGRP-LCa/PGRP-LCx riconoscono molecole monomeriche (Kaneko et al. 2004).

Un altro membro della famiglia delle PGRPs implicato nel riconoscimento dei batteri Gram negativi è PGRP-LE (Takehana et al. 2002), che agisce da recettore

citoplasmatico di molecole monomeriche di peptidoglicano, penetrate all'interno della cellula grazie alle loro dimensioni ridotte (Kaneko et al. 2004). Una forma tronca di PGRP-LE, contenente solo il dominio di legame al peptidoglicano, funziona poi nell'ambiente extra-cellulare per intensificare il riconoscimento di questa molecola a livello della superficie cellulare, mediato da PGRP-LC. (Takehana et al. 2004).

Esiste, infine, un membro della famiglia delle PGRPs che funge da regolatore negativo della via di segnalazione Imd. Si tratta di PGRP-LF: una riduzione dei livelli di questa proteina in assenza di infezioni è infatti sufficiente ad innescare l'attivazione della via di segnalazione Imd.

Il riconoscimento del peptidoglicano dei batteri Gram-positivi (Lys-type PGN) avviene ad opera dei recettori solubili PGRP-SA, PGRP-SD e GNBP1 (Gram negative binding protein: si tratta evidentemente di una denominazione errata) (Michel et al. 2001, Bischoff et al. 2004). PGRP-SA è il principale recettore della via di segnalazione di Toll (vedi di seguito) e forma con GNBP-1 un complesso presente nell'emolinfa di *Drosophila* (Pili-Floury et al. 2004). E' stato ipotizzato che il ruolo svolto da GNBP-1 sia quello di idrolizzare i peptidoglicani presenti sulla superficie batterica in piccoli frammenti suscettibili al riconoscimento da parte di PGRP-SA (Wang et al. 2006), PGRP-SD serve invece a riconoscere un sottoinsieme di batteri Gram positivi, in parziale ridondanza con il complesso PGRP-SA/GNBP-1 (Lemaitre Hoffmann 2007).

Oltre ai peptidoglicani dei batteri Gram positivi, anche i glucani dei funghi e dei lieviti sono potenti attivatori della via di segnalazione *Toll*. Essi sono riconosciuti da PRRs chiamati Gram-negative binding proteins (GNBP, ancora una volta un errore di denominazione), ed in particolare dalla proteina GNBP-3. Queste proteine hanno omologia di sequenza con le glucanasi batteriche e presentano due domini conservati: un dominio ammino-terminale detto *GNBP homology domain* ed un dominio carbossi-terminale corrispondente al dominio catalitico delle glucanasi. In GNBP-3, il primo dominio media il riconoscimento di glucani polimerici, mentre il secondo ha perso la sua attività enzimatica (Wang et al. 2006) (Fig. 6).

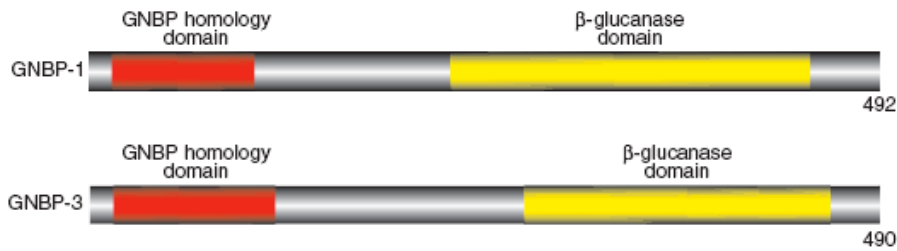


Figure 3. GNBP1 and GNBP3.

**Fig. 6.** Proteine GNBP-1 e GNBP-3 in *Drosophila melanogaster*. Immagine estratta da Hetru Hoffmann 2009 *NF-κB in the Immune Response of Drosophila*.

### 1.2.2 La via di segnalazione *Toll*

Come già accennato, la via di segnalazione di *Toll* è attivata in seguito ad infezioni di batteri Gram-positivi ed infezioni fungine (Lemaitre 1996; Michel et al. 2001; Gottar et al. 2006). Il principale gene bersaglio di questa via di segnalazione è, nell'ambito della risposta umorale, il gene codificante per il peptide antifungino drosomicina, ma risultano indotti anche i geni codificanti per defensina, cecropina e metchnikovina. La via di segnalazione *Toll* svolge inoltre un ruolo importante in altri aspetti della risposta immunitaria ed in particolare nelle risposte cellulari di fagocitosi dei microbi e incapsulamento dei parassiti, ed infatti centinaia sono i geni da essa controllati (Hultmark 2003).

Nel genoma di *Drosophila* sono stati identificati 9 geni che codificano per recettori *Toll*. Tutti condividono una stessa struttura molecolare, con un dominio extracellulare prevalentemente composto di ripetizioni ricche di leucina e motivi fiancheggiati ricchi di cisteina. Il primo ad essere stato identificato, *Toll-1*, è responsabile, in seguito ad induzione, della produzione di AMPs. Meno chiaro è il coinvolgimento degli altri geni nella risposta immunitaria. *Toll-5*, che fra tutti è il più vicino a *Toll-1* da un punto di vista filogenetico, può indurre l'espressione di drosomicina e metchnikowin ed interagisce con i domini intracitoplasmatici di *Toll-1* e della chinasi Pelle (vedi sotto) portando all'attivazione della trascrizione *Dorsal* dipendente (Luo et al. 2001). *Toll-9*, che, a differenza degli altri *Toll*, possiede un solo motivo ricco di cisteina tra il dominio transmembrana e le

ripetizioni ricche di leucina, è a sua volta in grado di attivare l'espressione costitutiva di drosomicina (Bettencourt et al. 2004).

La via di segnalazione di Toll è attivata quando, in seguito al riconoscimento dei patogeni da parte dei PRRs, viene innescata una cascata di proteasi che porta all'attivazione del suo ligando Spaetzle (Spz). La proteina Spz è sintetizzata e secreta dagli emociti sotto forma di precursore inattivo (pro-proteina) che consiste di un pro-dominio di 22 kDa e di una regione C-terminale di 14 kDa che forma una struttura a nodo di cisteine (DeLotto et al. 1998). Questo motivo strutturale è presente in numerose molecole di segnalazione dei vertebrati, e Spz è strettamente correlato alle neurotrofine, ad esempio il nerve growth factor (NGF) (Bidel et al. 2000, Mizuguchi 1998). In condizioni normali il pro-dominio di Spz maschera la regione C-terminale. Lo stimolo immunitario, induce proteolisi, che a sua volta causa un cambiamento conformazionale esponendo residui amminoacidici critici per il legame con il recettore Toll (Arnot et al. 2010).

L'enzima proteolitico responsabile del taglio di Spz a seguito del riconoscimento microbico è stato proprio chiamato Spaetzle processing enzyme (SPE) (Jang et al. 2006). Secondo il modello attualmente accreditato, questo enzima viene attivato, a seconda del tipo di microrganismo riconosciuto, da una di tre cascate proteolitiche situate a monte di esso (Fig. 8). Due di queste cascate portano all'attivazione di Grass (Gram-positive-specific serine protease) e sono innescate una dai  $\beta$ -glucani della parete cellulare dei funghi, e l'altra dai peptidoglicani di tipo Lys della parete cellulare dei batteri Gram positivi (El Chamy et al. 2008). Altre 4 serin proteasi, Spirit, Spheroid e Sphinx1/2, identificate in risposta ad infezioni sia di funghi che di batteri Gram positivi, potrebbero agire a valle di Grass nella cascata che porta all'attivazione di SPE (Kambri et al. 2006). A monte di Grass, invece, è stata identificata una serin proteasi modulare (ModSP) conservata nella risposta immunitaria degli insetti che ha un ruolo essenziale nel convogliare i segnali provenienti dalle proteine GGBP-3 e PGRP-SA, di cui si è discusso nel paragrafo precedente, alla cascata Grass-SPE-Spz (Buchon et al. 2009). La terza cascata di proteasi che porta all'attivazione di SPE è mediata dalla proteasi Persephone, attivata proteoliticamente da PR1, un fattore di virulenza secreto dai funghi, e da fattori di virulenza prodotti da batteri Gram positivi.

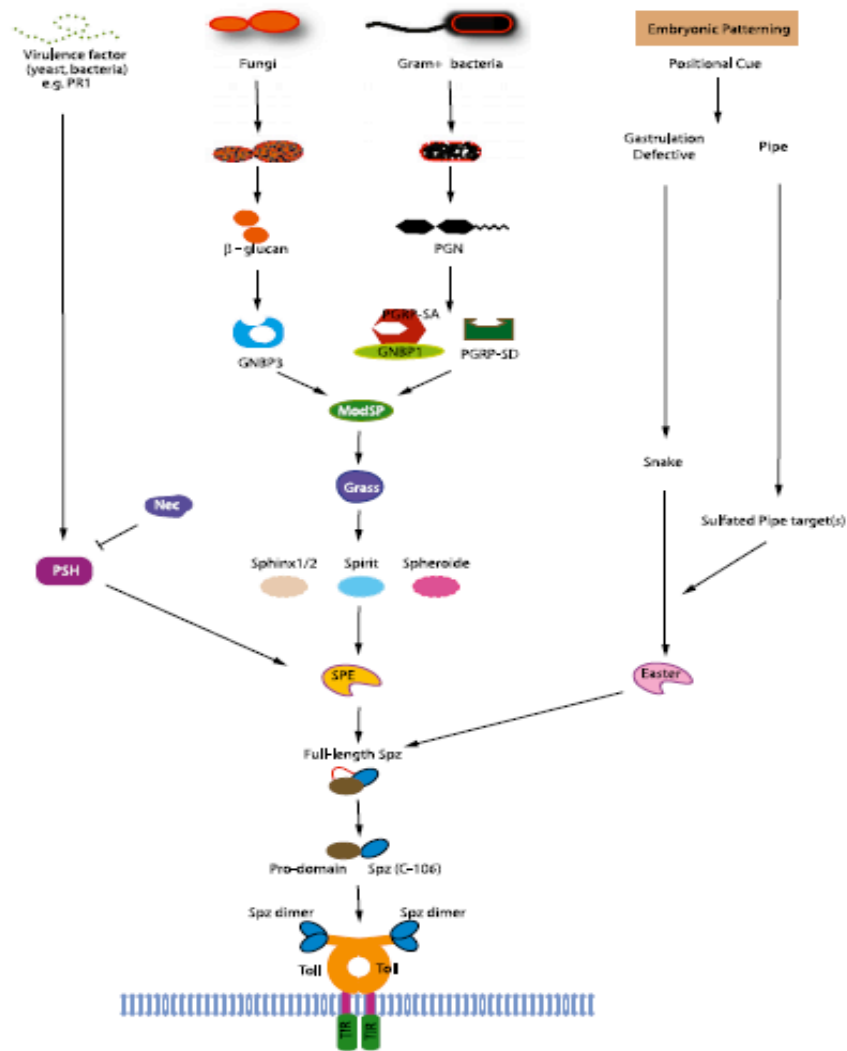
Sono stati suggeriti due modelli per spiegare il legame di Spz a Toll; il primo

implica che un dimero di Spz leghi i domini extracellulari di due recettori *Toll* (Weber et al. 2005). Un modello più recente ipotizza invece che due dimeri di Spz, ciascuno legante la regione N-terminale di uno dei due recettori Toll, innescano un cambiamento conformazionale di tali recettori attivando la via di segnalazione (Fig. 7) (Gangloff et al. 2008).

Una volta attivato da Spz, il recettore Toll si lega, attraverso il suo dominio intracellulare TIR (Toll/Interleukin-1 receptor), alla proteina MyD88, dotata di un analogo dominio proteico (Horng et al. 2001; Tauszig-Delamasur et al. 2002; Sun et al. 2002) (Fig. 8). In conseguenza dell'interazione con questa proteina adattatrice vengono reclutate altre due proteine, Tube e la chinasi Pelle, a formare, attraverso interazioni mediate dai loro cosiddetti “*death domain*” (DD), un complesso eterotrimerico MyD88-Tube-Pelle (Sun et al. 2002; Xiao et al. 1999; Moncrieffe et al. 2008). In tale complesso, MyD88 e Pelle non sono in contatto l'uno con l'altro, ma legano due distinte superfici del dominio DD di Tube, un'altra proteina adattatrice (Sun et al. 2002). In seguito alla formazione del complesso oligomerico MyD88-Tube-Pelle, il segnale procede alla fosforilazione e degradazione di Cactus. Sebbene non sia stato direttamente dimostrato, è possibile che la fosforilazione sia condotta da Pelle. Sembra infatti che Pelle sia la sola chinasi implicata nella fosforilazione di Cactus (Huang 2010). Questa avviene in due distinti motivi N-terminali; una volta fosforilato, Cactus viene ubiquitinato in posizione K48 e degradato dal proteasoma (Fernandez 2001), consentendo la traslocazione nucleare di Dorsal/DIF e dunque l'attivazione della trascrizione di diversi geni bersaglio.

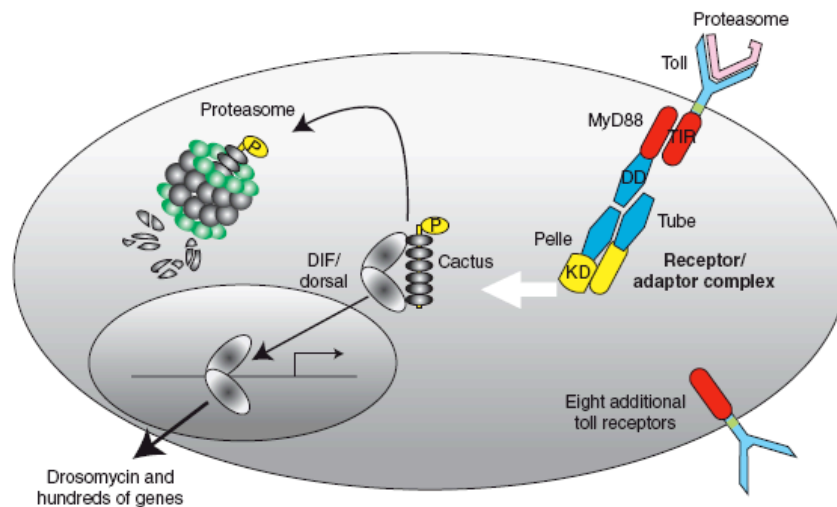
Altri componenti della via di segnalazione di Toll sono: il fattore DEAF-1 (*deformed epidermal autoregulatory factor 1*), che si lega ai promotori dei geni codificanti per metchnikowin e drosomicina ed è richiesto per l'espressione di questo secondo gene e per la difesa contro le infezioni fungine (Reed et al. 2008; Kutenkeuler et al. 2002); la proteina Gprk2 (*G Protein-coupled receptor kinase 2*), che interagisce con *Cactus*; la proteina Pellino, conservata anche nei mammiferi, che interagisce con la chinasi Pelle e funziona da regolatore positivo della via di segnalazione di Toll (Haghighyehi et al. 2010). Un regolatore negativo è invece WntD che riduce l'attività di Toll impedendo la traslocazione di Dorsal nel nucleo (Gordon et al. 2005). E' stato infine dimostrato che meccanismi di

endocitosi di Toll sono coinvolti nell'attivazione del recettore (Huang et al. 2010).



**Fig. 7.** Il taglio extracellulare di Spz porta all'attivazione della via di segnalazione di Toll. Nella risposta immunitaria, tre cascate di proteasi portano all'attivazione di SPE, che catalizza il taglio del precursore di Spz; la cascata di Persephone (PSH) è attivata da fattori di virulenza di batteri Gram-positivi e funghi. Le altre due cascate sono attivate dai PRRs che riconoscono e legano i peptidoglicani e i  $\beta$ -glucani della parete cellulare dei batteri Gram-positivi e dei funghi. Tutte le cascate convergono su ModSP-Grass, situato a monte di SPE. In seguito al processamento proteolitico, il pro-dominio di Spz viene tagliato, esponendo la porzione C-terminale di Spz critica per il legame di Toll. Spz si lega al recettore Toll ed inizia la trasduzione del segnale intracellulare. Immagine estratta da Valanne et al 2011 *The Drosophila Toll Signaling Pathway*.





**Fig. 8.** La via di segnalazione di Toll in *Drosophila melanogaster*. La trasmissione del segnale attraverso la via di Toll coinvolge un complesso di recettori/adattatori, composto da tre proteine contenenti un cosiddetto “death domain”: MyD88, Tube e Pelle. Il complesso trimerico si assembla intorno al “death domain” di Tube. Non è ancora chiaro come il segnale venga trasdotto da questo complesso a *Cactus*, omologo di I $\kappa$ B. Una volta fosforilato, *Cactus* viene poliubiquinato e degradato attraverso il proteasoma, liberando DIF/dorsal che viene traslocato all’interno del nucleo dove si lega agli elementi di risposta NF- $\kappa$ B, inducendo l’espressione di centinaia di geni, tra cui quelli che codificano per peptidi antimicrobici come la Drosomicina. Immagine estratta da Hetru Hoffmann 2009 *NF- $\kappa$ B the Immune Response of Drosophila*.

### 1.2.3 La via di segnalazione di *Imd*

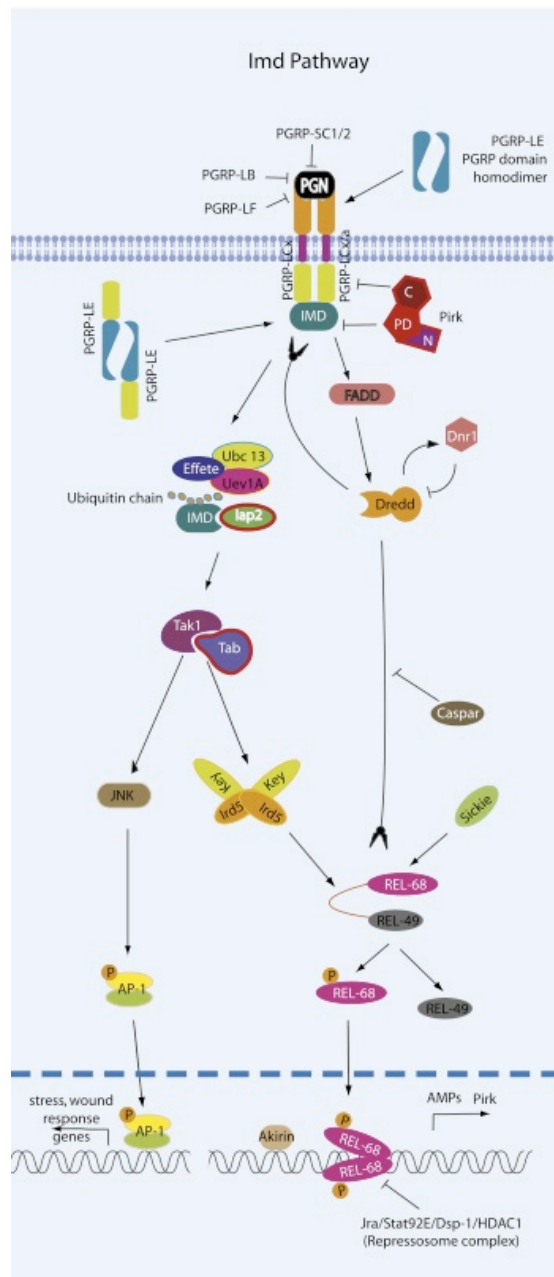
La via di segnalazione intracellulare attivata dai batteri Gram-negativi prende il nome dal suo componente chiave, la proteina *Imd* (*immune deficiency*) (Lemaitre 1995). Come precedentemente descritto, mentre l’attivazione della via di segnalazione di Toll è mediata dall’interazione di ligandi microbici con proteine recettoriali presenti in circolo, la via di segnalazione di *Imd* è innescata dalla diretta interazione del recettore transmembrana PGRP-LC (Choe et al. 2005) con il peptidoglicano dei batteri Gram-negativi (DAP-PGN). La cascata intracitoplasmatica (Fig. 9) che ne consegue inizia con il reclutamento della proteina *Imd*, dal peso molecolare di 25 kDa, che possiede un cosiddetto “*death domain*”

(Lemaitre 1995) ed è omologa alla proteina RIP1 dei mammiferi (Georgel et al. 2001). Attraverso meccanismi ad oggi non ancora pienamente conosciuti, Imd si associa ad una seconda proteina contenente anch'essa un "death domain", la proteina FADD (*Fas-associated death domain*) che a sua volta interagisce con la caspasi DREDD, dotata anch'essa di un "death domain" (Naitza et al. 2002, Leulier et al. 2000). Queste due proteine svolgono nella via di segnalazione Imd due ruoli, uno precoce ed uno più tardivo. Il primo consiste nel taglio endoproteolitico di Imd da parte di DREDD, con conseguente esposizione di un sito di legame per la proteina dIAP2 (*Inhibitor of apoptosis-2*). Una volta associato a dIAP2, in un complesso contenente anche UEV1A e Bendless, Imd viene poliubiquinato. In questo processo, il complesso UEV1A/Bendless funziona da "E2 conjugating Enzime", dIAP2 da E3 ligasi (Paquette N et al. 2010) E' plausibile che dUSP36 (*ubiquitin specific protease 36*) agisca come soppressore della via di segnalazione Imd invertendo tale poliubiquitinazione (Thevenon D. et al. 2009). Le catene di poliubiquitina servono probabilmente come supporto per l'ingaggio di un complesso formato dalla chinasi TAK1 e dall'adattatore dTAB2 e del complesso IKK formato da una subunità catalitica, la chinasi Ird5, e una subunità regolatrice, Kenny. Sia dTAB2 che Kenny contengono infatti siti di legame per la poliubiquitina. L'attivazione di dTAK prima e IKK dopo, porta a diretta fosforilazione di Relish da parte di IKK (Erturk-Hasdemir D. et al. 2009). Tale fosforilazione non è però necessaria per il taglio proteolitico, che avviene ad opera di Dredd (che così svolge il suo secondo ruolo nella via di segnalazione di Imd). IKK svolge comunque una funzione non catalitica, cioè indipendente dalla sua attività chinasi, nel taglio di Relish.

In seguito al processamento, il dominio trascrizionale ammino-terminale di Relish viene traslocato nel nucleo dove si lega agli elementi di risposta NF-kB inducendo l'espressione di geni deputati alla produzione di peptidi antimicrobici. Il frammento carbossi-terminale, invece, rimane nel citoplasma. Una proteina altamente conservata di 32 kDa, *Ankirin* agisce in associazione con Relish per controllare la trascrizione dei geni dipendenti dalla via di segnalazione Imd (Goto et al. 2008).

Numerosi regolatori negativi della via di segnalazione di Imd, sia intracellulari che extracellulari, sono stati identificati in *Drosophila melanogaster*. Questi

regolatori negativi includono i PRRs PGRP-LB, PGRP-LF, PGRP-SB1 e PGRP-SC1. Come accennato in precedenza, la proteina PGRP-LB, espressa nei corpi grassi e secreta nell'emolinfa, ha un'attività catalitica amidasica capace di tagliare il peptidoglicano (PGN DAP-type): limitando la sua disponibilità per il recettore PGRP-LC essa smorza dunque il segnale di Imd (Zaidman-Rémy et al. 2006). PGRP-SC, invece, è capace di digerire sia il peptidoglicano di cui si compone la parete cellulare dei batteri Gram positivi che quello dei batteri Gram negativi (Mellroth et al. 2005, Zaidman-Rémy et al. 2006). Altri regolatori negativi della via di segnalazione Imd sono le proteina Pirk, Caspar e Dnr1; le ultime due sono in particolare modulatori negativi dell'attività di DREDD. Pirk è una proteina intracellulare che interagisce con Imd e la coda citoplasmatica di PGRP-LC. Mutanti di *Pirk* presentano elevati livelli di peptidi antimicrobici, mentre la sovraespressione di questa proteina riduce la risposta alla via di segnalazione Imd accrescendo la suscettibilità alle infezioni di batteri Gram negativi (Kleino et al 2008). *Caspar* è una proteina citoplasmatica omologa di FAF-1 (Fas-associated factor), che si associa a vari componenti della via del Tumor Necrosis Factor (TNF) dei mammiferi, con cui la via di Imd presenta numerose somiglianze. Mutanti *Caspar* mostrano attivazione costitutiva della diptericina in assenza di infezione (Kim et al. 2006). Al contrario, la sovraespressione di *Caspar* inibisce l'induzione dei peptidi antimicrobici ed è stato proposto che la proteina prodotta da questo gene blocchi il taglio del fattore trascrizionale Relish, interferendo con DREDD (Kim et al. 2006). Dnr1 è una proteina conservata che consiste di un dominio *ezrin/radixin/moesin* ed un dominio C-terminale *Ring finger*, tale struttura suggerisce che Dnr1 possa funzionare da E3 ligasi.



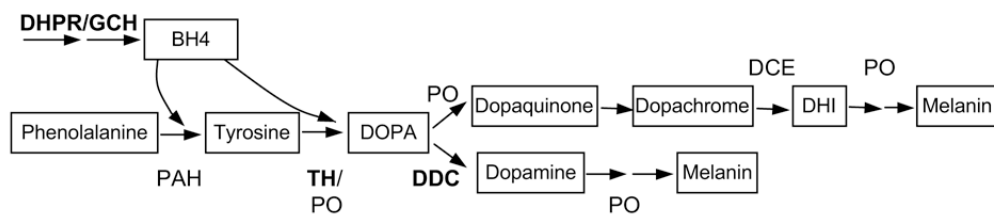
**Fig. 9.** La via di segnalazione *Imd* in *Drosophila melanogaster*. La via di segnalazione *Imd* è attivata dal PGN di tipo DAP che si lega al dimero della proteina PGRP-LC. IMD è connesso alla caspasi DREDD attraverso la proteina adattatrice FADD. DREDD taglia proteoliticamente IMD. In seguito al taglio IMD si associa alla proteina IAP2, una E3-ligasi, ed inoltre alle proteine UEV1a, Bendless (Ubc13) ed Effete (Ubc5) e viene poliubiquinato. Ciò attiva una cascata di chinasi a valle, che include Tak1 e IKK, portando alla fosforilazione e all'attivazione di Relish. Questo fattore trascrizionale viene tagliato proteoliticamente da DREDD e traslocando nel nucleo va ad attivare la trascrizione dei geni AMPs. La proteina Ankirin è richiesta per il funzionamento della via di segnalazione *Imd* a livello di Relish. Pirk, Caspar e Dnr1 sono regolatori negativi. Immagine estratta e modificata da Valanne 2011 *The Drosophila Toll Signaling Pathway*.

Studi di espressione genica nel doppio mutante Imd/Toll, effettuati mediante l'uso della tecnica del microarray, hanno dimostrato che queste cascate regolano almeno l'80% dei geni indotti in seguito a ferita, riflettendo il loro importante contributo nella sopravvivenza alle infezioni (De Gregorio et al. 2002). Non esiste nessuna evidenza di “*cross-talk*” tra le due vie di segnalazione citate (Toll/Imd), alcuni geni dei peptidi antimicrobici possono essere indotti da entrambi, mentre altri geni mostrano una specificità per una singola via di segnalazione.

### **1.2.4 La melanizzazione**

La reazione di melanizzazione, che prevede la sintesi *de novo* di melanina, è una rilevante risposta immunitaria in *Drosophila* e in altri insetti ed artropodi. Questa reazione viene attivata in seguito a rottura della cuticola ed interessa il sito stesso della ferita, ma anche la superficie di patogeni o parassiti che invadono l'emocele. Si tratta di un processo estremamente veloce ed infatti mentre sono necessarie alcune ore o anche alcuni giorni affinché le vie di segnalazione di Toll ed Imd inducano la produzione di effettori immunitari in seguito ad infezione microbica, la reazione di melanizzazione è innescata in pochi minuti (Tang 2009).

La via biosintetica che porta alla sintesi di melanina ha inizio con una reazione di idrossilazione della fenilalanina, catalizzata da un enzima definito fenilalanina idrossilasi (PAH). La tirosina così prodotta viene convertita dall'enzima fenolo ossidasi (PO) o dalla tirosina idrossilasi (TH) in 3,4 diidrossifenilalanina (DOPA). Questa o viene trasformata in dopachinone, sempre attraverso l'attività enzimatica della PO, o produce dopamina per azione dell'enzima Dopa decarbossilasi (DDC). Il dopachinone si converte in maniera non enzimatica in dopacromo, successivamente decarbossilato dall'enzima che converte il dopacromo (DCE), con formazione di 5,6 diidrossindolo (DHI) (Christensen 2005). Alla fine di questa cascata, sia la dopamina che il DHI sono convertiti in melanina, ancora una volta attraverso l'attività della PO (Fig. 10).



**Fig. 10.** Biosintesi della melanina in *Drosophila melanogaster*. All’inizio della cascata enzimatica che porta alla formazione di melanina, la fenilalanina è idrossilata a tirosina dalla fenilalanina idrossilasi (PAH) in presenza di tetraidrobiopterano (BH4), che a sua volta è prodotto da una catena enzimatica che include diidropteridina riduttasi (DHPR) e GTP ciclo idrolasi (GCH). La tirosina è convertita dalla fenolossidasi (PO) in DOPA che viene trasformata in dopachinone dalla PO o in dopamina dalla Dopa decarbossilasi (DDC). Il dopachinone si può convertire in maniera non enzimatica in dopacromo che è decarbossilato a 5,6 diidrossindolo (DHI) dall’enzima DCE *dopachrome conversion enzyme*. Dopamina e DHI sono convertite dalla PO in melanina. Immagine estratta da Tang 2009 *Regulation and function of the melanization reaction in Drosophila*.

Analisi di espressione genica mediante la tecnica del microarray hanno indicato che i livelli dei trascritti di alcuni geni codificanti per enzimi coinvolti nella formazione della melanina ed in particolare DDC, TH e DCE aumentano in seguito ad infezione di *Drosophila* con una miscela di batteri Gram-positivi e Gram-negativi, suggerendo che tali enzimi possano svolgere un ruolo regolativo dei processi di melanizzazione (De Gregorio, 2001). L’enzima chiave di questi processi è però la fenolossidasi (PO). Normalmente presente nell’insetto sotto forma di zimogeno inattivo detto pro-fenolossidasi (PPO), la PO viene infatti prodotta solo in seguito a stimolo immunitario.

Il genoma di *Drosophila* contiene 3 geni che codificano per profenolossidasi: PPO1-CG5779, PPO2-CG8193, PPO3-CG2952. Studi pionieristici condotti da Rizki et al. (Rizki et al. 1980) avevano suggerito che un particolare tipo di emociti, le cosiddette “*crystal cells*” (vedi sotto), fossero l’unica fonte di PPO nella *Drosophila*. Ed infatti la melanizzazione attivata dalla rottura della cuticola larvale è mediata, nel sito della ferita, esclusivamente dalle “*crystal cells*”. Uno studio approfondito dei profili di espressione genica negli emociti di *Drosophila* ha però più di recente rivelato che i geni *PPO1* e *PPO2* sono effettivamente espressi essenzialmente nelle “*crystal cells*”, ma il gene *PPO3* è espresso nei

lamellociti, cellule immunitarie che si differenziano in seguito alle infezioni di parassitoidi (Irving et al. 2005).

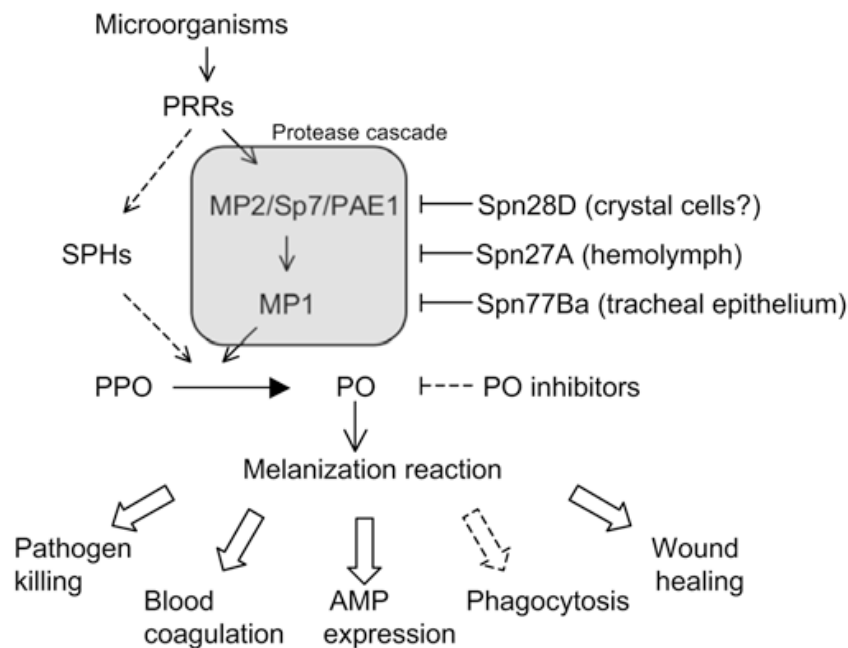
La sovra-espressione di PPO3, ma non quella di PPO1 o PPO2, in linee cellulari o moscerini adulti è capace di indurre melanizzazione costitutiva. Esperimenti con forme mutanti di PPO3 hanno inoltre rivelato che la PPO3 non processata è enzimaticamente attiva. Infine, è stato dimostrato che il silenziamento di PPO3 sopprime il fenomeno di melanizzazione costitutiva osservato nei mutanti *hop<sup>Tum-1</sup>*, in cui si ha differenziamento di lamellociti in assenza di infestazione parassitaria (Nam et al. 2008). Nel loro insieme, questi dati suggeriscono che la PPO3 svolge un ruolo importante nei processi di melanizzazione operati dai lamellociti durante la risposta immunitaria cellulare di incapsulamento delle uova dei parassitoidi.

Nonostante svolgano la loro azione a livello extra-cellulare, le PPO di tutti gli artropodi mancano del peptide segnale necessario per la secrezione; esse vengono quindi immagazzinate nelle “*crystal cells*” per essere rilasciate nell’ambiente extracellulare attraverso lisi cellulare (Rizki 1985). È stato dimostrato che la rottura di tali cellule con successiva melanizzazione, dipende in *Drosophila* dalla via di segnalazione della chinasi N-terminale c-Jun (JNK) e dall’attività di Eiger, omologo del TNF $\alpha$  dei mammiferi in *Drosophila*. Il rilascio delle PPO è inoltre influenzato da mutazioni nei geni codificanti per le GTPasi di tipo Rho, coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro. Ciò supporta l’idea che il citoscheletro sia coinvolto nella rottura delle “*crystal cells*” (Bidla et al. 2007).

L’attivazione di molte PPO richiede la rimozione di una porzione N-terminale di circa 50 residui amminoacidici, mediante il taglio di un legame conservato arginina-fenilalanina. Le PPO2 e PPO3 di *Drosophila* vengono invece tagliate in un sito di legame arginina-valina. L’enzima responsabile del processamento delle PPO di *Drosophila* è una serin proteasi detta propheloxydase activating enzyme (PPAE).

La PO viene regolata a diversi livelli. Prima di tutto, l’attivazione dipende dal riconoscimento di componenti della parete cellulare microbica o altri fattori e ciò fa sì che melanizzazione abbia luogo solo laddove questi fattori sono presenti, come ad esempio in un sito di infezione o di una ferita. Il riconoscimento di tali fattori porta poi all’attivazione di una cascata di proteasi. Poiché queste esistono

come zimogeni, cioè nella loro forma non attiva, la PO può essere rapidamente attivata solo dove ciò è effettivamente richiesto. Un ulteriore vantaggio dell'uso di una cascata di proteasi per mediare l'attivazione della PO è rappresentato dall'amplificazione del segnale generato. Essa offre inoltre molteplici possibilità di controllo, e questo avviene attraverso la funzione di proteine dette Serpine (Fig. 12).



**Fig. 12.** Modello di attivazione della reazione di Melanizzazione in seguito ad infezione microbica in *Drosophila melanogaster*. Il riconoscimento di un microrganismo da parte di un PRR innesca una cascata di proteasi che coinvolge la proteasi MP1 e MP2/Sp7/PAE1, che culmina con il taglio della PPO in PO. La Serpina Sp28D controlla il rilascio e la disponibilità della PO inibendo la sua attivazione, probabilmente nelle “*crystal cells*”. Al contrario, Sp27A agisce nell'emolinfa per inibire la cascata MP1/MP2 e prevenire l'eccessiva melanizzazione dopo l'infezione. Un'altra Serpina, Spn77Ba, regola la melanizzazione nelle trachee inibendo la stessa cascata di proteasi. Studi biochimici condotti in altre specie di insetti hanno dimostrato il coinvolgimento di proteine appartenenti alla famiglia dei cosiddetti omologhi delle serin proteasi (SPHs) nell'attivazione della PO.

La melanizzazione oltre ad uccidere direttamente i patogeni, coopera anche con altri tipi di risposta immunitaria come la coagulazione, la produzione di peptidi antimicrobici ed il riparo delle ferite. In altri artropodi, la melanizzazione facilita



anche la fagocitosi, ma non è ancora chiaro se ciò avvenga anche in *Drosophila* (Tang 2009). Immagine estratta da Tang 2009 Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*.

In *Drosophila*, i meccanismi molecolari coinvolti nell'attivazione della PO sono ancora oggetto di studi. La fase di innesco del processo di melanizzazione in seguito ad infezione microbica potrebbe vedere la partecipazione delle proteine PGRP-LE e PGRP-LC, in qualità di PRR. E' stato infatti osservato che se da un lato l'over-espressione di PGRP-LE determina melanizzazione costitutiva, dall'altro una mutazione a carico di questo stesso gene blocca l'attivazione della PO in seguito ad infezione di *E.coli* (Takehana et al. 2002; Takehana et al 2004.). L'over-espressione del recettore PGRP-LC in forma integra o tronca, priva cioè del dominio di riconoscimento del peptidoglicano, determina a sua volta massiva melanizzazione sia nelle larve che negli adulti. Non è però ancora chiaro se PGRP-LC attivi la melanizzazione direttamente o attraverso la via di segnalazione Imd.

Va inoltre menzionato che la cascata della PO può essere innescata in *Drosophila* anche in assenza di agenti microbici e causare la melanizzazione di vari tessuti.. Tale fenomeno è ad esempio associato a diverse mutazioni, alcune delle quali causano alterazione dei processi di ematopoiesi e/o delle funzioni delle cellule immunitarie, altre vanno invece a modificare tessuti non immunitari (Minakina 2006). I processi di melanizzazione che si osservano in seguito alla formazione di una ferita, possono poi essere attivati in risposta a segnali che provengono dalla ferita stessa e/o dagli emociti morenti intrappolati nel coagulo (Bidla et al. 2007; Galko et al. 2004).

Come si è detto, il riconoscimento microbico o comunque la produzione di specifici segnali a livello dei tessuti epiteliali danneggiati induce melanizzazione attraverso l'attivazione di una cascata di serin-proteasi. Due sono i membri di questa cascata identificati a tutt'oggi: MP1 e MP2/sp7/PAE1 (Castillejo-Lopez et al 2005; Leclerc et al 2006; Tang et al 2006). Essi appartengono alla famiglia delle cosiddette Clip proteasi, caratterizzate dalla presenza di un dominio di regolazione all'N-terminale provvisto di 3 ponti disolfuro che può ripiegarsi a costituire una struttura a graffetta. L'over-espressione dei geni MP1 e MP2 induce melanizzazione costitutiva accompagnata da semiletalità, mentre il "knockdown"

o dell'una o dell'altra proteina compromette l'attivazione della PO e di conseguenza la melanizzazione in seguito ad infezione microbica. La serin proteasi MP1 è richiesta per l'attivazione della PO in risposta sia all'infezione batterica che fungina, MP2, invece, si attiva solo in risposta all'infezione di funghi. Agendo a valle di MP2, la proteasi MP1 è un buon candidato ad essere l'enzima che attiva la profenolossidasi (PPAE), la proteasi che taglia direttamente la PPO, ma ciò è ancora oggetto di studio.

L'attivazione della melanizzazione deve essere strettamente regolata, in quanto una reazione non controllata genera eccessivi intermedi tossici che potrebbero essere deleteri per l'ospite (Tang 2008).

La regolazione avviene attraverso tre differenti tipi di Serpine (Serin protease inhibitors, Spn): Spn27A, Spn28D, Spn77Ba. Spn27A è stata la prima serpina ad essere identificata. Una mutazione per perdita di funzione del gene codificante per questa proteina determina melanizzazione non controllata e semiletalità, mentre la sua sovraespressione sopprime l'attivazione della PO indotta dai microrganismi (De Gregorio et al. 2002; Ligoxygakis et al. 2002.) La proteina Spn27A svolge un ruolo anche nella risposta immunitaria cellulare attivata in risposta a infezioni naturali, oltre che in seguito ad attacco da parte di parassitoidi.

La serpina Spn28D inibisce la PO in maniera diversa rispetto a Spn27A (Scherfer et al 2008). Il silenziamento di Spn28D attraverso RNAi porta a melanizzazione costitutiva in vari tessuti, in particolare quelli a diretto contatto con l'aria. Sorprendentemente, sia la melanizzazione indotta dall'infezione microbica, sia la pigmentazione della cuticola vengono soppresse da una forte riduzione di Spn28D, forse come conseguenza dell'esaurimento di PO. La Spn28D potrebbe allora avere la funzione di prevenire la prematura attivazione della PO ad uno stadio precoce e limitare la sua disponibilità generale.

La proteina Spn77Ba è espressa nell'epitelio delle trachee, il sistema respiratorio di *Drosophila*, ed il suo silenziamento in questo tessuto provoca melanizzazione costitutiva del tessuto stesso e letalità (Tang et al. 2008). La melanizzazione costitutiva delle trachee può essere soppressa dal silenziamento delle proteasi MP1 o MP2. Spn77Ba è dunque un inibitore, specifico per le trachee, della cascata di melanizzazione indotta da MP1/MP2, la stessa regolata da Spn27A

nell'emolinfa. La melanizzazione tracheale regolata da Spn77Ba può essere innescata dalla presenza di microrganismi, suggerendo che si tratta di una risposta immunitaria locale.

Interessante notare che la via di segnalazione Toll non solo controlla l'espressione dei peptidi antimicrobici, ma anche altre componenti della risposta immunitaria sistemica, tra cui appunto la melanizzazione. Le proteine Spn27A e Spn28D, e le serin proteasi MP1-MP2 sono attivate in seguito ad un danno della cuticola, in maniera Toll dipendente (De Gregorio et al. 2001). Inoltre, la mutazione *necrotic*, che distrugge la serpina Spn43Ac, un inibitore della cascata proteolitica che porta all'attivazione della via di segnalazione Toll, provoca melanizzazione costitutiva (Levascina 1999).

Per quanto riguarda invece le risposte immunitarie locali a livello degli epitelii, queste sono controllate dalla via di segnalazione Imd. È stato dunque dimostrato che una mutazione nella via di segnalazione Imd sopprime parzialmente la melanizzazione delle trachee indotta dal silenziamento della serpina Spn77Ba, suggerendo che questa via di segnalazione possa controllare l'espressione di molecole coinvolte nelle risposte di melanizzazione all'interno di questi organi (Tang 2008).

La melanizzazione è stata a lungo ritenuta un processo biologico molto importante nella risposta immunitaria degli artropodi: il sequestro di patogeni all'interno delle capsule di melanina dovrebbe presumibilmente prevenire la disseminazione di tali patogeni nell'emolinfa dell'ospite, e la deposizione di melanina nel sito di danno dovrebbe favorire la guarigione delle ferite. Inoltre, le specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate durante la melanizzazione sono tossiche per i patogeni. Ancora, è stato dimostrato che uno degli intermedi delle reazioni di melanizzazione, il DOPA, rinvenuto nel sangue di *Sarcophaga peregrina*, esibisce attività antimicrobica (Leem 1996). Studi *in vitro* effettuati con la PO purificata di *M. sexta* hanno a loro volta suggerito che gli intermedi della reazione di melanizzazione presentano elevata attività antimicrobica contro un ampio gruppo di batteri (Zhao et al 2007).

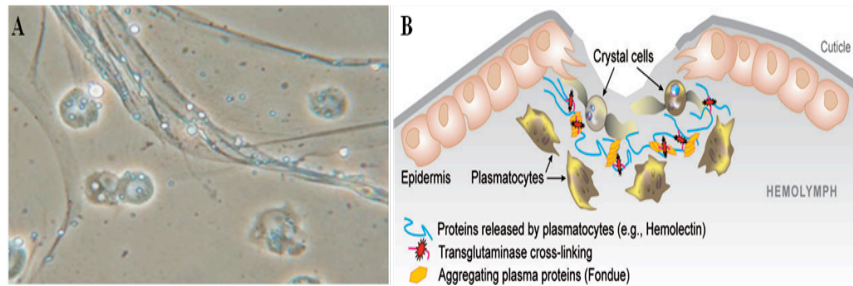
Studi condotti sia su *Drosophila* che su altri insetti sembrano però suggerire che l'importanza della melanizzazione nel combattere le infezioni batteriche, varia tra

diversi organismi. È stato ad esempio dimostrato che il silenziamento della serina proteasi CLIPA8, richiesta per l'attivazione della PO, non altera la sopravvivenza della zanzara *A. gambiae* in seguito ad infezioni di *E. coli* o *S. aureus* (Schnitger 2007). Al contrario, la melanizzazione potrebbe essere importante nel sistema immunitario di *M. sexta*. Per esempio, la virulenza di *Photorhabdus*, patogeno di *M. sexta*, dipende dalla produzione di un particolare composto che inibisce l'attività della PO (Boundy et al 2007). La repressione, inoltre, della PO dell'ospite attraverso RNAi incrementa la suscettibilità al *Photorhabdus* (Boundy et al 2007).

In *Drosophila*, la melanizzazione è particolarmente importante nella difesa contro l'attacco dei parassitoidi. Infatti, mutazioni che distruggono la reazione di melanizzazione compromettono in maniera significativa l'immunità contro il parassitoide *L. bouvardi* (Nappi et al. 1992; Rizki TM, Rizki RM 1990). Inoltre, inibendo la melanizzazione attraverso la sovraespressione della serina Spn27A nell'emolinfa, si è osservata una ridotta capacità dell'ospite di incapsulare e distruggere questo stesso parassitoide (Nappi et al 2005).

### **1.2.5 La coagulazione**

Efficienti meccanismi di coagulazione sono essenziali, in *Drosophila melanogaster* come in tutti gli insetti, per prevenire la perdita di emolinfa in seguito a lesioni della cuticola. Il processo di coagulazione è inoltre un'importante difesa immunitaria in quanto forma rapidamente una barriera all'infezione, immobilizzando i batteri e promuovendone la soppressione. La coagulazione è accompagnata da un incremento nella viscosità dell'emolinfa e dalla formazione di fibre (Scherfer et al 2004). Nelle larve di *Drosophila melanogaster* il coagulo gelatinoso è spesso associato alla presenza di emociti (Fig. 12).



**Fig. 12. A.** La reazione di coagulazione in *Drosophila melanogaster*. Un modello per la formazione del coagulo in un sito di ferita. In seguito alla ferita, i plasmatociti immediatamente rilasciano emolectina ed altre proteine che formano le fibre del coagulo. Per compattare le fibre vengono in aiuto proteine come Fondue, transglutaminasi e proPO, quest'ultima rilasciata dalle "crystal cells". Immagine estratta da Lemaitre Hoffmann 2007 *The Host Defense of Drosophila melanogaster*. **B.** Struttura del coagulo in *Drosophila melanogaster*. Il coagulo si compone di fibre che comprendono anche i plasmatociti. Immagine estratta e modificata da Bidla et al 2005 *Hemolymph coagulation and Phenoloxidase in Drosophila larvae*.

Una volta creata la ferita negli insetti, necessariamente i batteri devono essere bloccati, per evitare una loro invasione nell'emocele, attraverso il coagulo determinato da vari fattori coinvolti nel processo immunitario. Ancora non ci sono conoscenze su come i batteri vengono sequestrati nel coagulo, studi approfonditi hanno escluso l'ipotesi che le PGRPs e le GNBP possano essere coinvolti. Si pensa che i batteri possano essere intrappolati come particelle o possono essere legate chimicamente dall'azione di enzimi come le transglutaminasi o la fenolossidasi che compattano la matrice del coagulo senza coinvolgere il riconoscimento attivo di elicitori microbici da parte del sistema immunitario (Theopold et al 2002, Bidla et al 2005). La coagulazione dell'emolinfa in *Drosophila* è relativamente poco conosciuta rispetto ad altri aspetti della difesa immunitaria, ma comunque attraverso analisi "pull out" e di proteomica, sono stati isolati importanti componenti del processo di formazione del coagulo i quali sono stati sottoposti a diversi e dettagliati studi genetici e cellulari (Karlsson et al 2004, Scherfer et al 2004). Tra questi fattori ben caratterizzati si annoverano l'Emolectina (Goto et al 2001b, Goto et al 2003), la proteina Fondue (Scherfer et al 2006), e l'enzima Transglutaminasi. L'emolectina (Hml) è la proteina maggiormente coinvolta nel fenomeno della coagulazione (Karlsson et al 2004), ha un peso molecolare di circa 400 kDa ed è stata originariamente trovata come

proteina secreta di una linea cellulare Kc167 di *Drosophila melanogaster* (Goto et al 2001b). Studi hanno messo in evidenza che risulta essere costituita da multi-domini, alcuni dei quali sono conservati nei fattori di coagulazione attraverso l'evoluzione tra i vertebrati e gli artropodi (Lesch et al 2007). Il gene *Hml* è espresso negli emociti, in particolare risulta essere espresso in una sottopopolazione di plasmatici e nelle "crystal cells", ma non nei lamellociti (Goto et al 2003); infatti, nel terzo stadio larvale tale gene è espresso esclusivamente nei lobi anteriori delle ghiandole linfatiche che contengono appunto plasmatici e "crystal cells", ma non nei lobi posteriori in cui sono presenti i proemociti. Il gene *Hml* è coespresso sempre o con il gene *Peroxidasin* o con il gene della profenolossidasi, non si osservano mai cellule che esprimono solo il gene *Hml*. Quest'ultimo potrebbe essere considerato un nuovo marcatore cellulare per la classificazione degli emociti (Goto et al 2003). Studi di RNA *interference* hanno messo in evidenza che in assenza del gene *Hml*, nelle larve e negli adulti, non si osserva nessun difetto nello sviluppo, in condizioni normali (Goto et al 2003), quindi, i mutanti sono vitali e fertili indicando che tale gene non è richiesto per la vitalità (Goto et al 2003). Ma inibendo la funzione del gene, mediante saggi di RNA *interference*, si osservano gravi perdite di emolinfa dopo le ferite. Tale fenomeno non è dovuto a difetti di melanizzazione come era stato affermato da Ramet e i suoi collaboratori nel 2001 (Ramet et al 2001), ma alla mancanza della proteina emolectina che contribuisce a diversi aspetti del sigillo della ferita partecipando attivamente quindi al processo della coagulazione (Goto et al 2003). La proteina Emolectina non sembra essere però coinvolta attivamente nella difesa umorale in *Drosophila melanogaster*, infatti, dopo infezioni microbiche le mosche prive del gene *Hml* non manifestano alterazioni nella produzione di AMPs come Dipterina o Drosomicina (Goto et al 2003). L'emolectina inoltre condivide domini conservati con la proteina VWF presente nell'uomo. Tale proteina umana VWF è una glicoproteina del sangue multimerica essenziale per la coagulazione del sangue ed è importante per la formazione delle piastrine (emostasi) (Ruggeri 2003). Dal momento che esiste tale omologia di sequenza è probabile che ci sia anche una corrispondenza funzionale, e quindi l'Emolectina potrebbe contribuire all'aggregazione degli emociti mediante interazioni con altre proteine. E' stato dimostrato che mutanti del gene *Hml*, ottenuti mediante mutagenesi, confermano quanto osservato con l'RNA

*interference*, ovvero, mostrano un grave fenotipo di ridotta formazione della matrice del coagulo e falliscono nel formare le fibre di tale coagulo stesso (Lesch et al 2007). Sia le lipoforine, agenti pro coagulanti, che la proteina Fondue, che sono in grado di controllare l'emostasi negli insetti, possono agire in parallelo alla proteina Emodectina nel sigillare la ferita nei mutanti in cui il gene *hml* manca. Un altro fattore coinvolto nella coagulazione è la proteina Fondue, uno dei primi ad essere stato identificato (Karlsson et al 2004). Il gene *Fondue* (*fon*) codifica per una proteina richiesta per la coagulazione e per l'indurimento del coagulo (Scherfer et al 2006). Studi del profilo di espressione in risposta alle infezioni, dimostrano che il gene *fon* è un gene ad espressione tardiva con il più alto livello di espressione a 48 ore dopo l'infezione (De Gregorio et al 2002). E' stato dimostrato anche che l'espressione di *fon* è fortemente controllata dalla via di segnalazione Toll (De Gregorio et al 2002). Il gene *fon* codifica due trascritti alternativi per una proteina con due isoforme di 565 e 577 amminoacidi rispettivamente (Scherfer et al 2006). Una caratteristica della sequenza amminoacidica della proteina Fondue è la presenza di elementi ripetitivi, che potrebbero influenzare le proprietà biofisiche della proteina; tali ripetizioni includono amminoacidi come glicina, alanina e serina (Scherfer et al 2006). Fondue è una proteina secreta, infatti è una delle proteine presenti maggiormente nell'emolinfa larvale (Vierstraete et al 2003). L'inibizione del gene mediante RNA *interference* genera un fenotipo larvale caratteristico, le larve assumono una forma "banana like", causando letalità negli stadi pupali, dimostrando che la proteina Fondue è un importante fattore durante la metamorfosi. A differenza dell'Emodectina che è una proteina richiesta esclusivamente dagli emociti e non dai corpi grassi, Fondue è principalmente secreta nell'emolinfa e nei corpi grassi. Ciò indicherebbe che sia gli emociti che le proteine umorali sono coinvolte nella formazione del coagulo (Scherfer et al 2006). Nel corso del processo di coagulazione dell'emolinfa degli insetti, Fondue interagisce con altre proteine del coagulo Eig71Ee. In seguito ad una ferita, infatti, una gran quantità di queste proteine rimane nel siero dopo la coagulazione in caso in cui la funzione di *fon* è inibita attraverso l'RNA *interference*. Questo accade o perché Eig71Ee lega direttamente Fondue (ed è poi incorporato nel coagulo) o perché Eig71Ee può incorporarsi meglio nella matrice del coagulo quando è presente anche Fondue (Lindgren et al 2008). Un altro fattore altamente implicato nel processo della

coagulazione è l'enzima Transglutaminasi. Esso è coinvolto nella reticolazione del coagulo catalizzando legami covalenti tra residui di glutammina e lisina. Tale enzima catalizza almeno una parte della reazione di indurimento e compattazione del coagulo soffice negli insetti (Scherfer et al 2006). In *Drosophila melanogaster* un singolo gene codifica per tale enzima ed è espresso negli emociti (Johansson et al 2005); Risulta essere importante nel processo di coagulazione in *Drosophila melanogaster* in funzione del fatto che anche in altri organismi questo enzima è coinvolto in tale processo (Li et al 2002). L'enzima Transglutaminasi ha come ottimo substrato la proteina Fondue, grazie alla presenza in quest'ultima di molti residui di glutammina (Karlsson et al 2004). Recentemente è stato proposto un meccanismo immunitario innato conservato, basato sulla capacità dell'enzima transglutaminasi di usare un substrato microbico per sequestrare e immobilizzare i batteri nel coagulo durante il processo di coagulazione (Wang et al 2010). Ciò potrebbe dimostrare, come già accennato precedentemente, che i fattori di coagulazione si legano direttamente ai microbi nel processo di coagulazione dell'emolinfa (Wang et al 2014). La tappa finale del processo di coagulazione prevede la produzione di melanina per uccidere i batteri con intermedi tossici rilasciati durante il processo di melanizzazione (Scherfer et al 2004, Theopold et al 2004), ma la coagulazione delle cellule del sangue è indipendente dall'attività della fenolossidasi, la quale partecipa solo in parte al processo di formazione del coagulo (Goto et al 2003); infatti il processo di coagulazione si verifica anche in mutanti che non esprimono la fenolossidasi (Scherfer et al 2004); in effetti Bidla e i suoi collaboratori hanno dimostrato che i mutanti *Bc* e *lz*, in cui non si registra attività della fenolossidasi, sono capaci di bloccare il sanguinamento dovuto a piccole ferite ed è stato dimostrato che comunque in tali mutanti il coagulo soffice iniziale si forma (Bidla et al 2005). Quindi la fenolossidasi non è necessaria per la formazione del coagulo primario soffice (Scherfer et al 2004), ma il processo di melanizzazione è chiaramente visibile nel coagulo delle larve selvatiche (Bilda et al 2005). La fenolossidasi, influenzando le proprietà fisiche del coagulo, agisce per reticolare il coagulo stesso che risulta in una matrice più dura ma allo stesso tempo più fragile (Bilda et al 2005).



### 1.3 La risposta cellulare

In *Drosophila melanogaster* la risposta immunitaria cellulo-mediata coinvolge cellule circolanti nell'emolinfa, conosciute come emociti (Honti et al 2010). Le larve di *Drosophila* contengono diverse migliaia di emociti, i quali possono essere distinti in tre tipi sulla base delle loro caratteristiche funzionali e strutturali: plasmacociti, “*crystal cells*” e lamellociti (Fig.13) (Rizki T.M. 1978, Lanot et al 2000).

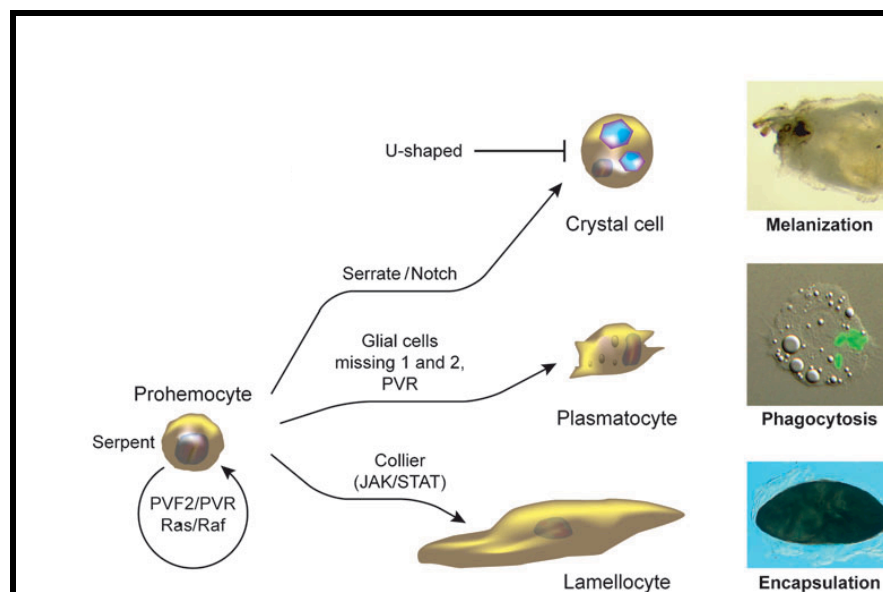
I plasmacociti sono cellule rotonde, non-adesive, omologhe dei macrofagi dell'uomo, con un diametro di 8-10  $\mu\text{m}$  e rappresentano il 95% degli emociti circolanti nell'emolinfa in tutti gli stadi di sviluppo (Lanot et al 2001). Essi sono deputati alla fagocitosi e partecipano all'incapsulamento (vedi sotto) e alla produzione di peptidi antimicrobici (AMPs) (Brehelin M. 1982). Nell'embrione, i plasmacociti fagocitano corpi apoptotici formati durante i processi di sviluppo (Franc et al 1999). Nelle larve e negli adulti sono responsabili della fagocitosi di batteri patogeni e funghi (Kock et al 2005, Ramet et al 2001). Allo stadio pupale, infine, partecipano alla metamorfosi attraverso la fagocitosi, la digestione ed il riciclo dei tessuti larvali (Lanot et al 2001).. I plasmacociti potrebbero inoltre essere richiesti per trasmettere un segnale dal tratto digestivo ai corpi grassi in seguito ad infezione orale da batteri Gram negativi come, ad esempio, *E. carotovora* (Charroux 2009).

Le “*crystal cells*” sono simili ai plasmacociti nelle dimensioni e morfologia, ma si distinguono per le inclusioni simili ai cristalli presenti nel loro citoplasma, ed inoltre contengono profenolossidasi. Esse sono fragili, si distruggono rapidamente e rilasciano il loro contenuto nell'emolinfa in seguito all'attivazione.

Il terzo ed ultimo tipo di emociti di *Drosophila melanogaster*, i lamellociti, sono cellule larghe e piatte di 25-40  $\mu\text{m}$ , non fagocitiche, che formano capsule intorno a corpi estranei presenti nell'emocele, come le uova e le larve dei parassitoidi. Inoltre, come già accennato nel capitolo in cui sono stati illustrati i processi di melanizzazione, essi producono una profenolossidasi, grazie alla quale, una volta formata, la capsula viene melanizzata (Nam et al 2008). Sono raramente visibili in larve sane, ma si differenziano in maniera massiva in seguito all'attacco da parte

di parassitoidi, arrivando a rappresentare il 50% delle cellule immunitarie in circolo (Brehelin M. 1982, Russo et al 2001).

Gli emociti larvali sono distribuiti in tre maggiori compartimenti: le ghiandole linfatiche, gli emociti circolanti e una popolazione di cellule sessili attaccate al tessuto epiteliale che si mobilitano in seguito all'infezione (Lanot et al 2000, Holz et al 2003). Recentemente Markus e i suoi collaboratori sono giunti alla conclusione che solo una piccolissima frazione dei lamellociti che appaiono in circolo nel corso di una risposta immunitaria cellulare ha origine dalle ghiandole linfatiche e che queste cellule che derivano dalle ghiandole linfatiche entrano in circolo in uno stadio relativamente tardivo (Markus et al 2009). I risultati del lavoro di Markus, quindi, suggeriscono che gli emociti sessili sono il maggior compartimento ematopoietico nella larva, e fungono da fonte di precursori di lamellociti all'inizio della risposta immunitaria.

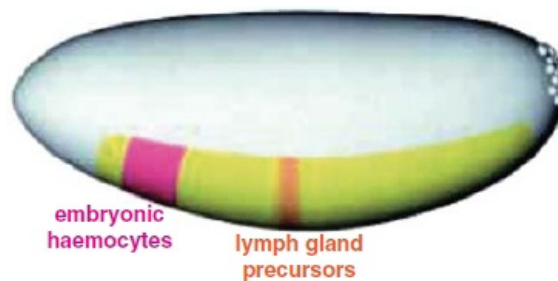


**Fig. 13.** Gli emociti di *Drosophila melanogaster* e la loro funzione. Le cellule immunitarie in *Drosophila melanogaster* si dividono in plasmatociti deputati alla fagocitosi, “crystal cells” coinvolte nella melanizzazione e lamellociti coinvolti nell’incapsulamento di corpi estranei come le uova dei parassitoidi. Immagine estratta e modificata da Lemaitre Hoffmann 2007 *The Host Defense of Drosophila melanogaster*.

### 1.3.1 L'ematopoiesi

L'ematopoiesi in *Drosophila* avviene in due fasi separate temporalmente e spazialmente dando origine alle tre linee di emociti (Meister Lagueux 2003) descritte precedentemente.

La prima ondata ematopoietica ha luogo negli embrioni, a livello del mesoderma procefalico (Rehorn et al 1996) (Fig.14), da cui hanno origine proemociti non differenziati che subiscono quattro rapide divisioni cellulari durante gli stadi embrionali da 8 a 11 (Tepass et al 1994). Successivamente, i proemociti bloccano la loro proliferazione e passano ad un programma di differenziamento che porta ad un numero prefissato di 600-800 emociti, comprendenti almeno l'80-90% dei plasmaciti differenziati, che colonizzano l'intero embrione (Tepass et al 1994). Contemporaneamente, una seconda popolazione di cellule si differenzia nelle vicinanze della regione anteriore dell'intestino, rimanendo localizzata intorno al proventricolo (Labestky et al 2000); tali cellule sono le “*crystal cells*”.

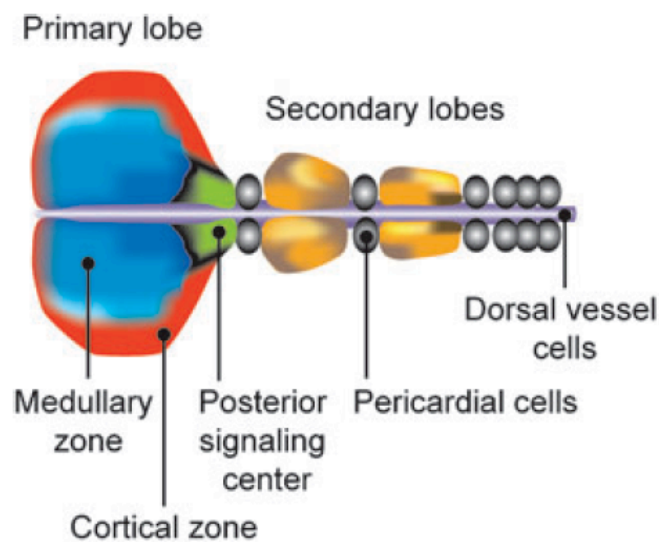


**Fig. 14.** Ematopoiesi embrionale. Gli emociti embrionali originano dal mesoderma procefalico (*embryonic hemocytes*). Immagine estratta e modificata da Holz et al 2003 *The two origins of hemocytes in Drosophila*.

Una seconda ondata ematopoietica ha luogo nella larva in un organo specializzato, la ghiandola linfatica (Lanot et al 2000). I precursori della ghiandola linfatica derivano dal mesoderma laterale, migrano dorsalmente e successivamente crescono durante il primo e il secondo stadio larvale (Krzemien et al 2007). Al terzo stadio larvale, la ghiandola linfatica rappresenta il sito di maggiore produzione di emociti durante tutto lo sviluppo larvale (Lanot et al 2001),

rappresentando quindi una riserva di emociti che diventeranno attivi durante la metamorfosi.

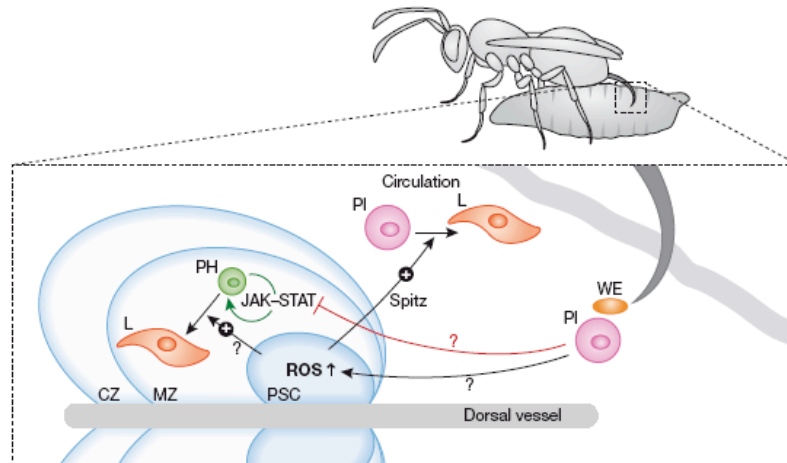
La ghiandola linfatica si compone di lobi accoppiati posizionati lungo il vaso dorsale, un organo circolatorio con funzione simile al cuore nei vertebrati (Jung et al 2005; Makhijani et al 2011). I lobi primari anteriori delle ghiandole linfatiche mature sono organizzati in una zona midollare (MZ) contenente i proemociti, una zona corticale (CZ) contenenti due tipi di emociti differenziati, i plasmatociti e le “*crystal cells*”, come anche progenitori intermedi, e un centro di segnale posteriore (PSC) (Fig.15).



**Fig. 15.** La ghiandola linfatica di *Drosophila melanogaster*. La ghiandola linfatica si dispone lungo il vaso dorsale e si compone di vari lobi divisi in lobi primari e secondari. Quelli primari comprendono la zona midollare (MZ), la zona corticale (CZ) e il centro di segnale posteriore (PSC). Immagine modificata da Lemaitre Hoffmann 2007 *The Host Defense of Drosophila melanogaster*.

Le cellule del PSC mantengono l'equilibrio tra i proemociti e gli emociti differenziati (Pennetier et al 2012), tali cellule negli embrioni sono regolate da due fattori trascrizionali, la proteina Hox Antennapedia (Antp) e Collier (Col) (Crozatier et al 2008). I segnali inviati dal PSC, come la proteina Hedgehog (Hh), agiscono in maniera non autonoma per mantenere l'attività di Hh stessa e della via di segnalazione JAK/STAT nella zona midollare, in questo modo si preservano un gruppo di cellule progenitrici attraverso lo sviluppo larvale (Crozatier et al 2008). In questo modo le cellule del PSC controllano l'omeostasi (Crozatier et al 2011).

E' stato dimostrato che l'attività di segnalazione della proteina Dpp/BMP nelle cellule del PSC controlla le dimensioni delle nicchie ematopoietiche; infatti, in assenza del segnale della proteina BMP, il numero di cellule PSC incrementa e di conseguenza gli emociti non si differenziano (Pernetier et al 2012). L'attività del gene *Collier* nel PSC controlla sia l'espressione della proteina Hh, sia le dimensioni della nicchia ematopoietica mediante la restrizione del segnale della proteina BMP alle cellule PSC. Il PSC, oltre a fungere da nicchia per i progenitori di emociti, è coinvolto anche nel coordinare la risposta immunitaria dell'ospite per combattere le infezioni dei parassitoidi (Meister and Ferrandon 2012). Sebbene le uova dei parassitoidi sono prevalentemente incapsulate dai lamellociti che originano dai plasmaciti in circolo, il PSC è richiesto per guidare il loro transdifferenziamento. E' stato proposto che un segnale proveniente dai plasmaciti dopo il riconoscimento del parassitoide permette al PSC di guidare il programma dei lamellociti nelle ghiandole linfatiche (Meister, Ferrandon 2012) (Fig. 16). È stato dimostrato che la parassitizzazione porta ad un aumento dei livelli di ROS nelle cellule PSC (Sinenko et al 2011), inoltre l'inattivazione del recettore EGF Spitz nel PSC impedisce la formazione di lamellociti circolanti sia dopo l'infestazione di parassitoidi che dopo la produzione in maniera artificiale dei ROS nelle cellule PSC (Sinenko et al 2011). E' stato proposto che Spitz agisce come una citochina che guida il transdifferenziamento dei plasmaciti presenti nell'emocele, che è elicitato dalla segnalazione di ROS nelle cellule PSC. Esiste una versione alternativa che determina la funzione di Spitz. Tale versione afferma che il recettore Spitz fornisce un segnale di sopravvivenza che protegge gli emociti dall'attacco dei parassitoidi (Meister, Ferrandon 2012).



**Fig. 16.** Reazione ematopoietica alle infezioni nelle larve di *Drosophila melanogaster*. (PH proemociti, L lamellociti, PI plasmatociti, PSC centro di segnale posteriore, MZ zona midollare, CZ zona corticale, WE uova del parassitoide). Quando un parassitoide depone l'uovo nella larva, esso viene riconosciuto dai plasmatociti che probabilmente inviano un segnale alle ghiandole linfatiche. Ciò inibisce la via di segnalazione JAK-STAT nei proemociti presenti nella zona midollare della ghiandola linfatica, facendo in modo che tali cellule immunitarie possano andare incontro a differenziamento. In tale condizione di stimolo immunitario aumenta anche il livello di ROS (specie reattive dell'ossigeno) nel PSC inducendo un transdifferenziamento dei plasmatociti in lamellociti e inducendo il differenziamento dei proemociti in lamellociti. Un segnale emesso dal PSC, il recettore EGF Spitz, è necessario affinché le cellule circolanti adottino attività di lamellociti. Immagine modificata da Meister e Ferrandon 2012 *Immune cell transdifferentiation: a complex crosstalk between circulating immune cells and the haematopoietic niche*.

Studi genetici su mutanti hanno permesso di capire come la proliferazione degli emociti è finemente regolata (Meister Lagueux 2003) in *Drosophila melanogaster*. È stato dimostrato che, l'omologo in *Drosophila* di PDGFR/VEGFR, la proteina PVR insieme con PVF2 svolge un ruolo cruciale nel controllare la proliferazione dei proemociti (Munier et al 2002), infatti, una over-espressione del gene PVF2 nelle larve determina un eccessivo aumento dei proemociti. Non è stato ancora documentato se il segnale di proliferazione prodotto da PVF/PVF2 è trasmesso attraverso la via di segnalazione Ras/Rak/MAPK, che coinvolge chinasi (Meister Lagueux 2003). Studi progressi risalenti al 1995, hanno messo in evidenza che le vie di segnalazione JAK/STAT e

Toll sono coinvolte nel regolare il numero degli emociti circolanti (Lemaitre et al 1995). Gli emociti sono regolati anche dal fattore con dominio GATA, *Serpent* (*Srp*). Il gene *Serpent* codifica per una proteina di 949 amminoacidi (Rehorn et al 1996), e i 680 amminoacidi al C-terminale (incluso il dominio a dita di zinco) sono identici alla sequenza di ABF o al fattore dGATAb (Abel et al 1993). Rehorn e i suoi collaboratori hanno dimostrato che l'espressione del gene *Srp* nel mesoderma anteriore dell'embrione indica che quello è il luogo da cui ha inizio lo sviluppo dei proemociti (Rehorn et al 1996). E' stato proposto che il gene *Serpent* potrebbe essere richiesto sia per controllare gli emociti primordiali all'interno del mesoderma durante gli stadi precoci dell'embriogenesi, sia più tardi per controllare l'espressione genica durante la maturazione degli emociti stessi (Meister Lagueux 2003). L'ematopoiesi in *Drosophila melanogaster* è controllata da diversi fattori e vie di segnalazione. Per determinare il feto dei plasmaciti negli embrioni, ovvero il differenziamento dei proemociti in plasmaciti, sono richiesti due proteine con caratteristici domini "zinc finger" a dita di zinco, queste proteine sono Gcm (*Glia cell missing*) (Lebestky et al 2000) e Gcm2 (Alfonso and Jones 2002). E' stato oltretutto dimostrato che Gcm svolge la sua funzione in *Drosophila* anche allo stadio larvale. Per quanto riguarda il destino delle "crystal cells", nelle larve, esso è regolato dalla via Serrate/Notch (Lebestky et al 2003) e dal fattore di trascrizione Lozenge Runx1-correlato (Labestky et al 2000). Lo sviluppo delle "crystal cells" è contrastato da *U-shaped* un fattore omologo di *Friend-of-GATA* (Fosset et al 2001). Nel caso dei lamellociti ancora non sono stati determinati fattori in grado di determinare il loro sviluppo (Meister Lagueux 2003), ma mutazioni in tre importanti geni sono da tempo conosciute essere in grado di stimolare la produzione dei lamellociti. Queste mutazioni sono: "gain of function" dei geni della via di segnalazione *Toll* e *JAK*, e la mutazione per perdita di funzione nel gene *Cactus*. Molti dei geni coinvolti nel controllo dell'ematopoiesi di *Drosophila* hanno la loro controparte omologa nei mammiferi come ad esempio i fattori GATA, la via Notch e la via di segnalazione JAK/STAT (Meister Lagueux 2003). E' stato inoltre dimostrato che il gene *Chn* può controllare lo sviluppo dei lamellociti; infatti una over-espressione di tale gene nei plasmaciti induce il differenziamento dei lamellociti sia in circolo che nelle ghiandole linfatiche, ed il suo "knockdown" riduce il differenziamento del 25% (Stofanko et al 2010). Recentemente è stato dimostrato che l'ematopoiesi larvale

ha inizio con la colonizzazione di microambienti ematopoietici da parte di cellule immunitarie già esistenti, senza coinvolgere la formazione *de novo* dei proemociti o il differenziamento di progenitori già esistenti (Makhijani et al 2011). Gli emociti embrionali differenziati arrivano allo stadio larvale, colonizzano sacche ematopoietiche (tasche muscolari epidermiche) e proliferano in questi posti (Makhijani et al 2011), ciò spiega il motivo per cui gli emociti embrionali persistono negli stadi post embrionali (Holz et al 2003). Attraverso tutta la vita larvale, gli emociti cosiddetti residenti sono in uno stato stazionario dinamico, scambiandosi tra i diversi ambienti ematopoietici (Makhijani et al 2011). Il microambiente in cui gli emociti risiedono ha una proprietà attrattiva e/o adesiva (Makhijani et al 2011), in quanto è stato dimostrato che anche se gli emociti si disperdono, successivamente ritornano spontaneamente nel loro microambiente, in quella che può essere definita la loro “casa”, in meno di un’ora (Makhijani et al 2011). Un ruolo funzionale molto importante nell’accasamento degli emociti del loro microambiente ematopoietico, è svolto dal sistema nervoso periferico (PNS) (Makhijani et al 2011). Il sistema nervoso periferico larvale è composta da vari gruppi di neuroni ventrali, dorsali e laterali ripetuti in modo segmentale. Ciascun segmento contiene gruppi di organi cordotonali (*ch*), (organi di senso costituiti da cellule stirate a guisa di corda, provviste di bastoncelli o filamenti rigidi, serve alla percezione delle vibrazioni), organi sensoriali esterni (*es*) e neuroni multi dendritici (*md*), che esercitano processi dendritici in tutte le aree del corpo larvale (Bodmer et al 1989). Gli emociti residenti si associano con i corpi cellulari e con le estensioni di diversi tipi di neuroni nel PNS laterale e dorsale che localizza insieme alla sacca ematopoietica formando la zona laterale (“*lateral patch*”) e la striscia dorsale (“*dorsal stripe*”) di emociti (Makhijani et al 2011). E’ stato dimostrato quindi che gli emociti larvali dipendono funzionalmente dal PNS che funziona come microambiente trofico e attrattivo per tali cellule immunitarie (Makhijani et al 2011). Studi sul mutante *Atonal (ato)*, o su larve geneticamente prive di neuroni, per esempio deficienti nell’organo cordotonale e pochi neuroni *md*, hanno messo in evidenza che in tali situazioni si osserva un progressivo declino apoptotico negli emociti e un incompleto profilo di emociti residenti (Makhijani et al 2011). Lo sviluppo ematopoietico, l’omeostasi e la risposta immunitaria nella larva di *Drosophila* sono coordinate dall’anatomica e funzionale connessione che esiste tra il PNS e le cellule del sangue. Tali

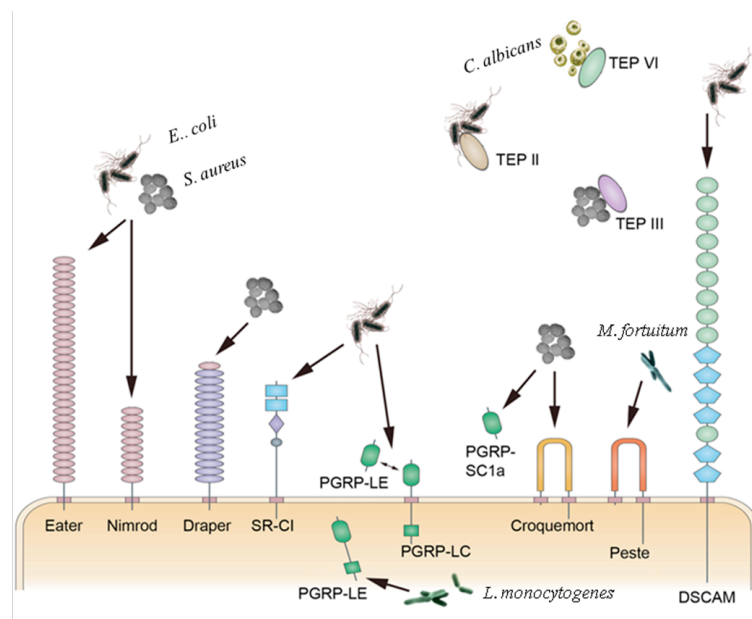


meccanismi potrebbero svolgere un ruolo importante anche nell'ematopoiesi dopo lo stadio larvale (Makhijani et al 2011).

I due maggiori meccanismi della risposta cellulare sono la fagocitosi e l'incapsulamento.

### **1.3.2 La fagocitosi**

La fagocitosi è un importante meccanismo di difesa immunitaria conservato attraverso l'evoluzione (Stuart et al 2005), un processo cellulare che prevede l'eliminazione di microrganismi dannosi attraverso il loro inglobamento e la distruzione dei residui dell'apoptosi coinvolgendo riarrangiamenti dinamici della membrana plasmatica (Shim et al 2010). Le principali cellule del sistema immunitario coinvolte nella fagocitosi sono i plasmotociti, che ho già descritto nel paragrafo della risposta cellulare. La fagocitosi è un complesso processo a tappe che richiede la cooperazione di numerose proteine ed eventi di segnale (Ulvila et al 2011). La prima tappa di questo processo prevede il riconoscimento delle particelle bersaglio, le quali vengono ingerite in seguito al rimodellamento del citoscheletro e dell'actina, e poi distrutte (Ulvila et al 2011) all'interno del fagosoma (Stuart and Ezekowitz 2008; Ulvila et al, 2011), attraverso enzimi lisosomiali, specie reattive dell'ossigeno e ossido nitrico. Nell'ambito del riconoscimento dei patogeni invasori, in *Drosophila melanogaster*, sono state identificate diverse proteine recettori ad azione fagocitaria deputate a tale riconoscimento. Il riconoscimento delle particelle da inglobare avviene attraverso le proteine PRRs (Fig. 17), e principalmente coinvolti nel riconoscimento microbico durante la fagocitosi sono i recettori con motivi ripetuti di tipo "EGF" (fattore di crescita epidermico). Le ripetizioni di tipo EGF sono abbondanti domini di proteine che giocano un ruolo nelle interazioni extracellulari proteina-proteina come l'adesione, la coagulazione e l'interazione ligando-recettore, contengono circa 40 amminoacidi che comprendono sei cisteine coinvolte in ponti disolfuro (Campbell and Bork 1993). Le proteine che possiedono tale dominio sono Draper, Nimrod e Eater.



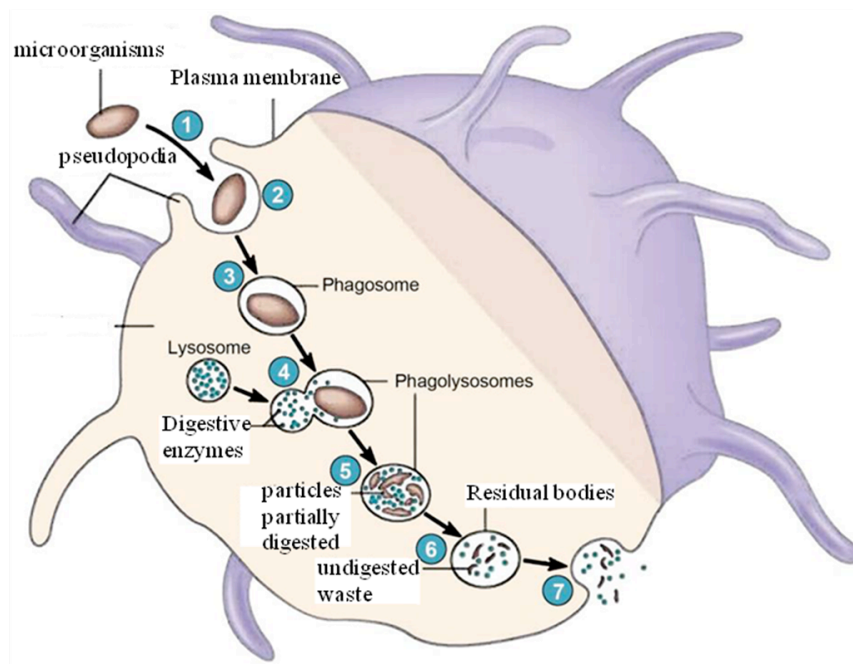
**Fig. 17.** Principali PRR coinvolte nella fagocitosi di *Drosophila melanogaster*. Immagine estratta e modificata da Ulvila et al 2011 *Drosophila phagocytosis- still many unknowns under the surface*.

Il gene *Draper* codifica per una proteina transmembrana, il cui dominio extracellulare contiene ripetizioni dei motivi di tipo EGF. Tale proteina è implicata nella fagocitosi di cellule apoptotiche (Manaka et al 2004) attraverso il riconoscimento di un ligando Pretaporter, ovvero una proteina del reticolo endoplasmatico localizzata sulla superficie cellulare durante l'apoptosi (Kuraishi et al 2009). La proteina Draper è implicata nella fagocitosi di *E. coli* e di *S. aureus*, oltre che nell'autofagia (Manaka et al 2004, Hashimoto et al 2009, McPhee et al 2010). La proteina Nimrod è, invece, una proteina transmembrana di circa 90-100 kDa con 10 caratteristiche ripetizioni di tipo EGF e con sei residui di cisteina (Kurucz et al 2007). Il gene *Nimrod* è espresso nei plasmatociti. Questo gene codifica per una proteina che rappresenta il fattore più importante coinvolto nella fagocitosi di *S. aureus* mediata dai plasmatociti e svolge un ruolo ridondante nella fagocitosi di *E. coli*. Tale proteina potrebbe essere coinvolta anche nei meccanismi di adesione cellulare (Kurucz et al 2007). E' stato osservato che l'over-espressione del gene *Nimrod* non compromette il legame dei batteri alla superficie cellulare dei plasmatociti (Kurucz et al 2007). Un'altra proteina PRR coinvolta nel riconoscimento microbico durante la fagocitosi è Eater.

Quest'ultima è altamente coinvolta nel riconoscimento, nel legame alla superficie cellulare e nella fagocitosi di batteri in *Drosophila melanogaster* (Kocks et al 2005). La proteina Eater si presenta come una proteina transmembrana di tipo 1, il cui dominio extracellulare della proteina Eater comprende una ripetizione di 32 motivi di tipo EGF non dipendenti dal calcio, e tale proteina riconosce i batteri attraverso 4 di questi motivi EGF posizionati all'N-terminale (Kocks et al 2005). Il gene *Eater* si esprime nei plasmatociti e in tutti i lobi delle ghiandole linfatiche, l'organo ematopoietico larvale, indicando che tale gene è espresso attraverso lo sviluppo degli emociti larvali. E' stato dimostrato che il gene *Eater* non è espresso nei lamellociti e ne tanto meno nelle "crystal cells" (Kocks et al 2005). In uno studio è stato dimostrato che Eater è un recettore "spazzino" che può agire sulla superficie cellulare come recettore dei microrganismi o può agire come un complesso recettore, i cui i 199 amminoacidi in posizione N-terminale partecipano direttamente al legame microbico (Kocks et al 2005). Il gene Eater è abbastanza importante per la fagocitosi in *Drosophila melanogaster*, infatti, alcuni studi hanno messo in evidenza che la perdita di funzione del gene *Eater* negli emociti compromette l'efficienza di fagocitare i batteri; inoltre, è stato dimostrato che anche in adulti di *Drosophila* in assenza del gene *Eater* la fagocitosi è altrettanto compromessa (Kocks et al 2005). Nel 2005, analisi di RNA interference associato a studi di profili di espressione hanno dimostrato che Eater è il maggior recettore della fagocitosi e che da solo copre il 60-70% dell'attività fagocitaria di batteri Gram positivi e di Gram negativi (Kocks et al 2005). Oltre alla proteina Eater, altri recettori "spazzino" "scavenger receptor" (SR), coinvolti nel riconoscimento durante la fagocitosi in *Drosophila melanogaster*, sono SR-C1, Peste e Croquemort. Le proteine SR sono recettori di superficie cellulare capaci di legare le molecole anioniche di molteplici microrganismi. E' un recettore "spazzino" di classe C1 conservato attraverso l'evoluzione dagli insetti ai mammiferi e rappresenta il sistema più primitivo di riconoscimento dei batteri. Il gene *SR-C1* si esprime negli emociti durante lo sviluppo embrionale ed è over-espresso in tali cellule immunitarie in seguito ad uno stimolo batterico (Irving et al 2005). Ad oggi, il suo ruolo nella fagocitosi non è ancora chiaro in quanto una sua mutazione ha poca influenza sulla fagocitosi, nonostante ciò è in grado di riconoscere batteri Gram positivi come *S. aureus* e batteri Gram negativi come *E. coli*, ma non è in grado di riconoscere i lieviti (Ramet et al 2001). La proteina

Peste è invece un recettore “spazzino” di classe B che non è in grado di internalizzare batteri Gram negativi come *E. coli* o batteri Gram positivi come *S. aureus* (Philips et al 2005), invece è richiesto per fagocitare batteri come *Mycobacterium fortuitum*. La proteina Peste è coinvolta nel riconoscimento di *L. monocytogenes* (Agaïsse et al 2005). L’altro recettore “spazzino” è Croquemort. Un recettore di classe B1 e membro della famiglia CD36. E’ una proteina coinvolta nel riconoscimento e nella fagocitosi delle cellule di origine apoptotica da parte dei plasmacociti durante l’embriogenesi. E’ stato dimostrato che induce la fagocitosi di *S. aureus* in adulti di *Drosophila* (Franc et al 1996, Franc et al 1999). Altre proteine che sono coinvolte nel riconoscimento microbico, che precede il processo di internalizzazione, sono le PGRP, le stesse proteine che sono coinvolte nel riconoscimento microbico nell’immunità umorale innata, e sono PGRP-SC1a, PGRP-LC e PGRP-LE. Le proteine PGRP-SC1a e PGRP-LC sono coinvolte nella fagocitosi di *E. coli* (Ramet et al 2002b) e di *S. aureus* (Garver et al 2006). La proteina PGRP-LE agisce con PGRP-LC nella resistenza ad *E. coli* (Takehana et al 2004). Ulteriori proteine coinvolte nel riconoscimento microbico sono la proteina Dscam, Down syndrome cell adhesion molecule, e le proteine TEPs, thioester containing proteins. La proteina Dscam è un recettore della superfamiglia delle immunoglobuline; il gene è composto di diversi e variabili esoni fiancheggiati da costanti esoni. Watson e i suoi collaboratori hanno proposto che il ruolo della proteina Dscam nella fagocitosi è quello di legarsi ad *E. coli* e funzionare sia da recettore fagocitico sia come opsonina portando ad una specificità, come quella tipica degli anticorpi nei mammiferi, nell’immunità cellulare di *Drosophila melanogaster* (Watson et al 2005). Le proteine TEPs sono di fatto dei fattori di segnalazione (opsonine) e fanno parte di un gruppo di proteine che comprendono  $\alpha$ -2 macrotubuline e i fattori del complemento C3/C4 tipiche dei vertebrati. In *Drosophila melanogaster* sono state trovate sei proteine TEPs (Lagueux et al 2000), di cui solo tre sono prodotte in eccesso dopo uno stimolo immunitario (Zdobnov et al 2002): TEP II TEP III e TEP IV che sono implicate nella fagocitosi di *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans* (Stroschein-Stevenson et al 2006-2009). Durante il processo di fagocitosi, dopo il riconoscimento del bersaglio segue la fase di internalizzazione del bersaglio microbico. Affinché ciò avvenga è necessario che la membrana plasmatica vada incontro a riarrangiamento con rimodellamento del citoscheletro actina-dipendente (Paladi et

al 2004). La fine regolazione dell'assemblaggio dei filamenti periferici di actina è necessaria per generare appropriate protrusioni cellulari (Shim et al 2010). Il rimodellamento della membrana plasmatica permette la formazione di una depressione (coppa fagocitaria) e l'estensione dei pseudopodi serve per circondare la particella bersaglio. Tale coppa fagocitaria si invagina e dopo la fusione dei pseudopodi la particella bersaglio viene internalizzata in un vescicola intracellulare che deriva dalla membrana plasmatica: il fagosoma. Il fagosoma, presente in forma precoce va incontro a maturazione e si fonde con le vescicole intracellulari come endosomi e lisosomi, portando alla formazione del fagolisosoma (Fig. 18). Le vescicole al loro interno contengono un pH acido ed enzimi digestivi molto attivi che bloccano la replicazione dei batteri e li distruggono (Kinchen et al 2008).



**Fig. 18.** Rappresentazione schematica del processo di fagocitosi dei microrganismi in *Drosophila melanogaster*. Immagine estratta e modificata da <http://classes.midlandstech.edu>.

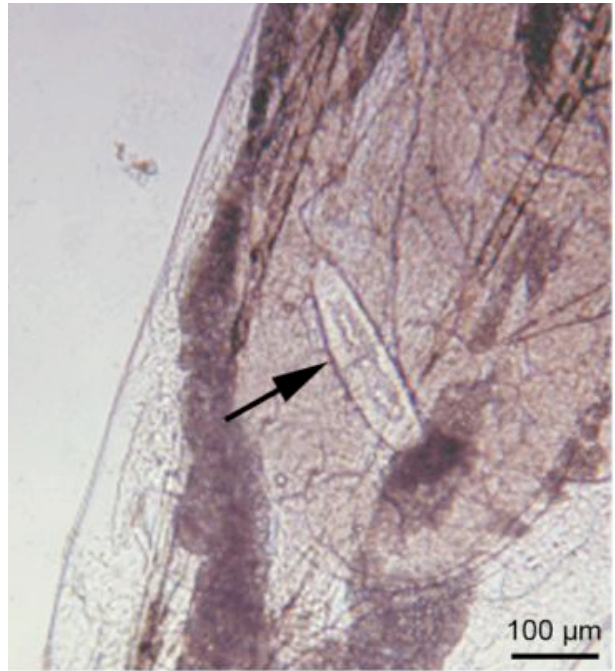
Diversi modelli di internalizzazione sono stati descritti per spiegare il processo della fagocitosi negli insetti, come ad esempio il modello zipper, il modello trigger e la macropinocitosi (Pearson et al 2003, Costa et al 2005). Quest'ultimo

modello permette l'internalizzazione simultanea di un gran numero di particelle microbiche, infatti, le particelle vengono ingerite in un cospicuo volume di liquido extracellulare. Questa internalizzazione viene effettuata attraverso la fusione di protrusioni extracellulari di membrana. I fagosomi sono generalmente larghi e le loro membrane non sono contigue alle particelle internalizzate. Il modello zipper si avvale, invece, del riconoscimento dell'integrità della superficie delle particelle attraverso le interazioni recettore-ligando – opsonina-recettore. L'internalizzazione si verifica attraverso l'emissione di pseudopodi che aderiscono alla superficie della particella estranea. Il modello trigger prevede, invece, l'internalizzazione della particella bersaglio senza la formazione di pseudopodi, la particella sembra affondare nel plasmacita senza avere contatto con la membrana plasmatica. Nell'ambito dei movimenti e riarrangiamenti che l'actina citoscheletrica deve necessariamente subire durante la fagocitosi, diverse proteine della famiglia Rho GTPase sono state scoperte svolgere un ruolo importante durante la migrazione cellulare immunitaria (Massol et al 1998). Le proteine CDC42 e Rac1 sono coinvolte nella formazione di filopodi e lamellopodi, rispettivamente. Queste proteine RhoGTPase sono reclutate alla membrana plasmatica, sulle quali entrano in contatto con le particelle estranee e inducono l'assemblaggio di actina per generare la coppa fagocitaria (Cox et al 1997). In *Drosophila* è stata identificata una proteina Rab35, appartenente alla famiglia Rab GTPase, come regolatore specifico di actina citoscheletrica nella membrana plasmatica e sembra essere coinvolta nella formazione di filopodi e lamellopodi (Shim et al 2010). E' stato dimostrato che Rab35 dirige il reclutamento di CDC42 e Rac1 al sito della formazione di filopodi e lamellopodi, ciò implica che Rab35 è un regolatore immunitario di trasporto di vescicole all'interno del complesso rimodellante di actina (Shim et al 2010). Studi di analisi di RNA *interference* oltre ad identificare tutti i recettori coinvolti nella fagocitosi dei microrganismi, hanno identificato centinaia di potenziali componenti intracellulari che partecipano alla fagocitosi di numerosi microrganismi, ma comunque, l'esatto meccanismo, gli eventi di interazione proteica e di segnalazione dopo il riconoscimento dei patogeni è ancora oggetto di studio (Ulvila et al 2011). Brennan ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che un gene, *Psidin*, che codifica per una proteina lisosomiale, è richiesto dagli emociti sia per la degradazione in seguito a fagocitosi dei batteri, sia è richiesto per l'induzione di

Defensina nei corpi grassi (Brennan et al 2007). Ciò stabilisce una connessione tra il riconoscimento dei patogeni e l'induzione dei peptidi antimicrobici da parte dei corpi grassi. Questo porta a suggerire che gli emociti potrebbero essere cellule che fagocitano i microrganismi e successivamente espongono antigeni *non-self* ai corpi grassi che a loro volta vengono indotti a produrre AMPs (Brennan et al 2007). Studi recenti hanno dimostrato che la fagocitosi e l'induzione di AMPs hanno effetti additivi (Nehme et al 2011), ma non sono influenzati l'uno dall'altro, indicando che negli adulti di *Drosophila melanogaster* esistono due sistemi indipendenti che però agiscono insieme nel combattere le infezioni (Nehme et al 2011). Una plausibile conclusione che si trae dai numerosi studi sulla fagocitosi è che essa appare, dal punto di vista molecolare, conservata tra *Drosophila* e i mammiferi, infatti, in entrambi i casi, i geni identificati codificano per proteine correlate all'actina oltre che correlate al meccanismo di endocitosi e ai mediatori del traffico vescicolare intracellulare (Ulvila et al 2011).

### **1.3.3 L'incapsulamento**

L'incapsulamento è una drammatica reazione di difesa messa in atto dagli insetti contro l'attacco di parassitoidi entomofagi, endofagi, dell'ordine Hymenoptera, che rilasciano le loro uova nell'emocele dell'ospite (Fig. 19).

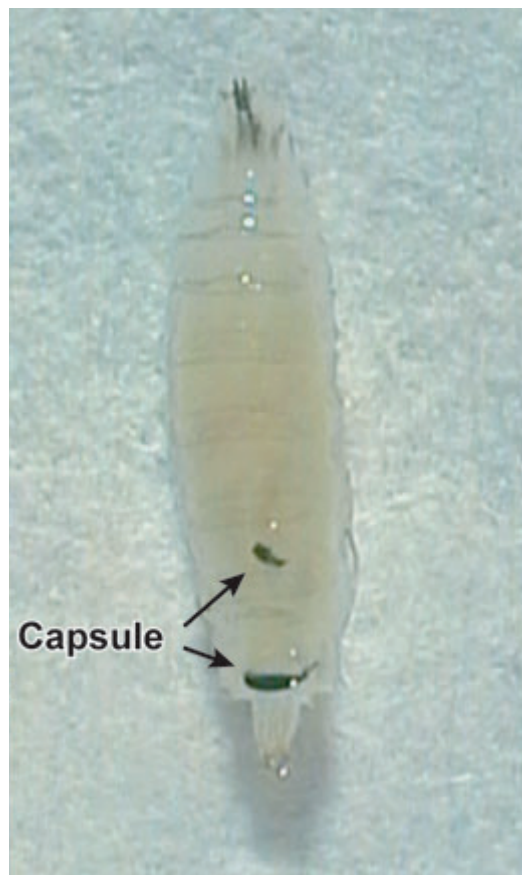


**Fig. 19.** Uovo del parassitoide, visibile all'interno dell'emocele dell'ospite subito dopo la parassitizzazione. Immagine estratta e modificata da Nappi e Christensen 2005.

Il processo di incapsulamento consta di tre importanti passaggi e richiede lo svolgimento di eventi coordinati sia dai plasmaciti che dai lamellociti. Innanzitutto i plasmaciti, che esercitano una permanente azione di sorveglianza in circolo, avvertono la presenza delle uova del parassitoide all'interno dell'emocele e, riconoscendole come corpo estraneo, si attaccano alla loro membrana di rivestimento detta *corion*. Nel far ciò, essi vanno incontro ad un esteso rimodellamento passando da una forma sferica ad una forma appiattita ed emettendo dalla periferia cellulare una complessa rete di filopodi (Williams et al 2009). Infine, attraverso la formazione di giunzioni cellulari, i plasmaciti circondano l'intero uovo del parassitoide separandolo dall'emocele (Russo et al 1996; Williams et al 2005). Entro poche ore dall'infestazione viene poi indotta una massiva proliferazione di emociti all'interno degli organi ematopoietici, nonché il transdifferenziamento dei plasmaciti presenti in circolo, dando luogo alla comparsa dei lamellociti (vedi paragrafo ematopoiesi). Questi iniziano il processo di formazione della capsula, andando a costituire una serie di strati cellulari intorno alle uova del parassitoide. Al termine di tale processo i lamellociti rilasciano il loro contenuto citoplasmatico ed in particolare la PPO che



attiva il processo di melanizzazione della capsula emocitaria (Nappi et al 1995) (Fig. 20). Lo svolgimento di tutti questi eventi richiede 48 ore alla normale temperatura di crescita di 25°C. All'interno della capsula il parassita viene poi probabilmente soppresso mediante la produzione localizzata di molecole citotossiche come le specie reattive dell'ossigeno (ROS) ed intermedi della cascata di melanizzazione (Nappi et al 1995), ma l'esatta causa della morte è ancora oggetto di indagine.



**Fig. 20.** Le capsule melanotiche all'interno della cavità emocelica di *Drosophila melanogaster* sono visibili dalla cuticola. Immagine estratta e modificata da Lemaitre Hoffmann 2007 *The Host Defence of Drosophila melanogaster*.

La conoscenza dei meccanismi molecolari responsabili della formazione della capsula immunitaria in seguito all'attacco dei parassitoidi è ancora piuttosto frammentaria. Ad oggi, la maggior parte dei geni identificati codifica per proteine coinvolte nell'adesione cellulare, come ad esempio le integrine  $\alpha$ PS4 e  $\beta$ PS (myospheroid) (Irving et al 2005; Wertheim et al 2005), e nel riarrangiamento del

citoscheletro associato a rimodellamento e migrazione cellulare, come ad esempio Rac1 Rac2 e CDC42, tutti membri della famiglia delle proteine RhoGTPasi (Williams et al 2005, Williams et al 2006; Sampson et al 2012). Nella loro forma inattiva, tali proteine sono legate a GDP e vengono attivate quando, in seguito a ricezione di specifici segnali da parte della cellula, il GDP viene sostituito dal GTP in una reazione catalizzata dalle proteine GEFs “guanine nucleotide exchange factors”. È stato dimostrato che una di queste proteine, chiamata Zizimin-related (*Zir*), è necessaria nella risposta immunitaria cellulare di *Drosophila*, sia per il corretto incapsulamento delle uova del parassitoide *L. boulardi*, sia per la corretta fagocitosi dei batteri in seguito ad infezione microbica (Sampson et al 2012). In particolare per ciò che riguarda l’incapsulamento, analisi fenotipiche di un allele mutante del gene *Zir* hanno evidenziato che la risposta cellulare di incapsulamento viene normalmente attivata ed infatti si ha la formazione di uno strato di rivestimento formato dai plasmotociti attorno all’uovo del parassitoide, ma la capsula rimane incompleta, in quanto i lamellociti non sono in grado di formare gli strati cellulari successivi. Attraverso saggi di parassitizzazione su doppi mutanti è stato poi dimostrato che *Zir* interagisce geneticamente con *Rac2* e *CDC42*, ma non con *Rac1* (Sampson et al 2012). È stato dunque suggerito che la rimozione del gene *Zir* possa causare difetti di attivazione delle prime due RhoGTPasi. Ciò potrebbe influenzare la corretta localizzazione di recettori cellulari, normalmente presenti sulla membrana plasmatica dei plasmotociti, necessari per il legame dei lamellociti, e/o potrebbe alterare specifici aspetti funzionali del citoscheletro, come la corretta localizzazione dei microtubuli o il traffico intracellulare delle integrine. all’interno dei lamellociti. Un ruolo di questo tipo non è stato ancora evidenziato per Rac2 e/o CDC42, mentre è stato adeguatamente documentato nel caso della RhoGTPasi Rac1, indispensabile per la corretta distribuzione della  $\beta$ -integrin Myospheroid sulla superficie dei lamellociti di *Drosophila* in risposta alla parassitizzazione di *L. boulardi* (Xavier and Williams 2011). Le integrine sono recettori di adesione cellulare eterodimerici che consistono di subunità  $\alpha$  e  $\beta$ . Come altri recettori presenti sulla membrana plasmatica, esse sono sottoposte ad endocitosi ligando-dipendente, per essere poi riportate alla superficie cellulare attraverso un processo di riciclo (Roberts et al 2001). In condizioni normali, in assenza cioè di stimoli immunitari, la proteina Myospheroid è uniformemente distribuita sulla membrana

plasmatica, ma in seguito ad attivazione degli emociti, come accade in presenza di uova di parassitoidi, essa va incontro ad un processo di rilocalizzazione e compare anche sulla superficie dei filopodi in formazione. Questo processo è regolato da Rac1 ed infatti mutanti di questa RhoGTPasi presentano difetti di localizzazione di Myospheroid in seguito a parassitizzazione. In condizioni di ipertermia, questi difetti vengono però aboliti, assieme ai difetti di incapsulamento presenti nei mutanti *Rac1*, il che suggerisce l'esistenza di un legame causale fra gli uni e gli altri.

Nei mutanti *Rac1*, così come nei mutanti *myspheroyd (myo)*, i plasmacociti sono capaci di aderire e circondare completamente l'uovo del parassitoide. Ciò dimostra che, durante l'incapsulamento, la funzione di questi geni non è richiesta nei plasmacociti. Per quanto riguarda in particolare il gene *mys*, esso si esprime a livelli più alti nei lamellociti che nei plasmacociti. 'E' stato inoltre dimostrato che un'altra  $\beta$  integrin,  $\beta v$ , è necessaria per l'adesione dei plasmacociti alle uova del parassitoide *L. bouhardi*. Per quanto riguarda invece Rac1, la proteina co-localizza con i microtubuli nei lamellociti e la quantità di Rac1 associata a questi componenti del citoscheletro aumenta in queste cellule dopo la parassitizzazione (Xavier and Williams 2011). In conclusione, il corretto riciclo delle integrine, regolato da Rac1, sembra essere necessario a garantire adeguata adesione e rimodellamento dei lamellociti durante l'incapsulamento delle uova dei parassitoidi.

Un'altra molecola di nell'adesione cellulare implicata nell'incapsulamento delle uova di *L. bouhardi* degli emociti è Neuroglian (Nrg), una proteina espressa sia dai lamellociti che dai plasmacociti (Williams 2009). L'omologo di Neuroglian nei mammiferi è coinvolto nell'aggregazione delle piastrine (Prevost et al 2002). In assenza di attivazione immunitaria una tirosina presente in un motivo aminoacidico conservato nel dominio intracellulare di tutte le molecole di adesione cellulare di tipo L1, risulta fosforilata nella proteina Neuroglian, ma viene defosforilata in seguito a parassitizzazione. Sulla base di queste osservazioni e del fenotipo di mutanti nel gene *Nng* è stato ipotizzato che la proteina Neuroglian partecipi a processi di interazione cellulare importanti per la formazione della capsula immunitaria, a partire dal primo strato costituito dai plasmacociti (Williams et al 2009). A differenza di mutazioni dei geni codificanti

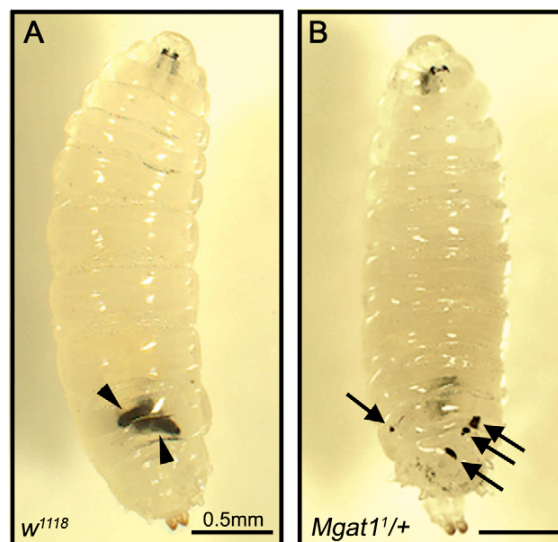
per le Rho GTPasi ed il loro regolatore Zizimin, nonché mutazioni a carico della  $\beta$ -integrina Myo che non alterano la capacità dei plasmotociti di aderire all'uovo del parassitoide e rivestirlo completamente, mutazioni a carico del gene *Ngr* risultano in una drastica riduzione del numero di plasmotociti attaccati ad esso e tali plasmotociti presentano un'alterata polarità.

Perturbazioni della morfologia dei plasmotociti si osservano anche in un mutante nullo del gene codificante per la nonaspasina TM9SF4 (Berger et al 2008). Le nonaspasine sono proteine caratterizzate da un largo dominio extracellulare all'N-terminale e nove putativi domini transmembrana, della cui funzione si sa poco. Il mutante nullo TM9SF4 di *Drosophila melanogaster* mostra difetti nella risposta immunitaria cellulo-mediata diretta contro i patogeni Gram negativi ed i parassitoidi (Berger et al 2008). Tali difetti funzionali sono associati ad anomalie del citoscheletro di actina che si riflettono nell'acquisizione, da parte dei plasmotociti, di morfologia e dimensioni eterogenee. In esperimenti condotti *in vitro*, i plasmotociti mutanti sono inoltre risultati incapaci di formare aree di contatto regolari con il substrato. E' stato dunque ipotizzato che la nonaspasina TM9SF4 possa controllare l'adesione cellulare, agendo attraverso meccanismi di segnalazione intracellulare che portano alla riorganizzazione dell' actina del citoscheletro (Berger et al 2008).

Uno degli aspetti più importanti e meno conosciuti dell'incapsulamento è il meccanismo che governa il riconoscimento delle uova in seguito al loro ingresso nell'emocele. In *Manduca sexta*, molecole appartenenti alla famiglia delle lectine di tipo C, proteine che legano i carboidrati in maniera calcio-dipendente, promuovono l'incapsulamento e allo stesso tempo stimolano l'attivazione della PPO, svolgendo una funzione di PRRs (Yu et al., 1999, 2002, 2005, 2006; Yu and Kanost, 2000; Ling and Yu, 2006a). Un analogo ruolo è stato attribuito in *Drosophila* a due lectine di tipo C specifiche per il galattosio, conosciute come DL2 e DL3. 'E stato infatti dimostrato che queste proteine legano gli emociti e possono mediare il reclutamento di queste cellule sulla superficie di corpi estranei. Ciò è stato osservato in saggi di incapsulamento *in vitro* in cui sono state utilizzate sferette ricoperte dalle molecole DL2 e DL3. (Jingqun et al 2006).

Un'altra lectina, l'agglutinina del germe di grano (wheat germ agglutinin, WGA), si lega in maniera specifica alla superficie dei lamellociti in mutanti che, in

conseguenza dell'innesco di reazioni autoimmuni, formano tumori melanotici (*tu*) (Rizki TM and Rizki RM 1983; Nappi and Silvers 1984). Ciò ha suggerito che la glicosilazione delle proteine della membrana dei lamellociti aumenti durante la risposta di incapsulamento. Di fatto, è stato recentemente dimostrato che la N-glicosilazione proteica ha un ruolo chiave nell'incapsulamento cellulare di *Drosophila* (Mortimer et al 2012). E' stato infatti messo in evidenza che mutazioni in 8 geni che codificano per enzimi responsabili di questo specifico tipo di modificazione post-traduzionale riducono la resistenza all'attacco dei parassitoidi. In pratica, difetti di regolazione del profilo di N-glicosilazione della superficie delle cellule immunitarie in seguito a parassitizzazione portano alla formazione di capsule difettive, che vanno via via disintegrandosi, divenendo incapaci di bloccare lo sviluppo della larva del parassitoide. Il ruolo delle proteine glicosilate è dunque quello di consolidare la capsula di emociti una volta che questa si è formata.



**Fig. 24.** Disfacimento delle capsule immunitarie in larve mutanti *Mgat1*<sup>1/+</sup>, 48-72 ore dopo l'attacco del parassitoide *L. clavipes*. La larva selvatica *w*<sup>1118</sup> incapsula completamente le uova del parassitoide (A). La larva mutante *Mgat1*<sup>1/+</sup> presenta piccoli pezzi di tessuto melanizzato liberamente circolanti nell'emocele, derivanti da capsule immunitarie sfaldatesi (vedi frecce) (B). Immagine estratta da Mortimer et al 2012 *Mgat1-dependent N-glycosylation of Membrane Components Primes Drosophila melanogaster BloodCells for the Cellular Encapsulation Response*.

Gli stessi autori hanno inoltre dimostrato che il veleno di una particolare specie di parassitoide, *L. victoriae*, altera il profilo di glicosilazione della membrana degli emociti e la sovraespressione di un enzima coinvolto nella N glicosilazione è in grado di conferire alla *Drosophila* resistenza nei confronti di questo parassitoide.

Al riconoscimento delle uova del parassitoide presenti all'interno dell'emocele fa seguito un processo di attivazione dei plasmotociti, ma anche di questo processo si sa molto poco. Un primo passo verso l'identificazione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'attivazione dei plasmotociti è stato fatto attraverso lo studio dei fattori di virulenza utilizzati da un parassitoide di *Drosophila melanogaster*, *Ganaspis* sp 1, per contrastare le difese immunitarie dell'ospite (Mortimer et al 2013). Tale studio ha dimostrato che i plasmotociti di *Drosophila* sono sottoposti ad una esplosione di calcio citoplasmatico poche ore dopo la parassitizzazione, e che questa esplosione di calcio è necessaria per attivare la risposta immunitaria cellulare. L'esplosione di calcio nei plasmotociti è soppressa dal veleno del parassitoide *Ganaspis* sp 1 (G1), ed in particolare da un componente di tale veleno, omologo di una ATPasi con funzione di pompa del calcio del reticolo sarco/endoplasmatico (SERCA). La proteina SERCA svolge un ruolo conservato nell'omeostasi del calcio: pompando ioni calcio dal citoplasma all'interno di siti di riserva del reticolo sarco/endoplasmatico abbassa i livelli intracellulari di calcio e dunque funge da regolatore negativo delle vie di segnalazione intracellulari mediate dal calcio. Con questo meccanismo la proteina SERCA del veleno di G1 impedisce ai plasmotociti di essere attivati e di migrare verso l'uovo del parassitoide innescando la risposta immunitaria cellulare.

Gli studi fin qui esposti delineano un quadro ancora alquanto frammentario dei meccanismi molecolari coinvolti nei processi di incapsulamento. Allo scopo dunque di collezionare altri tasselli che aiutassero a comporre l'intero mosaico, due diversi gruppi di ricerca hanno intrapreso due diversi approcci, uno di tipo genetico, l'altro di tipo molecolare. L'approccio genetico è consistito nell'effettuare un mini-screening di geni scelti sulla base di dati presenti in letteratura, in particolare geni coinvolti in processi di adesione cellulare (Howell et al 2012). Sono stati così selezionati 44 geni e sono state effettuate analisi fenotipiche di individui portatori di mutazioni per perdita di funzione, o individui

sottoposti a silenziamento genico negli emociti o ancora esprimenti, in queste stesse cellule, alleli dominanti negativi di ciascun gene. I mutanti di 25 di questi geni hanno mostrato difetti di incapsulamento, confermando gli studi sulle RhoGTPasi e le integrine su riportati, ma anche identificando nuovi componenti molecolari (Howell et al 2012) (Tab.1). In particolare, in mutanti del gene *LamininA* (*LanA*), che codifica per un componente della matrice extracellulare, gli emociti sono risultati incapaci di aderire alle uova dei parassitoidi. E' interessante rilevare che durante gli stadi iniziali della reazione di incapsulamento l'uovo del parassitoide viene ricoperto da uno strato di materiale proteico a tutt'oggi non identificato, che viene riconosciuto dai plasmatociti (Russo et al 1996). Tale materiale potrebbe essere dunque costituito da proteine della matrice cellulare. E' stato del resto ipotizzato che in alcuni tipi di cosiddetti mutanti melanotici, in si osserva la formazione di capsule immunitarie attorno a tessuti endogeni, il segnale che scatena la reazione autoimmune sia dato dalla presenza di alterazioni della matrice extracellulare (Rizki R.M. and Rizki T.M. 1974). Analogamente, la deposizione di una sorta di matrice extracellulare sulle uova dei parassitoidi potrebbe essere l'evento che scatena la reazione di incapsulamento diretta contro di esse.

<b>Geni</b>	<b>Ontologia</b>
<b>Rac1</b>	RhoGTPase
<b>Rac2</b>	RhoGTPase
<b>CDC42</b>	RhoGTPase
<b>Rho-like</b>	RhoGTPase
<b>Rho-BTB</b>	RhoGTPase
<b>CG11376</b>	Rho GEF
<b>Exn</b>	Rho GEF
<b>RhoGEF3</b>	Rho GEF

<b>vav</b>	Rho GEF
<b>LanA</b>	Matrice extracellulare
<b>betaInt-nu</b>	$\beta$ -integrine
<b>Ephrin</b>	Recettore, ligando
<b>Eph</b>	Recettore tirosina chinasi
<b>Glued</b>	Assemblaggio della dineina
<b>Dhc64C</b>	Catena pesante della dineina
<b>CG42247</b>	Assemblaggio dei microtubuli
<b>Cdk5a</b>	Attivatore di CDK5
<b>aPKC</b>	S/T chinasi
<b>CDK5</b>	S/T chinasi
<b>Pten</b>	Fosfatasi
<b>Flotillin2</b>	Proteina di impalcatura
<b>Shc</b>	Proteina di impalcatura
<b>CG7158</b>	Alsin Rab GEF
<b>dia</b>	Formina
<b>Eb1</b>	Assemblaggio dei microtubuli

**Tab. 1.** Geni di *Drosophila melanogaster* la cui mutazione compromette il processo di incapsulamento delle uova di *L. bouvardi*. Tabella estratta e modificata da Howell et al 2012.

Il secondo approccio mirato ad identificare nuove molecole coinvolte nei processi di incapsulamento è stato, come si è detto, di tipo molecolare. Si è infatti trattato di un'estensiva analisi del profilo trascrizionale degli emociti in risposta alla



parassitizzazione. Tale studio ha portato all'identificazione di 152 geni candidati, differenzialmente espressi durante le 72 ore successive all'attacco del parassitoide *A. tabida* (Wertheim et al 2005). La maggior parte di questi geni non era stata precedentemente associata all'immunità innata. Sulla base del loro profilo di espressione temporale i geni identificati sono stati suddivisi in 16 gruppi, 8 dei quali contenenti più di 5 geni. All'interno di questi 8 gruppi, 6 comprendono geni che sono sovra-espressi nelle larve parassitizzate, mentre i 2 rimanenti sono costituiti da geni il cui livello di espressione è ridotto nelle larve parassitizzate rispetto ai controlli non parassitizzati. Tutti i geni all'interno dei gruppi sono stati annotati e si è potuto dimostrare attraverso l'analisi statistica che due gruppi contenenti geni espressi subito dopo l'attacco del parassitoide sono associati a funzioni immunitarie, mentre un gruppo di geni espressi tardivamente nella parassitizzazione, è associato a funzioni coinvolte in cascate proteolitiche ed un gruppo di geni la cui espressione è ridotta nella larve parassitizzate a 72 ore dall'infestazione è associato a funzioni correlate all'impupamento. Il quadro che se ne ricava è quello di geni potenzialmente coinvolti nella iniziale reazione di difesa nei confronti di un attacco dei parassitoidi e geni che entrano in gioco in un secondo momento per dar luogo a risposte più lente che portano poi al consolidamento della capsula. I geni dell'ultimo gruppo, sottoespressi nelle larve parassitizzate, sono invece probabilmente legati, al ritardo di sviluppo dell'ospite in presenza della larva del parassitoide. Fra i geni sovraespressi di particolare interesse sono risultati alcuni geni codificanti per lectine ed integrine e geni con funzioni associate alla deposizione della melanina. Si è inoltre messo in evidenza un significativo aumento di espressione, subito dopo la parassitizzazione, di due geni codificanti per PRRs e tre geni codificanti per AMPs. Questo effetto, è stato però messo in relazione dagli autori con il danno provocato dalla puntura del parassitoide all'atto dell'ovideposizione e con la conseguente esposizione della larva all'attacco di microrganismi presenti sulla sua superficie o su quella dell'ovidepositore.

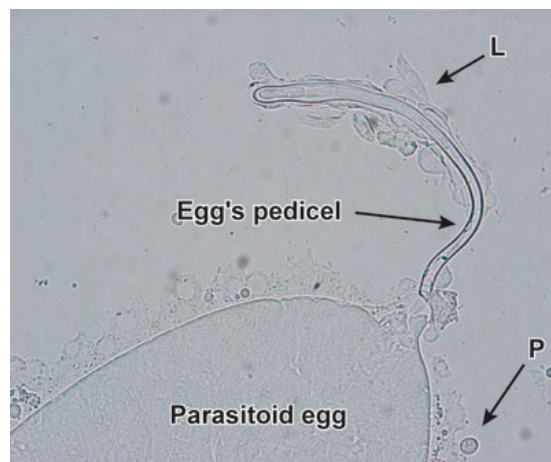
Un ruolo regolativo, necessario a tenere sotto controllo la proliferazione degli emociti durante l'infezione dei parassitoidi sembra infine essere svolto dalla proteina Hemese, una proteina transmembrana specifica di queste cellule. Larve Hemese-deficienti presentano infatti elevata proliferazione degli emociti (Kurucz et al 2003).

### 1.3.3.1 Parassitoidi

Gli insetti parassitoidi sono entomofagi caratterizzati da una grande varietà di strategie di adattamento alla vita parassitaria e in molti casi sono caratterizzati da un sorprendente grado di integrazione fisiologica con il loro ospite (Quicke 1997). I parassitoidi traggono protezione e nutrimento dalle proprie vittime arrecando loro un danno biologico. Si presentano come insetti privi di una vita autonoma e sono strettamente dipendenti dall'ospite. Essi hanno un ciclo di vita più breve rispetto all'ospite che soccombe solo quando la larva del parassitoide termina il suo sviluppo (Poiriè et al 2009). Tale strategia adattativa è comune negli insetti olometaboli (Diptera, Lepidoptera, Coleoptera) (Godfray 1994), in particolare è comune tra gli insetti dell'ordine Hymenoptera; tale ordine comprende l'80% delle specie con le suddette abitudini alimentari (Quicke 1997). I parassitoidi vengono classificati in base allo stadio di sviluppo dell'ospite che viene attaccato, e in cui si completa lo sviluppo del parassitoide, in oofagi, larva-pupali, larvali, ovo-larvali, pupali o immaginali. In base al numero di uova deposte i parassitoidi si suddividono in solitari o gregari. In funzione delle modalità di nutrizione i parassitoidi vengono classificati in ectoparassitoidi ed endoparassitoidi. Gli ectoparassitoidi si nutrono dall'esterno del corpo dell'ospite, invece gli endoparassitoidi si nutrono dall'interno del corpo dell'ospite (Godfray 1994). Sulla base delle loro abitudini alimentari i parassitoidi hanno sviluppato diverse strategie di regolazione dell'ospite e quindi vengono classificati in Idiobionti e Coinobionti. I parassitoidi Idiobionti sono per lo più oofagi, pupali e ectoparassitoidi larvali, essi uccidono l'ospite paralizzandolo bloccandone lo sviluppo al momento della parassitizzazione. Lo sviluppo dell'ospite viene bloccato grazie all'iniezione di specifiche secrezioni della femmina del parassitoide come il veleno o i peptidi tossici che consentono di preservare i tessuti ospiti e favorirne la digestione. Gli Idiobionti sono per lo più ectoparassitoidi che presentano stadi larvali estremamente voraci e di breve durata. L'ovideposizione di questi ultimi avviene negli ultimi stadi larvali e nelle pupe dell'ospite, ovvero in uno stadio vitale dell'ospite che gli consenta una completa e soddisfacente alimentazione. I parassitoidi Coinobionti presentano stadi larvali più lunghi rispetto agli Idiobionti, e si susseguono all'interno del corpo dell'ospite. Essi comprendono ecto ed endoparassitoidi larvali ed

endoparassitoidi di adulti. I Coinobionti adulti hanno una vita breve e producono molte uova di piccole dimensioni e spesso prive di vitello. Presentano un “*host range*” limitato in quanto mostrano una elevata specializzazione e possono attaccare vari stadi dello sviluppo pre-immaginale dell’ospite, nonostante per questo gruppo di parassitoidi l’ovideposizione sia stata definita come stadio-specifica. Gli endoparassitoidi Coinobionti si distinguono in “*conformers*” e “*regulators*”. I primi adattano il proprio sviluppo alla fisiologia dell’ospite, i secondi, che rappresentano la maggior parte degli endoparassitoidi Coinobionti, sono in grado di modificare la fisiologia dell’ospite a proprio vantaggio, attraverso complessi meccanismi che coinvolgono una serie di fattori di regolazione parassitaria sia di origine materna che embrionale. I “*regulators*” parassitizzano stadi precoci che non sono sufficienti a supportare il loro sviluppo, però non uccidono immediatamente l’ospite ma regolano la sua fisiologia, lo sviluppo e la morfologia consentendogli di continuare a svilupparsi ri-direzionando il metabolismo a proprio vantaggio fino al completo successo della parassitizzazione; infatti, la larva ospite è tenuta in vita fino al termine dello sviluppo della larva del parassitoide oltre il quale l’ospite muore. Ciò implica che il parassitoide e l’ospite instaurano un rapporto anatomico-fisiologico; tale rapporto può comportare meccanismi fisiologici complessi, che sono conosciuti come “*host regulation*” che consentono al parassitoide di eludere le difese immunitarie dell’ospite e di realizzare una fine regolazione del metabolismo, della riproduzione e dello sviluppo (Vinson e Iwantsch 1980). Sebbene le interazioni ospite-parassitoide sono ben caratterizzate a livello cellulare, ancora molto rimane da capire riguardo le basi molecolari della risposta immunitaria dell’ospite e l’abilità dei parassitoidi di combattere tale risposta immunitaria (Schlenke et al 2007). Un sistema ospite-parassitoide altamente studiato è il sistema *Drosophila*-parassitoide. I parassitoidi sono la maggior fonte di mortalità in *Drosophila*, come in molti altri insetti. Essi sono anche di importante significato economico come agenti di biocontrollo (Wertheim et al 2005). Le femmine di tali parassitoidi iniettano uova di circa 100  $\mu\text{M}$  attraverso la cuticola larvale, direttamente nell’emocele dell’ospite, superando barriere offerte dai tessuti come la cuticola, le trachee e l’intestino. Sono conosciute molte specie di parassitoidi di *Drosophila*; quelle appartenenti ai generi *Asobara*, *Leptopilina* e *Ganaspis* sono stati studiati molto intensivamente (Lemaitre Hoffmann 2007). Anche in *Drosophila* i

parassitoidi appartengono all'ordine Hymenoptera (Nordlander, 1980, 1982). La specie *Ganaspis* include parassitoidi larvali solitari che attaccano diverse specie di *Drosophila* (Nordlander, 1980, 1982; Vet and Bakker, 1985; Carton et al., 1986). I generi *Ganaspis* e *Leptopilina* condividono molte caratteristiche morfologiche, sebbene la relazione filogenetica tra questi generi è considerato abbastanza lontana (Schilthuisen et al., 1998). *Leptopilina* e *Ganaspis* depongono piccole uova (Fig. 22) coperte da un sottile corion con un pedicello nell'estremità anteriore.



**Fig. 22.** Uovo del parassitoide *L. bouvardi*. Il pedicello presenta lamellociti che andranno poi a formare la capsula. Immagine estratta e modificata da Lemaitre Hoffmann 2007 *The Host Defence of Drosophila melanogaster*.

*Leptopilina* e *Ganaspis* differiscono nel modo in cui essi individuano i loro ospiti, *Leptopilina* effettua la ricerca dell'ospite attraverso l'ovipositore, mentre *Ganaspis* attraverso vibrotassi (Vet and Bakker, 1985), utilizzando in maniera estremamente raffinata vibrazioni prodotte dall'ospite nel corso di varie attività dalla semplice locomozione all'attività di alimentazione. Il genere *Ganaspis* esplica parassitizzazioni su diverse specie di *Drosophila*, ad esempio *Ganaspis xanthopoda* parassitizza *Drosophila melanogaster* e *Drosophila sturtevanti*. In *Ganaspis xanthopoda* lo sviluppo embrionale è sincronizzato con quello del suo ospite (Melk et al 1999), *Ganaspis xanthopoda*, come molti altri parassitoidi, è sensibile all'ambiente ormonale dell'ospite e risponde alle fluttuazioni ormonali dei livelli di ecdisione all'interno dell'emolinfa dell'ospite (Melk et al 1999).

Ganaspis G1, un'altra specie di parassitoide larvale di *Drosophila*, usa il veleno SERCA per colpire l'esplosione di calcio dei plasmotociti e prevenire l'inizio della risposta immunitaria di incapsulamento. SERCA è una proteina di membrana di 110 kDa e non presenta nessuna sequenza segnale di secrezione. Il veleno SERCA in Ganaspis G1, esplica il suo meccanismo di azione attraverso particelle *virus-like* che rappresentano il veicolo di trasporto del veleno che entra negli emociti dell'ospite e determina la virulenza (Mortimer et al 2013). La specie di parassitoide *Asobara tabida* (*A. tabida*), invece, è una vespa braconide che parassitizza le larve di *Drosophila* in Europa e nel Nord America (Prevost et al 2005), in seguito a parassitizzazione determina una evasione immunitaria locale. La parassitizzazione effettuata da *A. tabida* provoca una transiente attivazione del sistema immunitario dell'ospite. Le uova di tale specie di parassitoide possiedono un corion appiccicoso che permette loro di attaccarsi ai tessuti dell'ospite, ciò porta all'incorporazione dell'uovo del parassitoide nei tessuti dell'ospite, impedendo agli emociti di legarsi alla superficie dell'uovo. Pertanto le uova di *A. tabida* sono inizialmente riconosciute dall'ospite, ma sembra esserci una competizione tra la reazione immunitaria dell'ospite e i meccanismi di evasione molecolare del parassitoide per evitare l'incapsulamento (Eslin et al 2000). Le basi molecolari dei meccanismi di evasione sono poco conosciuti e sono oggetto di indagine, ma è noto che il veleno di tale parassitoide non contiene particelle *virus-like*. Un altro parassitoide di *Drosophila melanogaster* privo di particelle *virus-like* è *Asobara citri* che sopprime il sistema immunitario dell'ospite incidendo direttamente sulle ghiandole salivari e conseguentemente sul numero degli emociti circolanti (Moreau et al 2003). La dimensione delle ghiandole linfatiche, infatti, è fortemente ridotta nelle larve di *Drosophila melanogaster* parassitizzate da *Asobara citri*. Il meccanismo molecolare che sta alla base della necrosi delle ghiandole linfatiche causata da *A. citri* non è ancora ben conosciuto (Lemaitre Hoffmann 2007). Parassitoidi del genere *Leptopilina* (Frigitidae=Eucoilidae) sono stati ampiamente studiati (Nordlander, 1980, 1982; Carton et al., 1986), hanno un'ampia distribuzione e possono causare alti livelli di mortalità in *Drosophila* (Carton et al 1986). Molti aspetti della biologia delle *Leptopilinae* e del sistema *Leptopilina-Drosophila* come il superparassitismo e interazione con la risposta immunitaria dell'ospite sono stati ben documentati (Rizki 1990). *L. victoriae*, un ceppo virulento di *Drosophila*,

produce particelle *virus-like* che attivamente interferiscono con la risposta di incapsulamento, il virus di tale ceppo parassitoide inibisce specificamente la glicosilazione proteica delle proteine sulla superficie dei lamellociti (Mortimer et al 2012), usando tale stratagemma come meccanismo di virulenza. Il veleno di *L. victoriae* agisce o direttamente sulle proteine glicosilate oppure in maniera indiretta, alterando il metabolismo dei carboidrati dell'ospite (Mortimer et al 2012). Un altro ceppo parassitoide è *Leptopilina clavipes*, un endoparassitoide solitario di *Drosophila*, in particolare di *Drosophila virilis*. Si presenta come un ceppo avirulento ed è caratterizzato da un tipo di riproduzione chiamata telitochia, ovvero le femmine si sviluppano partogeneticamente da uova non fertilizzate dopo la ristorazione della diploidia e sono al 100% imparentate alle madri. I maschi non esistono (Irene Mateo Leach et al 2009). Le vespe parassitoidi, nonostante la contro selezione dei loro ospiti, hanno evoluto numerosi metodi per combattere la risposta immunitaria dell'ospite, includendo strategie per una soppressione immunitaria passiva o per una evasione immunitaria attiva. Due specie strettamente correlate tra loro sono *L. boulardi* e *L. heterotoma* che parassitano con successo il loro ospite in natura e che rappresentano esempi di evasione immunitaria passiva ed attiva rispettivamente. *Leptopilina heterotoma* è la specie più studiata tra i parassitoidi di *Drosophila*. È stato dimostrato che *L. heterotoma* usa l'aggregazione di feromoni, prodotti dall'ospite *Drosophila simulans*, per localizzare le larve dell'ospite stesso. L'aggregazione dei feromoni è prodotta dai maschi, ma attrae mosche di entrambi i sessi. *L. heterotoma* è una specie che produce particelle *virus-like* che attivamente interferiscono con la risposta di incapsulamento: il virus del parassitoide causa la morte cellulare dei lamellociti determinando la loro lisi (Rizki et al 1984; Rizki 1994). Tale lisi è causata dalle particelle virali, rilasciate dalle ghiandole del veleno, che entrano nell'emolinfa delle larve insieme all'uovo e velocemente si legano agli emociti dell'ospite e vengono internalizzate. Tale parassitoide utilizza così una strategia di infezione altamente immuno soppressiva. L'infezione indotta da *L. heterotoma* risulta anche nell'apoptosi dei pro-emociti presenti nelle ghiandole linfatiche e anche dei plasmacociti circolanti (Chiu et al 2002). A differenza di *L. heterotoma* che è distribuita in tutta la regione del circolo artico, *L. boulardi* è conosciuta come una specie mediterranea e dei climi tropicali (Allemand et al 2002). Produce anch'essa particelle *virus-like*, ma la loro morfologia e meccanismo di azione

differisce da quelle di *L. heterotoma*. Il veleno di *L. bouleardi*, nei ceppi virulenti, blocca parzialmente l'induzione e il rilascio dei lamellociti dalle ghiandole linfatiche (Labrosse et al 2005), e può causare alterazioni nella struttura citoscheletrica nei lamellociti degli ospiti, i quali falliscono nell'aderire alle uova dei parassitoidi. Il parassitoide *L. bouleardi* è caratterizzato da uova che si attaccano ai tessuti ospiti e quindi si avvale di una strategia di evasione immunitaria passiva. *L. bouleardi* infetta specificamente il ceppo di *Drosophila melanogaster* (Fig. 23), mentre *L. heterotoma* infetta con successo un numero elevato di specie del genere *Drosophila*, e ciò permette di distinguere le due specie di *Leptopilina* in parassitoide specialista quale *L. bouleardi*, e generalista *L. heterotoma* (Schlenke et al 2007). *L. bouleardi* differisce da *L. heterotoma* nel numero di plasmaciti e lamellociti dell'ospite che vengono incrementati dopo l'attacco; infatti, i plasmaciti e i lamellociti significativamente sono incrementati nelle mosche selvatiche dopo l'attacco di *L. bouleardi* (Russo et al 2001). Questo incremento è accompagnato da una forte risposta trascrizionale immunitaria dell'ospite che determina l'attivazione dell'immunità umorale e cellulare e l'attivazione di vie di segnalazione immunitaria. E' stato dimostrato che un parassitoide generalista è più abile nel sopprimere la risposta immunitaria di *Drosophila melanogaster* rispetto ad un parassitoide che è specialista su *Drosophila melanogaster*. Se gli emociti dell'ospite, quindi, agiscono come sentinelle dell'infezione, la loro lisi indotta dal veleno di *L. heterotoma* per esempio può spiegare il mancato inizio della risposta immunitaria di *Drosophila melanogaster* al loro attacco. D'altra parte, la risposta immunitaria di *Drosophila melanogaster* nei confronti di *L. bouleardi* prevede sia armi cellulari che umorali del sistema immunitario e la via di segnalazione Toll appare essere un regolatore centrale di queste risposte. Le sorprendenti differenze nelle caratteristiche di infezione tra questi due parassitoidi strettamente correlati di *Drosophila* porta a supporre che la strategia di infezione immuno-evasiva dello specialista *L. bouleardi* è adattativa. Nel presente lavoro di tesi, per gli esperimenti di incapsulamento, è stato usato il ceppo G486 di *L. bouleardi* che si distingue dagli altri ceppi di tale parassitoide in quanto è avirulento in larve immunocompetenti di *Drosophila melanogaster*. Il ceppo G486 paragonato ai ceppi virulenti possiede particelle *virus-like* allungate e con poche vescicole (Schlenke et al 2007), la

naturale infezione di questo ceppo avirulento non determina alterazioni nella morfologia dei lamellociti (Schlenke et al 2007).



**Fig. 23.** Parassitizzazione di una femmina del parassitoide *L.bouvardi* su una larva di secondo stadio di *Drosophila melanogaster*. Attraverso l’ovipositore il parassitoide rilascia le proprie uova all’interno della cavità emocelica dell’ospite. Immagine estratta e modificata da <http://Ibbe.univ-lyon1.fr/Response-des-population-d-insectes.html>.

### 1.3.3.2 Tumori melanotici

Interferendo con la normale funzione e sviluppo degli emociti si può innescare una risposta immunitaria aberrante, caratterizzata dalla crescita smisurata della ghiandola linfatica e dal massivo differenziamento dei lamellociti. Questa risposta culmina con la prematura disintegrazione della ghiandola linfatica e la formazione nelle larve di “tumori melanotici” (chiamati anche masse melanotiche) costituiti da aggregati melanizzati di emociti, per lo più lamellociti (Dearolf C.R. 1998). Il fenotipo di questi tumori melanotici è caratterizzato dalla presenza di corpi neri che circolano liberi nella cavità emocelica o sono attaccati agli organi interni (Minakhina et al 2006). Questi, non invasivi, tumori sono rari in mosche “wild



*type*” ma possono essere frequenti in alcuni “*background*” genetici. Le capsule melanotiche condividono molte caratteristiche con le capsule che si formano intorno ai parassitoidi come ad esempio strati di lamellociti melanizzati. Le mutazioni melanotiche sono state classicamente suddivise in due categorie (Minakina et al 2006): classe I: le mutazioni modificano un tessuto non-ematopoietico e inducono un tipo di “risposta autoimmune”, come la mutazione nei geni *kurtz* o *spaghetti* (Minakhina et al 2006), classe II le mutazioni che influenzano una via di segnalazione all’interno degli stessi emociti, come mutazioni “*gain of function*” nelle vie JAK/STAT o Toll (Hanratty et al 1995). Le mutazioni nel gene *Cactus*, mutazioni “*gain of function*” nel gene *Toll* o la costitutiva espressione di *Dorsal* possono indurre il differenziamento dei lamellociti e causare la formazione di fenotipi tumorali melanotici (Qiu et al 1998, Lemaitre et al 1995). Una over-espressione di *hop<sup>Tum-1</sup>*, un gene JAK, causa proliferazione di pro-emociti e porta alla formazione dei tumori melanotici nelle ghiandole linfatiche (Harrison et al 1995). Una erronea espressione, inoltre di una forma dominante attiva di STAT92E può promuovere la tumorigenesi nell’occhio di adulti di *Drosophila* e indurre formazione di tumori nelle larve (Ekas et al 2010). Analisi *in vivo* di RNA *interference*, hanno individuato 59 geni soppressori tumorali melanotici. Tale studio ha messo in evidenza che la formazione di tumori è associata con il precoce differenziamento di cellule del sangue progenitrici nelle ghiandole linfatiche, e con il differenziamento spurio dei lamellociti. E’ stato dimostrato che la formazione di tumori melanotici è elicitata da difetti nei corpi grassi e nelle ghiandole linfatiche (Avet-Rochex et al 2010). E’ stato tra l’altro scoperto che gli emociti aderiscono ai tumori in seguito al rilevamento della rottura della membrana basale (Pastor-Pereja et al 2008).

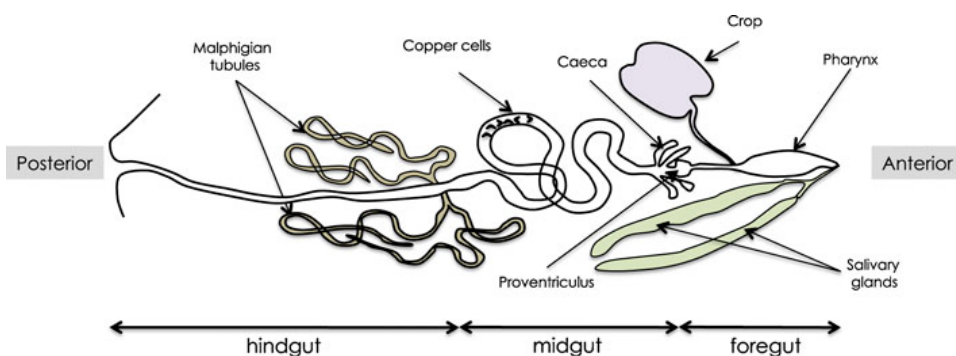
## 1.4 La risposta immunitaria epiteliale

In *Drosophila melanogaster* gli epiteli delle trachee e del tratto digestivo formano la prima barriera di difesa contro i patogeni, questi tessuti rappresentano i maggiori siti di scambio tra l’organismo e l’ambiente esterno ricco di microbi (Ferrandon et al 2013). Le cellule di tali epiteli sono coinvolte nella produzione locale di molecole effettrici come peptidi antimicrobici e specie reattive

dell'ossigeno in risposta a batteri che incontrano nell'emocele (Lemaitre Hoffmann 2007; Tzou et al, 2000). Un'efficace barriera fisica contro le invasioni microbiche è rappresentata dall'esoscheletro degli insetti che è formato a sua volta dalla cuticola che viene secreta dall'ipoderma sottostante (Ferrandon 2013). Quando questa corazza viene rotta da ferite, che possono verificarsi normalmente in natura, ha inizio una risposta ipodermale alla ferita seguita dalla coagulazione e dalla melanizzazione. Nell'ipoderma larvale Dif e Dorsal sono richiesti per impedire l'ingresso di microbi, attraverso la riparazione della lesione nell'epidermide (Matova et al 2010). Nelle cellule ipodermali delle larve è stata osservata una induzione locale, dipendente da Imd, dell'espressione di peptidi antimicrobici (AMPs); inoltre anche i geni che codificano per le proteine TEPs sono espresse nell'ipoderma (Bou et al 2011). Il tratto respiratorio è anch'esso considerato una prima linea nella difesa contro la naturale infezione microbica che avviene in *Drosophila melanogaster*. Allo stesso modo dei polmoni dei vertebrati, la funzione del tratto respiratorio in *Drosophila melanogaster* è quella di trasportare l'ossigeno all'organismo (Ferrandon 2013). Il sistema respiratorio in *Drosophila* esplica la sua azione grazie ad una rete di trachee che si dividono in sottobranche sempre più piccole fino all'ultima tracheola che trasporta l'ossigeno al tessuto (Ferrandon 2013). Le cellule delle trachee sono protette efficientemente da spiracoli all'ingresso del tubo tracheale e sono coperte da una cuticola secreta dal lato del lume del tubulo; ciò fa sì che le cellule non siano a diretto contatto con l'ambiente esterno (Ferrandon 2013). Nell'ambito della risposta epiteliale tracheale, i recettori probabilmente coinvolti nell'innescare la via di segnalazione Imd, sono PGRP-LC, PGRP-LA e PGRP-LE (Fig. 27), ovvero gli stessi fattori che sono deputati al riconoscimento microbico nella risposta umorale innata. Dopo lo stimolo immunitario a livello delle trachee è stata osservata una up-regolazione dei geni che codificano per le proteine PGRP-LA e PGRP-LF. Quest'ultimo è un regolatore negativo della via di segnalazione Imd. Un secondo sistema di regolazione negativa specifica tracheale dell'attivazione della via di segnalazione Imd attraverso l'infezione è fornito dalle proteine Tollo/Toll8 che sono altri membri della famiglia Toll (Fig. 24) (Akhouayri et al 2011). Questo membro della famiglia Toll potrebbe essere attivato da Spatzle-2 (SPZ2) e la sua azione potrebbe essere mediata da ECT-4, omologo del dominio TIR nell'uomo che contiene la proteina SARM. In assenza di regolazione negativa ed in presenza



insetti si trovano costantemente a contatto con svariati microrganismi che possono essere ingeriti. Una piccola parte di tali microrganismi, inoltre, può raggiungere la superficie dell'epitelio del tratto digestivo e al loro interno i microrganismi possono stabilire relazioni simbiotiche, di mutualismo o possono raggiungere concentrazioni elevate tale da portare ad una vera e propria infezione microbica. L'intestino delle larve di *Drosophila melanogaster* si sviluppa a partire da un epitelio circondato da mesoderma vescicolare; tutte le parti dell'intestino hanno origine durante l'embriogenesi; l'epitelio del tratto alimentare larvale si origina da due foglietti embrionali germinali: l'endoderma e l'ectoderma. L'endoderma dà origine all'intestino medio, mentre l'ectoderma forma l'intestino anteriore e posteriore (Technau et al 1985). L'intestino in *Drosophila melanogaster* si divide in tre differenti porzioni: intestino anteriore, intestino medio ed intestino posteriore (Fig. 25).



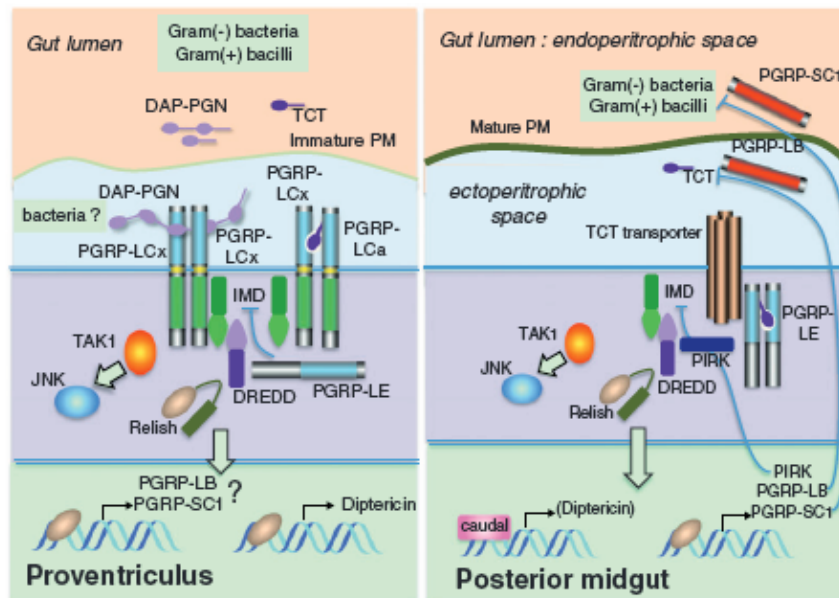
**Fig. 25.** Rappresentazione dell'intestino di adulto di *Drosophila melanogaster*. L'intestino in *Drosophila melanogaster* si divide in intestino anteriore, medio e posteriore. Da notare che le strutture definite cechi sono indicate in figura anche se esse esistono solo allo stadio larvale. Immagine estratta da Royet 2011 *Epithelial homeostasis and the underlying molecular mechanisms in the gut of the insect model Drosophila melanogaster*.

L'intestino di *Drosophila melanogaster* inoltre è innervato da neuroni provenienti dal sistema nervoso centrale (Royet 2011). Recenti studi hanno portato alla caratterizzazione qualitativa e quantitativa del microbiota dell'intestino degli insetti (Royet 2011). La presenza di batteri nell'intestino degli insetti è stata

dimostrata essere necessaria per determinare una maggiore longevità di tali insetti (Brummel et al 2004). La flora batterica, rappresentata da batteri definiti commensali, sembra essere necessaria per lo sviluppo ottimale della larva in assenza di nutrienti (Kounatidis et al 2012). Le comunità di batteri commensali di *Drosophila melanogaster* sono molto semplici, composte di circa 20 differenti specie che includono quattro o cinque specie del genere Acetobatteri e Lattobacilli, questi ultimi presenti anche nel microbiota dell'uomo. Studi volti a determinare il microbiota degli insetti, ovvero la popolazione di batteri commensali dell'intestino degli insetti, hanno dimostrato la capacità di tali batteri commensali di colonizzare adulti privi di batteri (Chandler et al 2011). Al contrario, i batteri commensali come *Erwinia carotovora carotovora* ed *E. coli* non esibiscono tale capacità (Ryu et al 2008). Il ceppo non patogeno di *Erwinia carotovora carotovora* 15 è uno strumento utile per indagare sull'omeostasi dell'intestino. Nell'ambito di batteri non commensali che naturalmente infettano ed uccidono la *Drosophila melanogaster*, Lemaitre e i suoi collaboratori hanno individuato una specie batterica, *Pseudomonas entomophila* (Pe) che infetta oralmente ed uccide le larve e gli adulti di *Drosophila melanogaster* (Vodovar et al 2005). Durante le infezioni microbiche a carico dell'intestino, la prima barriera contro i batteri è la matrice peritrofica, una membrana semipermeabile chitino-proteica che delimita l'intestino medio e svolge un ruolo importante nel mantenere la struttura dell'intestino degli insetti, facilitare la digestione e garantire una protezione all'invasione dei microrganismi e parassiti impedendo il loro passaggio attraverso di essa (Royet 2011). La membrana peritrofica evita il contatto diretto con la flora dell'intestino e l'epitelio intestinale. I batteri che rappresentano una minaccia per l'intestino e l'insetto stesso vengono eliminati attraverso proteine che modificano la composizione della loro membrana cellulare come il lisozima o enzimi che idrolizzano il peptidoglicano, presenti nel lume intestinale (Daffre et al 1994). Tali agenti antibatterici costitutivi fisici e chimici da soli non riescono a far fronte alle pesanti infezioni di batteri per cui sono integrati da due importanti difese chimiche come la produzione di peptidi antimicrobici da parte dell'epitelio intestinale e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (Nehme et al 2007, Chang et al 2005). Nel momento in cui si verifica una infezione microbica, i tessuti immunitari in *Drosophila*, emociti, corpi grassi ed anche l'intestino rilasciano peptidi antimicrobici che vengono

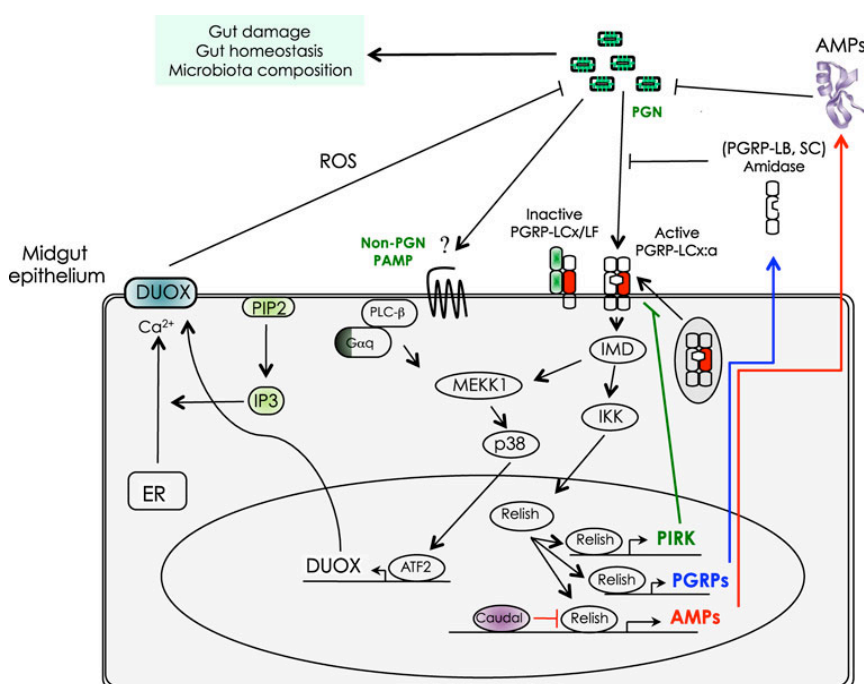
riversati nell'emolinfa in circolo o rimangono nell'intestino per controllare l'infezione microbica in atto (Royet 2011). I peptidi antimicrobici prodotti in risposta a stimoli immunitari negli epitelii intestinali sono senza dubbio gli stessi che il sistema immunitario innato produce nella risposta umorale in *Drosophila melanogaster*. Studi basati sul ceppo *E. carotovora carotovora* 15 hanno dimostrato che la produzione di AMPs è tessuto specifica; infatti, l'espressione della diptericina nelle larve in seguito ad una infezione si osserva nel proventricolo e in una parte dell'intestino medio, mentre non si osserva alcuna espressione di tale peptide antimicrobico in nessun altro tessuto. Studi su *Serratia marcescens*, un batterio patogeno, hanno confermato che l'induzione della risposta immunitaria è sia locale che sistemica e hanno dimostrato l'importanza della conseguente produzione locale di AMPs dipendente dalla via di segnalazione Imd, per combattere le infezioni microbiche (Nehme et al 2007). E' noto che la produzione di AMPs è sotto il controllo di due vie di segnalazione Toll e Imd. La produzione di AMPs nell'intestino oltre che essere dipendente da Imd, in piccola parte si avvale di un'altra via di segnalazione, la cascata JAK-STAT (Buchon et al 2009). Recenti studi, però, puntano verso il ruolo importante giocato dalla via di segnalazione Imd nella produzione di peptidi antimicrobici come protezione contro infezioni da Gram negativi come *Pseudomonas entomophila* e *Serratia marcescens* enfatizzando il ruolo critico nell'espressione locale di peptidi antimicrobici contro patogeni ingeriti attraverso il cibo (Nehme et al 2007, Liehl et al 2006). I batteri che determinano infezioni intestinali vengono riconosciuti da due proteine PGRP che sono PGRP-LC e PGRP-LE (Fig. 26). La regolazione dell'attivazione della via di segnalazione Imd è stata dimostrata essere molto importante nel processo di tolleranza immunitaria nei confronti di batteri nell'intestino (Royet 2011). E' noto che esistono diversi regolatori che impediscono l'attivazione della via di segnalazione Imd, in assenza di stimolo immunitario, come le proteine SKPA/SLMB/DCUL1, DNR-1 e Caspar, tali fattori regolano l'attivazione di Imd nelle cellule del sangue e nei corpi grassi, ma una loro funzione nelle trachee e nell'intestino ancora non è stata ancora chiarita. L'inibizione fornita da regolatori basali appare essere costitutiva, la regolazione negativa di tale via di segnalazione è esplicita da PGRP-SC/LB/LF e PIRK (Royet 2011). La proteina PGRP-LF attraverso la formazione di eterodimeri inattivi con PGRP-LCx, riduce l'attivazione della via di segnalazione

Imd (Basbous et al 2011); nel nucleo, invece il fattore trascrizionale *Caudal* direttamente sopprime l'espressione di AMPs mediata dai fattori NF- $\kappa$ B, dipendente da Imd, nella porzione posteriore dell'intestino medio (Ryu et al 2008). Questa costante repressione trascrizionale serve a mantenere l'integrità dell'epitelio dell'intestino e l'omeostasi del suo microbiota (Royet 2011). L'assenza di tale controllo porta alla produzione costante di AMPs che causa modificazioni nella popolazione di batteri commensali, apoptosi di cellule epiteliali e riduzione della durata della vita di *Drosophila melanogaster* (Royet 2011).



**Fig. 26.** Risposta immunitaria locale nell'intestino di *Drosophila melanogaster*. Lungo tutto l'intestino medio l'attivazione della via di segnalazione Imd è mediata differenzialmente. Al livello del proventricolo, la proteina PGRP-LC avverte la presenza di peptidoglicano extracellulare, sorprendentemente la proteina PGRP-LE, un sensore intracellulare di peptidoglicano, agisce come repressore della via di segnalazione Imd. In contrapposizione, la via di Imd è attivata attraverso PGRP-LE nell'intestino medio posteriore. L'attivazione di Imd probabilmente richiede uno stimolo forte fornito solo dalla divisione dei batteri, probabilmente patogeni. Un altro regolatore negativo di Imd è *Caudal*. In un'altra regione dell'intestino medio, la proteina Pirk sembra essere il più importante regolatore negativo. Insieme alle amidasi, questi regolatori negativi assicurano il basso livello di attivazione di Imd richiesto per mantenere il microbiota. Immagine estratta e modificata da Ferrandon 2013 *The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism Drosophila melanogaster: from resistance to resilience*.

A livello dell'intestino, la difesa antimicrobica si esplica anche grazie alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le specie reattive dell'ossigeno sono piccole molecole che derivano dall'ossigeno. La sintesi di ROS in *Drosophila melanogaster* è indotta rapidamente nell'intestino in seguito ad una naturale infezione ed agisce per eliminare il patogeno causando un danno ossidativo (Ha et al. 2005a; 2005b). Le specie reattive dell'ossigeno sono molecole effettrici altamente efficienti che esercitano la loro attività battericida verso un ampio gruppo di microrganismi (Ha et al 2009), interagiscono con numerosissime molecole, come le proteine, i lipidi e gli acidi nucleici e agiscono distruggendo o alterando la funzione di queste molecole (Bedard and Krause 2007). Infezioni microbiche naturali in *Drosophila* determinano uno scoppio di specie reattive dell'ossigeno che tiene sotto controllo la crescita dei batteri (Royet 2011). La regolazione della produzione dei ROS nell'intestino di *Drosophila* è abbastanza distinta da quella dei peptidi antimicrobici (Fig. 27) (Royet 2011).



**Fig. 27.** Rete di segnali che controlla la produzione di peptidi antimicrobici e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Immagine estratta da Royet 2011 *Epithelial homeostasis and the underlying molecular mechanisms in the gut of the insect model Drososophila melanogaster*.



I ROS sono prodotti costitutivamente nell'intestino a livelli basali attraverso una proteina associata alla membrana chiamata DUOX (ossidasi doppia), un membro della famiglia delle NADPH (Chang et al 2005). La natura molecolare degli elicitori batterici che attivano la via di DUOX ancora non è ancora chiara. Il livello basale dei ROS non è abbastanza potente per eliminare i batteri patogeni ingeriti attraverso il cibo. Quando il carico dei batteri nell'intestino aumenta, l'attività di DUOX e i livelli di espressione della proteina DUOX sono drammaticamente up regolati (Amcheslavsky et al 2009). Recenti studi riportano che i ROS, oltre ad avere un'azione microbica, sono coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi intestinale in seguito all'infezione, e sono coinvolti nella regolazione della proliferazione delle cellule staminali intestinali (Lee et al 2009). L'omeostasi intestinale si basa su uno stretto equilibrio tra le cellule epiteliali morte e il loro rinnovamento a partire da un gruppo di cellule staminali intestinali (ISC) (Royet 2011). Diversi studi recenti dimostrano che le infezioni intestinali comportano la morte delle cellule intestinali associata alla proliferazione e al differenziamento di cellule staminali intestinali per mantenere l'integrità del tessuto intestinale (Royet 2011). La reazione ai microrganismi nell'intestino non attiva solo il sistema immunitario, ma mantiene anche l'integrità del tessuto intestinale. La divisione delle cellule staminali intestinali e il loro rinnovo in tale tessuto può essere stimolata dall'espressione di geni apoptotici nell'intestino (Buchon et al 2009). L'ingestione di batteri invasivi come *E. carotovora carotovora* 15 o *Pseudomonas entomophila* stimolano anche la divisione delle cellule staminali intestinali ISC (Buchon et al 2009), infatti, è stato dimostrato che la divisione cellulare delle ISC incrementa di dieci volte dopo l'infezione batterica orale (Royet 2011). Sia il riconoscimento messo in atto da PGRP-LC che l'attivazione della via Imd sono indispensabili sia per la divisione delle ISC che per il differenziamento degli enteroblasti (EB) (Buchon et al 2009). Ciò indica che il peptidoglicano non innesca l'attivazione delle ISC, ma piuttosto è il danno indotto dai batteri alle cellule intestinali che stimola la divisione delle ISC, in accordo con l'osservazione che l'ingestione batterica si associa con l'aumentata apoptosi degli enterociti (EC). L'infezione locale può innescare una risposta immunitaria in organi distanti e questa comunicazione immunologica tra tessuti ed organi è in grado di mantenere l'omeostasi immunitaria (Wu et al 2012). La comunicazione tra gli organi aiuta l'organo ad aggiustare le propria prestazione

basandosi sulla risposta, di altri organi, alla condizione patologica e fisiologica. Il meccanismo molecolare alla base della comunicazione immunitaria innata tra organo ed organo non è ancora chiara, ma l'ossido nitrico sembra essere un induttore della comunicazione immunitaria tra gli organi in *Drosophila melanogaster* (Wu et al 2012). È stato proposto un modello per la comunicazione immunologica tra l'intestino e i corpi grassi. La produzione dei ROS a livello dell'intestino, che è indotta dall'infezione orale di *Erwinia carotovora carotovora* 15, può innescare l'attività trascrizionale di Rel per l'espressione sistemica di AMPs nei corpi grassi attraverso le vie dipendenti da ossido di nitrato (NO) e non dipendenti dall'ossido di nitrato (Wu et al 2012). I ROS innescano la trascrizione della nitrato ossido sintasi (NOS) nell'intestino, che promuove la produzione di ossido di nitrato e l'attivazione della via di segnalazione Imd per esprimere la diptericina nei corpi grassi. Gli emociti possono funzionare come un segnale di inoltro negli organi, tra l'intestino ed i corpi grassi, per l'attivazione della diptericina (Wu et al 2012). L'attivazione della trascrizione della drosomicina invece è mediata direttamente dai ROS (Wu et al 2012). Quindi i ROS possono svolgere un ruolo importante nella comunicazione tra organo ed organo, in particolare tra l'intestino e i corpi grassi, anche se tale ruolo è ancora oggetto di innumerevoli studi.

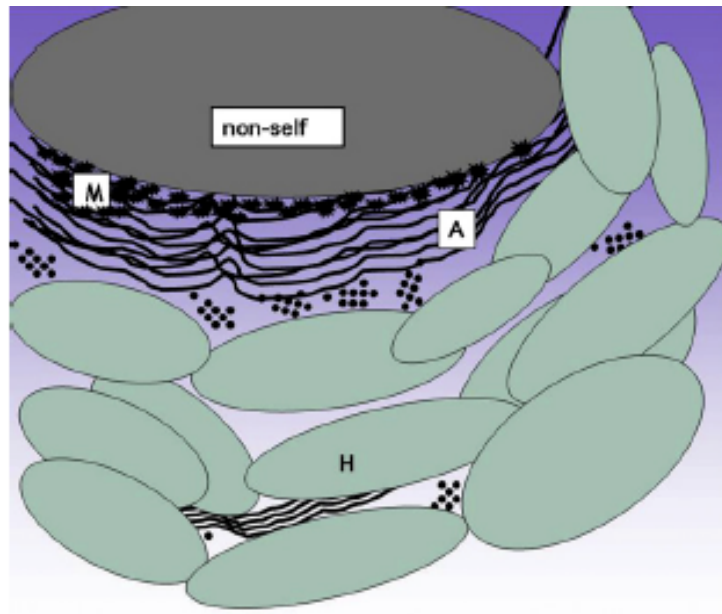
## **1.5 La proteina 102 di *Heliothis virescens***

Nei laboratori presso i quali ho svolto la mia Tesi di Dottorato è stato identificato un gene, chiamato 102, abbondantemente espresso negli emociti del Lepidottero Nottuide *Heliothis virescens*. La caratterizzazione funzionale di tale gene, effettuata mediante esperimenti condotti sia *in vitro* che *in vivo*, ha dimostrato che esso svolge un importante ruolo nella risposta immunitaria ed è in particolare coinvolto nei processi di incapsulamento e melanizzazione di corpi estranei.

Il gene 102 codifica per una proteina di 364 amminoacidi (P102), dotata di un peptide segnale di 31 amminoacidi, che mostra una identità di sequenza dell'86% con una proteina presente nel veleno delle larve di *Lonomia obliqua*, un Lepidottero Saturnide (Veiga et al 2005). Quest'ultima proteina appartiene alla

famiglia XendoU (Renzi et al 2006), comprendente proteine capaci di legare e idrolizzare molecole di RNA (Laneve et al 2008).

La proteina 102 genera fibrille amiloidi che si accumulano all'interno delle cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso degli emociti e, in seguito a stimolo immunitario, vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare per formare uno strato di rivestimento sulla superficie di corpi estranei presenti nell'emocele. Si costituisce così una sorta di impalcatura molecolare, capace di promuovere la sintesi localizzata di melanina (Falabella et al 2012). Nel momento in cui si interferisce con la formazione di questa struttura, viene compromessa, anche la formazione della capsula emocitaria, il che suggerisce che la proteina 102 abbia un importante ruolo nel coordinare le risposta di difesa umorali e cellulari (Falabella et al 2012) (Fig. 28). Non è al momento noto né come ciò possa avvenire né se altre molecole oltre alla proteina 102 possano contribuire ad integrare diverse funzioni durante i processi di incapsulamento melanotico.



**Fig. 28.** Modello di melanogenesi localizzata. Grossi corpi estranei presenti nell'emocele inducono la formazione di capsule costituite da diversi strati di emociti (H) e vengono soppressi mediante produzione localizzata di melanina (M) e radicali tossici generati durante la biosintesi di questo composto. La superficie dell'oggetto estraneo viene ricoperta da uno strato di fibrille amiloidi (A) che funge da impalcatura molecolare capace di promuovere la polimerizzazione di precursori tossici della melanina, prodotti in seguito all'attivazione di cascate proteolitiche. Immagine estratta da Falabella et al 2012 *Functional amyloids in insect immune response*.

## **2 Materiali e Metodi**

### **2.1 Terreno di coltura per l'allevamento di *Drosophila melanogaster***

I ceppi di *Drosophila melanogaster* sono stati allevati su un terreno a base di farina di mais, lievito e zucchero

Questo terreno viene preparato come segue:

A 2,2 litri di acqua vengono aggiunti 200 gr di zucchero, 150 g di farina di mais, 300 g di lievito e 10 g di agar e si porta il tutto ad ebollizione. Dopo circa 10 minuti vengono aggiunti 300 g di lievito e la cottura viene portata avanti per altri 10 minuti. Al termine, si aggiungono 36 ml di Nipagina dissolta al 10% in Etanolo. Il terreno di coltura viene quindi versato in appositi barattolini e lasciato raffreddare ed asciugare all'aria. I barattolini vengono infine tappati con cotone da batteriologia.

### **2.2 Mantenimento dei ceppi di *Drosophila melanogaster***

I ceppi di *Drosophila melanogaster* sono stati mantenuti in celle termoregolate ad una temperatura di 18°C o 25°C, con un ciclo di luce/buio di 12 ore. I ceppi sono stati trasferiti su terreno di coltura fresco ogni 10/20 giorni a seconda della temperatura a cui sono stati allevati. Per il trasferimento e l'osservazione allo stereomicroscopio i moscerini di *Drosophila melanogaster* sono stati anestetizzati con CO<sub>2</sub>.

## 2.3 Mantenimento del ceppo di *Leptopilina boulardi* G486 (avirulento)

Il ceppo G486 di *L.boulardi* è stato mantenuto sul ceppo *Nasrallah* di *Drosophila melanogaster*, caratterizzato da bassa immunoreattività. Popolazioni di larve di *Drosophila* al secondo stadio di sviluppo sono state esposte per 12 ore consecutive a 10 femmine del parassitoide. Queste sono state successivamente rimosse e le larve parassitizzate sono state incubate a 25°C fino all'emergenza, circa 21 giorni più tardi, degli adulti di *Leptopilina*.

## 2.4 Ceppi di *Drosophila melanogaster* utilizzati

Sono stati utilizzati i seguenti ceppi, derivanti dallo Stock Center di Bloomington:

- **105666:** Canton S, ceppo selvatico
- **6326:** *w[11118]*
- **w; TM3/TM6B**
- **8700:** *w[\*]; P{w[+mC]=He-GAL4.Z}85, P{w[+mC]=UAS-GFP.nls}8;* ceppo che esprime la proteina GFP negli emociti larvali.
- **1808:** *TM3, ry<sup>RK</sup> Sb<sup>1</sup> Ser<sup>1</sup> P{ry+t7.2=Delta2-3}99B/Df(3R)C7, ry<sup>506</sup>;* ceppo che esprime la trasposasi, usato per indurre l'escissione di elementi trasponibili P situati in prossimità dei geni *CG2145* e *CG3303*

- **25391:** *Df(1)BSC572, w[1118]/FM7h/Dp(2;Y)G, P{W[+Mc]=hs-hid}Y*; ceppo contenente una delezione della regione 9F8-10A3 del cromosoma X, che include il gene *CG2145*
- **33457:** *w[\*] P{w[+mC]=EP}CG2145[G605]*; ceppo contenente un elemento EP inserito nel 5' UTR del gene *CG2145*.
- **31783:** *w[1118]; P{w[+mC]=EP}G4297* ceppo contenente un elemento EP inserito 278 paia di basi a monte del sito di inizio della trascrizione del gene *CG3303*.

## 2.5 Generazione di delezioni mediante la tecnica del *jump out*

Per generare delezioni nella regione genomica in cui mappa il gene *CG2145* di *Drosophila melanogaster*, è stato usato un ceppo, ottenuto dallo Stock Center di Bloomington, che porta un elemento EP inserito nel 5' UTR di questo gene. Il ceppo in questione è stato incrociato con un ceppo definito *Jump starter*, contenente il gene che codifica per la trasposasi di P.

Si riportano qui di seguito gli incroci genetici effettuati:

1° incrocio per mobilizzare l'elemento EP

femmine vergini che portano l'elemento EP con genotipo

*w, P{w[+mC]=EP}CG2145[G605]*

e maschi *Jump Starter* con genotipo:

*TM3, ry<sup>RK</sup> Sb<sup>1</sup> Ser<sup>1</sup> P{Δ2-3}99B/Df(3R)C7, ry<sup>506</sup>*

Dalla progenie di questo incrocio sono stati selezionati i maschi che portano l'elemento EP sul cromosoma X (marcatore fenotipico  $w^+$ : occhi rossi) e il gene codificante per la trasposasi di P sul bilanciatore TM3 del terzo cromosoma

(marcatori fenotipici dominanti: *Stubble*, peli corti sullo scutello e *Serrate*, ali con margine sfrangiato), con il seguente genotipo:

$w, P\{w[+mC]=EP\}CG2145[G605]/Y; +/+; TM3, ry^{RK} Sb^l Ser^l P\{\Delta 2-3\}99B/+$

Il secondo incrocio è stato effettuato tra singoli maschi selezionati e femmine vergini con il seguente genotipo:

$FM7/w; +/+; +/+$

Da questo secondo incrocio sono state selezionate femmine vergini, portatrici di un cromosoma X, indicato con un asterisco, che ha perso l'elemento EP originariamente inserito nel 5'UTR del gene *CG2145*, e che dunque hanno occhi bianchi ed il seguente genotipo:

$*w/FM7; +/+; +/+$

Tali femmine sono state incrociate a loro volta singolarmente con maschi aventi il seguente genotipo:

$Y/FM7; +/+; +/+$

Da questo incrocio sono state selezionate femmine vergini e maschi aventi gli occhi bianchi, dal seguente genotipo:

$*w/FM7; +/+; +/+$  e  $*w/Y; +/+; +/+$

che, incrociati tra di loro, hanno permesso infine di generare un ceppo costituito da individui con un unico tipo di cromosoma X, quello in cui è avvenuta l'escissione dell'elemento EP:

$*w/*w; +/+; +/+$  e  $*w/Y; +/+; +/+$

Ciascun ceppo è stato sottoposto ad analisi molecolare mediante PCR al fine di identificare possibili mutanti per delezione del gene *CG2145*.

Per generare delezioni nella regione genomica in cui mappa il gene *CG3303* di *Drosophila melanogaster*, è stato usato un ceppo, ottenuto dallo Stock Center di Bloomington, che porta un elemento EP inserito 278 basi a monte del sito di

inizio della trascrizione di questo gene. Il ceppo in questione è stato incrociato con lo stesso ceppo *Jump starter* utilizzato nel precedente esperimento.

Si riportano qui di seguito gli incroci genetici effettuati:

1° incrocio per mobilizzare l'elemento EP

femmine vergini *Jump Starter* con genotipo:

$TM3, ry^{RK} Sb^1 Ser^1 P\{\Delta 2-3\}99B/Df(3R)C7, ry^{506}$

e maschi che portano l'elemento EP con genotipo:

$w; P\{w[+mC]=EP\}CG3303[G4297]$

Dalla progenie di questo incrocio sono stati selezionati maschi e femmine che portano l'elemento EP (marcatore fenotipico  $w^+$ : occhi rossi) sul terzo cromosoma e il gene codificante per la trasposasi sul bilanciatore TM3 del terzo cromosoma (marcatori fenotipici dominanti: *Stubble*, peli corti sullo scutello e *Serrate*, ali con margine sfrangiato) sul terzo cromosoma, con il seguente genotipo:

$w/w$  e  $w/Y; +/+; P\{w[+mC]=EP\}CG3303[G4297]/TM3, ry^{RK} Sb^1 Ser^1 P\{\Delta 2-3\}99B$

Il secondo incrocio è stato effettuato tra singoli maschi o singole femmine selezionate e, rispettivamente, femmine vergini o maschi con il seguente genotipo:

$w/w$  e  $w/Y; +/+; TM3/TM6B$

Da questo secondo incrocio sono state selezionate femmine vergini o maschi, portatori, sia le une che gli altri, di un terzo cromosoma, indicato con un asterisco, che ha perso l'elemento EP originariamente inserito a monte del gene *CG3303*, e che dunque hanno occhi bianchi ed il seguente genotipo:

$w/w$  o  $w/Y; +/+; *+/TM3$

Tali femmine e maschi sono state incrociate singolarmente a loro volta con maschi e femmine vergini aventi il seguente genotipo:

$w/w$  o  $w/Y; +/+; TM3/TM6B$



Da questo incrocio sono stati selezionati maschi e femmine vergini aventi gli occhi bianchi, dal seguente genotipo:

$w/w$  o  $w/Y; +/+; *+/TM3$  o  $TM6B$

Incrociando tra di loro gli individui TM3 o gli individui TM6 si sono infine potuti selezionare individui con un unico tipo di terzo cromosoma, quello in cui è avvenuta l'escissione dell'elemento EP. Questi individui, incrociati a loro volta, hanno generato il ceppo:

$w/w$  e  $w/Y; +/+; *+/*+$

Ciascun ceppo è stato sottoposto ad analisi molecolare mediante PCR al fine di identificare possibili mutanti per delezione del gene *CG3303*.

## **2.6 Estrazione di DNA genomico da adulti di *Drosophila melanogaster***

10 individui per ciascun ceppo sono stati raccolti in provette Eppendorf e congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'omogenizzazione è stata effettuata in 200  $\mu\text{l}$  di Buffer A, utilizzando un pestello di plastica perfettamente aderente alle pareti dell'eppendorf. Dopo un'incubazione di 30 minuti a  $65^{\circ}\text{C}$  sono stati aggiunti 400  $\mu\text{l}$  di una soluzione LiCl/KAc, trasferendo la provetta in ghiaccio per almeno 10 minuti. Si è dunque effettuata una centrifugazione a 16.000 x g di 15 minuti a temperatura ambiente. Il sovrantante è stato trasferito in una nuova provetta, evitando di prelevare il materiale particolato presente in superficie. Sono stati aggiunti 360  $\mu\text{l}$  di isopropanolo e i campioni sono stati centrifugati a 16.000 x g per 15 minuti a temperatura ambiente. Il sovrantante è stato eliminato, il pellet lavato con etanolo 70% mediante centrifugazione di 5 minuti a 16.000 x g, asciugato all'aria ed infine risospeso in 100  $\mu\text{l}$  di TE 1X.

## **SOLUZIONI**

### **Buffer A**

100 mM Tris-HCl, pH 7.5

100 mM EDTA

100 mM NaCl

0,5% SDS

### **LiCl/KAc**

1 parte di KAc 5M e 2,5 parti di LiCl 6M

## **2.7 Estrazione di RNA totale da emociti larvali**

20 larve di *Drosophila melanogaster* all'inizio terzo stadio di sviluppo sono state raccolte dal mezzo di coltura e sciacquate in acqua, Etanolo 95% e poi 2 volte in PBS 1X freddo. Sono state quindi trasferite all'interno di un cestello con filtro da 64  $\mu\text{m}$  poggiato su di una piccola piastra Petri e pressate fino a sfaldamento utilizzando come pestello la base di una provetta eppendorf. L'emolinf fuoriuscita è stata raccolta in 400  $\mu\text{l}$  di PBS 1X freddo, cui sono stati aggiunti altri 800  $\mu\text{l}$  derivanti da due consecutivi lavaggi delle carcasse larvali. I campioni sono stati quindi centrifugati a 100 x g per 10 minuti a 4°C per rimuovere eventuali frammenti di tessuto ed il supernatante è stato centrifugato a 300 x g per 10 minuti a 4°C per portare a pellet gli emociti. Questi sono stati lisati mediante aggiunta di 100  $\mu\text{l}$  di TRI-REAGENT (Sigma-Aldrich), una soluzione pronta all'uso contenente guanidina isotiocianato e fenolo. Il lisato è stato centrifugato a 12.000 x g per 10 minuti a 4°C per rimuovere il materiale insolubile (membrane extracellulari, polisaccaridi e DNA ad alto peso molecolare) ed il supernatante, contenente RNA e proteine, è stato trasferito in una nuova provetta eppendorf ed incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'aggiunta di 20  $\mu\text{l}$  di cloroformio e 15 secondi di vigorosa agitazione, i campioni sono stati incubati per

10 minuti a temperatura ambiente. La miscela è stata quindi centrifugata a 12.000 x g per 15 minuti a 4°C e alla fase acquosa, contenente l'RNA, sono stati aggiunti 50 µl di isopropanolo. Dopo 10 minuti di incubazione i campioni sono stati centrifugati a 12.000 x g per 10 minuti a 4°C. L'RNA precipitato è stato lavato con 100 µl di Etanolo 75% e, dopo centrifugazione a 7.500 x g per 5 minuti a 4°C, è stato asciugato per 10 minuti all'aria e risospeso in 20 µl di H<sub>2</sub>O trattata con Di-etil-pirocarbonato (DEPC), un potente inibitore delle RNasi. La concentrazione dell'RNA estratto è stata determinata mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm, ed i campioni sono stati infine conservati a -80°C.

## **2.8 Trattamento delle preparazioni di RNA con DNasi I**

Eventuali residui di DNA presenti nelle preparazioni di RNA sono stati eliminati mediante digestione con TURBO™ DNase (Ambion). A tale scopo, a 10 µg di RNA totale in un volume di 44 µl di H<sub>2</sub>O trattata con DEPC sono stati aggiunti 5 µl di Buffer 10X e 1 µl (2 Unità) di TURBO™ DNase e si è effettuata un'incubazione per 30 minuti a 37°C. Al termine, si è aggiunto EDTA in concentrazione finale 15 mM e la DNasi è stata inattivata mediante incubazione del campione a 75°C per 10 minuti.

## **2.9 Reazione di retrotrascrizione**

Ad 1 µg di RNA totale sono stati aggiunti 2 µl di una soluzione 50 µM di *random primers* e H<sub>2</sub>O trattata con DEPC, fino a raggiungere un volume di 14 µl. I campioni sono stati centrifugati brevemente a 12.000 x g, riscaldati a 85°C per 3 minuti ed immediatamente raffreddati in ghiaccio. Sono stati quindi aggiunti i rimanenti componenti della reazione:

2 µl di 10X First Strand Synthesis Buffer (Ambion)

2 µl di una miscela di dNTP, ciascuno in concentrazione 5 mM

1 µl di inibitore di RNasi 40 U/µl (Ambion)

1 µl dell'enzima M-MLV Reverse Transcriptase 100U/ µl (Ambion)

Dopo essere stati delicatamente miscelati e brevemente centrifugati a 12.000 x g, i campioni sono stati incubati a 42°C per 1 ora. La trascrittasi inversa è stata infine inattivata mediante incubazione a 92°C per 10 minuti.

## **2.10 Reazione di PCR (polymerase chain reaction)**

Le reazioni di PCR sono state allestite utilizzando come stampo plasmidi contenenti cDNA clonati, DNA genomico o prodotti di retrotrascrizione. Tali DNA sono stati miscelati ai componenti di reazione riportati qui di seguito, alle indicate concentrazioni finali:

Oligonucleotidi di innesco 0,4 µM ciascuno

dNTP 200µM ciascuno

MgCl<sub>2</sub> 2mM

PCR Buffer 1X

Taq DNA Polimerasi 0,05 U/µl

Un frammento di 414 paia di basi del cDNA CG2145, denominato P<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> CG2145, è stato sintetizzato mediante una reazione di PCR, utilizzando come stampo 1 pg del cDNA completo, già disponibile in laboratorio, ed i seguenti oligonucleotidi:

CG2145P<sub>1</sub>: CCTCCTATCGGCCACAGA

CG2145R<sub>1</sub>: GCGTTACCGAGGAAGAGA

Il *thermal cycler* è stato impostato con il seguente programma:

95°C 5'

94°C 30''

57°C 30''

72°C 30''

72°C 10'

8°C *forever*

} x 30 cicli

Un frammento di 263 paia di basi del cDNA CG3303, denominato P<sub>2</sub>/R<sub>1</sub> CG3303, è stato sintetizzato a partire da RNA di embrioni 0-18 ore, mediante una reazione di RT-PCR in cui sono stati utilizzati i seguenti oligo:

CG3303 P<sub>2</sub>: CAATGGACGCAGTGCAGCA

CG3303 R<sub>1</sub>: ACCTGAAGTGGTCTTCCCCT

Il *thermal cycler* è stato impostato con il seguente programma:

95°C 5'

94°C 30''

58°C 30''

72°C 1'

72°C 10'

8°C *forever*

} x 35 cicli

L'analisi molecolare dei ceppi ottenuti dall'esperimento di *jump out* dell'elemento EP situato nel 5'UTR del gene *CG2145* è stata effettuata utilizzando come stampo il DNA genomico di femmine di tali ceppi e una coppia di oligonucleotidi disegnati uno immediatamente a monte del sito di inserzione dell'elemento EP

(EP forw) nel ceppo 33457:  $w[*] P\{w[+mC]=EP\}CG2145[G605]$ , e l'altro a cavallo di primo introne e secondo esone del gene *CG2145* (EP rev).

EP forw GATCGCGTCGTAAGCTCATT

EP rev AGGCATCTAGCGGGGATTAT

Questa PCR diagnostica, ha consentito di discriminare eventi di escissione precisa (ricostruzione delle sequenze selvatiche) e imprecisa.

Gli eventi di escissione imprecisa sono stati sottoposti ad ulteriori analisi molecolari, con l'aiuto delle seguenti coppie di oligonucleotidi, disegnati all'interno del gene *CG2145* e nelle regioni fiancheggianti a monte e a valle:

Dm102fw GTCTTTGTCTACGAGGTGAAGG

Dm102rev GCCACGAATAGGTGACAATG

2145forw1 ATTGTTGTACGCCAAGGCA

102DmRT rev TGAACAGCAGCCGCATCTTG

EP forw GATCGCGTCGTAAGCTCATT

102DmRT rev TGAACAGCAGCCGCATCTTG

EP forw GATCGCGTCGTAAGCTCATT

Dm102rev GCCACGAATAGGTGACAATG

2145UPfw CTGATGAAGGTCCCTTCAG

2145UPrv1 AGCCACTTCAATAGGCTATG

L'analisi molecolare dei ceppi ottenuti dall'esperimento di *jump out* dell'elemento EP situato 278 paia di basi a monte del gene *CG3303* è stata effettuata utilizzando come stampo il DNA genomico di femmine di tali ceppi e coppie di oligonucleotidi disegnati all'interno del gene *CG3303* e nelle regioni fiancheggianti. La PCR diagnostica, che ha consentito di discriminare eventi di escissione precisa (ricostruzione sequenze genomiche selvatiche) e imprecisa, è stata eseguita con la seguente coppia di oligonucleotidi, uno disegnato immediatamente a monte dell'inserzione dell'elemento EP (EP3303forw) nel ceppo 31783:  $w[1118]$ ;  $P\{w[+mC]=EP\}G4297$ , e l'altro all'interno del terzo esone del gene *CG3303* (CG3303R2):

EP3303fw: CATATGCTGCACATTGTCAT

CG3303R2: CGTTGGATGCTCCTGCACA

Gli eventi di escissione imprecisa sono stati sottoposti ad ulteriori analisi molecolari, con l'aiuto delle seguenti coppie di oligonucleotidi, la prima disegnata all'interno del gene *CG3303*, la seconda nella regione fiancheggiante il gene al 3':

CG3303fw1: TGATGAAGCTGACCATGCGT

CG3303rev1: ATGTGGCAGGGTTCCTCCTT

3303fw: CCATTTTCAGCCAGGACCAC

3303rev: CGGGAGCCGGATACGACTAT

Altri oligonucleotidi sono stati disegnati a monte del gene *CG3303*, ma reazioni di PCR condotte con tali oligonucleotidi hanno dato risultati di difficile interpretazione a causa della presenza di molte sequenze ripetute.

Per le reazioni di RT-PCR mirate a verificare l'espressione del gene *CG2145* negli emociti di *Drosophila* sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi:

CG2145 P<sub>0</sub> GTCAGTCGCTTGCCGAGT

CG2145 R<sub>0</sub> CTGCCGTGGGTGTAACCA

CG3303 P<sub>2</sub> CAATGGACGCAGTGCAGCA

CG3303 R<sub>1</sub> ACCTGAAGTGGTCTTCCCCT

## **2.11 Preparazione di Gel di Agarosio**

Porre in una beuta la quantità di agarosio necessaria a preparare un gel ad una determinata concentrazione ed aggiungere l'appropriato volume di tampone di corsa elettroforetica TBE 1X. Bollire la miscela in un fornello a microonde fino a che l'agarosio non è completamente dissolto. Aggiungere bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 1 µg/ml ed agitare bene. Versare in un vassoietto per corsa elettroforetica e lasciare polimerizzare per circa 30 min prima dell'uso. Orre dunque il gel in una vaschetta per elettroforesi e coprirlo completamente con il tampone TBE 1X.

Preparare i campioni da caricare sul gel aggiungendovi un tampone di caricamento, contenente come colorante il blu di bromofenolo (BBF) o lo xilene cianolo (XC), ad una concentrazione finale 1X.

### **SOLUZIONI**

#### **TBE 10X (Tris-borato-EDTA)**

0,9 M Tris Base

0,9 M Acido borico

20 mM EDTA pH 8.0

#### **Tampone di caricamento con BBF 10X**

50% Glicerolo

TE 1X

0,25% Blu di Bromofenolo



### **Tampone di caricamento con XC 10X**

66,6% Saccarosio

H<sub>2</sub>O

0,41% xilene cianolo

## **2.12 Estrazione da gel di agarosio e purificazione di prodotti di PCR**

I prodotti di PCR sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di agarosio e si è proceduto all'estrazione da gel e purificazione dei frammenti di DNA di interesse, utilizzando il QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen), di cui si riporta qui di seguito il protocollo:

Tagliare, con l'aiuto di un bisturi, la banda contenente il frammento di DNA di interesse, cercando di rimuovere quanto più agarosio possibile.

Porre il frammento di gel in una provetta eppendorf e pesarlo

Aggiungere 3 volumi di Buffer QG ad un volume di gel

Incubare a 50°C per 10 minuti, agitando la provetta ogni 2-3 minuti per facilitare la dissoluzione del gel .

Aggiungere un volume di isopropanolo e miscelare

Trasferire la miscela sulla colonnina QIA quick, posta in una provetta eppendorf da 2 ml, e centrifugare per 1 minuto alla massima velocità .

Eliminare il liquido che ha attraversato la colonnina

Aggiungere sulla colonnina 0,5 ml di Buffer QG, centrifugare per 1 minuto alla massima velocità ed eliminare l'eluato.

Lavare la colonnina aggiungendo 0,75 ml di Buffer PE e centrifugare per 1 minuto

Eliminare il liquido che ha attraversato la colonnina e centrifugare nuovamente per 1 minuto a 13.000 x g.

Eluire il DNA con 50 µl di Buffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5).

## 2.13 Clonaggi

Il frammento P<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> CG2145 (vedi paragrafo PCR) è stato clonato nel vettore pCRII TOPO, assemblando 50 ng di frammento con 1 µl di soluzione salina e 1 µl di di soluzione TOPO vector, entrambe forniti dalla Invitrogen, in un volume finale di 6 µl. La miscela è stata quindi incubata per 30 minuti a temperatura ambiente. 2 µl di tale miscela sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule competenti di un ceppo recipiente di *E. coli*.

Il frammento P<sub>2</sub>/R<sub>1</sub> CG3303 (vedi paragrafo PCR) è stato sottoposto a reazione di fosforilazione, secondo il seguente protocollo:

Riscaldare il DNA risospeso in H<sub>2</sub>O a 70°C per 5 minuti

Raffreddare per 5 minuti in ghiaccio e aggiungere:

T4 Polynucleotide Kinase (PNK) Buffer 1X (Roche)

ATP 1mM

T4 PNK 10U

Incubare 1 ora a 37°C

Effettuare un'estrazione con fenolo cloroformio alcool isoamilico (25:24:1) e precipitare il DNA in Na acetato 0,3 M e due volumi di Etanolo 100%

Asciugare il pellet e risospendere in H<sub>2</sub>O

Come vettore di clonaggio per il frammento P<sub>2</sub>/R<sub>1</sub> del cDNA CG3303 è stato utilizzato pBluescript SK (Invitrogen), digerito con l'enzima di restrizione SmaI e sottoposto a reazione di defosforilazione secondo il seguente protocollo:

Riscaldare 2 µg del vettore digerito per 10 min a 65°C e raffreddare immediatamente in ghiaccio

Aggiungere 1 U di fosfatasi alcalina (Roche) ed incubare per 15 minuti a 37°C e poi per 15 minuti a 56°C.

Aggiungere una seconda aliquota di fosfatasi alcalina e ripetere le incubazioni alle due temperature indicate

La reazione di ligazione è stata eseguita assemblando, in un volume finale di 10 µl, il DNA del vettore pBluescript e del frammento P<sub>2</sub>/R<sub>1</sub> del cDNA CG3303 dissolti in H<sub>2</sub>O in rapporto molare 1:2, Ligase Buffer in concentrazione finale 1X, ATP in concentrazione finale 1 mM e 10 unità di T4 DNA ligasi (Roche). La miscela di reazione è stata quindi incubata a 16 °C per tutta la notte.

La trasformazione di cellule competenti TOP10 di *E. coli* è stata eseguita secondo il protocollo riportato qui di seguito:

Centrifugare brevemente la provetta eppendorf contenente la reazione di ligazione

Scongelare in ghiaccio le cellule competenti TOP10 (Invitrogen)

Aggiungere da 1 a 5 µl della reazione di ligazione alla provetta contenente le cellule competenti TOP10

Miscelare gentilmente e incubare 30 minuti in ghiaccio

Incubare la provetta per 30 secondi in un bagnetto a 42°C e raffreddarla immediatamente in ghiaccio

Aggiungere 250 µl di mezzo di coltura SOC pre-riscaldato, trasferire in una provetta Falcon da 10 ml e incubare a 37°C., in agitazione, per 1 ora

Seminare 2-200 µl di batteri in coltura su piastre di LB-agar contenenti Ampicillina 100µg/ml

Invertire le piastre e lasciar crescere i batteri a 37°C per tutta la notte.

### **Mezzo di coltura SOC**

2% Tryptone

0.5% Estratto di lievito

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

20 mM glucosio

## **2.14 Minipreparazione di DNA plasmidico**

Si riporta qui di seguito il protocollo utilizzato:

Inoculare una colonia batterica in 5 ml di LB contenente l'appropriato antibiotico di selezione e incubare a 37°C in agitazione per circa 16 ore

Trasferire 1,5 ml di coltura batterica in un provetta Eppendorf

Centrifugare per 1 minuto a 13.000 x g a temperatura ambiente

Eliminare il supernatante e risospendere il pellet batterico in 1ml di TE 1X

Centrifugare a 13.000 x g per 1 min a temperatura ambiente

Eliminare il supernatante e risospendere il pellet batterico in 100 µl di Soluzione I fredda + 0,4% di lisozima

Incubare per 5 minuti in ghiaccio

Aggiungere 200 µl di Soluzione II e miscelare delicatamente ma accuratamente invertendo la provetta

Incubare in ghiaccio per 5 minuti.

Aggiungere 150 µl di Soluzione III e miscelare delicatamente ma accuratamente invertendo la provetta

Incubare in ghiaccio per 5 minuti

Centrifugare a 13.000 x g per 10 minuti a 4°C

Prelevare 400 µl di supernatante (facendo attenzione a non aspirare il precipitato) e trasferirlo in una nuova provetta Eppendorf

Aggiungere 400 µl di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25:24:1) e miscelare

Centrifugare a 13.000 x g per 5 minuti a 4°C

Prelevare la fase acquosa e trasferirla in una nuova provetta Eppendorf

Aggiungere 1ml di etanolo 95% e miscelare

Lasciare in precipitazione per 10 minuti a temperatura ambiente

Centrifugare a 13.000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente

Eliminare il supernatante e lavare il pellet con 1 ml di etanolo 70%

Asciugare il pellet e risospendere in 50 µl di TE 1X contenente RNasi A 40 µg/ml

Incubare 30 minuti a 37°C

Le minipreparazioni di DNA plasmidico da utilizzarsi per reazioni di sequenziamento sono state sottoposte ai seguenti trattamenti aggiuntivi:

Aggiungere RNasi T1 40 µg/ml

Incubare 30 minuti a 37°C

Aggiungere 0.6 volumi di soluzione PEG e miscelare

Lasciare 1 ora in ghiaccio

Centrifugare a 13.000 x per 5 minuti a 4°C e rimuovere il supernatante (il pellet è invisibile)

Lavare il pellet 2 volte con 150 µl di Etanolo 70%

Asciugare il pellet per 20 minuti all'aria

Risospendere in 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O o TE 1X

## **SOLUZIONI**

### **LB (Brodo Luria Bertani)**

10 g di Triptone

5 g di Estratto di lievito

10 g di NaCl

H<sub>2</sub>O per portare a volume finale di 1 litro

Sterilizzare in autoclave e conservare a temperatura ambiente.

### **TE 1X**

10mM Tris-HCl, pH 8.0

1mM EDTA pH 8.0

### **Soluzione I**

50 mM glucosio

10 mM EDTA

25mM Tris-HCl pH8

Sterilizzare in autoclave e conservare a 4°C. Aggiungere LISOZIMA al momento dell'utilizzo.

### **Soluzione II**

0,2 N NaOH

1% SDS

Preparare al momento dell'utilizzo

### **Soluzione III**

60 ml di Acetato di Potassio 5 M

11,5 ml di Acido Acetico Glaciale

28,5 ml di H<sub>2</sub>O

### **Soluzione PEG**

PEG 6000 20%

NaCl 2,5 M

## **2.15 *Medium preparation di DNA plasmidico***

E' stato utilizzato il QIAGEN KIT, di cui si riporta qui di seguito il protocollo:

Inoculare una colonia batterica in 50 ml di LB contenente l'appropriato antibiotico di selezione e incubare a 37°C in agitazione per circa 16 ore

Centrifugare la coltura batterica a 6000 x g a 4°C per 15 minuti

Risospendere il pellet batterico in 4 ml di Buffer P1+RNase A

Aggiungere 4 ml di Buffer P2, miscelare delicatamente invertendo la provetta 4-6 volte e incubare a temperatura ambiente per 15 minuti

Aggiungere 4 ml di Buffer P3, miscelare immediatamente invertendo la provetta 4-6 volte e incubare in ghiaccio per 15 minuti

Centrifugare a 20.000 x g per 30 minuti a 4°C

Rimuovere il supernatante contenente il DNA plasmidico, centrifugarlo nuovamente a 20.000 x g a 4°C per 15 minuti e prelevarlo una seconda volta

Equilibrare una QIAGEN tip 100 applicando 4 ml di Buffer QBT e lasciando che questo attraversi la colonna per gravità

Applicare il supernatante contenente il DNA alla QIAGEN tip per farlo legare alla resina

Lavare la QIAGEN tip 2 volte con 10 ml di Buffer QC

Eluire il DNA con 5 ml di Buffer QF

Precipitare il DNA con 3,5 ml (0,7 volumi) di isopropanolo a temperatura ambiente, miscelare e centrifugare immediatamente a 15.000 x g per 30 minuti a 4°C

Lavare il pellet con 2 ml di Etanolo 70% e centrifugare a 15.000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente

Asciugare il pellet all'aria e risospenderlo in H<sub>2</sub>O

Determinare la concentrazione del DNA estratto mediante lettura dell'assorbanza a 260 nm

## **2.16 Preparazione di DNA stampo per la sintesi di sonde ad RNA specifiche per i geni *CG2145* e *CG3303***

I frammenti P<sub>1</sub>/R<sub>1</sub> CG2145 e P<sub>2</sub>/R<sub>1</sub> CG3303, clonati rispettivamente nei vettori pCR II TOPO e pBluescript, sono stati amplificati mediante una reazione di PCR, utilizzando le coppie di oligonucleotidi CG2145 P<sub>1</sub>/ CG2145 R<sub>1</sub> e CG3303 P<sub>2</sub>/ CG3303 R<sub>1</sub>. I prodotti di questa reazione di PCR sono stati sottoposti ad una seconda reazione di PCR in cui sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi:

CG2145T7/P<sub>1</sub>:

TAATACGACTCACTATAGGGCCTCCTATCGGCCACAGA



CG2145Sp6/R<sub>1</sub>:

ATTTAGGTGACACTATAGAAGGCGTTACCGAGGAAGAGA

CG3303T7/P<sub>2</sub>:

TAATACGACTCACTATAGGGCAATGGACGCAGTGCAGCA

CG3303Sp6/R<sub>1</sub>:

ATTTAGGTGACACTATAGAAGACCTGAAGTGGTCTTCCCCT

Tali oligonucleotidi sono costituiti, nella loro porzione 3', dalle stesse sequenze degli oligonucleotidi utilizzati nella precedente reazione di PCR e nella loro porzione 5' dalle sequenze dei promotori delle RNA polimerasi T7 o Sp6

La reazione di PCR è stata allestita nelle condizioni standard (vedi paragrafo PCR) ad eccezione della concentrazione degli oligonucleotidi, qui pari a 100 nM.

Il thermal cycler è stato poi impostato con il seguente programma:

95°C 5'

94°C 30''

57°C+5°C 30''

72°C 1'

x 5 cicli

94°C 30''

72°C+5°C 30''

72°C 1'

x 25 cicli

72°C 10'

8°C *forever*

Il prodotto di PCR è stato sottoposto ad estrazione con fenolo cloroformio alcool isoamilico (25:24:1) e precipitato con 0.5 M ammonio acetato e 2 volumi Etanolo 100% a -80°C per 30 minuti. Il pellet ottenuto mediante centrifugazione a 16.000 x g per 15 minuti a 4°C è stato lavato con Etanolo 70%, asciugato e risospeso in H<sub>2</sub>O trattata con DEPC.

La concentrazione del DNA è stata determinata mediante lettura di assorbanza a 260 nm.

## **2.17 Sintesi di sonde ad RNA marcate con digossigenina specifiche per i geni *CG2145* e *CG3303***

La reazione di trascrizione *in vitro* è stata allestita in ghiaccio, utilizzando il DIG RNA labeling kit Sp6/T7 (Roche), come di seguito indicato:

0,4 µg di DNA stampo T7P<sub>1</sub>/R<sub>1</sub>Sp6 CG2145 o T7P<sub>2</sub>/R<sub>1</sub>SP6 CG3303

2 µl DIG RNA labeling mix 10X

2 µl Transcription Buffer 10X

2 µl RNA polimerasi SP6 o T7 20 U/µl

H<sub>2</sub>O per un volume finale di 20 µl

Dopo aver miscelato e centrifugato brevemente, la soluzione è stata incubata per 6 ore a 37°C. Sono stati poi aggiunti 2 µl di DNasi I 10 U/µl ed è stata effettuata un'incubazione di 15 minuti a 37°C per rimuovere il DNA stampo. La reazione è stata poi bloccata mediante l'aggiunta di 2 µl di EDTA 0,2 M pH 8.0 ed il DNA è stato precipitato con 2,5 µl di LiCl 4M e 75 µl di Etanolo freddo, per 30 minuti a -80°C. È stata effettuata una centrifugazione a 13.000 x g per 15 minuti a 4°C, il pellet è stato lavato con Etanolo 70% e, dopo centrifugazione a 13.000 x g per 5

minuti, è stato asciugato all'aria per essere infine risospeso in soluzione di ibridazione (vedi sotto).

L'efficienza di marcatura delle sonde ad RNA è stata determinata mediante uno *spot assay*. Tutti i passaggi sono stati eseguiti a temperatura ambiente. In pratica, sono state preparate diverse diluizioni delle sonde neosintetizzate e di un RNA di controllo marcato con digossigenina, a concentrazione nota (da 10 pg/μl a 0.03 pg/μl). 1 μl di ciascuna diluizione dell'RNA di controllo e delle sonde neosintetizzate è stato applicato su di un pezzetto di membrana di nylon carica positivamente di dimensioni 4x6 cm (*Hybond N<sup>+</sup> GE Healthcare*) e, dopo aver lasciato asciugare le goccioline all'aria si è trasferita la membrana in stufa a 80°C sottovuoto per 30 minuti, in modo da fissare l'RNA. Al termine, la membrana è stata posta in una vaschetta contenente 20 ml di *Washing Buffer* e lasciata in agitazione per per 2 minuti. Successivamente, la membrana è stata incubata per 30 minuti in 10 ml di *Blocking solution* e poi per 30 minuti in 10 ml di *Blocking solution* contenente una diluizione 1:10.000 di anticorpi anti-digossigenina coniugati con fosfatasi alcalina. Dopo 2 lavaggi, ciascuno di 15 minuti, in 20 ml di *Washing Buffer*, la membrana è stata equilibrata per 5 minuti in 10 ml di *Detection Buffer*. Sono stati quindi posti sulla membrana 5 ml di *Detection Buffer*+100 μl di NBT/BCIP e si è atteso il tempo necessario ad ottenere un sufficiente sviluppo di colorazione. La reazione è stata infine bloccata mediante lavaggio della membrana in TE 1X.

## **SOLUZIONI**

### **SSC 20X**

NaCl 3 M

Sodio citrato tribasico (Diidrato) 0.3 M

Portare il pH a 7.0 con 10 N NaOH, trattare con DEPC e autoclavare.

### **RNA Dilution Buffer**

H<sub>2</sub>O trattata con DEPC: 20X SSC: Formaldeide (37%): in rapporto 5: 3: 2

La soluzione va preparata al momento dell'utilizzo.

### **Maleic acid Buffer**

0.1 M Acido Maleico

0.15 M NaCl

Portare il pH a 7.5 con NaOH

### **Washing Buffer**

Maleic acid Buffer + Tween 20 in concentrazione finale 0.3% (v/v)

### **Blocking solution**

Diluire in Maleic acid Buffer la Blocking solution 10X fornita dal kit della Roche.  
in rapporto 1:10

La soluzione va preparata al momento dell'utilizzo

### **Detection Buffer**

0.1 M Tris-HCl

0.1 M NaCl

Portare a pH 9.5

## **2.18 Raccolta e fissazione di embrioni di *Drosophila melanogaster***

Femmine adulte di *Drosophila melanogaster* sono state messe a deporre per 18 ore su piastrine Petri contenenti un terreno a base di agar e succo di mela, in modo da ottenere embrioni in diverso stadio di sviluppo. Gli embrioni sono stati raccolti in un setaccio di nylon e decorionati mediante incubazione per circa 3 minuti in una soluzione al 50% di ipoclorito di sodio. Dopo essere stati abbondantemente risciacquati in H<sub>2</sub>O distillata, gli embrioni sono stati posti in una boccettina di vetro da 25 ml contenente 10 ml di soluzione fissativa PEM-FA e 10 ml di Eptano ed incubati in questa soluzione per 30 minuti in leggera agitazione. La fase acquosa (inferiore) è stata eliminata e sono stati aggiunti 10 ml di Metanolo. A questo punto, effettuando una vigorosa agitazione per 1 minuto, è stata eliminata anche la membrana di rivestimento più interna dell'uovo, la membrana vitellina.

Eptano e metanolo sono stati rimossi e gli embrioni sono stati lavati 3 volte con Etanolo 100%, prima di essere conservati a -20°C.

Al momento dell'utilizzo, gli embrioni sono stati reidratati attraverso una serie di lavaggi con Etanolo in concentrazione decrescente: 75% , 50%, 25% ed infine posti in PBS 1X.

### **Terreno di agar e succo di mela**

9 g di Agar

300 ml H<sub>2</sub>O

Portare ad ebollizione ed aggiungere 100 ml di succo di mela commerciale. Portare nuovamente ad ebollizione e lasciare raffreddare per poi aggiungere 5 ml di Nipagina 10% in Etanolo (antimuffa). Versare in piastrine Petri.

## **PEM**

100 mM Pipes

2 mM EGTA

1 mM MgSO<sub>4</sub>

Portare a pH 7.0

## **PEM-FA**

9 ml PEM + 1 ml Formaldeide 37%

## **PBS (Phosphate Buffer Saline)**

NaCl 130 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM

Portare a pH 7.4

## **2.19 Ibridazione *in situ* su embrioni di *Drosophila melanogaster***

Il protocollo utilizzato è riportato qui di seguito:

### **Ibridazione**

Lavare gli embrioni reidratati 2 volte per 10 minuti con PTW

Effettuare post-fissazione e permeabilizzazione mediante incubazione per 30 minuti in PP

Lavare 2 volte per 10 minuti in PTX

Lavare 2 volte per 5 minuti in una soluzione 1:1 di PTX e soluzione di ibridazione HS

Pre-ibridare in HS per almeno 1 ora a 56°C

Eliminare tutto il liquido ed aggiungere la soluzione con la sonda ad RNA marcata con digossigenina

Incubare per 16 ore a 56°C

Effettuare la seguente serie di lavaggi a 58°C, utilizzando soluzioni pre-riscaldate:

2 lavaggi di 20 minuti in HS

1 lavaggio di 20 minuti in una miscela 3:1 di HS e PTX

1 lavaggio di 20 minuti in una miscela 1:1 di HS e PTX

1 lavaggio di 20 minuti in una miscela 1:3 di HS e PTX

Effettuare i seguenti lavaggi a temperatura ambiente:

1 lavaggio di 10 minuti in PTX

2 lavaggi di 15 minuti in PTW

### **Incubazione con anticorpi anti-digossigenina coniugati con fosfatasi alcalina**

Diluire 1:20 in PBT una soluzione di anticorpi anti-digossigenina coniugati con fosfatasi alcalina preadsorbiti 1:100 su embrioni fissati, arrivando ad una concentrazione finale di 1:2000 (50 µl di anticorpi preadsorbiti 1:100 + 950 µl di PBT)

Incubare per 1 ora a temperatura ambiente su di un agitatore orbitale

Lavare 3 volte per 10 minuti con 1 ml di PBT

### **Reazione colorimetrica della fosfatasi alcalina**

Lavare 2 volte per 5 minuti in AP Buffer

Preparare il substrato colorimetrico durante l'ultimo lavaggio con AP Buffer: 20µl di soluzione NBT/BCIP in 1 ml di AP Buffer

Aggiungere alla provetta contenente gli embrioni 500 µl di substrato colorimetrico e trasferire il tutto in una piastra a pozzetti multipli al riparo dalla luce.

Controllare di tanto in tanto lo sviluppo del colore mediante osservazione allo stereomicroscopio.

Quando la colorazione è sufficientemente visibile, trasferire gli embrioni in una provetta eppendorf e bloccare la reazione mediante lavaggi in PBT su di un agitatore orbitale (Il pH del PBT è fisiologico, mentre il pH dell'AP Buffer è alcalino. Il cambiamento di pH blocca dunque la reazione)

Rimuovere il PBT ed aggiungere 1 ml di Etanolo 100%

Lavare 2 volte per 5 minuti con Etanolo 100%

Montare i vetrini in Balsamo del Canada

## **SOLUZIONI**

Tutte le soluzioni vanno preparate in H<sub>2</sub>O trattata con DEPC ed autoclavata

### **PTW**

PBS 1X

Tween-20 0.2%

### **Soluzione di post-fissazione PP**

PBS 1X

Formaldeide EM grade methanol free 4%

Tween 20 0.1%



## **PTX**

PBS 1X

Triton X100 0.3%

## **Soluzione di ibridazione HS**

Formamide 50%

SSC 5X

Eparina 50 µg/ml

Tween 20 0.1%

DNA di sperma di salmone sonicato e denaturato mediante bollitura 100µg/ml

tRNA 500 µg/ml

La soluzione va conservata a -20°C

## **PBT**

PBS 1X

Tween- 20 0.1%

## **AP Buffer**

100 mM Tris-HCl pH 9.5

100 mM NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

0.1% Tween-20

## 2.20 Ibridazione *in situ* su emociti larvali circolanti

Il ceppo di *Drosophila melanogaster* utilizzato è il seguente:

w[\*]; P{w[+mC]=He-GAL4.Z}85, P{w[+mC]=UAS-GFP.nls}8

Tale ceppo contiene un transgene codificante per la Green Fluorescent Protein, posto sotto il controllo delle sequenze UAS, riconosciute dall'attivatore trascrizionale di lievito GAL4. Poiché questo viene prodotto da un secondo transgene, specificamente espresso negli emociti, tali cellule risultano fluorescenti.

10 larve di *Drosophila melanogaster* al terzo stadio di sviluppo, lavate in H<sub>2</sub>O, etanolo 75% e PBS 1X, sono state adagiate in una goccia di PBS 1X posta all'interno di un'area circolare tracciata con una *PAP pen* su di un vetrino poli-lisinato. Cuticola e sottostante epidermide sono state rimosse con l'ausilio di due pinzette a punta sottile, permettendo all'emolinfa di riversarsi nella goccia di PBS. Una volta rimosse le carcasse, i vetrini sono stati incubati per 30 minuti in camera umida, per permettere agli emociti di attaccarsi e andare incontro al processo di "spreading". Dopo 20 minuti di fissazione in 100 µl di paraformaldeide 4% in PBS in camera umida, sono stati effettuati tre lavaggi veloci con 100 µl di PBT, seguiti da due lavaggi di 5 minuti ciascuno in soluzione di ibridazione HB e PBT, in rapporto 1:1. È stata dunque effettuata una pre-ibridazione di 2 ore a 60°C in HB, in camera umida saturata con 2X SSC, al termine della quale sono stati posti sui vetrini 100 µl di HB contenente 100 ng di sonda antisenso o sonda senso, specifiche per il gene *CG2145*, marcate con digossigenina. È stata effettuata un'incubazione per tutta la notte a 60°C in camera umida saturata con 2X SSC. Il mattino seguente, è stata eseguita la seguente serie di lavaggi, a 60°C, sempre in camera umida saturata con 2X SSC:

2 lavaggi di 10 minuti in HB

1 lavaggio di 10 minuti in una miscela 3:1 di HB e PBT

1 lavaggio di 10 minuti in una miscela 1:1 di HB e PBT

1 lavaggio di 10 minuti in una miscela 1:3 di HB e PBT

Sono stati quindi eseguiti 3 lavaggi di 10 minuti in PBT a temperatura ambiente, seguiti da 1 ora di incubazione, in camera umida, in *Blocking solution*. Questa è stata sostituita da una soluzione di anticorpi secondari anti-digossigenina coniugati con fosfatasi alcalina, diluiti 1:2000 in PBT e l'incubazione è stata portata avanti per tutta la notte a 4°C in camera umida. Il mattino seguente, sono stati effettuati 3 lavaggi di 10 minuti in PBT, quindi 2 lavaggi di 5 minuti in AP Buffer. Il substrato colorimetrico è stato preparato come riportato nel paragrafo precedente, aggiungendo 20 µl di NBT/BCIP ad 1 ml di AP Buffer ed è stato incubato con i preparati, in camera umida al buio. Lo sviluppo di colore è stato seguito nel tempo e la reazione è stata infine bloccata lavando i vetrini 3 volte per 10 minuti in PBT.

## **SOLUZIONI**

### **Soluzione di ibridazione HB**

Formamide 50%

SSC 2X

Eparina 50 µg/ml

DNA di sperma di salmone sonicato e denaturato mediante bollitura 100 µg/ml

Triton X100 0.3%

tRNA 500 µg/ml

2% Roche blocking reagent

5 mM EDTA

0,1% Tween-20

H<sub>2</sub>O trattata con DEPC

### **Blocking solution, per ibridazione *in situ***

PBT

1% BSA

## **2.21 Generazione di una proteina di fusione CG2145 Thioredoxin tag-His tag-S-tag**

Il cDNA del gene *CG2145*, ottenuto mediante reazione di RT-PCR da RNA estratto da larve di *Drosophila melanogaster*, è stato sottoposto a PCR con i seguenti oligonucleotidi:

fw: TACAAGAACGAGGTACACAT

rev: ATTCTCCGGATAGGCGCTGC

Il frammento ottenuto, privo della sequenza che codifica per il peptide segnale, è stato inserito nel vettore pET32ek/LIC (2198 bp) ed il plasmide così generato è stato trasformato nel ceppo di *E.coli* Rosetta Gami DE3

### **Induzione dell'espressione della proteina di fusione**

Si riporta qui di seguito il protocollo:

Inoculare una singola colonia di batteri trasformati in 5 ml di LB contenente Ampicillina 100µg/ml e Cloramfenicolo 34µg/ml ed incubare la coltura per 16 ore a 37°C in agitazione

Inoculare i 5 ml di coltura batterica in 250 ml di LB, contenente gli antibiotici su menzionati

Incubare in agitazione a 37°C e monitorare l'assorbanza fino a che l'OD<sub>600</sub> non raggiunge un valore compreso tra 0,5 e 0,7

Prelevare 1 ml della coltura batterica e centrifugare per 1 minuto a 16.000 x g a temperatura ambiente

Eliminare il supernatante, risospendere il pellet in 50 $\mu$ l di 5X SDS-PAGE Sample Buffer e conservare a -20°C (Controllo non indotto)

Aggiungere alla restante coltura batterica IPTG ad una concentrazione finale di 0.5 mM

Lasciare in agitazione per 4 ore a 37°C

Prelevare 1 ml della coltura batterica e centrifugare per 1 minuto a 16.000 x g a temperatura ambiente

Eliminare il supernatante, risospendere il pellet in 100 $\mu$ l di 5X SDS-PAGE Sample Buffer e conservare a -20°C (Controllo indotto)

Centrifugare l'intera coltura batterica a 4.000 x g per 20 minuti a temperatura ambiente e conservare il il pellet a -20 °C

### **Purificazione della proteina di fusione**

La proteina di fusione CG2145-Thioredoxin-tag His-tag S-tag è stata purificata in condizioni denaturanti, mediante cromatografia di affinità su matrice Ni-NTA. L'acido nitriloacetico (NTA) è una molecola dotata di proprietà chelanti. Essa occupa quattro dei sei siti di legame presenti nella sfera di coordinazione dello ione nichel, lasciando due siti liberi di interagire con le istidine dell'His Tag della proteina di fusione. Il protocollo utilizzato per la purificazione è riportato qui di seguito:

Scongela in ghiaccio il pellet batterico conservato a -20°C e risospenderlo in Buffer di lisi: 4 ml per ogni grammo di peso del pellet

Miscelare e trasferire in provette di polipropilene da 50 ml

Congelare in bagnetto ghiaccio secco/alcool denaturato e scongelare in H<sub>2</sub>O fredda, ripetendo la procedura per 2 volte

Sonicare in ghiaccio

Centrifugare il lisato batterico a 10.000 x g per 30 minuti a 4°C

Conservare il supernatante: frazione proteica solubile. Aggiungere 5 µl di 2X SDS-PAGE Sample Buffer a 5 µl di supernatante e conservare a -20°C

Pesare il pellet e risospenderlo in Buffer B, nella misura di 5 ml per ogni grammo, lasciando la miscela in agitazione per 1 ora

Centrifugare a 10.000 x g per 30 minuti a temperatura ambiente

Prelevare il supernatante, aggiungervi la resina Ni-NTA, nella misura di 1 ml per ogni 4 ml di lisato batterico e miscelare lasciando in agitazione per 1 ora

Caricare la miscela di lisato batterico e resina su di una colonna vuota tappata alla base e lasciare che la resina decanti

Rimuovere il tappo che chiude la colonna e raccogliere il liquido che defluisce, contenente le proteine che non si sono legate alla matrice Ni-NTA

Effettuare 4 lavaggi da 15 ml con Buffer B a pH 8.0

Effettuare 4 lavaggi da 15 ml con Buffer C a pH 6.3

Eluire con Buffer E a pH 4.5, raccogliendo 13 frazioni da 0,5 ml ciascuna

Aggiungere a 10 µl di ciascuna frazione un'uguale quantità di 2X SDS-PAGE Sample Buffer.

Riscaldare tutti i campioni, compresi quelli di controllo allestiti durante le varie fasi della procedura di purificazione, a 95°C per 5 minuti e caricarli su di un gel di acrilammide al 7% per SDS-PAGE (vedi sotto), assieme ad un marcatore di pesi molecolari.

Effettuare la corsa elettroforetica a 20 mA, in tampone Tris-Glicina-SDS

## **SOLUZIONI**

### **Buffer di lisi**

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

300mM NaCl

10 mM Imidazolo

Portare il pH a 8.0 con NaOH

**Buffer B, Buffer C e Buffer E**

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 mM Tris-HCl

8 M Urea

Portare il pH a 8.0 con NaOH per il Buffer B e a 6.3 o 4.5 con HCl, rispettivamente per il Buffer C e il Buffer E

**5X SDS-PAGE Sample Buffer**

0.225 M Tris-HCl pH 6.8

50% glicerolo

5% SDS

0.05% Blu di bromofenolo

0.25 M DTT

**2X SDS-PAGE Sample Buffer**

0.09 M Tris-HCl pH 6.8

20% glicerolo

2% SDS

0.02% Blu di bromofenolo

0.1 M DTT

## **2.22 Preparazione di estratti proteici larvali**

20 larve al terzo stadio di sviluppo sono state lavate in H<sub>2</sub>O ed omogeneizzate a freddo, in 200µl di Buffer di estrazione contenente inibitori di proteasi, mediante l'utilizzo di un pestello di plastica perfettamente aderente alle pareti della provetta. L'omogenato è stato centrifugato a 16.000 x g per 5 minuti a 4°C ed il sovranatante è stato prelevato, aliquotato e conservato a -80°C.

### **SOLUZIONI**

#### **Buffer di estrazione delle proteine**

150 mM NaCl

1.0% Nonidet P-40

50 mM Tris-HCl pH 8.0

5% Glicerolo

10 µg/ml Aprotinina

10 µg/ml Pepstatina

10 µg/ml Leupeptina

1 mM PMSF

## **2.23 Determinazione della concentrazione proteica mediante il Metodo Bradford (micro-saggio)**

Si riporta di seguito il protocollo utilizzato:

Preparare 5 diluizioni in H<sub>2</sub>O di Bovine serum albumine (BSA) da utilizzare come standard: 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml.



Pipettare 400  $\mu$ l di ciascuna diluizione della proteina standard in due nuove provette Eppendorf, in modo da ottenere due replicati per ciascun valore di concentrazione.

Preparare apposite diluizioni di estratti proteici a concentrazione ignota.

Aggiungere 100  $\mu$ l di soluzione del Biorad Protein Assay a ciascuna provetta Eppendorf e miscelare utilizzando il vortex.

Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti-1 ora.

Misurare l'assorbanza a 595 nm.

Costruire una curva di calibrazione, riportando in grafico sull'asse delle ascisse i valori di concentrazione e sull'asse delle ordinate i valori di assorbanza delle soluzioni della proteina standard. Utilizzare i valori di assorbanza dei campioni di estratto proteico per derivare dalla curva di calibrazione la loro concentrazione relativa.

## 2.24 Western Blot

### SDS-PAGE e trasferimento

Il *Resolving gel* è stato preparato all'8% , miscelando 2 ml di una soluzione al 40% di Acrilammide-Bis Acrilammide 29:1, 2,5 ml di 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 ml di SDS 10% e 5.4 ml di H<sub>2</sub>O bidistillata. Per innescare la reazione di polimerizzazione sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di Persolfato di Ammonio al 10% e 7  $\mu$ l di TEMED. Terminata, in circa 30 minuti, la polimerizzazione del *Resolving gel* è stato preparato lo *Stacking gel* al 5%, miscelando 0,375 ml di una soluzione al 40% di Acrilammide-Bis Acrilammide 29:1, 0,38 ml di 1M Tris-HCl pH 6.8, 0.03 ml di SDS al 10% e 2.182 ml di H<sub>2</sub>O bidistillata. Anche qui, per innescare il processo di polimerizzazione sono stati aggiunti Persolfato di ammonio al 10% e TEMED, in quantità di 30  $\mu$ l e 3  $\mu$ l, rispettivamente.

I campioni, contenenti 50  $\mu$ g di proteine in Buffer di estrazione, sono stati preparati per il caricamento aggiungendo ad essi un volume di Laemmli Buffer 2X e riscaldandoli a 95°C per 5 minuti. La corsa elettroforetica è stata effettuata a

20 mA con Tampone Tris-Glicina-SDS. Al termine, il gel è stato lavato per 15 minuti con Buffer di trasferimento. Per il trasferimento si è utilizzata una membrana PVDF (GE Healthcare), attivata in metanolo 100% per pochi secondi, sciacquata in H<sub>2</sub>O distillata per 5 minuti ed infine equilibrata in Buffer di trasferimento. Le proteine sono state trasferite dal gel alla membrana di PVDF mediante passaggio di corrente a 20V per tutta la notte in camera fredda in Buffer di trasferimento. Al termine, la membrana è stata immersa in una soluzione di TBS-T e latte liofilizzato al 5% ed incubata per 1 ora a temperatura ambiente su di un agitatore. Dopo un breve risciacquo in TBS-T, la membrana è stata incubata in TBS-T e latte liofilizzato al 5% contenente un anticorpo policlonale prodotto in coniglio dalla PRIMM Biotech e diretto contro la proteina ricombinante CG2145 da me generata. L'anticorpo, pre-adsorbito su larve del ceppo mutante 9B in diluizione 1:20, è stato usato per il Western Blot in diluizione finale 1:2000. Dopo 2 brevi risciacqui ed un lavaggio di 15 minuti, seguito da 3 lavaggi di 5 minuti, in abbondante TBS-T, la membrana è stata incubata per 2 ore in TBS-T e latte liofilizzato al 5% contenente un anticorpo secondario anti-rabbit coniugato con la perossidasi (HRP), diluito 1:60000 (GE Healthcare). Al termine dell'incubazione, la membrana è stata sottoposta a 2 brevi risciacqui ed un lavaggio di 15 minuti, seguito da 3 lavaggi di 5 minuti, in abbondante TBS-T. Infine. La membrana è stata incubata per 5 minuti con la soluzione di rivelazione "ECL-PLUS" (GE Healthcare) e la produzione di chemiluminescenza è stata rivelata mediante esposizione ad una lastra fotografica.

### **Rimozione anticorpo primario e secondario dalla membrana (*Stripping*)**

Con questo passaggio la membrana è stata preparata a riutilizzo ed incubazione con un anticorpo diretto contro una proteina di riferimento.

La membrana è stata immersa in *Stripping Buffer* ed incubata a 50°C per 30 minuti in agitazione occasionale. Dopo due lavaggi di 10 minuti in TBS-T a temperatura ambiente, è stata incubata per 1 ora in TBS-T contenente latte liofilizzato al 5%. Al termine, la membrana è stata sottoposta ad incubazione con un anticorpo anti- $\alpha$  tubulina diluito 1:2000 ed un anticorpo secondario anti-mouse coniugato con perossidasi diluito 1:60.000 (GE Healthcare), seguendo la stessa procedura su riportata.

## **SOLUZIONI**

### **Laemmli Buffer 2X**

125 mM Tris-HCl pH 6.8

4% SDS

20% Glicerolo

0,2% BBF

2-mercaptoetanolo diluito 1:20

### **Tris-Glicina 5X**

125 mM Tris-base

1 M Glicina

### **Tris-Glicina-SDS 5X**

125 mM Tris-base

1 M Glicina

0,5% SDS

### **Buffer di trasferimento**

20% Metanolo

Tris-Glicina 1X

### **TBS 1X**

8 g NaCl

20 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.6

Aggiungere H<sub>2</sub>O per portare ad un volume finale di 1 litro e controllare il pH

### **TBS-T 0,1%**

TBS + 0,1% Tween 20

### **Stripping Buffer**

100 mM 2-Mercaptoetanol

2% SDS

62.5 mM Tris-HCl pH 6.7

## **2.25 Immunofluorescenza su emociti circolanti di *Drosophila melanogaster***

L'intera procedura è stata effettuata a temperatura ambiente, se non diversamente indicato. 10 larve di *Drosophila melanogaster* al terzo stadio di sviluppo sono state dissanguate su di un vetrino poli-lisinato e gli emociti lasciati aderire al vetrino e fissati come descritto nel paragrafo relativo all'ibridazione *in situ*. Al termine della fissazione, sono stati effettuati tre lavaggi veloci con 100 µl di PBS 1X. I vetrini sono stati dunque sistemati in un apposito contenitore portavetrini e sono stati eseguiti altri tre lavaggi, di 5 minuti ciascuno, in costante agitazione. Sono stati quindi versati all'interno del cerchietto tracciato con la *PAP pen* 100 µl di *Blocking Solution* ed è stata effettuata un'incubazione di 30 minuti in camera umida. Al termine, sono stati eseguiti due lavaggi in PBST, di 5 minuti ciascuno, all'interno del contenitore portavetrini, in costante agitazione. Gli emociti sul vetrino sono stati poi incubati in 100 µl di siero anti-CG2145, preadsorbito su

embrioni mutanti 9B e diluito 1: 200 in *Blocking Solution*, per tutta la notte a 4°C in camera umida. Il mattino seguente sono stati eseguiti tre lavaggi in PBST, di 5 minuti ciascuno, nel contenitore portavetrini, in costante agitazione a temperatura ambiente. Si è quindi effettuata un'incubazione con 100 µl di anticorpo secondario (goat anti-rabbit IgG coniugate con Texas red, Molecular Probes), diluito 1:400 in *Blocking solution*, per 30 minuti in camera umida. Dopo quattro lavaggi in PBST, ciascuno di 5 minuti, nel contenitore portavetrini in costante agitazione, i vetrini sono stati montati in 10µl di *ProLong Gold Antifade reagent with DAPI* (Invitrogen).

## **SOLUZIONI**

### **Blocking Solution**

3% Goat serum

0,5% BSA (Sigma-Aldrich)

0,3% Triton X 100

PBS 1X

### **PBST**

0,1% Triton

PBS 1X

## **2.26 Analisi della vitalità**

Per analizzare la vitalità di individui privi della funzione del gene *GC2145* è stato effettuato un incrocio fra femmine di un ceppo che porta un'estesa delezione della regione 9F8-10A3 del cromosoma X, che include il gene *CG2145*:

Df(1)BSC572, w[1118]/FM7h/Dp(2;Y)G, P{W[+Mc]=hs-hid}Y

e maschi portatori di una delezione del solo gene *CG2145*, da me prodotta e denominata CG2145-9B:

CG2145-9B/Y

E' stata dunque effettuata la conta della progenie, andando a confrontare il numero di femmine eterozigoti CG2145-9B/FM7 e femmine Df(1)BSC572/CG2145-9B.

## 2.27 Saggi di incapsulamento

I saggi di incapsulamento sono stati condotti utilizzando un ceppo avirulento del parassitoide endofago *L.boulardi*, il ceppo G486.

Gruppi di 20-30 larve di *Drosophila* al secondo stadio di sviluppo, contenenti sia individui mutanti Def(1)BSC572/9B, sia individui di controllo FM7ActGFP/9B (per un totale di 170 larve/genotipo) sono stati esposti per 2 ore ad 1 femmina di *L. boulardi*. Le femmine del parassitoide erano state precedentemente sottoposte ad un periodo di "training" della durata di 24 ore su popolazioni di larve di un ceppo selvatico di *Drosophila*, allo scopo di evitare fenomeni di superparassitizzazione.

Dopo 48 ore, le larve di *Drosophila* sono state dissezionate ed è stata verificata la presenza di uova/larve del parassitoide all'interno dell'emocele. Grado di incapsulamento e grado di melanizzazione sono stati definiti mediante osservazione al microscopio ottico.

I dati raccolti sono stati sottoposti al test statistico del chi quadro.

## 2.28 Saggi di infezione batterica

I saggi di infezione batterica sono stati condotti usando colture a saturazione di batteri Gram+ e Gram-, rispettivamente *Micrococcus luteus* ed *Escherichia coli* (ceppo DH5 $\alpha$ )

1 ml di ciascuna coltura batterica è stato centrifugato a 3.000 x g per 5 minuti a temperatura ambiente ed il pellet è stato risospeso in 50 µl di PBS 1X.

Gruppi di 20 femmine adulte mutanti Def(1)BSC572/9B , e femmine adulte di controllo 9B/FM7h (per un totale di circa 200 individui), sono state infettate, 3 giorni dopo l'emergenza dalla pupa, mediante puntura effettuata sul torace, in posizione dorsale, con un ago sottile di tungsteno inoculato nella sospensione batterica concentrata.

Subito dopo l'infezione, le femmine sono state incubate a 25°C, in barattolini contenente anche maschi, ed il numero delle femmine sopravvissute è stato registrato quotidianamente per un tempo totale di 10 giorni. I dati raccolti sono stati sottoposti al test statistico del chi quadro.

## **2.29 Saggio di attività fenolossidasi nell'emolinfa**

10 larve mutanti Def(1)BSC572/9B e 10 larve di controllo FM7ActGFP/9B sono state lavate in H<sub>2</sub>O ed Etanolo. Esse sono state quindi disposte su di un vetrino portaoggetto e punte nell'ultimo segmento addominale, in posizione dorsale, con un capillare di vetro, attraverso il quale è stata prelevata l'emolinfa. Questa è stata raccolta in una provetta eppendorf posta in ghiaccio, contenente 25 µl di Buffer Fosfato 0,1 M a pH 6.2. E' stata quindi effettuata un' incubazione di 1 ora a freddo, durante la quale è stato eseguito un microsaggio Bradford per determinare la concentrazione proteica dei campioni.

Il saggio di attività fenolossidasi è stato condotto a temperatura ambiente, aggiungendo rapidamente a 55 µg di proteine dell'emolinfa diluite in 25 µl di PBS, 25 µl di una soluzione 20 mM di L-DOPA, substrato della fenolossidasi. Esattamente 3 minuti dopo, è stata registrata la formazione dell'intermedio di reazione Dopacromo, mediante lettura dell'assorbanza a 490 nm,, utilizzando un lettore di piastre ELISA.

I dati ottenuti sono stati sottoposti a test statistico (*T-test*).

### **3. Risultati**

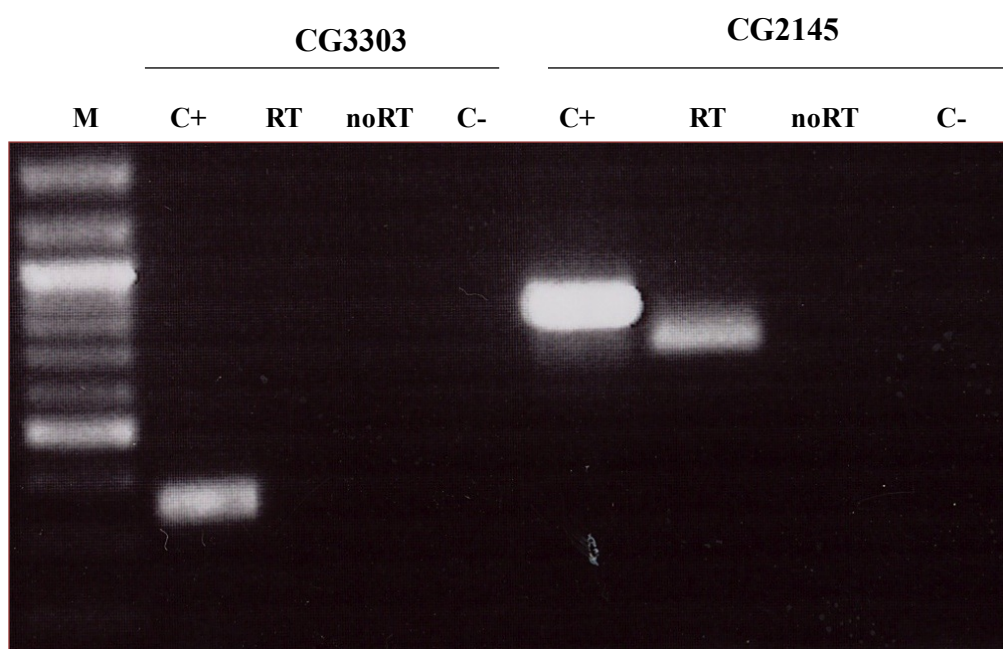
#### **3.1 Identificazione di potenziali ortologhi del gene *102* di *Heliothis virescens* in *Drosophila melanogaster***

La ricerca di potenziali ortologhi del gene *102* di *Heliothis virescens* in *Drosophila melanogaster* è stata intrapresa comparando la sequenza amminoacidica della proteina codificata da questo gene con l'intera banca dati delle proteine di *Drosophila*, mediante analisi BLAST. Tali analisi hanno identificato due proteine, indicate con le sigle CG2145 e CG3303, dotate di significativa omologia di sequenza con la proteina 102. La prima, codificata da un gene situato sul cromosoma X, presenta un'identità del 38% ed una similarità del 59% con la proteina 102. La seconda, codificata da un gene situato sul terzo cromosoma, è invece correlata con la proteina 102 in ragione di un'identità del 34% ed una similarità del 56%. Come si osserva nell'allineamento multiplo mostrato nella Figura 1, la sequenza proteica conservata si trova nella porzione C-terminale delle tre proteine. La proteina CG3303, costituita da 322 amminoacidi, ha una lunghezza più simile a quella della proteina 102, costituita da 364 amminoacidi, mentre la proteina CG2145 presenta un'estensione all'N-terminale ed ha dimensione complessiva di 592 amminoacidi.





Poiché il gene *102* di *Heliothis virescens* è espresso a elevati livelli negli emociti, ci si aspetta che il suo ortologo in *Drosophila* sia espresso in questo stesso tipo cellulare. Per evidenziare allora la possibile presenza dei trascritti dei geni *CG3303* e *CG2145* negli emociti di *Drosophila*, ho eseguito esperimenti di RT-PCR su RNA estratto da emociti larvali. I risultati, mostrati nella Figura 2, hanno dimostrato che il gene *CG2145* è effettivamente espresso negli emociti, mentre ho ottenuto per il gene *CG3303* un risultato apparentemente negativo. Questi dati suggerivano che il gene *CG2145* potesse essere l'omologo funzionale del gene *102* di *Heliothis virescens*. Ho allora focalizzato i miei studi successivi su questo gene.



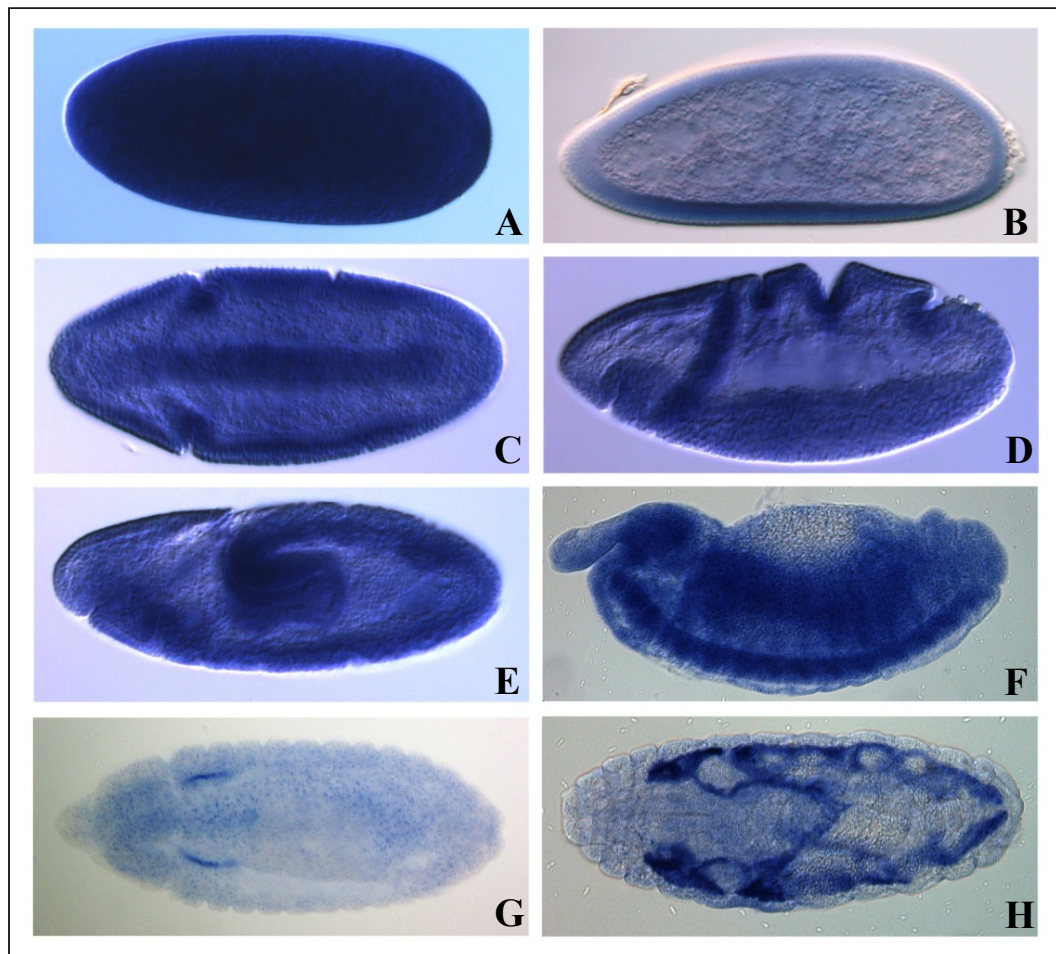
**Fig. 2.** RT-PCR su RNA estratto da emociti larvali. In questo esperimento sono state utilizzate coppie di oligonucleotidi specifiche per i geni *CG3303* e *CG2145*. Apparentemente, solo quest'ultimo è espresso nelle cellule immunitarie circolanti. C+: controllo positivo, reazione di PCR eseguita su DNA genomico; C-: controllo negativo, reazione di PCR eseguita in assenza di DNA stampo; RT: reazione di RT-PCR completa; noRT: reazione di RT-PCR eseguita in presenza di tutti i componenti, tranne l'enzima trascrittasi inversa. Le maggiori dimensioni del prodotto di PCR ottenuto da DNA genomico rispetto a quello derivante dal cDNA sono dovute alla presenza di un introne.

Il gene *CG2145* è indicato in *Flybase* con il simbolo *Dmel/CG2145* (*Flybase ID*: FBgn0030251), mappa sul cromosoma X in posizione X:10,821,432-10,823,745, quindi è lungo 2314 paia di basi.

### **3.2 Determinazione del profilo di espressione del gene *CG2145* negli embrioni di *Drosophila melanogaster***

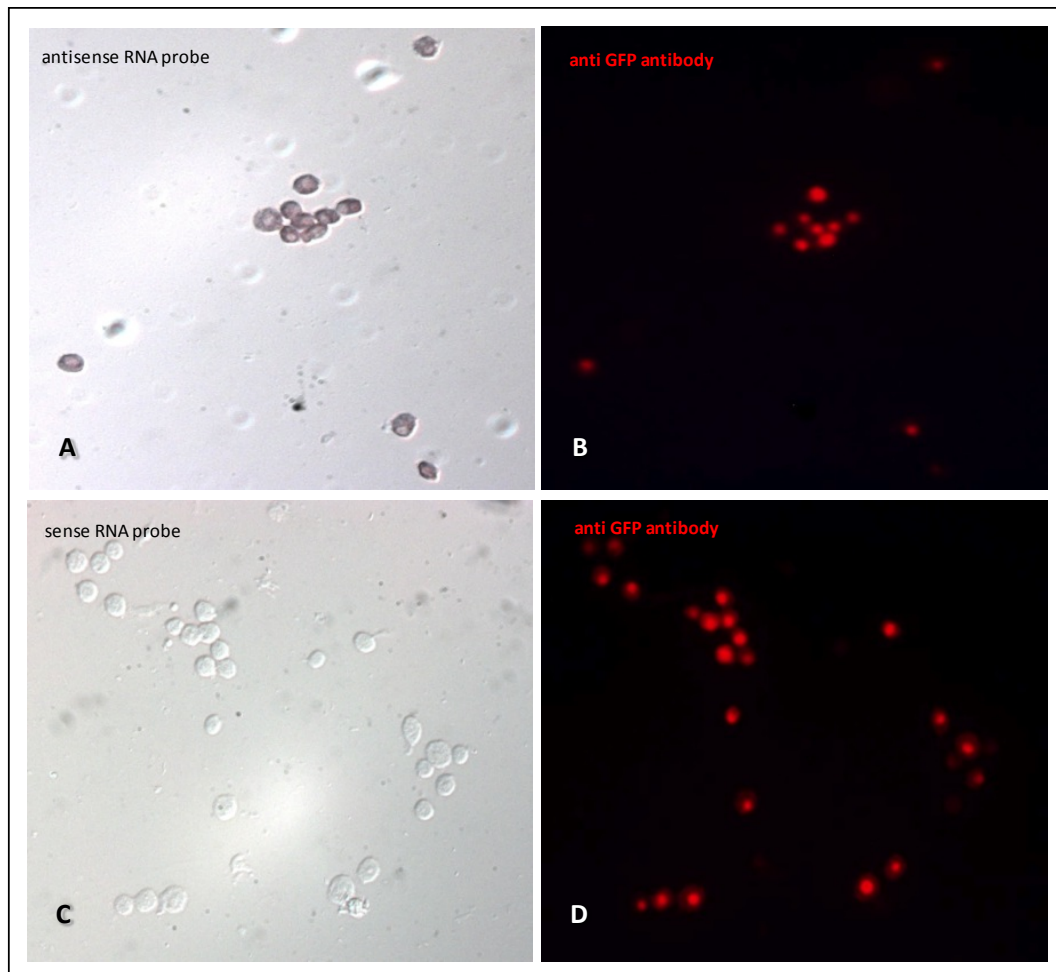
Ho iniziato la caratterizzazione di questo nuovo gene di *Drosophila melanogaster* definendo innanzitutto il suo profilo di espressione spazio-temporale durante lo sviluppo. Esperimenti di ibridazione *in situ*, riportati nella Figura 3, hanno dimostrato che il gene *CG2145* è espresso durante tutta l'embriogenesi, seguendo un andamento piuttosto complesso ed articolato. Nell'uovo appena deposto, un'abbondante quantità di trascritto di origine materna è uniformemente distribuita in tutto il citoplasma (Figura 3A), ma va scomparendo negli stadi di sviluppo immediatamente successivi (dati non mostrati). Nello stadio 4, di blastoderma cellulare, le cellule ventrali contengono una maggiore quantità di trascritto rispetto a quelle dorsali (Figura 3B) e questo riflette probabilmente l'inizio della trascrizione del gene *CG2145* in queste cellule dell'embrione. L'espressione del gene *CG2145* diviene poi particolarmente intensa in una banda di cellule situata in posizione mediana, che vanno a formare il cosiddetto solco ventrale. Questo si manifesta come una fessura longitudinale nella regione ventrale dell'embrione ed il suo ruolo è quello di guidare i processi di migrazione cellulare che portano alla formazione del mesoderma. Ciò si può osservare distintamente nella Figura 3C, che mostra una visione ventrale di un embrione a stadio di sviluppo 6. In questa stessa figura si osserva accumulo del trascritto del gene *CG2145* anche nei solchi cefalici che si formano nella regione anteriore dell'embrione in concomitanza con il solco ventrale e dividono la porzione cefalica dalla restante parte del corpo. Durante lo stadio di sviluppo successivo viene completata la gastrulazione ed il gene *CG2145* è espresso anche nei primordi del futuro endoderma. La Figura 3D mostra una visione laterale di un embrione di stadio 7, in cui si osserva la presenza del trascritto sia nelle cellule embrionali che si invaginano in posizione antero-ventrale per formare, all'estremità anteriore del solco ventrale, l'abbozzo dell'intestino medio anteriore, sia in un gruppo di cellule situate posteriormente, in posizione dorsale, coinvolte

nella formazione dell'amnioproctodeo, una tasca in cui le cellule polari vengono trascinate all'interno dell'embrione e che darà origine all'intestino medio posteriore. L'immagine mostra inoltre che il gene *CG2145* è espresso anche in tre solchi chiaramente visibili sul lato dorsale dell'embrione, il solco cefalico già citato, il solco trasversale anteriore ed il solco trasversale posteriore. Questi ultimi sono delle strutture transienti che comprendono le cellule primordiali dell'amnioserosa, una membrana extraembrionale che si formerà in seguito. L'espressione del gene *CG2145* persiste nel mesoderma e negli abbozzi dell'intestino medio negli stadi di sviluppo successivi e fino allo stadio 10, in cui si completa il cosiddetto allungamento della banda germinale, un processo durante il quale l'embrione aumenta le sue dimensioni lungo l'asse antero-posteriore, mentre si assottiglia lungo l'asse dorso-ventrale, con conseguente ripiegamento su se stesso (Figura 3E). Il processo poi si reverte e l'embrione si accorcia nuovamente, ristabilendo la sua normale topologia. La Figura 3F mostra un'immagine laterale di un embrione di stadio 13 in cui la retrazione della banda germinale è completa ed ha inizio una serie di complessi movimenti morfogenetici che porteranno all'involuzione della testa. In questo stadio il gene *CG2145* si esprime nell'intestino medio e in tutto il sistema nervoso centrale comprendente la corda nervosa ventrale e i gangli sopraesofagei, masse cerebrali derivanti dalla fusione dei gangli dei primi tre somiti cefalici, che si posizionano dorsalmente allo stomodeo. Il gene *CG2145* è espresso anche negli stadi finali dello sviluppo embrionale, in maniera più localizzata. Durante lo stadio 15 il segnale di ibridazione è presente nelle ghiandole salivari e in una serie di piccoli punti visibili in tutto il corpo dell'embrione (Figura 3G). Questi puntini corrispondono agli emociti, che in questo stadio di sviluppo si distribuiscono in vari distretti embrionali. Di notevole interesse è poi il fatto che il gene si esprime, durante lo stadio 17, nei corpi grassi che, come detto nell'introduzione, sono assieme agli emociti i principali organi immunitari di *Drosophila* (Figura 3H).



**Fig. 3.** Ibridazione *in situ* su embrioni a vari stadi di sviluppo di un ceppo selvatico di *Drosophila melanogaster*. Per questo esperimento è stata utilizzata una sonda antisenso ad RNA marcata con digossigenina, specifica per il gene *CG2145*. Il gene *CG2145* si esprime in diversi tessuti durante tutta l'embriogenesi. A: embrione appena deposto contenente il trascritto di origine materna. B: visione laterale di un embrione di stadio 4, in cui si osserva che il gene *CG2145* si esprime nelle cellule del lato ventrale. C: vista ventrale di un embrione di stadio 6 che mostra l'espressione del gene *CG2145* nel solco ventrale e nei solchi cefalici. D: visione laterale di un embrione di stadio 7, che mostra la presenza del trascritto del gene *CG2145*, oltre che nel solco cefalico, anche in altri gruppi di cellule che vanno incontro a migrazione, per formare gli abbozzi dell'intestino medio anteriore e posteriore ed i solchi trasversali anteriore e posteriore. E: vista laterale di un embrione di stadio 10, mostrata per evidenziare che il trascritto del gene *CG2145* persiste nel mesoderma e nell'endoderma fino al termine del processo di estensione della banda germinale. F: visione laterale di un embrione di stadio 13, in cui osserva espressione del gene *CG2145* nell'intestino e nel sistema nervoso centrale formato dalla corda ventrale e dai gangli sopraesofagei. G: visione dall'alto di un embrione di stadio 15, che permette di evidenziare il trascritto del gene nelle ghiandole salivari e negli emociti. H: embrione di stadio 17, che mostra l'espressione del gene *CG2145* nei corpi grassi.

Per verificare dunque se il gene *CG2145* continuasse ad essere espresso nei tessuti coinvolti nella risposta immunitaria anche negli stadi di sviluppo successivi all'embriogenesi, ho effettuato esperimenti di ibridazione *in situ* su emociti e corpi grassi larvali. Ho potuto così dimostrare che sia gli emociti (Figura 4), sia i corpi grassi (dati non mostrati) trascrivono attivamente il gene *CG2145* anche durante gli stadi larvali. Per ciò che riguarda gli emociti, questi dati confermano i risultati degli esperimenti di RT-PCR mostrati in Figura 2, fugando eventuali dubbi legati alla difficoltà di isolare gli emociti in forma pura ed ottenere preparazioni di RNA non contaminate da altri tipi cellulari. Nel caso degli esperimenti di ibridazione *in situ*, non sussiste invece alcuna difficoltà a discriminare gli emociti, in quanto solo essi sono in grado di aderire ai vetrini. Ad ogni modo, ho utilizzato per questi esperimenti un ceppo transgenico in cui gli emociti sono marcati dall'espressione della GFP (vedi materiali e metodi). Come si può osservare nella Figura 4A-B, il segnale di ibridazione ottenuto con una sonda antisenso che riconosce il trascritto del gene *CG2145* corrisponde a cellule GFP-positive. Nessun segnale di ibridazione si osserva invece con una sonda senso (Figura 3 C-D).

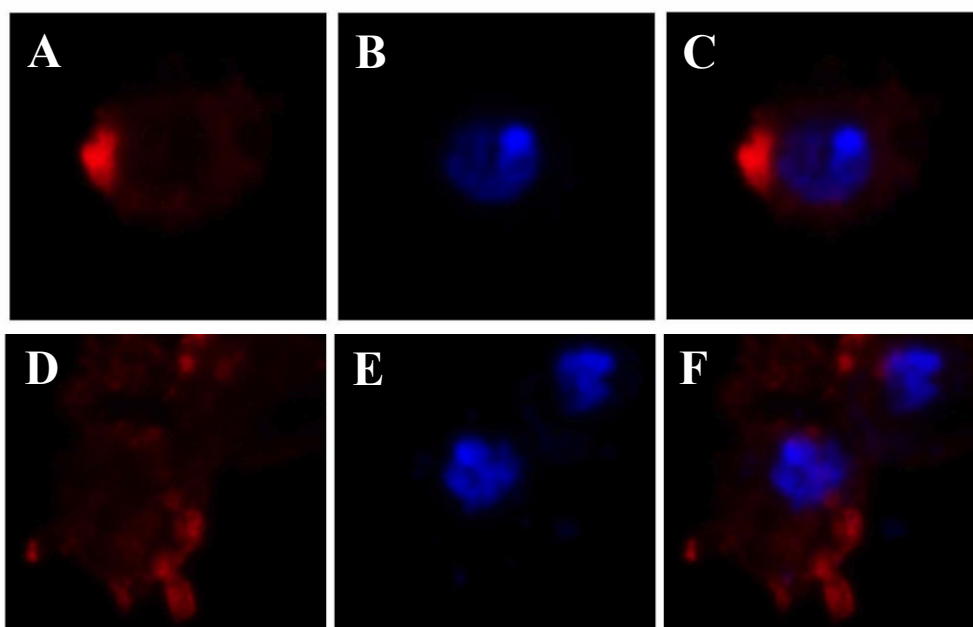


**Fig. 4.** Ibridazione *in situ* su emociti larvali. Il ceppo utilizzato è He-Gal4 UAS-GFP, caratterizzato dall'espressione della GFP negli emociti circolanti. A e C: osservazione al microscopio in luce trasmessa di emociti ibridati rispettivamente con una sonda antisense e una sonda senso. B e D: osservazione in fluorescenza dei preparati mostrati rispettivamente in A e C. La colorazione rossa indica la presenza di GFP, evidenziata mediante immunofluorescenza indiretta (vedi materiali e metodi).

### 3.3 Localizzazione intracellulare della proteina CG2145

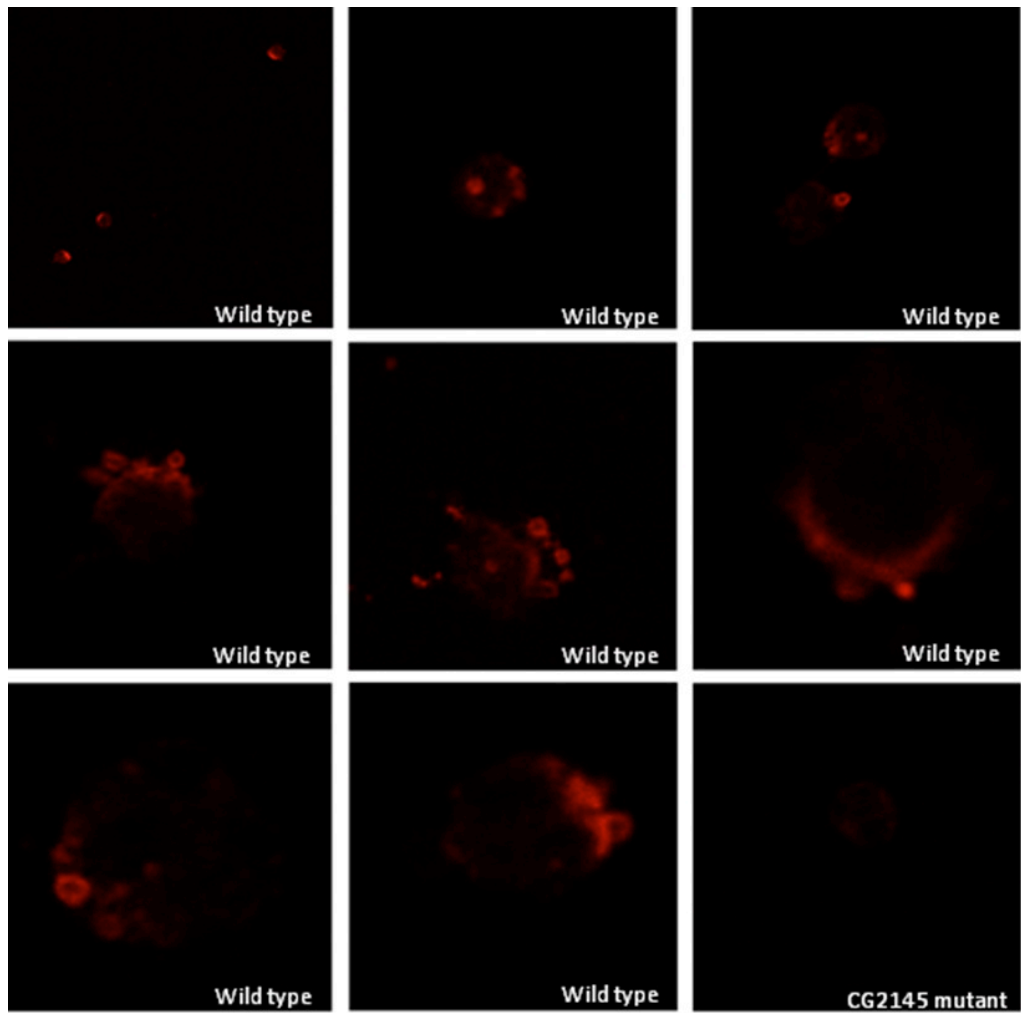
Per ottenere informazioni circa la distribuzione intracellulare della proteina CG2145, ho innanzitutto generato un anticorpo policlonale diretto contro una proteina ricombinante (vedi materiali e metodi). Ho dunque utilizzato questo anticorpo in esperimenti di immunolocalizzazione su emociti larvali di un ceppo selvatico di *Drosophila melanogaster*. Come si osserva nella Figura 5, in cui sono mostrate immagini ottenute al microscopio confocale, la proteina CG2145 è distribuita in maniera asimmetrica nel citoplasma degli emociti (A-C). Essa si

localizza infatti in maniera polarizzata ad un lato delle cellule emocitarie, opposto a quello in cui si trova il nucleo. La membrana cellulare a contatto con i siti di accumulo della proteina CG2145 dà poi origine a peculiari strutture vescicolari che si distaccano dalla superficie della cellula, portando con sé abbondanti quantità della proteina stessa (D-F). La Figura 6, in cui è mostrata una collezione di immagini di diversi emociti, documenta il processo di formazione di queste vescicole ed il loro rilascio nell'ambiente extracellulare.



**Fig. 5.** Localizzazione intracellulare della proteina CG2145. Le immagini mostrano sezioni di emociti larvali, ottenute al microscopio confocale. Pannelli A e D: anticorpo anti-CG2145. Pannelli B e E: colorazione DAPI per evidenziare i nuclei. Pannelli C e F: sovrapposizione. La proteina CG2145 si localizza ad un polo della cellula prospiciente il nucleo (A-C) e va poi ad accumularsi all'interno di strutture vescicolari che si distaccano dalla superficie cellulare (D-F).





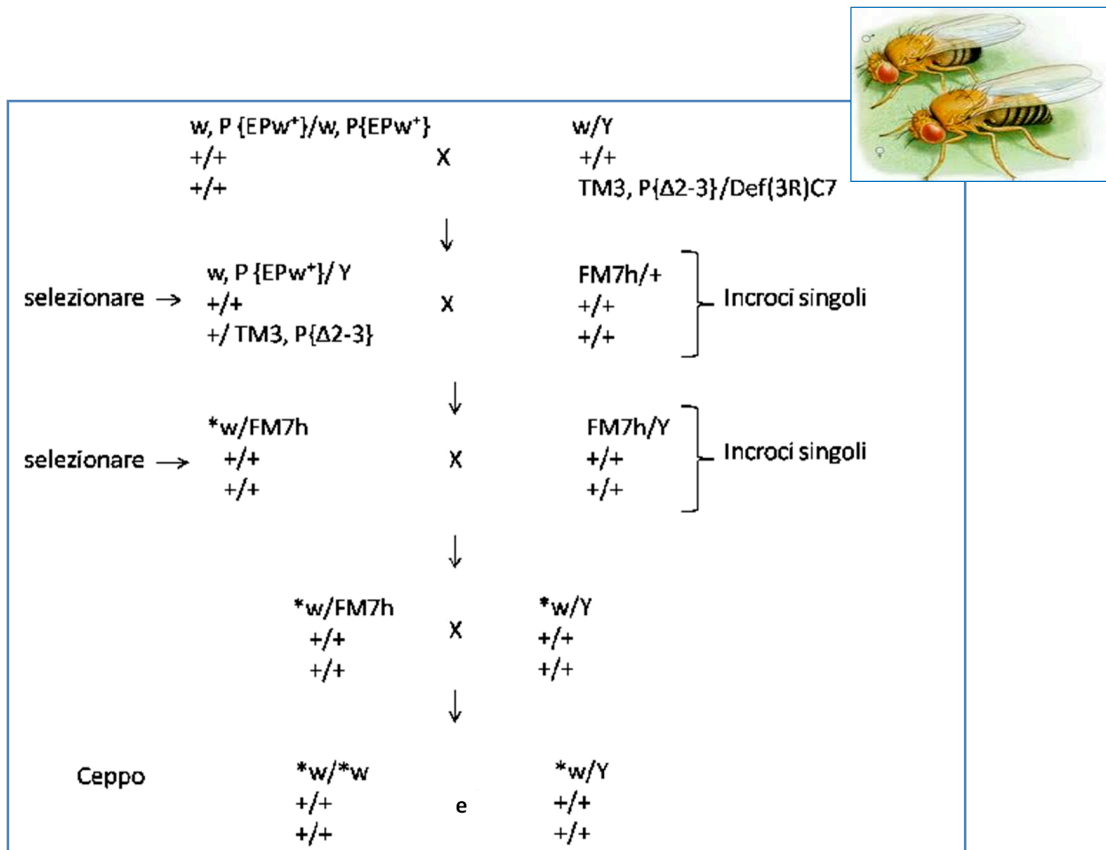
**Fig. 6.** Rilascio della proteina CG2145 nell'ambiente extracellulare. Le immagini mostrano una collezione di sezioni di emociti larvali, ottenute al microscopio confocale. Si osservano stadi successivi di formazione e distacco dalla superficie cellulare di vescicole contenenti la proteina CG2145.

### 3.4 Isolamento di mutazioni per delezione di sequenze del gene *CG2145*

Per intraprendere l'analisi funzionale del gene *CG2145*, ho generato, utilizzando opportuni strumenti genetici, una serie di delezioni nella regione genomica in cui esso è localizzato, ed ho poi mappato l'estensione delle delezioni ottenute facendo ricorso a strumenti molecolari. L'obiettivo era ottenere un cromosoma in cui tutto o parte del gene *CG2145* fosse stata rimossa, lasciando inalterati i geni adiacenti.

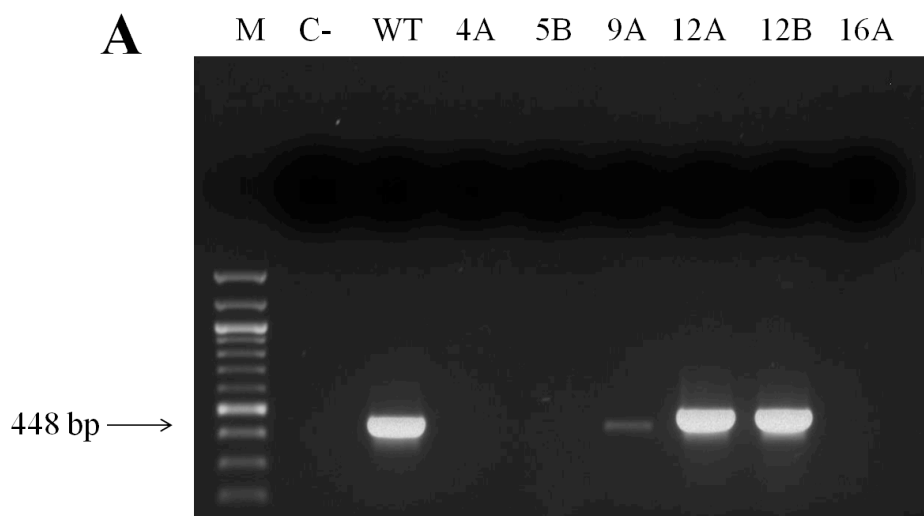
Per indurre delezioni nella regione genomica di mio interesse, ho utilizzato il ceppo  $w[*] P\{w[+mC]=EP\}CG2145[G605]$ , contenente un elemento trasponibile

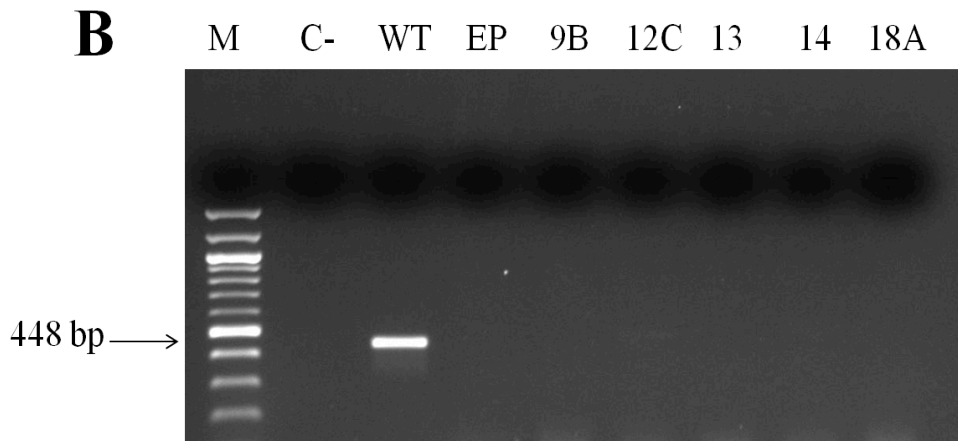
P localizzato nella porzione non tradotta al 5' del gene *CG2145* (5'UTR), in posizione +31 rispetto al sito di inizio della trascrizione, ed ho mobilizzato questo elemento trasponibile fornendo una fonte di trasposasi. Gli incroci genetici eseguiti per mobilizzare questo elemento trasponibile, selezionare gli individui in cui era avvenuta la mobilizzazione e creare da ciascuno di essi una linea stabile sono riportati nella Figura 7.



**Fig. 7.** Schema degli incroci genetici eseguiti per generare delezioni nella regione genomica in cui mappa il gene *CG2145*.  $EPw^+$  indica un elemento trasponibile P ingegnerizzato situato all'interno di questo gene nel ceppo utilizzato. Questo elemento trasponibile manca delle sequenze codificanti per la trasposasi, ma possiede le sequenze terminali ripetute ed invertite necessarie per la trasposizione e contiene le sequenze del gene white ( $w^+$ ), utilizzato come marcatore fenotipico selezionabile.  $\Delta 2-3$  indica l'elemento P ingegnerizzato  $P\{ry+t7.2=\Delta 2-3\}$  inserito in posizione 99B sul bilanciatore del terzo cromosoma TM3. Questo elemento P non è in grado di trasportare, ma codifica per una trasposasi funzionale. FM7h è un bilanciatore del cromosoma X. L'asterisco indica il cromosoma X in cui è avvenuta l'escissione dell'elemento trasponibile  $EPw^+$ .

L'escissione degli elementi trasponibili P può avvenire in maniera precisa, portando a ricostituzione della corretta sequenza genomica nel sito di inserzione, o in maniera imprecisa, producendo delezioni nelle sequenze genomiche fiancheggianti. Per discriminare fra queste due possibilità, le linee ottenute da individui selezionati per perdita dell'elemento P sono state sottoposte ad analisi molecolare, mediante una strategia basata su reazioni di PCR. Una prima reazione di PCR è stata effettuata utilizzando un oligonucleotide (EP forw) disegnato sulle sequenze genomiche immediatamente a monte del sito di inserzione dell'elemento P nel ceppo di partenza e un altro oligonucleotide (EP rev) disegnato internamente al gene *CG2145*, a cavallo tra il primo introne ed il secondo esone. Grazie a tale coppia di oligonucleotidi sono state sottoposte ad analisi molecolare un centinaio di linee. Un esempio dei risultati ottenuti è mostrato nella Figura 8. Nel pannello A di questa Figura, si osserva che la mobilizzazione dell'elemento P è avvenuta in maniera precisa nel caso delle linee indicate come 9A, 12A e 12B, che mostrano un prodotto di amplificazione di lunghezza corrispondente a quello ottenuto da un ceppo selvatico. Il pannello B mostra invece assenza di prodotto di amplificazione in una serie di linee in cui è avvenuto un evento di escissione imprecisa, tra cui la linea 9B che, come indicato sotto, ho selezionato per eseguire le mie analisi fenotipiche.





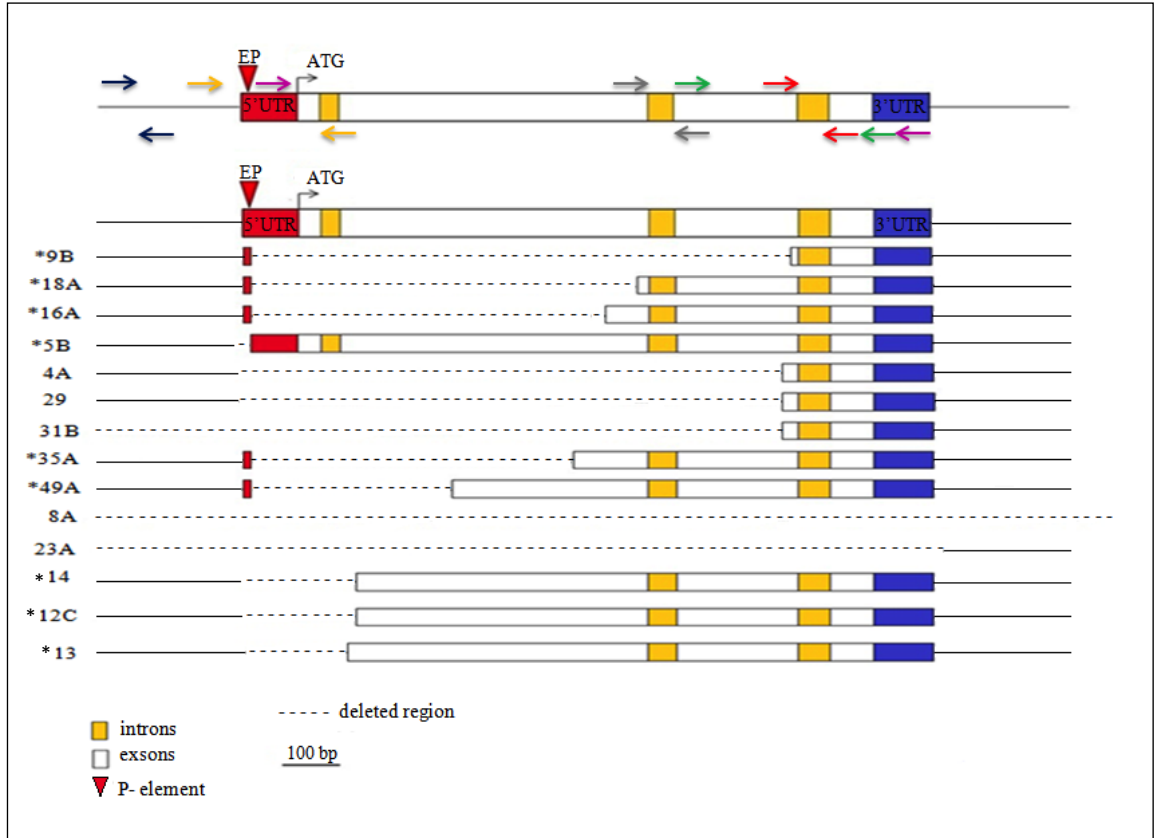
**Fig. 8.** Analisi molecolare di diverse linee di *Drosophila* ottenute mediante mobilizzazione di un elemento P situato all'interno del gene *CG2145*. Sono mostrati i prodotti di reazioni di PCR eseguite su DNA genomico per amplificare un frammento situato a cavallo dell'originario sito di inserzione dell'elemento P. Pannello A: nei campioni 4A, 5B e 16A non si osserva prodotto di amplificazione, dunque tali linee derivano da un evento di escissione imprecisa dell'elemento P. Nei campioni 9A, 12A e 12B è presente un prodotto di amplificazione uguale a quello, di 448 bp, ottenuto da un ceppo selvatico: in tali linee l'escissione dell'elemento P è avvenuta in maniera precisa e di conseguenza il gene si è ricostituito. WT indica il ceppo selvatico di controllo; C- è il controllo negativo privo del DNA stampo; EP indica il ceppo in cui l'elemento P è inserito nel 5' UTR del gene *CG2145*. In questo campione non si osserva prodotto di amplificazione perché la presenza dell'elemento P accresce notevolmente le dimensioni del frammento compreso fra i due primers, rendendo impraticabile la reazione di amplificazione mediante PCR. Pannello B: il prodotto di amplificazione, visibile nel controllo selvatico, è assente in tutti i campioni, incluso il campione 9B.

Le linee derivanti da eventi di escissione imprecisa dell'elemento P, identificate nel corso di questo primo screening molecolare, sono state sottoposte ad ulteriori analisi mediante PCR, utilizzando coppie di oligonucleotidi disegnati sulle sequenze del gene *CG2145* e su quelle delle regioni fiancheggiatrici (vedi materiali e metodi).

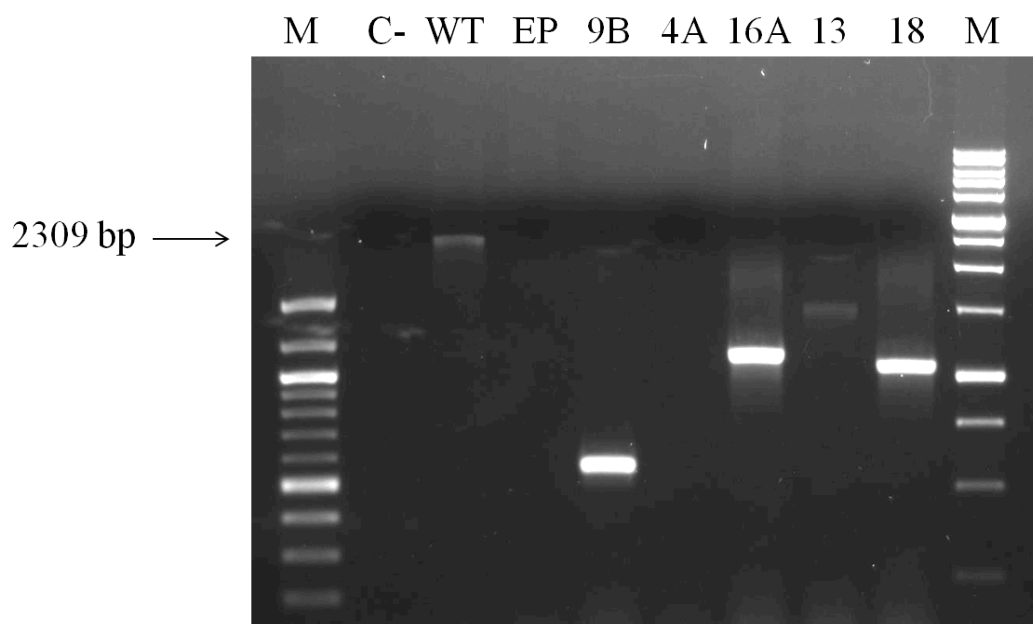
La mappatura delle delezioni effettuata mediante PCR mi ha in definitiva permesso di identificare 14 differenti mutanti. In 9 di questi mutanti la lesione molecolare è confinata all'interno del gene *CG2145*, mentre negli altri mutanti

sono assenti anche regioni genomiche fiancheggianti, situate a valle e/o a monte di esso. Nella Figura 9 è riportata in maniera schematica la struttura della regione genomica di interesse in tutti i mutanti ottenuti. Nel mutante 5B il gene *CG2145* è quasi completamente integro e mancano solo le 31 paia di basi del 5' UTR situate a monte del sito originario di inserzione di P. Nei mutanti 14, 12C e 13 le delezioni partono poche basi a valle del sito di inizio della trascrizione e terminano all'inizio del secondo esone. Nei mutanti 49A, 35A, 16A e 18A le delezioni si estendono dal sito originario di inserzione di P nel 5'UTR del gene *CG2145*, al secondo esone, che manca in questi mutanti di porzioni via via crescenti secondo l'ordine indicato. Nei mutanti 4A, 29 e 31B le delezioni si estendono maggiormente all'interno del gene *CG2145*, fino a comprendere gran parte del terzo esone. Però, mentre nei mutanti 4A e 29 le estremità 5' delle delezioni cadono poche decine di basi prima dell'inizio del gene *CG2145*, nel mutante 31B la delezione si estende maggiormente in direzione 5' e potrebbe interessare anche i geni situati a monte. I mutanti 8A e 23A mancano completamente del gene *CG2145*, ma le delezioni si estendono al di là di esso, in entrambe le direzioni; nel caso del mutante 8A i limiti della delezione non sono stati definiti e quindi tale delezione potrebbe interessare i geni fiancheggianti sia a monte che a valle, mentre nel caso del mutante 23A è stato definito il limite 3', che cade poco a valle del gene *CG2145*.

Tra i vari mutanti ottenuti, quello che presenta la più estesa delezione delle sequenze del gene *CG2145*, mantenendo intatte le regioni genomiche fiancheggianti, è il mutante 9B. La delezione del mutante 9B è stata mappata, come tutte le altre, innanzitutto mediante analisi molecolare per PCR. Come si osserva nella Figura 10, utilizzando una sequenza oligonucleotidica situata immediatamente a monte dell'originario sito di inserzione dell'elemento trasponibile P, in combinazione con un'altra sequenza situata alla fine dell'ultimo esone del gene *CG2145*, si è ottenuto un prodotto di amplificazione di dimensioni assai ridotte rispetto a quello ottenuto da un ceppo di controllo. Ciò ha indicato la presenza di una delezione confinata all'interno del gene. L'esatta estensione di questa delezione è stata determinata mediante sequenziamento del frammento prodotto per PCR. L'analisi della sequenza ottenuta ha dimostrato che il mutante 9B manca dell'intera regione codificante del gene *CG2145*. Tale mutante può dunque essere considerato un mutante nullo.



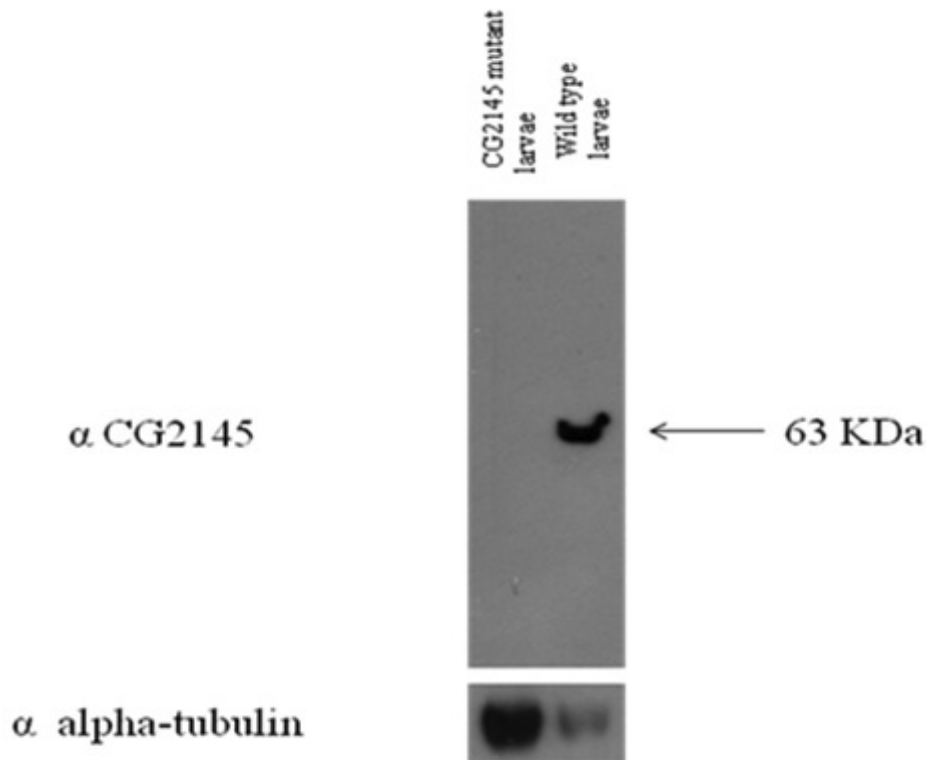
**Fig. 9.** Mappa delle delezioni ottenute nella regione genomica in cui è localizzato il gene *CG2145*. Sono stati identificati 14 differenti mutanti per delezione. In 9 di essi, indicati con l'asterisco, la lesione molecolare è confinata all'interno del gene *CC2145*, mentre negli altri la delezione si estende nelle regioni fiancheggianti e può interessare anche uno o più geni a monte e/o a valle del gene *CG2145*. Il mutante 9B è quello che mostra la delezione più estesa, compresa all'interno di questo gene.



**Fig. 10.** Analisi molecolare della linea 9B. Sono mostrati i prodotti di reazioni di PCR eseguite su DNA genomico con un oligonucleotide situato subito a monte dell'originario sito di inserzione dell'elemento P, ed uno situato alla fine dell'ultimo esone del gene *CG2145*. Il prodotto ottenuto dalla linea 9B ha una lunghezza di circa 550 paia di basi, mentre quello ottenuto dal ceppo di controllo è di 2309 paia di basi. Ciò dimostra che la linea 9B presenta una estesa delezione di sequenze interne al gene *CG2145*. Altre linee presentano delezioni meno estese. C-: controllo negativo privo di DNA stampo; WT: ceppo selvatico di controllo; EP: ceppo in cui l'elemento P è inserito nel 5' UTR del gene *CG2145*.

### 3.5 Il mutante *CG2145-9B* è un mutante nullo

Per verificare che il mutante *CG2145-9B* è, in effetti, un mutante nullo, ho effettuato un'analisi di Western Blot su estratto proteico di larve di terzo stadio, utilizzando l'anticorpo policlonale diretto contro la proteina di fusione CG2145 da me prodotto. Come si può osservare nella Figura 11, questo anticorpo riconosce una proteina del peso atteso di 63 KDa in un estratto proteico di larve di controllo, ma questa proteina è assente in larve omozigoti per la mutazione *CG2145-9B*. Questo risultato è la prova formale del fatto che l'allele mutante *CG2145-9B* è un allele nullo, ovvero è incapace di produrre la proteina CG2145.



**Fig. 11.** Analisi di Western Blot. L'esperimento è stato condotto utilizzando un anticorpo diretto contro la proteina CG2145, su estratti proteici totali di larve di terzo stadio di sviluppo della linea omozigote mutante *CG2145-9B* e del ceppo selvatico *Canton S* di *Drosophila melanogaster*, usato come controllo. La membrana è stata successivamente incubata con un anticorpo diretto contro la alfa-tubulina, per effettuare un controllo del caricamento. La proteina CG2145 di 63 KDa è presente nel ceppo di controllo, ma assente nella linea mutante *CG2145-9B*.

### 3.6 Caratterizzazione fenotipica del mutante *CG2145-9B*

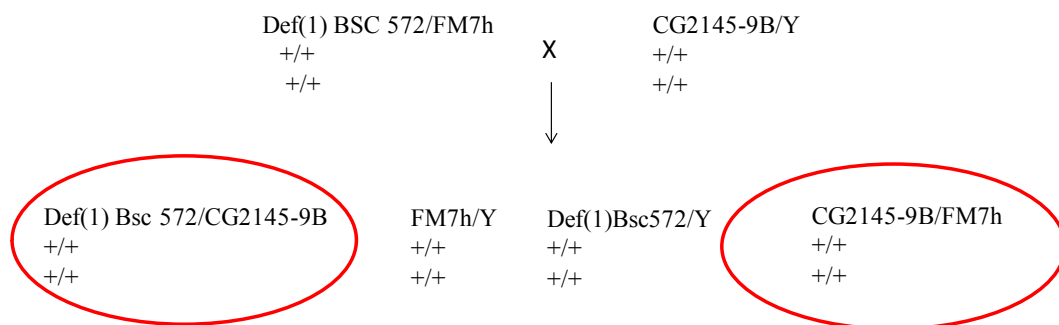
Il ceppo omozigote per la mutazione *CG2145-9B* non presenta apparentemente difficoltà ad essere propagato, indicando che la mancanza della proteina CG2145 non compromette nè la vitalità nè la fertilità di *Drosophila*. Gli individui omozigoti per questa mutazione non presentano inoltre evidenti alterazioni morfologiche. D'altro canto, i dati di espressione durante lo sviluppo embrionale da me ottenuti dimostrano che i trascritti del gene *CG2145* sono presenti in maniera abbondante durante tutta l'embriogenesi ed in particolare marcano, nei primi stadi, cellule implicate in importanti processi morfogenetici. Le analisi fenotipiche da me effettuate sono state allora innanzitutto mirate a valutare la



percentuale di sopravvivenza di embrioni mutanti per il gene *CG2145* rispetto ad embrioni di controllo. Successivamente, ho eseguito una serie di saggi funzionali, mirati a saggiare la risposta immunitaria di larve e adulti mutanti. Per tutti questi esperimenti ho utilizzato individui *CG2145-9B/Def(1)BSC572*, portatori della mutazione *CG2145-9B* in trans con una delezione di un'estesa regione genomica comprendente il gene (ottenuta dallo Stock Center di Bloomington), e li ho confrontati con individui di controllo eterozigoti per la mutazione stessa. La scelta di non utilizzare per le analisi fenotipiche individui omozigoti per la mutazione *CG2145-9B* è nata dall'esigenza di evitare che mutazioni a carico di altri geni, eventualmente presenti sul cromosoma, potessero interferire con i miei saggi. Inoltre, individui mutanti e individui di controllo sono stati ottenuti mediante un unico incrocio, riducendo al minimo la variabilità genetica, cosa particolarmente importante soprattutto per i saggi di incapsulamento.

### 3.6.1 La sopravvivenza embrionale non è alterata in assenza della proteina CG2145

La vitalità degli embrioni privi della funzione del gene *CG2145* è stata valutata andando a registrare il numero di femmine mutanti e femmine di controllo, nate dall'incrocio mostrato nella Figura 12.

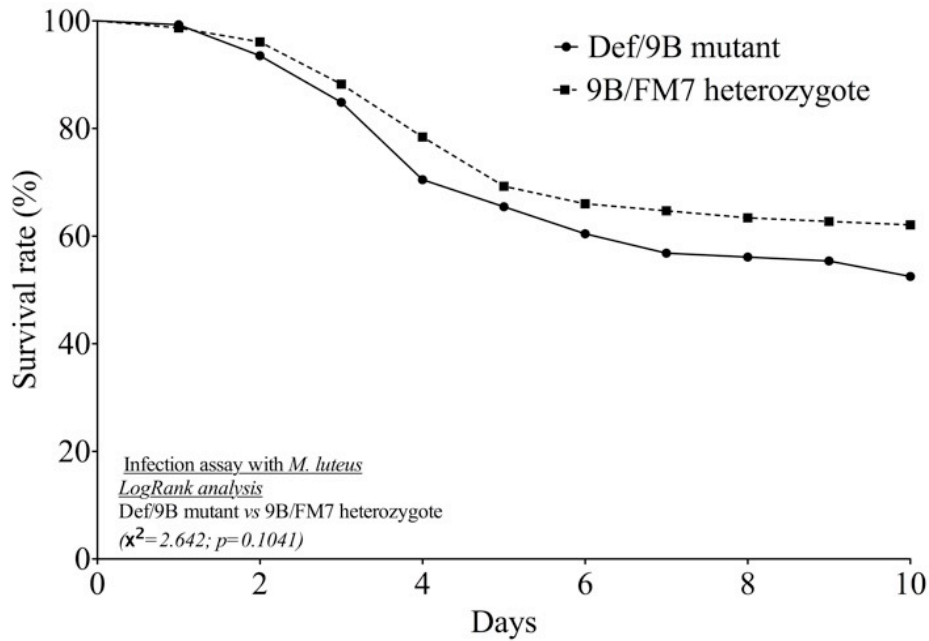


**Fig. 12.** Schema dell'incrocio genetico effettuato per ottenere femmine *Def(1)BSC572/CG2145-9B* e femmine *CG2145-9B/FM7h*. Sono indicati i genotipi di tutti gli zigoti prodotti, inclusi gli zigoti *Def(1)Bsc572/Y*, che non si sviluppano.

Su di un totale di 199 femmine nate, 101 (50,8%) erano femmine *Def(1)BSC572/CG2145-9B* e le restanti 98 (49,2%) erano femmine di controllo *CG2145-9B/FM7h*. È dunque evidente che non ci sono significative differenze di vitalità tra embrioni mutanti ed embrioni eterozigoti. Questi dati confermano che le funzioni svolte dal gene *CG2145* durante lo sviluppo embrionale non sono necessarie per la sopravvivenza.

### **3.6.2 Il mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B* resiste alle infezioni microbiche**

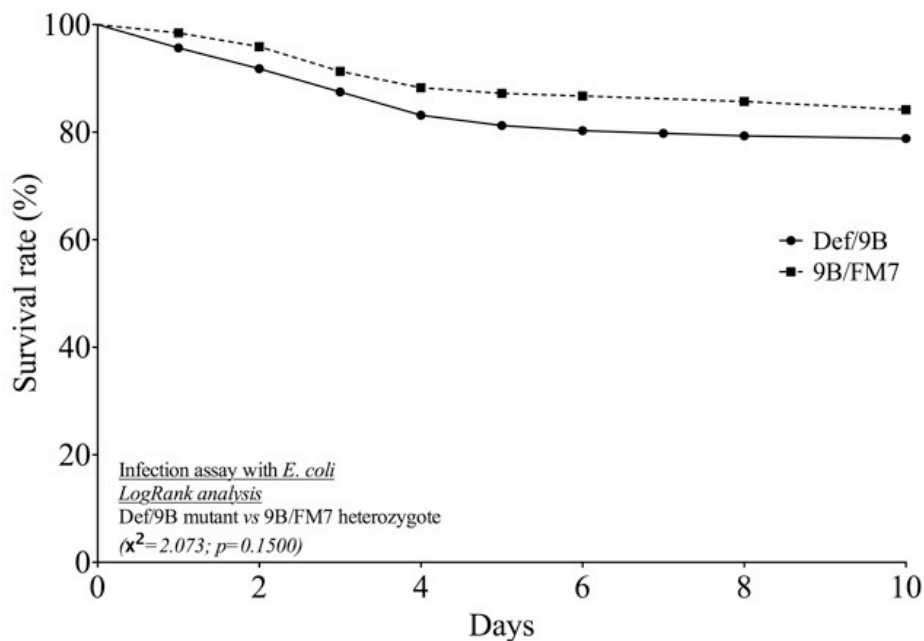
Per saggiare l'efficienza della risposta immunitaria innata in assenza della funzione del gene *CG2145*, ovvero la capacità di rispondere ad attacchi e stimoli esterni, ho effettuato specifici saggi funzionali. La resistenza alle infezioni microbiche è stata valutata eseguendo esperimenti di iniezione intraemocelica di batteri Gram positivi e Gram negativi in individui adulti. Sono state utilizzate circa 200 mosche per ciascun genotipo, il numero di individui sopravvissuti è stato registrato per 10 giorni successivi alle infezioni e i dati ottenuti sono stati sottoposti al test statistico del chi quadro. Nell'analisi non sono stati presi in considerazione gli individui morti nelle prime tre ore dopo l'infezione. I risultati relativi alle infezioni con il batterio Gram positivo *M. luteus* sono riportati nella Figura 13, in cui si osserva che le curve di sopravvivenza del mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B* e del controllo *CG2145-9B/FM7h* hanno un andamento simile ed infatti il test statistico applicato non ha rivelato differenze statisticamente significative ( $\chi^2=2,642$ ,  $p=0,1041$ ).



**Fig. 13.** Curve di sopravvivenza all'infezione di batteri Gram positivi. L'infezione batterica attraverso puntura intraemocelica è stata effettuata con microaghi imbevuti in una sospensione concentrata di *M. luteus*. Femmine mutanti *Def(1)BSC572/CG2145-9B* (linea continua) e femmine eterozigoti *CG2145-9B/FM7h* (linea tratteggiata) utilizzate come controllo sono state trattate 3 giorni dopo la fuoriuscita dall'involucro pupale. I dati riportati in grafico sono stati raccolti durante i 10 giorni successivi all'infezione e mostrano che gli individui mutanti hanno lo stesso grado di sopravvivenza degli individui di controllo. *LogRank* analysis  $p=0.1041$ .

Risultati analoghi sono stati ottenuti in esperimenti di infezione intraemocelica effettuati con il batterio Gram negativo *E. coli*. Questi risultati sono riportati nella Figura 14. La curva di sopravvivenza del mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B* non mostra differenze statisticamente significative con quella del controllo *CG2145-9B/FM7h* ( $\chi^2=2,073$ ,  $p=0,1500$ ).

Mosche mutanti prive della funzione del gene *CG2145* non manifestano quindi suscettibilità alle infezioni con batteri Gram negativi nè alle infezioni con batteri Gram positivi. Nel loro complesso, questi dati dimostrano che i processi immunitari di riconoscimento ed eliminazione degli agenti microbici non sono compromessi in assenza della proteina *CG2145*.

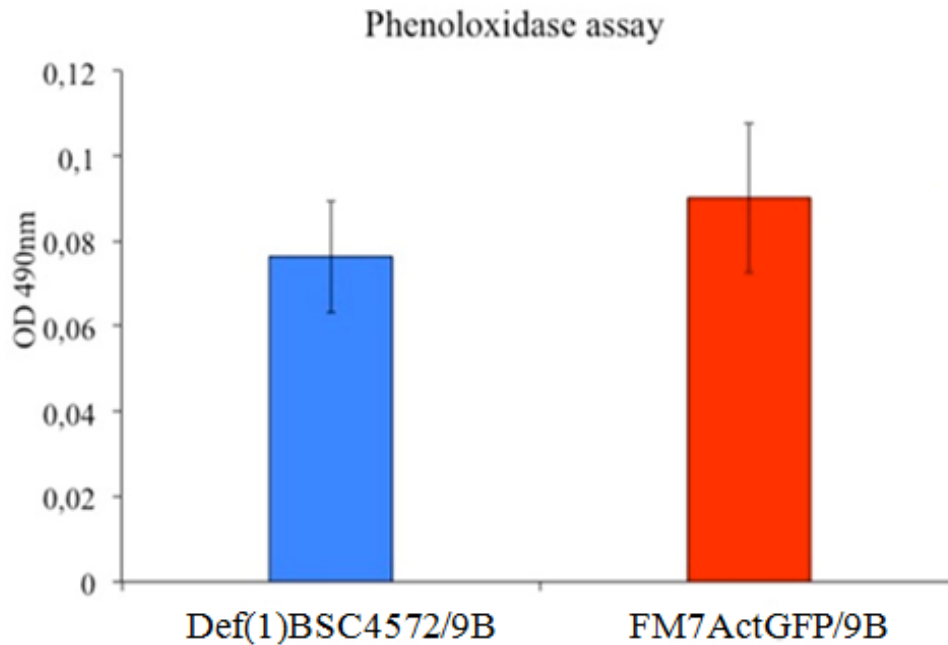


**Fig. 14.** Curve di sopravvivenza all'infezione di batteri Gram negativi. L'infezione batterica attraverso puntura intraemocelica è stata effettuata con microaghi imbevuti in una sospensione concentrata di *E. coli*. Femmine mutanti *Def(1)BSC572/CG2145-9B* (linea continua) e femmine eterozigoti *CG2145-9B/FM7h* (linea tratteggiata) utilizzate come controllo sono state trattate 3 giorni dopo la fuoriuscita dall'involucro pupale. I dati riportati in grafico sono stati raccolti durante i 10 giorni successivi all'infezione e mostrano che gli individui mutanti hanno lo stesso grado di sopravvivenza degli individui di controllo. *LogRank* analysis  $p=0.1500$ .

### 3.6.3 Il mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B* non mostra alterazioni dell'attività fenolossidasi

Allo scopo di verificare se il gene *CG2145* possa essere coinvolto nei processi di sintesi della melanina ho effettuato un saggio di attività della fenolossidasi presente nell'emolinfa di mutanti *Def(1)BSC572/CG2145-9B* e rispettivi controlli *FM7ActGFP/CG2145-9B*. I risultati ottenuti, riportati nella Figura 15, mostrano che non vi è riduzione dell'attività di questo enzima negli individui *Def(1)BSC572/CG2145-9B*. Non vi sono infatti differenze statisticamente significative tra i due genotipi sottoposti ad esame ( $p=0,198$ ). Questo dato indica che in assenza della proteina *CG2145* si ha una normale attivazione dei processi di melanizzazione. Il tipo di esperimento effettuato non è comunque in grado di

indicare se questa proteina possa avere un ruolo nel confinare spazialmente le reazioni di sintesi di melanina, così come dimostrato per la proteina 102 di *Heliothis virescens*. Questa possibilità rimane dunque ancora aperta.

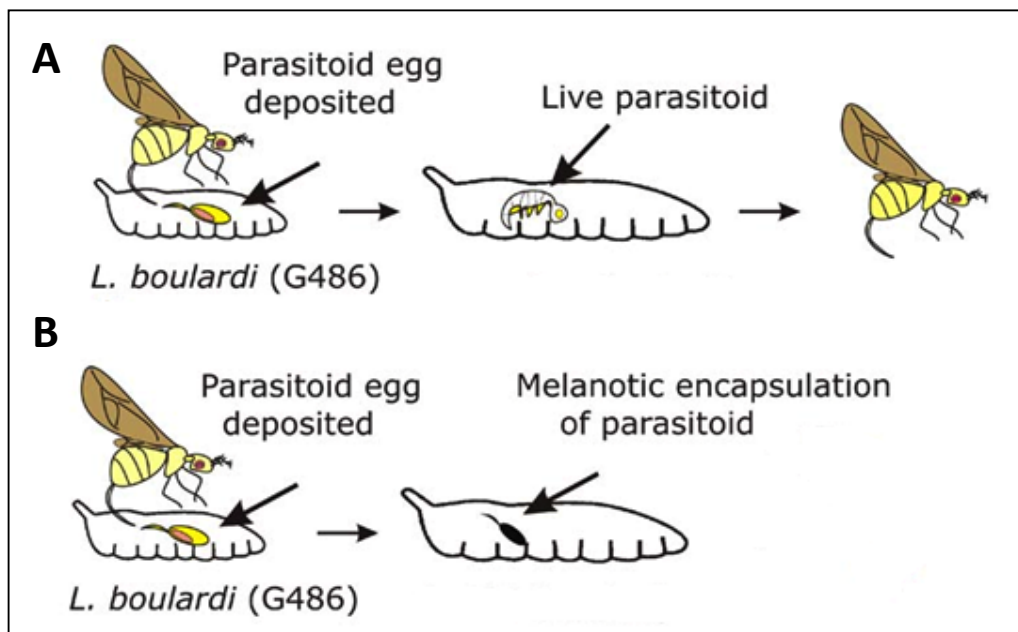


*T-test*,  $t = 1.403$ ,  $df = 8$ ,  $p = 0.198$

**Fig. 15.** Attività fenolossidasi nell'emolinfa del mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B* e del controllo eterozigote *FM7ActGFP/CG2145-9B*. Campioni di emolinfa quantificati mediante saggio Bradford (55µg di proteine totali), sono stati addizionati con 10 mM L-DOPA in 10 mM Buffer Fosfato pH 6.2 in un volume finale di 50 µl. Le misurazioni spettrofotometriche sono state condotte a temperatura ambiente registrando l'OD a 490 nm (formazione dell'intermedio di reazione Dopacromo), 3 minuti dopo l'aggiunta del substrato esogeno L-DOPA. L'esperimento è stato ripetuto 5 volte. Non si rileva differenza statisticamente significativa tra il mutante e il controllo. *T-test*,  $t = 1.403$ ,  $df = 8$ ,  $p = 0.198$ .

### 3.6.4 Il mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B* ha una ridotta capacità di incapsulare le uova dei parassitoidi

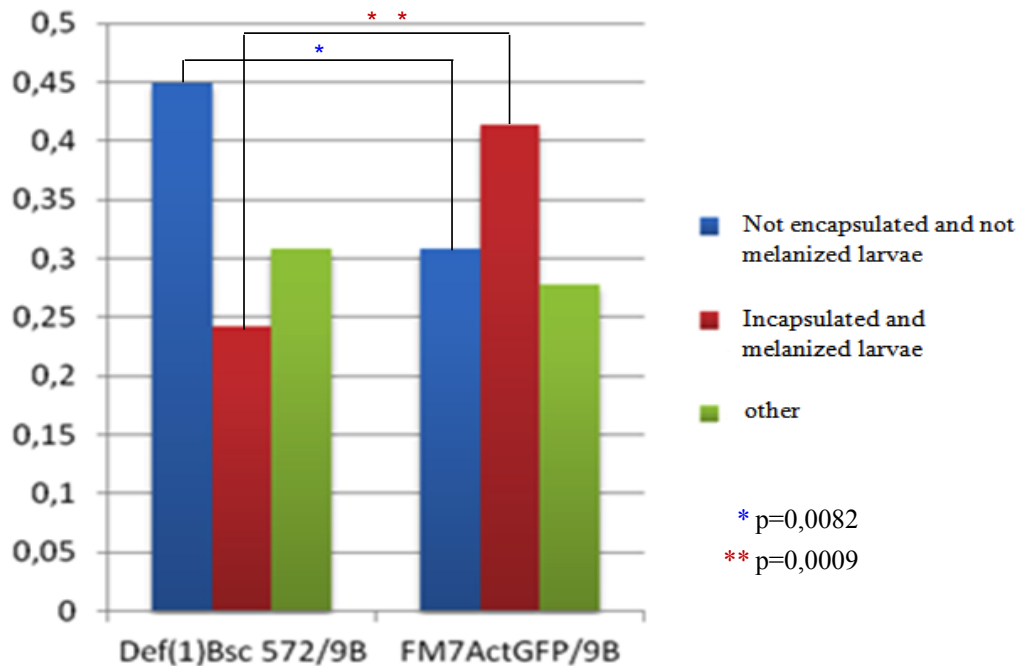
Per mettere in luce un possibile ruolo del gene *CG2145* nella risposta immunitaria di incapsulamento, ho saggiato la capacità delle larve mutanti *Def(1)BSC572/CG2145-9B* di formare una capsula emocitaria attorno all'uovo di un parassitoide deposto all'interno dell'emocele, confrontando questa capacità con quella delle larve di controllo. L'induzione di questo specifico tipo di risposta immunitaria è stata effettuata su larve al secondo stadio di sviluppo, mediante esposizione per 4 ore ad una femmina adulta di *Leptopilina bouleari*, ceppo G486. Nella Figura 16 è riportata una schematizzazione esemplificativa dei due possibili destini cui va incontro l'uovo del parassitoide una volta introdotto all'interno della larva ospite: incapsulamento o sviluppo. Il prevalere dell'una o l'altra situazione dipende dalle specifiche caratteristiche di immunocompetenza del ceppo di *Drosophila* recipiente, poichè il particolare ceppo di *Leptopilina* che è stato utilizzato è un ceppo avirulento.



**Fig. 16.** Immagine rappresentativa dei possibili effetti prodotti dalla parassitizzazione di una larva di *Drosophila melanogaster* da parte del parassitoide *Leptopilina bouleari* (G486: ceppo avirulento). A: la larva del parassitoide si accresce nella larva ospite fino a diventare adulto; B: la larva del parassitoide viene incapsulata e melanizzata.

Sono state sottoposte al saggio di incapsulamento circa 170 larve di *Drosophila melanogaster* per ciascun genotipo usato. Dopo 48 ore dalla parassitizzazione le larve sono state dissezionate e i dati raccolti sono stati analizzati. I risultati, riportati nella Figura 17, dimostrano che esiste una differenza statisticamente significativa tra il mutante ed il suo rispettivo controllo per quanto riguarda la capacità di incapsulare le uova e le larve del parassitoide. Si osserva infatti che mentre nelle larve di controllo *FM7ActGFP/CG2145-9B* il 41% delle uova/larve del parassitoide sono completamente incapsulate e melanizzate, questa percentuale scende al 24% nelle larve *Def(1)BSC572/CC2145-9B* ( $p=0,0009$ ). Anche il numero delle uova/larve del parassitoide non incapsulate e non melanizzate è differente per i due genotipi dell'ospite messi a confronto ed ovviamente si ha qui una differenza di segno opposto. Mentre le uova/larve del parassitoide non incapsulate e non melanizzate sono il 31% del totale nel controllo, la percentuale sale al 45% nel mutante ( $p=0,0082$ ). Nell'istogramma mostrato nella Figura 17 si nota anche una barra che si riferisce a varie situazioni intermedie che sono state riscontrate, ossia presenza di uova/larve del parassitoide incapsulate ma non melanizzate, parzialmente incapsulate o con capsule parzialmente melanizzate. Tali situazioni intermedie si incontrano più o meno con la stessa frequenza nel mutante e nel controllo.

## Encapsulation assay



**Fig. 17.** Risposta di incapsulamento in larve mutanti *Def(1)BSC572/CG2145-9B* e larve di controllo *FM7ActGFP/CG2145-9B*. Il saggio è stato effettuato su un campione di 170 larve per ciascun genotipo, sottoposte a parassitizzazione da parte di una femmina di *Lepopilina boulandi* del ceppo avirulento G486, durante un lasso temporale di 4 ore. Dopo 48 ore le larve di *Drosophila melanogaster* sono state dissezionate per esaminare la presenza e la morfologia delle capsule immunitarie. L'indice di incapsulamento è più elevato per il controllo rispetto al mutante, in quanto maggiore è il numero di uova/larve del parassitoide totalmente incapsulate e melanizzate, mentre minore è il numero di uova/larve del parassitoide completamente prive di segni di incapsulamento e melanizzazione.

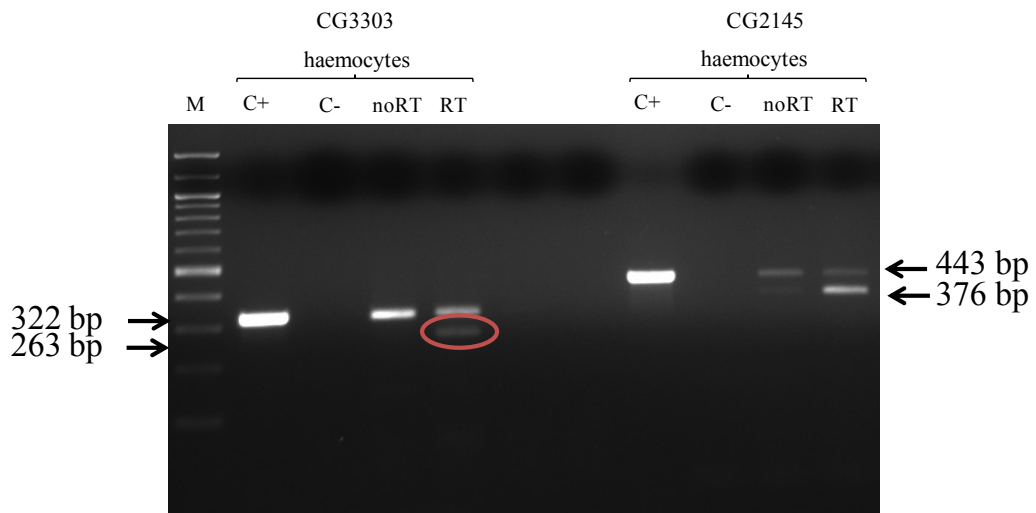
Questi risultati dimostrano che la capacità di incapsulare le uova dei parassitoidi è compromessa nel mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B*. La proteina *CG2145* di *Drosophila melanogaster* è dunque coinvolta nei processi di risposta immunitaria che portano alla formazione delle capsule melanotiche. Dal momento che questa proteina presenta una significativa omologia di sequenza con la proteina 102 di *Heliothis virescens*, i miei dati indicano che le due proteine condividono anche un'omologia funzionale.



### **3.7 Il gene *CG3303* è espresso negli emociti larvali**

Nonostante in assenza della proteina CG2145 i processi di incapsulamento vengano senz'altro compromessi, non si osserva un'inibizione drammatica come quella che si osserva in *Heliothis virescens* in seguito a silenziamento del gene *102* (dati non pubblicati). La perdita del gene *CG2145* nel mutante *Def(1)BSC572/CG2145-9B* potrebbe allora essere compensata da un altro gene con funzioni almeno in parte sovrapponibili a quelle del gene *CG2145*. Un ottimo candidato sarebbe in teoria il gene *CG3303*, il cui prodotto presenta anch'esso omologia di sequenza con la proteina 102 di *Heliothis virescens* (Figura 1). Gli esperimenti di RT-PCR mostrati in Figura 2 avevano però indicato che questo gene non è espresso negli emociti. A questo punto della mia tesi, ho deciso di verificare nuovamente la possibilità che il gene *CG3303* venga trascritto, seppure a bassi livelli, in queste cellule immunitarie. Ho dunque ripetuto gli esperimenti di RT-PCR cambiando vari parametri, come quantità del cDNA saggiato, numero di cicli della PCR e soprattutto coppie di oligonucleotidi utilizzati. Come si osserva nella Figura 18, ho ottenuto, da RNA estratto da emociti larvali, un prodotto di RT-PCR della lunghezza attesa per il cDNA del gene *CG3303*.

Sulla base di questo risultato ho iniziato la caratterizzazione di questo secondo gene, caratterizzazione tuttora in corso.

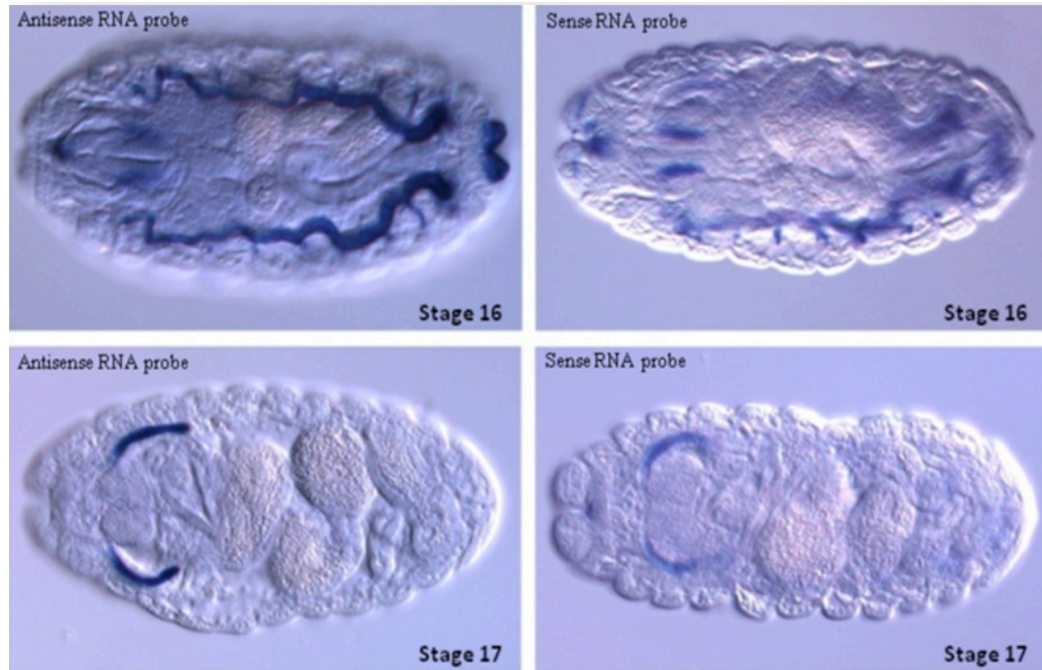


**Fig. 18.** RT-PCR su RNA estratto da emociti larvali. La banda debole cerchiata in rosso è il prodotto di RT-PCR di lunghezza attesa di 322 paia di basi, corrispondente al cDNA del gene *CG3303*, che è dunque espresso negli emociti. Il secondo prodotto di reazione di 322 bp deriva da amplificazione di DNA genomico presente come contaminante nella preparazione di RNA utilizzata. C+: controllo positivo, reazione di PCR eseguita su DNA genomico, C-: controllo negativo, reazione di PCR eseguita in assenza di DNA stampo; RT: reazione di RT-PCR completa; noRT: reazione di RT-PCR eseguita in presenza di tutti i componenti, tranne l'enzima trascrittasi inversa.

### 3.8 Determinazione del profilo di espressione del gene *CG3303* negli embrioni di *Drosophila melanogaster*

Ho iniziato la caratterizzazione del gene *CG3303*, definendone, così come avevo fatto per il gene *CG2145*, il profilo di espressione spazio-temporale durante l'embriogenesi. Esperimenti di ibridazione *in situ* hanno dimostrato che il gene *CG3303* è espresso solo negli stadi terminali dello sviluppo embrionale (Figura 19 e dati non mostrati). Un forte segnale di ibridazione si osserva durante lo stadio 16 nelle trachee, che rappresentano il sistema respiratorio di *Drosophila melanogaster*, e nella regione anale. Successivamente, durante lo stadio 17 che coincide con la schiusa dell'embrione, l'mRNA del gene *CG3303* è presente nelle ghiandole salivari. Nei pannelli di destra della Figura 18 si osserva che la sonda senso del gene *CG3303*, utilizzata come controllo, presenta un debole segnale di ibridazione negli stessi tessuti evidenziati con la sonda antisense. Questo risultato non sembra essere un artefatto, in quanto esperimenti di RT-PCR hanno dimostrato che il gene *CG3303* produce anche un trascritto antisense (dati non

mostrati). Non è al momento noto quale sia la funzione di questo trascritto, ma questo aspetto sarà oggetto di studi futuri.



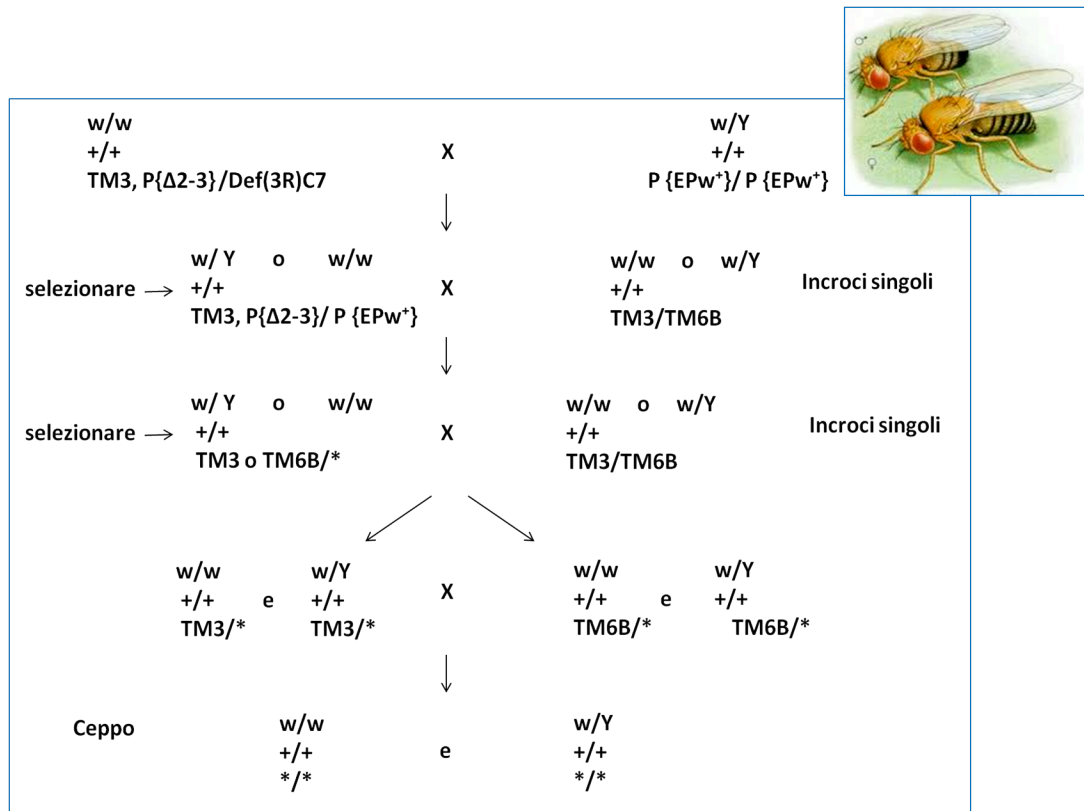
**Fig. 19.** Ibridazione *in situ* su embrioni di un ceppo selvatico di *Drosophila melanogaster*. Per tale esperimento sono state utilizzate sonde antisense (pannelli a sinistra) e senso (pannelli a destra) ad RNA marcate con digossigenina, specifiche per il gene *CG3303*. Il gene *CG3303* si esprime solo negli stadi terminali dell'embriogenesi e solo in specifici organi: nelle trachee e nella regione anale durante lo stadio 16 e nelle ghiandole salivari durante lo stadio 17. Il segnale di ibridazione che si registra con la sonda senso è stato confermato da esperimenti di RT-PCR che hanno dimostrato che entrambe i filamenti del gene *CG3303* vengono trascritti.

### **3.9 Isolamento di mutazioni per delezione di sequenze del gene *CG3303***

Il gene *CG3303*, indicato in *Flybase* con il simbolo *Dmel/CG3303* (*Flybase ID*: FBgn0038381), mappa sul braccio destro del terzo cromosoma in posizione 3R:11,734,120-11,736,089 e la sua lunghezza è dunque pari a 1970 paia di basi.

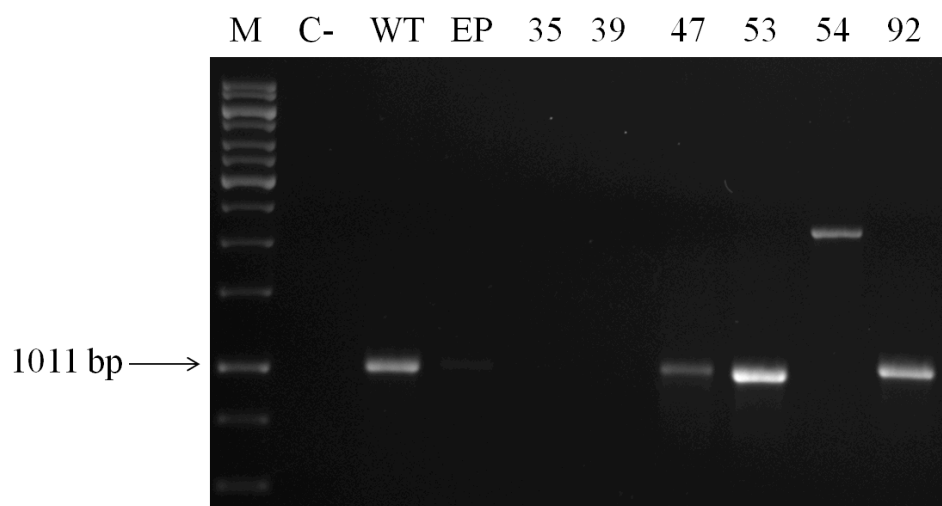
Per ottenere delezioni nella regione genomica in cui mappa il gene *CG3303*, ho utilizzato il medesimo approccio di cui mi ero servita per generare delezioni delle sequenze del gene *CG2145*. L'elemento P che sono andata a mobilitare era

inserito 278 paia di basi a monte del sito di inizio della trascrizione del gene *CG3303* nel ceppo *w*[1118];  $P\{w[+mC]=EP\}G429$ . Lo schema degli incroci genetici eseguiti per mobilizzare questo elemento trasponibile, selezionare gli individui in cui era avvenuta la mobilizzazione e creare da ciascuno di essi una linea stabile, è riportato nella Figura 20.



**Fig. 20.** Schema degli incroci genetici eseguiti per generare delezioni nella regione genomica in cui mappa il gene *CG3303*.  $EPw^+$  indica un elemento trasponibile P ingegnerizzato situato 278 bp a monte del sito di inizio della trascrizione di questo gene nel ceppo utilizzato. Questo elemento trasponibile manca delle sequenze codificanti per la trasposasi, ma possiede le sequenze terminali ripetute ed invertite necessarie per la trasposizione e contiene le sequenze del gene *white* ( $w^+$ ), utilizzato come marcatore fenotipico selezionabile.  $\Delta 2-3$  indica l'elemento P ingegnerizzato  $P\{ry+t7.2=\Delta 2-3\}$  inserito in posizione 99B sul bilanciatore del terzo cromosoma *TM3*. Questo elemento P non è in grado di trasportare, ma codifica per una trasposasi funzionale. *TM3* e *TM6B* sono due diversi bilanciatori del terzo cromosoma. L'asterisco indica un cromosoma tre in cui è avvenuta l'escissione dell'elemento trasponibile  $EPw^+$ .

Le linee ottenute da individui selezionati per perdita dell'elemento P sono state sottoposte ad analisi molecolare. La strategia utilizzata è stata la stessa sfruttata in precedenza. Ho dunque eseguito reazioni di PCR per le quali mi sono servita di un oligonucleotide (EP3303forw) disegnato sulle sequenze genomiche immediatamente a monte del sito di inserzione dell'elemento P nel ceppo di partenza e un altro (CG3303R2) disegnato all'interno del terzo esone del gene *CG3303*. Con tale coppia di oligonucleotidi sono state analizzate più di cento linee. Come si osserva nella Figura 21, questa analisi molecolare mi ha permesso di identificare linee in cui l'elemento P si è scisso in maniera precisa, ricostituendo la corretta sequenza genomica (presenza di prodotto di amplificazione delle stesse dimensioni del prodotto ottenuto da un ceppo selvatico), linee in cui si è scisso in maniera imprecisa generando delezioni delle regioni fiancheggianti (assenza di prodotto di amplificazione o presenza di un prodotto di lunghezza inferiore al prodotto ottenuto da un ceppo selvatico), ed anche linee, come la 54, in cui è rimasto un pezzo dell'elemento P. In quest'ultimo caso ho ottenuto un prodotto di amplificazione più lungo del prodotto ottenuto da un ceppo selvatico. Le linee derivanti da eventi di escissione imprecisa dell'elemento P, identificate nel corso di questo primo screening molecolare, sono state sottoposte ad ulteriori analisi mediante PCR, utilizzando coppie di oligonucleotidi disegnati sulle sequenze del gene *CG3303* e su quelle delle regioni fiancheggianti.

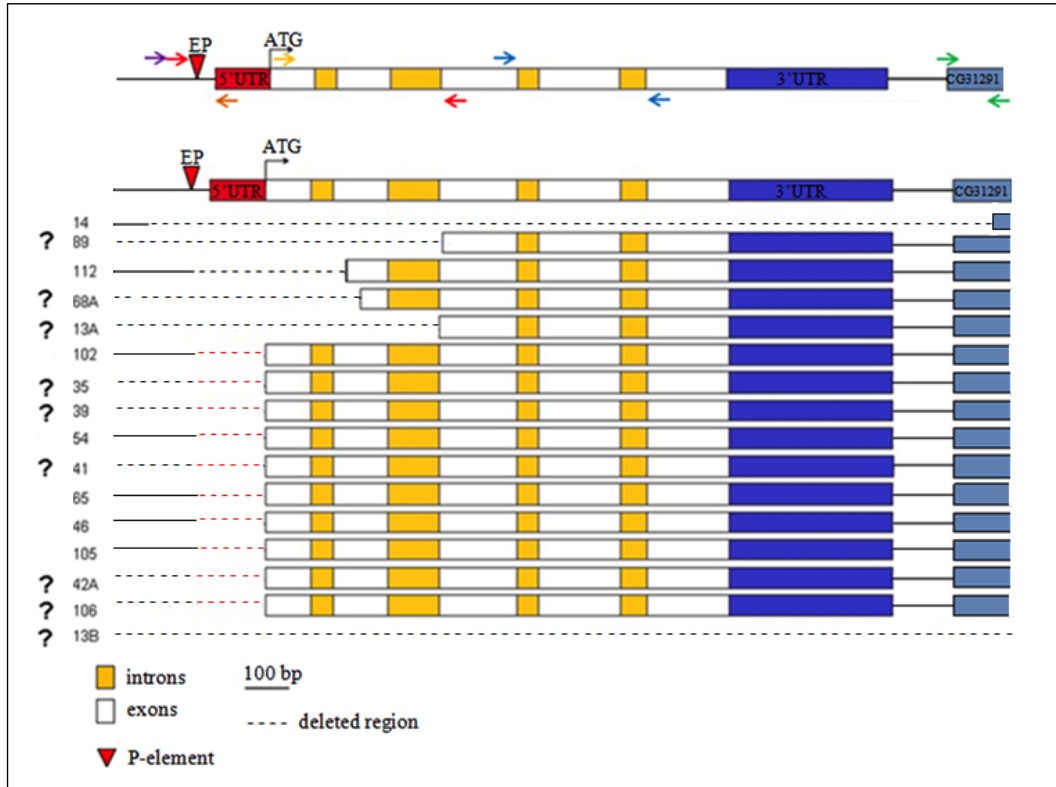


**Fig. 21.** Analisi molecolare di diverse linee di *Drosophila* ottenute mediante mobilizzazione di un elemento P situato all'interno del gene *CG3303*. Sono mostrati i prodotti di reazioni di PCR eseguite su DNA genomico per amplificare un frammento situato a cavallo dell'originario sito d'inserzione dell'elemento P. Nei campioni 47, 53 e 92 è presente un prodotto di amplificazione, uguale a quello, di 1011 bp, ottenuto da un ceppo selvatico: in queste linee l'escissione dell'elemento P è avvenuta in maniera precisa ricostituendo le corrette sequenze genomiche. Il ceppo 54, che mostra una prodotto di amplificazione ad alto peso, contiene ancora un pezzo dell'elemento P. Nei campioni 35 e 39 manca prodotto di amplificazione, di conseguenza tali linee contengono delle delezioni. WT indica il ceppo selvatico di controllo; C- è il controllo negativo privo del DNA stampo; EP indica il ceppo in cui l'elemento P è inserito 278 bp a monte del gene *CG3303*. In tale campione non si osserva prodotto di amplificazione perché la presenza dell'elemento P accresce notevolmente le dimensioni del frammento compreso fra i due primers, rendendo impraticabile la reazione di amplificazione mediante PCR.

La mappatura delle delezioni effettuata mediante PCR mi ha in definitiva permesso di identificare 16 differenti mutanti. Nella Figura 22 è riportata in maniera schematica la struttura della regione genomica di interesse in tutti i mutanti isolati. In 5 di essi, denominati 102, 54, 65, 46 e 105, sono presenti resti dell'elemento P; poichè però l'intera regione codificante del gene *CG3303* è sicuramente inalterata, questi mutanti non sono stati analizzati ulteriormente. La regione codificante del gene *CG3303* è intatta anche nei mutanti 35, 39, 41, 42 e 106, portatori di delezioni nella regione genomica a monte del sito originario di inserzione di P. Il mutante 13B presenta una delezione che interessa l'intero gene e si estende nelle regioni fiancheggianti, comprendendo almeno parte del gene a

valle, *CG31291*. Nei mutanti 13A e 89 il gene è deleto fino al secondo introne. Nel mutante 68A, il gene manca del primo esone, del primo introne e di parte del secondo esone. Nella Fig. 22 tutti questi mutanti sono contrassegnati da un punto interrogativo, ad indicare che la loro caratterizzazione molecolare non è completa e che in particolare non è stata definita l'estensione delle delezioni a monte del gene *CG3303*, a causa della mancanza di una sequenza di riferimento. Infatti, nel corso delle mie analisi, mi sono resa conto che la banca dati del genoma di *Drosophila melanogaster* contiene informazioni non esatte riguardo la regione genomica fiancheggiante il gene *CG3303*, in direzione 5'. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che il gene *CG3303* è situato all'interno di una regione eterocromatica il cui sequenziamento non è stato ancora completato e/o validato. Ovviamente questo inconveniente ha reso molto difficile la caratterizzazione molecolare dei mutanti ottenuti. Nonostante questa difficoltà sono riuscita a definire in maniera esatta l'estensione delle delezioni per due linee mutanti: 14 e 112. Nella prima di queste due linee la delezione inizia 1835 nucleotidi a monte del sito di inizio di trascrizione del gene *CG3303*, comprende questo gene per intero ed interessa anche la parte terminale (585 nucleotidi) del gene a valle, *CG3129*, che ha un orientamento opposto rispetto al gene *CG3303*. Nella linea mutante 112 la delezione si estende invece dal punto dell'originaria inserzione dell'elemento P fino al primo introne, con l'aggiunta di dieci paia di basi del secondo esone.

Individui portatori di queste delezioni in omozigosi sono vitali, fertili e non mostrano difetti morfologici evidenti. Future analisi fenotipiche saranno volte a saggiare l'effetto di queste delezioni, singolarmente e in combinazione con delezioni del gene *CG2145*, su tutti gli aspetti della risposta immunitaria.



**Fig. 22.** Mappa delle delezioni ottenute nella regione genomica in cui è localizzato il gene *CG3303*. Sono stati identificati 16 differenti mutanti per delezione. La presenza del punto interrogativo sta ad indicare che la caratterizzazione molecolare non è completa e che in particolare non è stata definita l'estensione delle delezioni a monte del gene *CG3303*. Il tratteggio colorato indica sequenze potenzialmente incluse nelle delezioni.



## 4. Discussione

Le strategie di difesa utilizzate dagli insetti sono ampiamente condivise da specie distanti da un punto di vista evolutivo anche centinaia di milioni di anni e sembrano fondarsi su meccanismi molecolari comuni. Analisi comparative scaturite in questi ultimi anni da un gran numero di progetti di sequenziamento genomico hanno infatti permesso di evidenziare l'elevato grado di conservazione di geni coinvolti nella risposta immunitaria.

Le capsule immunitarie, all'interno delle quali gli emociti intrappolano i parassiti multicellulari, hanno una morfologia assai simile in tutti i taxa (Pech and Strand 1996) e le uniche variazioni osservate tra le specie riguardano la rapidità con cui avviene l'incapsulamento, il tipo di emociti partecipanti e la presenza o meno di melanizzazione (Salt 1970; Rowley and Ratcliffe, 1981; Lackie, 1988; Strand and Pech 1995).

La somiglianza morfologica delle capsule immunitarie di diversi insetti riflette la somiglianza dei processi che portano alla loro formazione. Studi descrittivi hanno in particolare evidenziato le strette interazioni che si instaurano fra le cellule coinvolte. In Lepidotteri e Ditteri, che sono stati maggiormente oggetto d'indagine, questi processi sono affidati alla cooperazione fra due tipi di emociti. In particolare, sia in *Pseudoplusia includens* che in *Drosophila melanogaster*, è stato osservato che un tipo di cellule (denominate granulociti nel caso del Lepidottero, plasmatociti nel caso di *Drosophila*) riconosce il bersaglio da incapsulare ed aderisce ad esso formando un primo strato di rivestimento, ed un secondo tipo di cellule (chiamate plasmatociti nel caso del Lepidottero, lamellociti nel caso di *Drosophila*), reclutato dal primo, forma multipli strati concentrici strettamente aderenti l'uno all'altro, costituendo la massa principale della capsula immunitaria (Pech and Strand 1996).

Se le tappe fondamentali di formazione della capsula immunitaria sono conservate, almeno fra Lepidotteri e Ditteri, è ragionevole ritenere che siano conservati anche i meccanismi molecolari coinvolti.

I risultati descritti in questa Tesi di Dottorato hanno identificato nella proteina CG2145 di *Drosophila melanogaster* un omologo strutturale e funzionale della

proteina 102 di *Heliothis virescens*, recentemente caratterizzata dai laboratori in cui ho svolto la mia attività sperimentale (Falabella et al. 2012). A mia conoscenza, si tratta del primo caso di proteine omologhe per cui viene formalmente dimostrato il coinvolgimento nei processi di incapsulamento di insetti appartenenti a due diversi ordini. Ai dati da me ottenuti mediante analisi genetica in *Drosophila melanogaster* si affiancano infatti dati funzionali ottenuti mediante silenziamento genico sia in *Heliothis virescens*, sia in un'altra specie di Lepidottero, *Spodoptera littoralis*, i primi non pubblicati, gli altri riportati in un lavoro attualmente in fase di stampa, cui ho contribuito e che dunque riporto in appendice (Di Lelio et al. 2014).

La proteina CG2145 è specificamente richiesta nella risposta immunitaria di incapsulamento diretta contro le uova dei parassitoidi. Fagocitosi e immunità umorale intesa come produzione di peptidi antimicrobici non sono infatti alterate nel mutante nullo da me generato, come indirettamente dimostrato dalla resistenza di questo mutante all'introduzione di agenti microbici nell'emocele. Per ciò che riguarda la melanizzazione, i saggi di attività fenolossidasi da me eseguiti non hanno evidenziato difetti di innesco delle cascate proteolitiche che portano all'attivazione della profenolossidasi. Ulteriori saggi sono però necessari per analizzare la capacità del mutante di regolare l'intero processo correttamente.

Il gene *CG2145* è espresso nei principali tessuti immunitari della *Drosophila*, emociti e corpi grassi, a partire dal momento in cui essi si formano nell'embrione. Negli emociti larvali, il suo prodotto proteico è presente all'interno di strutture vescicolari che si distaccano dalla superficie cellulare, presumibilmente per riversare il loro contenuto nell'ambiente extracellulare. In maniera analoga, la proteina 102 di *Heliothis virescens*, contenuta all'interno di grosse cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso, viene estrusa dagli emociti durante un processo di degranulazione, sotto forma di fibrille che vanno a depositarsi sulla superficie di corpi estranei presenti nell'emocele e si ritrovano anche fra gli strati di emociti che compongono la capsula immunitaria (Falabella et al. 2012).

La presenza di strutture fibrillari è stata descritta anche nelle capsule immunitarie di *Drosophila* (Rizki and Rizki 1979). Studi ultrastrutturali delle capsule che si formano nel mutante melanotico *tu<sup>w</sup>*, in conseguenza di un aberrante processo autoimmunitario che coinvolge tessuti endogeni, hanno infatti dimostrato che le

membrane plasmatiche di lamellociti adiacenti sono in stretto contatto in alcune regioni, mentre in altre sono separate da uno spazio attraversato da materiale fibrillare elettrondenso, apparentemente derivante da vescicole secrete. ‘E stato allora suggerito che queste vescicole possano essere coinvolte, assieme al materiale in esse contenuto, nell’adesione tra i lamellociti durante il processo di aggregazione che porta alla formazione della capsula immunitaria.

Sulla base dei miei risultati, è possibile dunque ipotizzare che la proteina CG2145 sia un componente del materiale fibrillare contenuto all’interno delle capsule immunitarie di *Drosophila*. Esperimenti di immunoelettromicroscopia sono attualmente in corso per verificare questa ipotesi.

La natura del materiale fibrillare presente nella capsula immunitaria degli insetti non è stata di fatto ancora chiarita. Una possibilità è che si tratti di una sorta di matrice extracellulare, analoga a quella che costituisce la lamina basale che delimita la cavità emocelica e ricopre la superficie degli organi interni di questi organismi. Studi in diversi ordini di insetti hanno infatti indicato che gli emociti contribuiscono alla formazione della lamina basale, rilasciando consistenti quantità di materiale microfibrillare (Akai and Sato, 1973; Beaulaton, 1968; Nardi e Miklasz, 1989; Sass et al., 1994; Wigglesworth, 1973). Questi studi hanno trovato la loro conferma in *Drosophila*, in cui è stato dimostrato che vari costituenti della lamina basale vengono espressi dagli emociti, oltre che dalle cellule dei corpi grassi (Martinek et al. 2008).

Un recente lavoro ha poi evidenziato un primo, diretto, legame funzionale tra lamina basale e incapsulamento. ‘E stato infatti dimostrato che mutazioni nel gene codificante per un componente della lamina basale, la laminina, impediscono la formazione di capsule immunitarie (Howell et al., 2012). Negli individui mutanti, i plasmotociti sono risultati incapaci di attaccarsi all’uovo del parassitoide *Leptopilina boulardi*. Uno studio trascrittomico, in cui si è analizzata la risposta di *Drosophila* all’attacco di un altro parassitoide, *Asobara tabida*, ha poi dimostrato la presenza di componenti della matrice extracellulare fra i geni regolati positivamente (Wertheim et al., 2005).

La proteina CG2145 potrebbe dunque essere una nuova proteina della matrice extracellulare, implicata nella formazione sia delle capsule immunitarie, sia della lamina basale.

L'efficienza di incapsulamento è ridotta nel mutante da me isolato, in cui l'intera porzione codificante del gene *CG2145* è stata deleta e dunque la proteina CG2145 è completamente assente. L'effetto prodotto non è così drammatico come quello che si osserva nel mutante per il gene della laminina. Questo potrebbe significare che mentre la laminina svolge un ruolo cruciale nell'assemblaggio della lamina basale fungendo da impalcatura per il reclutamento di altri componenti, la proteina CG2145 svolge all'interno di questa struttura un più semplice ruolo di supporto. D'altro canto, in *Heliothis virescens* il silenziamento della proteina 102 ha l'effetto di bloccare praticamente del tutto l'incapsulamento. In *Drosophila*, la proteina CG2145 potrebbe allora avere perso (o non aver mai acquisito) quella posizione di centralità che il suo ortologo occupa nei processi di formazione della capsula immunitaria dei lepidotteri. In alternativa, la proteina CG2145 potrebbe condividere almeno parte delle sue funzioni con un'altra proteina, possibilmente la proteina CG3303, anch'essa dotata di una significativa omologia di sequenza con la proteina 102 di *Heliothis virescens*. La perdita del gene *CG2145* nel mutante da me generato potrebbe allora essere in qualche modo compensata dalla presenza del gene *CG3303*, anch'esso espresso negli emociti. Questo aspetto potrà essere chiarito andando a saggiare la risposta di incapsulamento di individui doppiamente mutanti.

Se la questione di una possibile ridondanza funzionale dei geni *CG2145* e *CG3303* durante i processi di incapsulamento rimane aperta, è però chiaro che essi svolgono funzioni diverse durante lo sviluppo, dal momento che sono espressi in diversi tessuti dell'embrione. Il trascritto del gene *CG2145* è inoltre presente in tutti gli stadi embrionali, il secondo solo al termine dell'embriogenesi.

Nei primi stadi di sviluppo embrionale l'espressione del gene *CG2145* marca in maniera specifica gruppi cellulari coinvolti nei movimenti morfogenetici della gastrulazione. È interessante rilevare che, in tutti gli organismi, i siti interessati da processi di migrazione cellulare connessi alla morfogenesi vanno incontro a rimodellamento dei componenti della lamina basale, che vengono infatti sintetizzati a livelli elevati durante la crescita e lo sviluppo (Xu et al 2006). Il

trascritto del gene *SPARC*, codificante per un componente della lamina basale, ha durante l'embriogenesi di *Drosophila* una distribuzione praticamente sovrapponibile a quella del gene *CG2145* (Martinek et al., 2008). Il profilo di espressione di questo gene è dunque compatibile con l'ipotesi che la proteina *CG2145* sia un componente della matrice extracellulare che forma la lamina basale e che tale proteina partecipi ai processi di rimodellamento di questa struttura. Studi di immunolocalizzazione permetteranno di chiarire se la proteina *CG2145* sia effettivamente presente nella matrice extracellulare che riveste gli organi interni di *Drosophila*. Quale che sia la sua funzione durante l'embriogenesi, essa non è comunque necessaria per la sopravvivenza.

In conclusione, ho dimostrato che il gene *CG2145* di *Drosophila melanogaster* è un ortologo del gene *102* dei Lepidotteri, implicato nella risposta immunitaria di incapsulamento attraverso cui gli insetti si difendono dai parassiti multicellulari. Studi futuri mi permetteranno di far luce sui meccanismi molecolari responsabili delle sue funzioni ed è ragionevole ritenere che si verrà a delineare un quadro di reti molecolari conservate da un punto di vista evolutivo. Il mutante del gene *CG2145* da me generato costituisce una risorsa essenziale per questi studi, che si potranno avvalere di un'ampia gamma di strumenti di genetici e molecolari sviluppati in questo organismo modello, ma non disponibili in altri insetti. Potrò inoltre essere guidata dalla notevole quantità di informazioni che sono state acquisite negli ultimi vent'anni sul sistema immunitario di *Drosophila* e che hanno reso questo moscerino un organismo di elezione per lo studio dei processi immunitari.

## 5. Bibliografia

Abel T., Michelson A. M. and Maniatis T. 1993. *A Drosophila GATA family member that binds to Adh regulatory sequence is expressed in the developing fat body. Development* 119, 623-633.

Agaisse H., Burrack L. S., Philips J. A., Rubin E. J., Perrimon N., Higgins D. E. 2005. *Genome-wide RNAi screen for host factors required for intracellular bacterial infection. Science* 309, 1248-1251.

Akai H. and Sato S. 1973. *Ultrastructure of the larval hemocytes of the silkworm, Bombyx mori L. (Lepidoptera: Bombycidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 2, 207-231.

Akhouayri I., Turc C., Royet J., Charroux B. 2011. *Toll-8/Tollo negatively regulates antimicrobial response in the Drosophila respiratory epithelium. PLoS Pathog.* 7:e1002319.

Alfonso T.B., Jones B.W. 2002. *Gcm2 promotes glia cell differentiation and is required with glia cells missing for macrophage development in Drosophila. Dev. Biol.* 248(2): 369-83.

Allemand R., Lemaitre C., Frey F., Bouletreau M., Vavre F. et al. 2002. *Phylogeny of six African Leptopilina species (Hymenoptera : Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of Drosophila, with description of three new species. Annales De La Societe Entomologique De France* 38: 319–332.

Amcheslavsky A., Jiang J., Ip Y.T. 2009. *Tissue damage-induced intestinal stem cell division in Drosophila. Cell Stem Cell*, 4:49-61.

Arnold J.N., Wormald M.R., Sim R.B., Rudd P.M., Dwek R.A. 2007. *The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. Annu Rev Immunol* 25: 21–50.

Arnot C. J., Gay N. J., Gangloff M., 2010. *Molecular mechanism that induces activation of Spatzle, the ligand for the Drosophila Toll receptor. J. Biol. Chem.*, 285: 19502-19509.

Avet-Rochex A., Boyer K., Polesello C., Gobert V., Osman D., Roch F., Augè B., Zanet J., Haenlin M., Waltzer L. 2010. *An in vivo RNA interference screen*

*identifies gene networks controlling Drosophila melanogaster blood cell homeostasis. BMC Dev Biol 10: 65.*

Basbous N., Coste F., Leone P., Vincentelli R., Royet J., Kellenberger C., Roussel A. *The Drosophila peptidoglycanrecognition protein LF interacts with peptidoglycanrecognition protein LC to downregulate the Imd pathway. EMBO Rep 2011, 12:327-333.*

Bedard K. and K. H. Krause. 2007. *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 87(1): 245-313.*

Bergeret E., Perrin J., Williams M., Grunwald D., Engel E., Thevenon D., Taillebourg E., Bruckert F., Cosson P., Fauvarque M. O. 2008. *TM9SF4 is required for Drosophila cellular immunity via cell adhesion and phagocytosis. Journal of Cell Science 121, 3325-3334.*

Bettencourt R., Tanji T., Yagi Y., Ip Y.T. 2004. *Toll and Toll-9 in Drosophila innate immune response. J. Endotoxin Res. 10, 261–268.*

Bibel M., Barde Y. A. 2000. *Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev 14, 2919-2937.*

Bidla G., Dushay M.S., Theopold U. 2007. *Crystal cell rupture after injury in Drosophila requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. J Cell Sci 120:1209-15.*

Bidla G., Lindgren M., Theopold U., Dushay M. S. 2005. *Hemolymph coagulation and phenoloxidase in Drosophila larvae. Developmental and Comparative Immunology 29, 669-679.*

Bischoff V., Vignal C., Boneca I.G., Michel T., Hoffmann J.A., Royet J. 2004. *Function of the Drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. Nat. Immunol. 5: 1175-1180.*

Bodmer R., Carretto R. and Jan Y. N. 1989. *Neurogenesis of the peripheral nervous system in Drosophila embryos: DNA replication patterns and cell lineages. Neuron 3, 21-32.*

Bou A. R., Hetru C., Troxler L., Doucet D., Ferrandon D., Matt N. 2011. *Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of Drosophila melanogaster. J Innate Immun., 3:52-64.*

Brehelin M. 1982. *Comparative study of structure and function of blood cells from two Drosophila species*. *Cell Tissue Res.* 221, 607-615.

Brennan C.A., Delaney J.R., Schneider D.S., Anderson K.V. 2007. *Psidin is required in Drosophila blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body*. *Curr. Biol* 17, 67-72.

Brummel T., Ching A., Seroude L., Simon A.F., Benzer S. 2004. *Drosophila lifespan enhancement by exogenous bacteria*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12974–12979.

Buchon N., Broderick N.A., Chakrabarti S. and Lemaitre, B. 2009. *Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in Drosophila*. *Genes Dev.* 23, 2333–2344.

Buchon N., Poidevin M., Kwon H. M., Guillou A., Sottas V., Lee B. L. and Lemaitre B. 2009. *A single modular serine protease integrates signals from pattern-recognition receptors upstream of the Drosophila Toll pathway*. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 106: 12442–12447.

Campbell I.D. and Bork P. 1993. *Epidermal growth factor-like modules*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3, 385–392.

Carton Y., Bouletreau M., Van Lenteren J. C. and van Alphen J. C. M. 1986. *The Drosophila parasitic wasps*. In *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol. 3 (ed. M. Ashburner, H. L. Carson, J. N. Thompson), pp. 347–394. New York: Academic Press.

Castillejo-Lopez C, Hacker U. 2005. *The serine protease Sp7 is expressed in blood cells and regulates the melanization reaction in Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*, 338:1075-82.

Chandler J.A. et al. 2011. *Bacterial communities of diverse Drosophila species: ecological context of a host–microbe model system*. *PLoS Genet.* 7, e1002272.

Chang C.I., Ihara K., Chelliah Y., Mengin-Lecreulx D., Wakatsuki S. et al. 2005. *Structure of the ectodomain of Drosophila peptidoglycan-recognition protein LCa suggests a molecular mechanism for pattern recognition*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10279–10284.



Charroux B and Royet J. 2009. *Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the Drosophila immune response. Proc. Acad. Natl. Sci. USA 106 (24) 9797-802.*

Chiu H. Govind S. 2002. *Natural infection of D. melanogaster by virulent parasitic wasps induces apoptotic depletion of hematopoietic precursors. Cell Death Differ 9: 1379–1381.*

Chiu H., Ring B.C., Sorrentino R.P., Kalamariz M., Garza D. et al. 2005. *dUbc9 negatively regulates the Toll-NF-kappa B pathways in larval hematopoiesis and drosomycin activation in Drosophila. Dev Biol 288: 60–72.*

Choe K.M., Lee H., Anderson K.V. 2005. *Drosophila peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) act as a signal-transducing innate immune receptor. Proc. Natl. Acad. Sci 102: 1122-1126.*

Christensen B.M., Li J, Chen CC, Nappi AJ. 2005. *Melanization immune responses in mosquito vectors. Trends Parasitol 21:192-9.*

Costa S. C. P., Ribeiro C., Girard P. A., Zumbihl R., Brehelin M. 2005. *Modes of phagocytosis of Gram-positive and Gram-negative bacteria by Spodoptera littoralis granular haemocytes. Journal of Insect Physiology 51, 39-46.*

Cox D., Chang P., Zhang Q., Reddy P. G., Bokoch G. M. and Greenberg S. 1997. *Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. J. Exp. Med. 186:1487–1494.*

Crozatier M., Ubeda J.M., Vincent A., Meister M. 2004. *Cellular immune response to parasitization in Drosophila requires the EBF orthologue collier. PLoS Biol. 2 E196.*

Crozatier M., Vincent A. 2008. *Control of multidendritic neuron differentiation in Drosophila: The role of Collier. Dev. Biol. 315:232-242.*

Crozatier M., Vincent A. 2011. *Drosophila: A model for studying genetic and molecular aspects of haematopoiesis and associated leukaemias. Dis Model Mech 4: 439-445.*

Daffre S., Kylsten P., Samakovlis C., Hultmark D. 1994. *The lysozyme locus in Drosophila melanogaster: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. Mol Gen Genet 242:152–162.*

De Gregorio E, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata S, et al. 2002. *An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in Drosophila*. *Dev Cell* 3:581-92.

De Gregorio E., Spellman P.T., Rubin G.M, Lemaitre B. 2001. *Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 12590-95.

De Gregorio E., Spellmann P.T., Tzou P., Rubin G.M., Lemaitre B. 2002. *The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in Drosophila*. *EMBO J.* 21: 2568-2579.

Dearolf C.R. 1998. *Fruit fly "Leukemia"*. *Biochim Biophys Acta.* 1377: M13-23.

DeLotto Y., DeLotto R. 1998. *Proteolytic processing of the Drosophila Spätzle protein by easter generates a dimeric NGF-like molecule with ventralising activity*. *Mech Dev.* 72, 141-148.

Di Lelio I., Varricchio P., Di Prisco G., Marinelli A., Lasco V., Caccia S., Casartelli M., Giordana B., Rao R., Gigliotti S., F. Pennacchio. 2014. *Functional analysis of an immune gene of Spodoptera littoralis by RNAi*. *Journal of Insect Physiology*.

Ekas L. A., Cardozo T. J., Flaherty M. S., McMillian E. A., Gonsalves F. C., Bach E. A. 2010. *Characterization of a dominant-active STAT that promotes tumorigenesis in Drosophila*. *Dev Biol* 344 (2): 621-36.

El Chamy L., Leclerc V., Caldelari I. and J. M. Reichhart. 2008. *Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways 'upstream' of Toll*. *Nat. Immunol.* 9: 1165–1170.

Erturk-Hasdemir D. et al. 2009. *Two roles for the Drosophila IKK complex in the activation of Relish and the induction of antimicrobial peptide genes*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 9779–9784.

Eslin P., Prevost G. 2000. *Racing against host's immunity defenses: a likely strategy for passive evasion of encapsulation in Asobara tabida parasitoids*. *J. Insect. Physiol.* 46:1161–67.

Falabella P., Riviello L., Pascale M., Di Lelio I., Tettamanti G., Grimaldi A., Iannone C., Monti M., Pucci P., Tamburro A.M., deEguileor M., Gigliotti S., Pennacchio F. 2012. *Functional amyloids in insect immune response. Insect Biochemistry and molecular Biology*, 1-9.

Fernandez N.Q., Grosshans J., Goltz J.S., Stein D. 2001. *Separable and redundant regulatory determinants in Cactus mediate its dorsal group dependent degradation. Development* 128: 2963-2974.

Ferrandon D. 2013. *The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism Drosophila melanogaster: from resistance to resilience. Current Opinion in Immunology*, 25:59–70.

Fossett N., Tevosian S.G., Gajewski K., Zhang Q., Orkin S.H., and Schulz R.A. 2001. *The friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7342–7347.

Franc N. C., Dimarcq J. L., Lagueux M., Hoffmann J., Ezekowitz R. A. 1996. *Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. Immunity* 4, 431-443.

Franc N.C., Heitzler P., Ezekowitz R.A., White K. 1999. *Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila. Science* 18, 284 (5422): 1991-4.

Galko M.J., Krasnow M.A. 2004. *Cellular and genetic analysis of wound healing in Drosophila larvae. PLoS Biol*; 2:239.

Galko M.J., Krasnow M.A. *Cellular and genetic analysis of wound healing in Drosophila larvae. PLoS Biol* 2004; 2:239.

Gangloff M., Murali A., Xiong J., Arnot C.J., Weber A. N., Sandercock A. M. Robinson C. V., Sarisky R., Holzenburg A., Kao C., Gay N.J. 2008. *Structural insight into the mechanism of activation of the Toll receptor by the dimeric ligand Spatzle. J. Biol. Chem.* 283: 14629-14635.

Garver L. S., Wu J., Wu L. P. 2006. *The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of Staphylococcus aureus in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103,660-665.

Geisler R., Bergmann A., Hiromi Y., Nusslein-Volhard C. 1992. *Cactus, a gene involved in dorsoventral pattern formation of Drosophila, is related to the IκB gene family of vertebrates. Cell 71: 613-621.*

Georgel P., Naitza S., Kappler C., Ferrandon D., Zachary D., Swimmer C., Kopczynski C., Duyk G., Reichhart J. M., Hoffmann J. A. 2001. *Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. Dev. Cell. 1(4): 503-14.*

Godfray H. C. J. 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology, Princeton University Press, Princeton.*

Goto A., Kadowaki T., Kitagawa Y. 2003. *Drosophila hemolectin gene is expressed in embryonic and larval hemocytes and its knock down causes bleeding defects. Dev. Biol. 264:582-91.*

Goto A., Kumagai T., Kumagai C., Hirose J., Narita H., Mori H., Kadowaki T., Beck K., Kitagawa Y. 2001b. *A Drosophila hemocyte-specific protein, hemolectin, similar to human von Willebrand factor. Biochem. J. 359, 99-108.*

Goto A., Matsushita K., Gesellchen V., El Chamy L., Kutteneuler D., Takeuchi O., Hoffmann J.A., Akira S., Boutros M., Reichhart J.M. 2008. *Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-κB-dependent gene expression in Drosophila and mice. Nat Immunol 9: 97–104.*

Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, Reichhart JM, Wang C, Butt TM, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D. 2006. *Dual detection of fungal infections in Drosophila via recognition of glucans and sensing of virulence factors. Cell 127: 1425–1437.*

Gottar M., Gobert V., Michel T., Belvin M., Duyk G., Hoffmann J.A., Ferrandon D., Royet J. 2002. *The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. Nature 416: 640-644.*

Ha E.M., Lee K.A., Seo Y.Y., Kim S.H., Lim J.H., Oh B.H., Kim J. and Lee W.J. 2009. *Coordination of multiple dual oxidase-regulatory pathways in responses to commensal and infectious microbes in drosophila gut. Nat. Immunol. 10, 949–957.*

Ha E.M., Oh C.T., Bae Y.S., Lee W.J. 2005a. *A direct role for dual oxidase in Drosophila gut immunity. Science. 310:847-850.*

Ha E.M., Oh C.T., Ryu J.H., Bae Y.S., Kang S.W., Jang I.H., Brey P.T., Lee W.J. 2005b. *An antioxidant system required for host protection against gut infection in Drosophila. Dev Cell. 8:125-132.*

Haghighyeghi A., Sarac A., Czerniecki S., Grosshans J. and F. Schöck. 2010. *Pellino enhances innate immunity in Drosophila. Mech. Dev. 127: 301–307.*

Hanratty W.P., Dearolf C.R. 1995. *The Drosophila Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. Mol Gen Genet 238:33-37.*

Harrison D. A., Binari R., Nahreini T. S., Gilman M., Perrimon N. 1995. *Activation of a Drosophila Janus Kinase (JAK) causes hematopoietic neoplasia and developmental defects. EMBO 14(12) 2857-65.*

Hashimoto Y., Tabuchi Y., Sakurai K., Kutsuna M., Kurokawa K., Awasaki T., Sekimizu K., Nakanishi Y., Shiratsuchi A. 2009. *Identification of lipoteichoic acids as a ligand for draper in the phagocytosis of Staphylococcus aureus by Drosophila hemocytes. J. Immunol. 183(11): 7451-60.*

Hetru C. and Jules A. Hoffmann 2011. *NF- $\kappa$ B in the Immune Response of Drosophila. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009; 1: a000232.*

Holz A., Bossinger B., Strasser T., Janning W. and Klapper R. 2003. *The two origins of hemocytes in Drosophila. Development 130, 4955-4962.*

Honti V., Csordas G., Markus R., Kurucz E., Jankovics F., Ando I. 2010. *Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocytes lineages and of the hematopoietic compartments in Drosophila melanogaster. Molec. Immunol. 47: 1997-2014.*

Horng T. and R. Medzhitov. 2001. *Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 12654–12658.*

Howell L., Sampson C.J., Xavier M.J., Bolukbasi E., Heck M.M., Williams M.J. 2012. *A direct miniscreen for genes involved in the Drosophila anti-parasitoid immune response. Immunogenetics 64 (2): 155-161.*

Huang H.R., Chen Z.J., Kunes S., Chang G.D., Maniatis T. 2010. *Endocytic pathway is required for Drosophila Toll innate immune signaling. Proc. Natl Acad. Sci. USA 107, 8322–8327.*

Huguet C., Crepieux P., Laudet V. 1997. *Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors and I $\kappa$ B inhibitors: evolution from a unique common ancestor. Oncogene 15: 2965-2974.*

Hultmark D. 2003. *Drosophila immunity: Paths and patterns. Curr Opin Immunol 15:12-19.*

Irene Mateo Leach. *Lost sex: the evolutionary Biology of Parthenogenesis. Chapter 17: Thelytoky in Hymenoptera with Venturia canescens and Leptopilina clavipes as Case studies. 2009. Springer.*

Irving P, Ubeda JM, Doucet D, Troxler L, Lagueux M, Zachary D, et al. 2005. *New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis. Cell Microbiol; 7:335-50.*

Jang I.H., Chosa N., Kim S.H., Nam H.J., Lemaitre B., Ochiai M., Kembris Z., Brun S., Hashimoto C., Ashida M., Brey P.T., Lee W. J. 2006. *A Spätzle-processing enzyme requie for Toll signaling activation in Drosophila innate immunity. Dev Cell 10 (1) 45-55.*

Jingqun Ao, Erjun Ling, Xiao-Qiang Yu. 2007. *Drosophila C-type lectins enhance cellular encapsulation. Molecular Immunology 44, 2541–2548.*

Johansson K.C., Metzendorf C., Soderhall K. 2005. *Microarray analysis of immune challenged Drosophila hemocytes. Experimental Cell Research 305, 145-155.*

Jung S.H., Evans C.J., Uemura C., Banerjee U. 2005. *The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. Development 132: 2521-33.*

Kambris Z., Brun S., H. Jang I., Nam H. J., Romeo Y., Takahashi K., Lee W. J., Ueda R. and Lemaitre B. 2006. *Drosophila immunity: a large-scale in vivo RNAi screen identifies five serine proteases required for Toll activation. Curr. Biol. 16:808–813.*

Kaneko T., Goldman W.E., Mellroth P., Steiner H., Fukase K., et al. 2004. *Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the Drosophila IMD pathway. Immunity 20: 637-49.*

Karlsson C., Korayem A.M., Scherfer C., Dushay M.S., Theopold U. 2004. *Proteomic analysis of the Drosophila larval hemolymph clot. Journal of Biological Chemistry 279, 52033-52041.*

Kim M., Lee J. H., Lee S. Y, Kim E. and J. Chung. 2006. *Caspar, a suppressor of antibacterial immunity in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 16358–16363.*

Kinchen J. M., Ravichandron K. S. 2008. *Phagosome maturation: going through the acid test. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 9, 781-795.*

Kleino A., Myllymaki H., Kallio J., Vanha-aho L.M., Oksanen K., Ulvila J., Hultmark D., Valanne S., Ramet M. 2008. *Pirk is a negative regulator of the Drosophila Imd pathway. J Immunol 180: 5413–5422.*

Kocks C., Cho J.H., Nehme N., Ulvila J., Pearson A.M., Meister M. et al. 2005. *Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in Drosophila. Cell 123:335-46.*

Kounatidis I. and Ligoxygakis P. 2012. *Drosophila as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. Open Biol 2012 2, 120075.*

Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B.A., Hoffmann R., and Otvos L. Jr. 2001. *The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. Biochem 40:3016–3026.*

Krzemien J., Dubois L., Makki R., Meister M., Vincent A., Crozatier M. 2007. *Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre. Nature 446, 325-328.*

Kuraishi T., Nakagawa Y., Nagaosa K., Hashimoto Y., Ishimoto T., Moki T., Fujiita Y., Nakayawa H., Dohmae N., Shiratsuchi A., Yamamoto N., Ueda K., Yamaguchi M., Awasaki T., Nakanishi Y. 2009. *Pretaporter, a Drosophila protein serving as a ligand for Drapen in the phagocytosis of apoptotic cells. EMBO J. 28(24): 3868-78.*

Kurucz E., Markus R., Zsomboki J., Folk-Medzihradzky K., Darula Z., Vilmos P., Udvardy A., Krausz I., Lukacsovich T., Gateff E., Zettervall C. J., Hultmark D., Andò I. 2007. *Nimord, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in Drosophila plasmatocytes. Curr. Biol. 17 (7): 649-54.*

Kurucz E., Zettervall C. J., Sinka R., Vilmos P., Pivarcsi A., Ekengren S., Hegedus Z., Ando I. and Hultmark D. 2003. *Hemese, a hemocyte-specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in Drosophila. PNAS no.5 vol. 100 52622–2627.*

Kuttenkeuler D., Pelte N., Ragab A., Gesellchen V., Schneider L., Blass C., Axelsson E., Huber W. and Boutros M. 2010. *A large-scale RNAi screen identifies Deaf1 as a regulator of innate immune responses in Drosophila. J. Innate Immun. 2: 181–194.*

Labrosse C., Eslin P., Doury G., Drezen J.M., Poirie M. 2005. *Haemocyte changes in D. melanogaster in response to long gland components of the parasitoid wasp Leptopilina boulardi: a Rho-GAP protein as an important factor. J Insect Physiol 51: 161–170.*

Lackie A. M. 1988. *Immune mechanisms in insects. Parasitol. Today 4, 98-105.*

Lagueux M., Perrodou E., Levashina E. A., Capovilla M., Hoffmann J. A. 2000. *Constitutive expression of a complement-like protein in Toll and JAK gain-of-function mutants of Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 11427-11432.*

Laneve P., Gioia U., Ragno R., Altieri F., Di Franco C., Santini T., Arceci M., Bozzoni I., Caffarelli E. 2008. *The tumor marker human placental protein 11 is an endoribonuclease. J. Biol. Chem. 283, 34712e34719.*

Lanot R., Zachary D., Holder F., Meister M. 2000. *Post- embryonic hematopoiesis in Drosophila. Dev. Biol. 230: 243-57.*

Lanot R., Zachary D., Holder F., Meister M. 2001. *Postembryonic hematopoiesis in Drosophila. Dev Biol 230, 243-257.*

Lebestky T., Chang T., Hartenstein V. and Banerjee U. 2000. *Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. Science 288: 146–149.*



Lebestky T., Jung S.H., Banerjee U. 2003. *A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis. Genes Dev. 17(3):348-53.*

Leclerc V, Pelte N, El Chamy L, Martinelli C, Ligoxygakis P, Hoffmann JA, et al. 2006. *Prophenoloxidase activation is not required for survival to microbial infections in Drosophila. EMBO Rep 2006; 7:231-5. 40.*

Lee W. J. .2009. *Bacterial-modulated host immunity and stem cell activation for gut homeostasis. Genes Dev 23:2260–2265.*

Leem J.Y., Nishimura C., Kurata S., Shimada I., Kobayashi A., Natori S. 1996. Purification and characterization of N-beta-alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J Biol Chem 271:13573-7*

Lehrer R. I., Barton A., Daher K.A., Harwig S.S., Ganz T. and Selsted M.E.1989. *Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. J Clin Invest 84:553–561.*

Lemaitre B. and Hoffmann J., 2007. *The host defense of Drosophila melanogaster. Annu.Rev.Immunol.25:697-743.*

Lemaitre B., Kromer-Metzger E., Michaut L., Nicolas E., Meister M., Georgel P., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. 1995. *A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 9465-9469.*

Lemaitre B., Kromer-Metzger E., Michaut L., Nicolas E., Meister M., Georgel P., Reichhart J. M. and Hoffmann J. A. 1995a. *"A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense." Proc Natl Acad Sci U S A 92(21): 9465-9.*

Lemaitre B., Meister M., Govind S., Georgel P., Steward R., Reichhart M., Hoffmann J.A. 1995. *Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during immune response in Drosophila. EMBO J. 14: 536-545.*

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. *The dorsoventral regulatory gene cassette spaetzle/Toll cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell 1996;86:1-20.*

Lesch C., Goto A., Lindgren M., Bilda G., Dushay M.S., Theopold U. 2007. *A role for Hemolectin in coagulation and immunity in Drosophila melanogaster. Developmental and Comparative Immunology 31: 1255-1263.*

Leulier F., Parquet C., Pili-Floury S., Ryu J.H., Caroff M., Lee W.J., Mengin-Lecreulx D., Lemaitre B. 2003. *The Drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. Nat. Immunol. 4: 478-484.*

Leulier F., Rodriguez A., Khush R. S., Abrams J. M., Lemaitre B. 2000. *The Drosophila caspase Dredd is required to resist gram-negative bacterial infection. EMBO rep. 1(4): 353-8.*

Levashina E.A., Langley E., Green C., Gubb D., Ashburner M., Hoffmann J.A. et al. 1999. *Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient Drosophila. Science 285:1917-9.*

Li D., Scherfer C., Korayem A. M., Zhao Z., Schmidt O. Theopold U. 2002. *Insect Hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32, 919-928.*

Liehl P., Blight M., Vodovar N., Boccard F., Lemaitre B. 2006. *Prevalence of local immune response against oral infection in a Drosophila/Pseudomonas infection model. PLoS Pathog 2:e56.*

Ligoxygakis P, Pelte N, Ji C, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, et al. 2002. *A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of Drosophila. EMBO J; 21:6330-7.*

Lindgren M., Riazi R., Lesch C., Wilhelmsson C., Theopold U., Dushay M. S. 2008. *Fondue and transglutaminase in the Drosophila larval clot. Journal of insect Physiology 54, 586-592.*

Ling E., Yu X. Q. 2006a. *Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunelectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm Manduca sexta. Dev. Comp. Immunol. 30, 289–299.*

Louis L. Pech and Michael R. Strand. 1996. *Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. Journal of Cell Science 109, 2053-2060.*

Luo C., Shen B., Manley J.L., Zheng L. 2001. *Tehao functions in the Toll pathway in Drosophila melanogaster: possible roles in development and innate immunity. Insect Mol. Biol. 10, 457–464.*

Makhijani K., Brandy A., Tanaka T., Rulifson E., Bruckner K. 2011. *The peripheral nervous system support blood cell homing and survival in the Drosophila larva. Development 138, 5379-5391.*

Manaka J., Kuraishi T., Shiratusuchi A., Nakai Y., Higashida H., Henson P., Nakanishi Y. 2004. *Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by Drosophila hemocytes/macrophages. J. Biol. Chem. 279(46): 48466-76.*

Markus R., Laurinyecz B., Kurucz E., Honti V., Bajusz I., Sipos B., Somogyi K., Kronhamn J., Hultmark D., Andò I. 2009. *Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci USA 106: 4805-9.*

Martinek N., Shahab J., Saathoff M., Ringuette M. 2008. *Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV dependent stability of basal laminae in Drosophila embryos. Journal of Cell Science 121, 1671-1680.*

Martinelli C., Reichhart J.M. 2005. *Evolution and integration of innate immune system from fruit flies to man: lessons and questions. Journal of Endotoxin Research, 11: 243-248 PubMed 16176662.*

Massol P., Montcourrier P., Guillemot J. C., and Chavrier P. 1998. *Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. EMBO J. 17: 6219–6229.*

Matova N., Anderson K.V. 2010. *Drosophila Rel proteins are central regulators of a robust, multi-organ immune network. J Cell Sci. , 123:627-633.*

McPhee C. K., Baehrecke E. H. 2010. *The engulfment receptor Draper is required for autophagy during cell death. Autophagy 6(8): 1192-3.*

Meister M. 2004. *"Blood cells of Drosophila: cell lineages and role in host defence."Curr Opin Immunol 16(1): 10-5*

Meister M. and Ferrandon D. 2012. *Immune cell transdifferentiation: a complex crosstalk between circulating immune cells and the haematopoietic niche. EMBO reports vol. 13 n. 1.*

Meister M. and Lagueux M. 2003. *Drosophila blood cells. Cell. Microbiol. 5: 573-580.*

Meister M., Hetru C., Hoffmann J.A. 2000. *The antimicrobial host defense of Drosophila. Curr Top Microbiol Immunol 248: 17-36.*

Melk J. P. and Govind S. 1999. *Developmental analysis of Ganaspis xanthopoda, a larval parasitoid of Drosophila melanogaster. The Journal of Experimental Biology 202, 1885–1896.*

Mellroth P., Karlsson J., Hakansson J., Schultz N., Goldman W.E., Steiner H. 2005. *Ligand-induced dimerization of Drosophila peptidoglycan recognition proteins in vitro. Proc Natl Acad Sci USA. 102:6455-6460.*

Meng X., Khanuja BS, Ip YT. 1999. *Toll receptor-mediated Drosophila immune response require Dif, an NF- $\kappa$ B factor. Genes Dev 13: 792-797.*

Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J. 2001. *Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. Nature 414: 756 – 759.*

Minakina S., Steward R. 2006. *Melanotic mutants in Drosophila: pathways and phenotypes. Genetics 174 (1): 253-263.*

Mizuguchi K., Parker J. S., Blundell T. L., Gay N. J. 1998. *Getting knotted: a model for the structure and activation of Spätzle. Trends Biochem. Sci. 23, 239-242.*

Moncrieffe M. C., Grossmann J. G and N. J. Gay. 2008. *Assembly of oligomeric death domain complexes during Toll receptor signaling. J. Biol. Chem. 283:33447–33454.*

Moreau S.J., Eslin P., Giordanengo P., Doury G. 2003. *Comparative study of the strategies evolved by two parasitoids of the genus Asobara to avoid the immune response of the host, Drosophila melanogaster. Dev. Comp. Immunol. 27:273–82.*

Mortimer N. T., Goecks J., Kacsoh B. Z., Mobley J. A., Bowersock G. J., Taylor J. and Schlenke T. A. 2013. *Parasitoid wasp venom SERCA regulates Drosophila calcium levels and inhibits cellular immunity. PNAS, 110 (23) 9427–9432.*

Mortimer N. T., Kacsoh B. Z., Keebaugh E. S., Schlenke T. A. 2012. *Mgat1-dependent N-glycosylation of Membrane Components Primes Drosophila melanogaster Blood Cells for the Cellular Encapsulation Response. PLoS Pathog 8(7): e1002819.*

Munier A.I., Doucet D., Perrodou E., Zachary D., Meister M., Hoffmann J.A., Janeway C.A. Jr and Lagueux M. 2002. *PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in Drosophila larvae. EMBO Rep 3:1195–1200.*

Naitza S., Rossè C., Kappler C., Georgel P., Belvin M., Gubb D., Camonis J., Hoffmann J. A., Reichhart J. M. 2002. *The Drosophila immune defense against gram-negative infection require the death protein dFADD. Immunity 17(5): 575-81.*

Nam H.J., Jang I.H., Asano T., Lee W.J. 2008. *Involvement of Pro-phenoloxidase 3 in Lamellocyte-mediated Spontaneous Melanization in Drosophila. Mol Cells; 26.*

Nappi A. J. and Vass E. 1993. *"Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions." Pigment Cell Res 6(3): 117-26.*

Nappi A. J., Vass E., Frey F. and Carton Y. 2000. *"Nitric oxide involvement in Drosophila immunity." Nitric Oxide 4(4): 423-30.*

Nappi A.J. and Christensen B.M. 2005. *Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. Nsect Biochem. Mol.Biol. 35:443-459.*

Nappi A.J., Ottaviani E. 2000. *Cytotoxicity and cytotoxic molecule in invertebrates. BioEssays 22: 469-480.*

Nappi A.J., Silvers M. 1984. *Cell surface changes associated with cellular immune reactions in Drosophila. Science 225: 1166–1168.*

Nappi A.J., Vass E., Frey F., Carton Y. 1995. *Superoxide anion generation in Drosophila during melanotic encapsulation of parasites. Eur. J. Cell Biol. 68:450-56.*

Nappi AJ, Carton Y, Vass E. 1992. *Reduced cellular immune competence of a temperaturesensitive dopa decarboxylase mutant strain of Drosophila melanogaster against the parasite Leptopilina boulardi. Comp Biochem Physiol B; 101:453-60.*

Nard J. B. and Miklasz S. D. 1989. *Hemocytes contribute to both the formation and breakdown of the basal lamina in developing wings of Manduca sexta. Tissue & Cell 21, 559-567.*

Nehme N. T., Quintin J., Cho J. H., Lee J., Lafarge M. C., Kocks C., Ferrandon D. 2011. *Relative roles of the cellular and humoral response in the Drosophila host defense against three gram-positive bacterial infections. Plos One 6, e14743.*

Nehme N.T., Liegeois S., Kele B., Giammarinaro P., Pradel E., Hoffmann J.A., Ewbank J.J., Ferrandon D. 2007. *A model of bacterial intestinal infections in Drosophila melanogaster. PLoS Pathog, 3:e173.*

Nelson R. E., Fessler L. I., Takagi Y., Blumberg B., Keene D. R., Olson P. F., Parker C. G., Fessler J. H. 1994. *Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development. EMBO J. 13, 3438-3447.*

Nordlander G. 1980. *Revision of the genus Leptopilina Forster, 1869, with notes on the status of some other genera (Hymenoptera, Cynipoidea: Eucoilidae). Ent. Scand. 11, 428–453.*

Nordlander G. 1982. *Systematics and phylogeny of an interrelated group of genera within the family Eucoilidae (Insects: Hymenoptera, Cynipoidea). PhD thesis, University of Stockholm, Stockholm.*

Paladi M., Tepass U. 2004. *Function of Rho GTPases in embryonic blood cell migration in Drosophila. J. Cell. Sci 117(Pt26): 6313-26.*

Paquette N. et al. 2010. *Caspase-mediated cleavage, IAP binding, and ubiquitination: linking three mechanisms crucial for Drosophila NF-kappaB signaling. Mol. Cell 37, 172–182.*

Park C.B., Kim H.S., and Kim S.C. 1998. *Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. Biochem Biophys Res Commun* 244:253–257.

Pastor-Pereja J. C., Wu M., Xu T. 2008. *An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in Drosophila. Dis Model Mech* 1(2-3): 144-54.

Pearson A. M., Beksa K., Ramet M., Protas M., McKee M., Brown D., Ezekowitz R. A. B. 2003. *Identification of cytoskeletal regulatory proteins requie for efficient phagocytosis in Drosophila. Microbes and Infection* 5, 815-824.

Pennetier D., Oyallon J., Morin-Poulard I., Dejean S., Vincent A. 2012. *Size control of the Drosophila hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. PNAS* vol. 109 n. 9 3389-3394.

Philips J. A., Rubin E. J., Perrimon N. 2005. *Drosophila RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. Science* 309 (5738) 1251-53.

Pili-Floury S., Leulier F., Takahashi K., Saigo K., Samain E., et al. 2004. *In vivo RNAi analysis reveals an unexpected role for GNBPI in the defense against Gram-positive bacterial infection in Drosophila adults. J.Biol.Chem.* 279:12848-53.

Poirié M., Carton Y., Dubuffet A. 2009. *Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. C. R. Biol.* 332: 311-320.

Prevost G., Eslin P., Doury G., Moreau S.J., Guillot S. 2005. *Asobara, braconid parasitoids of Drosophila larvae: unusual strategies to avoid encapsulation without VLPs. J. Insect. Physiol.* 51:171–79.

Prevost N., Woulfe D., Tanaka T., Brass T. F. 2002. *Interaction between Eph kinase and ephrins provide a mechanism to support platelet aggregation cell-to-cell contact has occured. Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9219-9224.

Qiu P., Pan P.C., Govind S. 1998. *A role for the Drosophila Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. Development* 125: 1909-1920.

Quicke D. L. J. 1997. *Parasitic wasps. Chapman & Hall, London.*

Ramet M., Manfrulli P., Pearson A., Mathey-Prevost B., Ezekowitz R.A. 2002b. *Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a Drosophila receptor for E. coli. Nature 416, 644-648.*

Ramet M., Pearson A., Manfrulli P., Li X., Koziel H., Gobel V. 2001. *Drosophila scavenger receptor C1 is a pattern recognition receptor for bacteria. Immunity 15: 1027-38.*

Reed D. E., Huang X. M., Wohlschlegel J. A., Levine M. S. and Senger K.. 2008. *DEAF-1 regulates immunity gene expression in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 8351–8356.*

Rehorn k. P., Thelen H., Michelson A. M. &Reuter R. 1996. *A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and Drosophila. Development (Cambridge, UK) 122, 4023-4031.*

Renzi F., Caffarelli E., Laneve P., Bozzoni I., Brunori M., Vallone B. 2006. *The structure of the endoribonuclease XendoU: from small nucleolar RNA processing to severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 12365e12370.*

Rizki R. M. and Rizki T. M. 1979. *Cell interactions in the differentiation of a melanotic tumor in Drosophila. Differentiation 12(3): 167-78.*

Rizki R. M., Rizki T. M. 1984. *Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81(19): 6154-8.*

Rizki R. M., Rizki T. M. 1994. *Parasitoid-induced cellular immune deficiency in Drosophila. Ann. NY Acad. Sci. 712:178-94.*

Rizki R.M., Rizki T.M. 1974. *Basement membrane abnormalities in melanotic tumor formation of Drosophila. Experientia, 30:543-546.*

Rizki R.M., Rizki T.M. 1990. *Parasitoid virus-like particles destroy Drosophila cellular immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8388–92.*

Rizki T.M. 1978. *The circulatory system and associated cells and tissue. In The Genetics and Biology of Drosophila, ed. M. Ashburner, TRF Wright, pp. 397-452. New York: Academic.*



Rizki T.M. and Rizki R.M. 1983. *Blood cell surface changes in Drosophila mutants with melanotic tumors. Science* 220: 73–75

Rizki T.M. R.M., Grell E. 1980. *A mutant affecting the crystal cells in Drosophila melanogaster. Roux's Arch. Dev. Biol.* 188: 91-99.

Rizki T.M., Rizki R.M., Bellotti R.A. 1985. *Genetics of a Drosophila phenoloxidase. Mol Gen Genet;* 201:7-13.

Rizki TM, Rizki RM. 1990. *Encapsulation of parasitoid eggs in phenoloxidase-deficient mutants of Drosophila melanogaster. J Insect Physiol;* 36:523-9.

Roberts M., Barry S., Woods A., van der Sluijs P., Norman J. 2001. *PDGF regulated rab4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. Curr Biol* 11(18): 1392–1402.

Rowley A. F. and Ratcliffe N. A. 1981. *Insects. In Invertebrate Blood Cells (ed. N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley), pp. 471-490. Academic Press, New York.*

Royet J. 2011. *Epithelial homeostasis and the underlying molecular mechanisms in the gut of the insect model Drosophila melanogaster. Cell. Mol. Life Sci.* 68:3651–3660.

Royet J., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. 2005. *Sensing and signaling during infection in Drosophila. Curr. Opin. Immunol.* 17: 11-17.

Ruggeri Z.M. 2003. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb Haemost.* 1(7): 1335-42.

Russo J., Brehelin M., Carton Y. 2001. *Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of D. melanogaster caused by virulent and avirulent strains of parasitic wasp leptopilina bouardi. J. Insect Physiol* 47, 167-172.

Russo J., Dupas S., Frey F., Carton Y. and Brehelin M. 1996. *Insect immunity:early events in the encapsulation process of parasitoid (Leptopilina bouardi) eggs in resistant and susceptible strains of Drosophila Parasitology*112, 135-142.

Ryu J.H. et al. 2008. *Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in Drosophila. Science* 319, 777–782.

Ryu J.H., Kim S.H., Lee H.Y., Bai J.Y., Nam Y.D., Bae J.W., Lee D.G., Shin S.C., Ha E.M., Lee W.J. 2008. *Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in Drosophila*. *Science* 2008, 319:777-782.

Salt, G. 1970. *The Cellular Defense Reactions of Insects*. Cambridge University Press, Cambridge.

Sampson C. J., Valanne S., Fauvarque M. O., Hultmark D., Rämet M. and Williams M. J. 2012. *The RhoGEF Zizimin-related acts in the Drosophila cellular immune response via the Rho GTPases Rac2 and Cdc42*. *Dev. Comp. Immunol.* 38, 160–168.

Sass M., Kiss A. and Locke M. 1994. *Integument and hemocyte peptides*. *J. Insect Physiol.* 40, 407-421.

Scherfer C, Tang H, Kambris Z, Lhocine N, Hashimoto C, Lemaitre B. 2008. *Drosophila Serpin-28D regulates hemolymph phenoloxidase activity and adult pigmentation*. *Dev Biol*;323:189-96.

Scherfer C., Kerlsson C., Loseva O., Bilda G., Goto A., Havemann J., Dushay M.S., Theopold U. 2004. *Isolation and Characterization of hemolymph clotting factors in Drosophila melanogaster by a Pullout Method*. *Current Biology* 14: 625-629.

Scherfer C., Qazi M. R., Takahashi K., Ueda R., Dushay S. M., Theopold U., Lemaitre B. 2006. *The Toll immune-regulated Drosophila protein Fondue is involved in hemolymph clotting and puparium formation*. *Dev. Biology* 295, 156-163.

Schilthuizen M., Nordlander G., Stouthamer R. and van Alphen J. J. M. 1998. *Morphological and molecular phylogenetics in the genus Leptopilina (Hymenoptera: Cynipoidea: Eucoilidae)*. *Syst. Ent.* 23, 253–264.

Schlenke T. A., Morales J., Govind S., Clark A. G. 2007. *Contrasting Infection Strategies in Generalist and Specialist Wasp Parasitoids of Drosophila melanogaster*. *PLOS- Pathog.* 3(10): e158.

Schnitger A.K., Kafatos F.C., Osta M.A. 2007. *The melanization reaction is not required for serviva of Anopheles gambiae mosquitoes after bacterial infections*. *J Biol Chem* 282:21884-8.

Sharma S., Verma I. and Khuller G.K. 1999. *Biochemical interaction of human neutrophil peptide-1 with Mycobacterium tuberculosis H37Ra. Arch Microbiol* 171:338–342.

Shim J., Lee S. M., Yoon J., Kweon H. S., Kim Y. J. 2010. *Rab35 mediates transport of Cdc 42 and Rac1 to the plasma membrane during phagocytosis. Mol. Cell. Biol.* 30(6): 1421-33.

Sinenko S. A., Shim J., Banerjee U. 2011. *Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in Drosophila. EMBO (13) 1:* 83-9.

Stofanko Martin, So Yeon Kwon., Badenhorst Paul. 2010. *Lineage Tracing of lamellocytes demonstrates Drosophila macrophage plasticity. PLoS ONE* 5(11):e14051.

Strand M. R. and Pech L. L. 1995. *Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. Annu. Rev. Entomol.* 40, 31-56.

Stroschein-Stevenson S. L., Foley E., O'Farrell P. H., Johnson A. D. 2006. *Identification of Drosophila gene products required for phagocytosis of Candida albicans. Plos Biol* 4, e4.

Stuart L. M., Ezekowitz R. A. 2008. *Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. Nat. Rev. Immunol.* 8(2): 131-41.

Stuart L.M., Ezekowitz R.A. 2005. *Phagocytosis: elegant complexity. Immunity;* 22:539-50.

Sun H., Bristow B. N., Qu G. and S. A. Wasserman. 2002. *A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12871–12876.

Takehana A, Katsuyama T, Yano T, Oshima Y, Takada H, Aigaki T, et al. 2002. *Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in Drosophila larvae. Proc Nat Acad Sci USA;* 99:13705-10.

Takehana A., Yano T., Mita S., Kotani A., Oshima Y., Kurata S. 2004. *Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in Drosophila immunity. EMBO J.* 23:4690-700.

Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. 2006. *Two proteases defining a melanization cascade in the immune system of Drosophila*. *J Biol Chem*; 281:28097-104

Tang H, Kambris Z, Lemaitre B, Hashimoto C. 2008. *A serpin that regulates immune melanization in the respiratory system of Drosophila*. *Dev Cell*; 15:617-26.

Tang. 2009. *Regulation and function of the melanization reaction in Drosophila*. *Fly* 3:1, 105-111.

Tauszig-Delamasure S., Bilak H., Capovilla M., Hoffmann J. A. and Imler J. L. 2002. *Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections*. *Nat. Immunol.* 3: 91–97.

Technau G., Campos-Ortega J.A. 1985. *Fate mapping in wild type Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* 194:196–212.

Tepass U., Fessler L.I., Aziz A., Hartenstein V. 1994. *Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in Drosophila*. *Development* 120: 1829-1837.

Theopold U., Li D., Fabbri M., Scherfer C., Schmidt O. 2002. *The coagulation of insect hemolymph*. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 363-372.

Thevenon D. et al. 2009. *The Drosophila ubiquitin-specific protease dUSP36/Scny targets IMD to prevent constitutive immune signaling*. *Cell Host Microbe* 6, 309–320.

Tzou P., Ohresser S., Ferrandon D., Capovilla M., Reichhart J.M., Lemaitre B., Hoffmann J.A., Imler J.L. 2000. *Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in Drosophila surface epithelia*. *Immunity*. 13:737–748.

Ulvila J., Vanha-Aho L. M., Ramet M. 2010. *Drosophila phagocytosis- still many unknowns under the surface*. *APMIS*, 119(10): 651-62.

Veiga A.B., Ribeiro J.M., Guimarães J.A., Francischetti I.M. 2005. *A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar Lonomia obliqua*:

*identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. Gene 355, 11e27.*

Vet L. E. M. and Bakker K. 1985. *A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps. II. A quantitative study on eight eucoilid species. Oikos 44, 487–498.*

Vierstraete E., Cerstiaens A., Baggerman G., Van den Bergh G., De Loof A., Schoofs L. 2003. Proteomics in *Drosophila melanogaster* first 2D database of larval hemolymph proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 831-838.

Vinson S. B., Iwantsch G. F. 1980. *Host regulation by insect parasitoids. Quart. Rev. Biol. 55: 143-165.*

Vodovar N., Vinals M., Liehl P., Basset A., Degrouard J., Spellman P., Boccard F., Lemaitre B. 2005. *Drosophila* host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 11 414–11 419.*

Wagner C., Isermann K., Roeder T. 2009. *Infection induces a serviva program and local remodeling in the airway epithelium of the fly. FASEB J 23:2045-2054.*

Wang L, Weber AN, Atilano ML, Filipe SR, Gay NJ, Ligoxygakis P. 2006. *Sensing of Gram-positive bacteria in Drosophila: GNBPI is needed to process and present peptidoglycan to PGRP-SA. EMBO J. 25, 5005 – 5014.*

Wang L., Kounatidis I., Ligoxygakis P. 2014. *Drosophila* as model to study the role of the blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology vol 3 art. 113.*

Wang Z., Wilhelmsson C., Hyrs P., Loof T.G., Dobes P., Klupp M.et al. 2010. Pathogen entrapment by transglutaminase-a conserved early innate immune mechanism. *PLoS Pathog.* 6:e1000763.

Warner T., Liu G., Kang D. Ekengren S., Steiner H., Hultmark D. 2000. *A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 13772-13777.*

Watson F. L., Puttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D. L., Hughes M., Kondo M., Rebel V. I., Schmucker D. 2005. *Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science 309, 1874-1878.*

Weber A. N., Moncrieffe M.C., Gangloff M., Imler J.L., Gay N.J. 2005. *Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway. J.Biol. Chem. 280: 22793-33799.*

Werner T., Liu G., Kang D., Ekengren S., Steiner H., Hultmark D. 2000. *A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruits fly Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci 97: 13772-13777.*

Wertheim B., Kraaijeveld A. R., Schuster E., Blanc E., Hopkins M., Pletcher S. D., Strand M. R., Partridge L. and H. J. Godfray. 2005. *Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in Drosophila. Genome Biology, 6: R94.*

Wigglesworth V. B. 1973. *Haemocytes and basement membrane formation in Rhodnius. J. Insect Physiol. 19, 831-844.*

Wigglesworth V.B. 1990. *The properties of the lining membrane of the insect tracheal system. Tissue Cell 22:231-238.*

Williams M. J. 2009. *The Drosophila cell adhesion molecule neuroglian regulates lissencephaly-1 localisation in circulating immunosurveillance cells. BMC Immunol.10, 17.*

Williams M. J., Ando I. and Hultmark D. 2005. *Drosophila melanogaster Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. GenesCells 10, 813–823.*

Williams M. J., Wiklund M. L., Wikman S. and Hultmark D. 2006. *Rac1 signalling in the Drosophila larval cellular immune response. J. Cell.Sci. 119 (Pt10), 2015–2024.*

Wu S. C., Liao C. W., Pan R. L. and Juang J.L. 2012. *Infection-Induced Intestinal Oxidative Stress Triggers Organ-to-Organ Immunological Communication in Drosophila. Cell Host & Microbe 11, 410–417.*

Xavier M. J. And Williams M. J. 2011. *The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in Drosophila immunosurveillance cells. PLoS ONE 6:e19504.*

Xiao T., Towb P., Wasserman S. A. and S. R. Sprang. 1999. *Three-dimensional structure of a complex between the death domains of Pelle and Tube. Cell* 99:545–555.

Yeaman M.R. and Yount Y.N. 2003. *Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. Pharmacol Rev* 55:27–55.

Yu X. Q., Gan H., Kanost M.R. 1999. *Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, Manduca sexta, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 585–597.

Yu X. Q., Kanost M.R. 2000. *Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, Manduca sexta, is induced in response to gram-negative bacteria. J. Biol. Chem.* 275, 37373–37381.

Yu X. Q., Ling E., Tracy M.E., Zhu Y. 2006. *Immulectin-4 from the tobacco hornworm Manduca sexta binds to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. Insect Mol. Biol.* 15, 119–128.

Yu X. Q., Tracy M.E., Ling E., Scholz F.R., Tenczek T. 2005. *A novel C-type immulectin-3 from Manduca sexta is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 285–295.

Yu X. Q., Zhu Y.F., Ma C., Fabrick J.A., Kanost M.R. 2002. *Pattern recognition proteins in Manduca sexta plasma. Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1287–1293.

Zaidman-Remy A., Hervè M., Poidevin M., Pili-Floury S., Kim M.S., Balnot D., Oh B.H., Ueda R., Mengin-Lecreulx D., Lemaitre B. 2006. *The Drosophila amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. Immunity* 24: 463-473.

Zambon R.A., Nandakumar M., Vakharia V.N., Wu L.P. 2005. *The Toll pathway is important for an antiviral response in Drosophila. Pro Natl Acad Sci* 102: 7257-7262.

Zdobnov E. M., von Mering C., Letunic I., Torrents D., Suyanna M., Copley R. R., Christophides G. K., Thomasova D., Holt R. D., Subramanian G. M. et al. 2002. *Comparative genome and proteome analysis of anopheles gambiae and Drosophila melanogaster. Science* 298, 149-159.

Zhao M., Soderhall I., Park J.W., Ma Y.G., Osaki T., Ha N.C. et al. 2005. *A novel 43-kDa protein as a negative regulatory component of phenoloxidase-induced melanin synthesis. J Biol Chem, 280:24744-51.*



## Appendice

Nell'ambito dell'attività di ricerca svolta durante il corso di dottorato, ho collaborato al progetto che riguardava lo studio funzionale del gene omologo al gene 102 di *Heliothis virescens*, in un altro Lepidottero, *Spodoptera littoralis* basato sull'uso del silenziamento genico mediato da RNAi.

Nel presente lavoro di cui sono coautrice riportiamo l'identificazione di un cDNA codificante per una proteina che presenta un elevato livello di omologia con la proteina P102 in un'altra specie di Lepidottero Nuttuide, *Spodoptera littoralis* (Boisduval). Il corrispondente gene è altamente espresso negli emociti, dove la proteina viene accumulata in grandi compartimenti citoplasmatici, in maniera analoga a quanto precedentemente osservato per la proteina P102 di *H. virescens*. Esperimenti di silenziamento genico mediante RNA interference hanno fornito una diretta dimostrazione del ruolo svolto da questa proteina nella risposta immunitaria. Si è ottenuta, infatti, una forte soppressione della reazione d'incapsulamento e di melanizzazione in seguito a somministrazione orale di molecole di RNA a doppio filamento dirette contro il gene, mentre il conferimento attraverso iniezioni all'interno dell'emoceliche non ha prodotto alcun effetto. Poco dopo la loro somministrazione, le molecole di dsRNA sono state rinvenute all'interno delle cellule intestinali, attraverso le quali transitano per raggiungere gli emociti, in cui è stato registrato un significativo grado di silenziamento del gene bersaglio. Complessivamente i dati dimostrano che il gene 102 svolge un ruolo chiave nell'immunità e che questa sua funzione è conservata in due diverse specie di Lepidotteri, *Heliothis virescens* e *Spodoptera littoralis*. Inoltre, la possibilità di alterare l'espressione di questo gene attraverso la somministrazione orale di molecole di RNA a doppio filamento ha una particolare importanza da un punto di vista applicativo. Si può sfruttare come strategia per migliorare l'impatto degli antagonisti naturali degli insetti, per esempio. Ed infatti dati preliminari indicano che l'immunosoppressione innescata da questo trattamento è in grado di aumentare significativamente l'effetto letale del *Bacillus thuringiensis* in larve mature di *S. littoralis*. Di seguito si riporta il lavoro che è in pubblicazione sulla rivista *Journal of Insect Physiology*:

## Functional analysis of an immune gene of *Spodoptera littoralis* by RNAi

1  
2  
3  
4 Ilaria Di Lelio<sup>1</sup>, Paola Varricchio<sup>1</sup>, Gennaro Di Prisco<sup>1</sup>, Adriana Marinelli<sup>1</sup>, Valentina Lasco<sup>1,2,3</sup>,  
5 Silvia Caccia<sup>4</sup>, Morena Casartelli<sup>4</sup>, Barbara Giordana<sup>4</sup>, Rosa Rao<sup>1</sup>, Silvia Gigliotti<sup>2,3\*</sup>, F.  
6 Pennacchio<sup>1\*</sup>  
7  
8  
9

10  
11 <sup>1</sup>Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, via Università 100, 80055  
12 Portici (Napoli), Italy  
13  
14

15 <sup>2</sup> Istituto di Genetica e Biofisica “A. Buzzati-Traverso”, CNR, via P. Castellino 111, 80131 Napoli,  
16 Italy  
17  
18

19 <sup>3</sup>Istituto di Bioscienze e Biorisorse, CNR, via P. Castellino 111, 80131 Napoli, Italy  
20

21 <sup>4</sup>Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, via Celoria 26, 20133 Milano, Italy  
22  
23  
24  
25

26 \*Corresponding authors: [f.pennacchio@unina.it](mailto:f.pennacchio@unina.it) (F.P.); [silvia.gigliotti@ibbr.cnr.it](mailto:silvia.gigliotti@ibbr.cnr.it) (S.G.)  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

1  
2 Insect immune defences rely on cellular and humoral responses targeting both microbial pathogens  
3  
4 and metazoan parasites. Accumulating evidence indicates functional cross-talk between these two  
5  
6 branches of insect immunity, but the underlying molecular mechanisms are still largely unknown.  
7  
8 We recently described, in the tobacco budworm *Heliothis virescens*, the presence of amyloid fibers  
9  
10 associated with melanogenesis in immune capsules formed by hemocytes, and identified a protein  
11  
12 (P102) involved in their assembly. Non-self objects coated by antibodies directed against this  
13  
14 protein escaped hemocyte encapsulation, suggesting that P102 might coordinate humoral and  
15  
16 cellular defence responses at the surface of foreign invaders. Here we report the identification of a  
17  
18 cDNA coding for a protein highly similar to P102 in a related Lepidoptera species, *Spodoptera*  
19  
20 *littoralis*. Its transcript was abundant in the hemocytes and the protein accumulated in large  
21  
22 cytoplasmic compartments, closely resembling the localization pattern of P102 in *H. virescens*.  
23  
24 RNAi-mediated gene silencing provided direct evidence for the role played by this protein in the  
25  
26 immune response. Oral delivery of dsRNA molecules directed against the gene strongly suppressed  
27  
28 the encapsulation and melanization response, while hemocoelic injections did not result in evident  
29  
30 phenotypic alterations. Shortly after their administration, dsRNA molecules were found in midgut  
31  
32 cells, en route to the hemocytes where the target gene was significantly down-regulated. Taken  
33  
34 together, our data demonstrate that P102 is a functionally conserved protein with a key role in insect  
35  
36 immunity. Moreover, the ability to target this gene by dsRNA oral delivery may be exploited to  
37  
38 develop novel technologies of pest control, based on immunosuppression as a strategy for  
39  
40 enhancing the impact of natural antagonists.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 *Key words: hemocytes, encapsulation, melanization, immunity, gene silencing.*  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

## 1 Introduction

1  
2 Insect cuticle is an effective physical barrier preventing the entrance into the haemocoel of a  
3  
4 number of foreign invaders, which is complemented by a powerful innate immune system, active  
5  
6 against pathogens and parasites. The recognition of non-self intruders immediately activates a  
7  
8 number of defence reactions, mediated by circulating molecules and immune cells, which are  
9  
10 commonly referred to as humoral and cellular immunity, respectively (Lemaitre and Hoffmann,  
11  
12 2007; Kounatidis and Ligoxygakis, 2012). However, these two virtual arms of the immune response  
13  
14 are basically different components of a unique machinery, since they are inextricably linked and  
15  
16 reciprocally modulate their function through complex interactions, only partially understood  
17  
18 (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Cerenius et al., 2008). Insect pathogens and parasitoids are able to  
19  
20 successfully overcome these immune barriers by using virulence factors, which often disrupt the  
21  
22 melanization response (Pennacchio and Strand, 2006; Eleftherianos et al., 2007; Beck and Strand  
23  
24 2007; Lu et al., 2008; Colinet et al., 2009; Strand, 2012). However, how this effect is associated  
25  
26 with suppression of encapsulation (i.e. the formation of a cellular multilayer enclosing non-self  
27  
28 elements) is not well defined, and there is also some unresolved controversy on the general  
29  
30 assumption that melanogenesis is an absolute requirement for killing parasites and pathogens  
31  
32 (Cerenius et al., 2008; Nappi and Christensen, 2005).  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 We recently discovered that an insect immune gene, highly expressed in the hemocytes of *Heliothis*  
43  
44 *virescens* and denoted as *I02*, encodes a protein (P102) which generates around non-self objects a  
45  
46 layer of amyloid fibers associated with melanin (Falabella et al., 2012). The active role of amyloids  
47  
48 in insect melanogenesis appears to closely mimic the strategy used by mammals to cope with the  
49  
50 intrinsic toxicity of the intermediate metabolites in the melanin biosynthetic pathway. Indeed, the  
51  
52 conserved structural characteristics of the amyloid molecular scaffold allow tight binding of  
53  
54 cytotoxic melanin precursors, hastening their polymerization and preventing the lethal diffusion of  
55  
56 these molecules outside of the confined compartment where melanogenesis takes place (Fowler et  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
al., 2006; 2007). Moreover, we also provided indirect evidence that the *102* gene might modulate the cellular immune response, as G Sepharose beads injected into the larval hemocoel were poorly encapsulated when coated with anti-P102 antibodies (Falabella et al., 2012). Collectively, the reported experimental data indicate a central role of this gene in the immune response, but how this is exerted and if a conserved mechanism exists in other lepidopteran species still remain open questions.

Here we address these issues, using a related moth species, *Spodoptera littoralis*, a polyphagous pest of remarkable economic importance, occurring in many regions of Africa, Asia and Europe ([http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Spodoptera\\_litura/PRODLI\\_ds.pdf](http://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Spodoptera_litura/PRODLI_ds.pdf)). We obtained and characterized a full-length cDNA encoding a protein with high sequence similarity to P102. To characterize this protein from a functional point of view and to establish if and how it is involved in the modulation of immune response we silenced its coding gene by RNAi. This approach allowed us to gather direct evidence on the role of this gene in insect immune response.

The use of RNAi in Lepidoptera has been widely pursued, but with more difficulties compared to other insect orders (Terenius et al., 2011). The causes of these problems are often unknown, and the registered failures could be due to a combination of different factors, such as, for example, the life stage and the amount of dsRNA used, the gene itself and its predominant site of expression (Yu et al., 2013). However, a fairly good number of studies on Lepidoptera are encouraging, in particular those reporting effective RNAi induced by oral delivery of dsRNA (Turner et al. 2006; Mao et al., 2007; Surakasi et al., 2011). With this in mind, we first defined an effective protocol to orally deliver controlled amounts of dsRNA to the experimental larvae, able to induce RNAi in the tissue where the target gene is predominantly expressed. Then, we studied the phenotypic alterations associated with gene knockdown, by developing a simple bioassay to score the immune response against non-self objects injected into the hemocoel. The obtained results shed light on the functional

1  
2 role played by the immune gene studied and set the stage for future development of novel pest  
3 control technologies, based on RNAi strategies.  
4  
5  
6  
7

## 8 **2 Materials and Methods**

### 9 **2.1 Insect material**

10  
11 *S. littoralis* larvae were individually reared on artificial diet (41.4 g/L wheat germ, 59.2 g/L  
12 brewer's yeast, 165 g/L corn meal, 5.9 g/L ascorbic acid, 1.53 g/L benzoic acid, 1.8 g/L methyl 4-  
13 hydroxybenzoate and 29.6 g/L agar), at  $25 \pm 1$  °C and  $70 \pm 5\%$  RH, with 16:8 hours light-dark  
14 period.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

### 26 **2.2 Hemocyte collection**

27  
28 Larval hemolymph was collected from a cut of the abdominal proleg into ice-cold MEAD anti-  
29 coagulant buffer (98 mM NaOH, 145 mM NaCl, 17 mM EDTA, 41 mM citric acid, pH 4.5).  
30  
31 Hemocytes were separated from plasma by 5 minutes centrifugation at 500 g, at 4°C.  
32  
33  
34  
35  
36  
37

### 38 **2.3 Identification of 102 Sl cDNA**

39  
40 A partial 102 Sl cDNA (accession number FQ016824.1) was identified by BLAST analyses  
41 (Altschul *et al.*, 1990; Gish e States, 1993) in a public database of EST sequences from *S. littoralis*  
42 male antenna, using as query the sequence of the *H. virescens* 102 cDNA (accession number  
43 FR751090). The predicted 102 Sl protein (P102 Sl) and P102 sequences (accession number  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

1 were 3'GSP1 F (TACATCCAAGTAAATTTGCAAGGC) and 3'GSP2 F  
2 (CGCTACAACAACGTCAACTT). In the 5' RACE experiment, 5'GSP1 R  
3 (TGAGTCCGATTGAACA) was used as gene specific primer for reverse transcriptase while  
4  
5 5'GSP2 R (CTCGTAGCTCTTCTTCTTGGCATA) and 5'GSP3 R  
6  
7 (ATCGACGACACCGCCTACTA) were used for nested PCR reactions. RACE products were  
8  
9 purified from low-melting agarose and sequenced directly by using GSPs as sequencing primers.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17

## 18 **2.4 RNA extraction**

19  
20 Total RNA was extracted from *S. littoralis* fifth instar larvae and from hemocytes, integument, fat  
21  
22 body and gut, using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to  
23  
24 manufacturer's instructions.  
25  
26  
27  
28  
29

## 30 **2.5 dsRNA synthesis**

31  
32 Total RNA purified from hemocytes of *S. littoralis* sixth instar larvae was retro-transcribed with  
33  
34 the RETRO script® Kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) and a 580 bp long *102 Sl* cDNA  
35  
36 fragment was obtained by PCR using the 3'GSP1 F primer (see above) in combination with the  
37  
38 *102Sl Rev* primer (GGCCCAGAACATTCTCACCTC). This cDNA fragment was used as template  
39  
40 for a nested-PCR reaction, performed with primers containing at their 5' ends the T7 polymerase  
41  
42 promoter sequence (*T7-102Sl* F:  
43  
44 TAATACGACTCACTATAGGGAGAACCTCCTGAGCGTGCCTGA; *T7-102Sl* R:  
45  
46 TAATACGACTCACTATAGGGAGGGAGTGCTGCTTCAGAATCAT). The resulting PCR  
47  
48 product served in turn as template to synthesize dsRNAs (469 bp long), using the Ambion  
49  
50 MEGAscript® RNAi Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's  
51  
52 instructions.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 dsRNA preparations were quantified by measuring their absorbance at 260 nm with a  
2 Biophotometer (Eppendorf) and purity was evaluated by assessing 260/280 nm absorbance ratios.  
3  
4 Products were run on 1 % agarose gels to confirm their integrity.  
5  
6  
7  
8  
9

## 10 **2.6 Administration of dsRNA to *S. littoralis* larvae**

11 *S. littoralis* fourth instar larvae (first day) were anaesthetized by immersion in sterile water and 1 µl  
12 of 102 *Sl* dsRNA or GFP dsRNA (control) solution was poured into the lumen of the foregut by  
13 means of a Hamilton Microliter syringe (1701RNR 10µl, gauge 26s, length 55 mm, needle 3).  
14  
15 dsRNA treatments consisted of two oral administrations per day (every 12 hours), for 3 days (from  
16 fourth to fifth instar). dsRNA solutions at three different concentrations were used: 4.5, 45 and 450  
17 ng/µl. 12 hours after the last dsRNA administration, treated larvae were processed for quantitative  
18 RT-PCR analysis or injected with chromatographic beads. Immune-challenged larvae were subjected  
19 to the encapsulation assay (see below) or processed for quantitative RT-PCR analysis 12 hours after  
20 bead injection.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35 Intra-hemocoelic injections were performed on neck membrane of *S. littoralis* fourth instar larvae  
36 (last day), using a Hamilton Microliter syringe (1701RNR 10µl, gauge 26s, length 55 mm, needle  
37 2). 12 hours after the administration of a single dsRNA dose (450 ng in 1 µl volume), experimental  
38 larvae received an injection of chromatographic beads and were subjected to the encapsulation  
39 assay (see below) or processed, 12 hours after bead injection, for quantitative RT-PCR analysis.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

## 52 **2.7 Encapsulation assay**

53 CM Sepharose fast flow chromatography beads (Pharmacia), suspended in phosphate saline  
54 solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2), were injected  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 into *S. littoralis* larvae using a Hamilton Microliter syringe (702 RNR 25ul, gauge 22s, length 55  
2 mm, needle 3). After 24 hours, beads were recovered upon larval dissection and scored to evaluate  
3 their encapsulation rate, which was expressed with an index taking into account both the  
4 encapsulation degree of each recovered bead and the relative abundance of beads with a given  
5 encapsulation degree (Li *et al.*, 2007).  
6  
7  
8  
9  
10

## 11 **2.8 Western blot and immunolocalization analyses**

12 Hemocytes were lysed in SDS-PAGE sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10%  
13 glycerol, 0.1% bromophenol blue, 358 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). Western blot analysis was carried  
14 out as previously described, using a rabbit polyclonal antibody raised against the P102 protein of *H.*  
15 *virescens* (Falabella *et al.*, 2012).  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

27 Immunostaining of *S. littoralis* hemocytes with anti-P102 antibodies was performed as previously  
28 described (Falabella *et al.*, 2012), using as secondary antibodies goat anti-rabbit IgGs conjugated to  
29 BODIPY FL (Molecular Probes). Nuclei were stained by 30 min incubation in PBS containing 2  
30 mM TOTO-3 (Molecular Probes), followed by extensive washes in PBS. Stained hemocytes,  
31 mounted in Vectashield mounting medium (Vector Labs), were analysed by laser scanning confocal  
32 microscopy, using a Leica TCS SP2 AOBS microscope equipped with a HCX PL APO 63X/1.32-  
33 0.6 oil objective. Image cropping and adjustment were accomplished using Photoshop (Adobe).  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

## 48 **2.9 qRT-PCR**

49 qRT-PCR was carried out by using *102 Sl* gene-specific primers (*102SIRT F*:  
50 GGCGGTGTCGTCGTCGATTATG; *102SIRT R*: GAGCGAGGAAATGTTCAAT ), designed to  
51 detect a segment of the *102 Sl* mRNA external to the segment targeted by the dsRNAs. *S. littoralis*  
52  $\beta$ -actin gene (accession number Z46873) was used as endogenous control for RNA loading ( $\beta$ -  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 *actinRT F*: CCGTCTTCCCATCCATCGT; *β-actinRT R*: CCTTCTGACCCATACCAACCA). All  
2 primers were designed using Primer Express, version 1.0 software (Applied Biosystems). mRNA  
3 levels were measured by one-step qRT-PCR using the SYBR Green PCR Kit (Applied Biosystems,  
4 Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.  
5  
6

7  
8  
9 The amount of the target transcript relative to the endogenous control was determined using the  
10  $\Delta\Delta C_t$  method. For validation of the  $\Delta\Delta C_t$  method the difference between the  $C_t$  value of *I02 Sl* and  
11 the  $C_t$  value of *β-Actin* transcripts [ $\Delta C_t = C_{t(I02Sl)} - C_{t(\beta-Actin)}$ ] was plotted versus the log of ten-fold  
12 serial dilutions (5000, 500, 50, 5 and 0.5 ng) of the purified RNA samples. The plot of log total  
13 RNA input versus  $\Delta C_t$  displayed a slope less than 0.1 (Slope = 0.0154, R2 = 0.0776), indicating that  
14 the efficiencies of the two amplicons were approximately equal.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

## 27 **2.10 dsRNA uptake by midgut cells**

28 dsRNA was fluorescently labeled using the Silencer<sup>®</sup> siRNA labeling kit Cy<sup>TM</sup>3 (Ambion),  
29 following the manufacturer's procedure. Early fifth instar *S. littoralis* larvae were fed with 1  $\mu$ l  
30 Cy3-dsRNA (780 ng/ $\mu$ l in 0.5X PBS) or 1  $\mu$ l 0.5X PBS (control). After 1 h, midguts were isolated  
31 in PBS, cut longitudinally and processed for confocal microscopy analysis. Briefly, tissues were  
32 fixed 20 min with 4% paraformaldehyde in PBS and rinsed 3 times in PBS. To label the nuclei,  
33 midgut samples were incubated 20 min with Hoechst 33342 (5  $\mu$ g/ml in PBS) and rinsed 3 times  
34 with PBS. Finally the midguts were mounted in DABCO (Sigma)-Mowiol (Calbiochem), covered  
35 with coverslip and examined under a confocal laser scanning microscope TCS SPE UV (Leica  
36 Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) using an oil immersion objective 63X, NA 1.30, ACS  
37 APO (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). A 532 nm laser was used for excitation of  
38 Cy3-dsRNA (acquisition window: 550-650 nm) and for transillumination, and a 405 nm laser was  
39 used for excitation of Hoechst (acquisition window: 415-500 nm).  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 For each experimental condition, the fluorescence intensity (arbitrary units, a. u.) of at least 20  
2 optical sections in different regions of the midgut (fluorescence acquisitions were performed with  
3 the same settings, i.e. laser intensity, sampling, acquisition rate, pinhole and photomultimer  
4 settings) was calculated using the ImageJ freeware (Rasband, W.S., ImageJ; US National Institutes  
5 of Health, Bethesda, MD, <http://www.rsbl.info.nih.-gov/ij/>).  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

## 15 **2.11 Statistical analysis**

16 Normality of data was checked by using the Shapiro-Wilk test and the D'Agostino-Pearson test,  
17 while homoscedasticity was checked with Bartlett's test.  
18  
19  
20  
21  
22

23 One-Way ANOVA test and Tukey's posthoc test were used to compare *102 Sl* transcript levels in  
24 larval tissues. Encapsulation rates in larvae treated with *102 Sl* dsRNA or GFP dsRNA were  
25 compared using the Chi-square test. The non-parametric Mann-Whitney U test was employed to  
26 identify statistically significant differences in the abundance of the *102 Sl* transcript in larvae treated  
27 with dsRNAs. All data were analyzed using Prism software, v. 5.0c (GraphPad software; San  
28 Diego, California, USA).  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43

## 44 **3 Results**

### 45 **3.1 *Spodoptera littoralis* 102 (*102 Sl*) gene**

46 A truncated cDNA showing 92% sequence identity with the *H. virescens* *102* gene was retrieved  
47 from an EST library of *S. littoralis*; the full-length cDNA was obtained by 5' and 3' RACE, and  
48 hereafter denoted as *102 Sl* (accession number XXX). This cDNA encodes a predicted protein of  
49 349 aa (P102 *Sl*), with a putative signal peptide of 16 aa, that shows 92,8% sequence identity with  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 as remarkable sequence identity is also found in non-Noctuidae species, with rates ranging from  
2 81,4% (*Bombyx mori*) to 86,5% (*Papilio xuthus*). Actually, its similarity to a venom protein of  
3  
4 *Lonomia obliqua* (Lepidoptera, Saturniidae) larvae (83,6% sequence identity) (Veiga et al., 2005)  
5  
6 allows the inclusion of P102 *Sl* in the XendoU protein family (Renzi et al., 2006), to which belong  
7  
8 members having RNA binding and hydrolytic activities (Laneve et al., 2008).  
9

10  
11  
12 The expression profile in different host tissues assessed by qRT-PCR analysis indicated that *102 Sl*  
13 gene is highly transcribed in the hemocytes (Fig. 2) (One-Way ANOVA,  $F_{3,23}=31.37$ ;  
14  $p<0.0001$ ). Western blot analysis of proteins extracted from *S. littoralis* hemocytes, using the  
15 antibody generated against P102, identified a protein of about 40 kDa in size (Fig. 3 A), which  
16  
17 closely matches the expected size of the translation product of the full-length cDNA encoding P102  
18  
19 *Sl*. The immunostaining of hemocytes evidenced multiple, intensely labelled spots of large size  
20  
21 localized in the cytoplasm, similar to those reported for P102 of *H. virescens* (Falabella et al.,  
22  
23 2012), as well as more diffuse intranuclear signals (Fig. 3 B-D).  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

### 36 **3.2 Gene functional analysis**

37  
38  
39

40 P102 *Sl* shares many molecular features with P102, which appears to influence both encapsulation  
41  
42 and melanization of foreign intruders (Falabella et al., 2012). To assess if they are functional  
43  
44 equivalents and to gather more direct evidence on the role of this gene in the immune response, we  
45  
46 adopted a RNAi experimental approach and assessed the phenotypic changes associated with gene  
47  
48 silencing. The regular encapsulation and melanization of injected beads in control larvae that  
49  
50 received an oral injection of GFP dsRNA (Fig. 4 A) was not observed in the large majority of beads  
51  
52 recovered from experimental larvae orally treated with *102 Sl* dsRNA (Fig. 4 B). To have a  
53  
54 quantitative evaluation of the encapsulation response, we adopted an “encapsulation index”, which  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

is calculated on the basis of the number of beads coated by hemocytes and the degree of coating they show. For all doses considered, the encapsulation index was significantly lower in larvae that received an oral injection of *102 Sl* dsRNA, even though the encapsulation deficit induced by 4.5 ng dose was limited, compared to the dramatic adverse effect exerted by higher experimental doses (Fig. 4C), (4.5 ng  $\chi^2=5.608$ ,  $df=1$ ,  $p=0.0179$ ; 45 ng  $\chi^2=289.6$ ,  $df=1$ ,  $p<0.0001$ ; 450 ng  $\chi^2=292.9$ ,  $df=1$ ,  $p<0.0001$ ). These evident symptoms of immunosuppression were not observed when the highest experimental dose of dsRNA (450 ng/larva) was delivered through injection into the hemocoel. In these conditions nearly identical values of the encapsulation index, very close to 100%, were recorded from control and experimental larvae, at both 24 h and 48 h post-treatment (Fig. 4D).

To demonstrate that these changes in the immune response were associated with significant reduction of *102 Sl* transcript levels, we performed qRT-PCR experiments on whole larvae orally treated with dsRNA, both before and after immune challenge by bead injection. The target gene was significantly down-regulated in *102 Sl* dsRNA treated larvae, compared to controls, at all doses considered (Fig. 5A) (Mann-Whitney test, 4.5 ng dsRNA  $U=22.0$ ,  $n_1=10$ ,  $n_2=10$ ,  $p=0.0355$ ; 45 ng dsRNA  $U=9.0$ ,  $n_1=10$ ,  $n_2=10$ ,  $p=0.0011$ ; 450 ng dsRNA  $U=18.0$ ,  $n_1=10$ ,  $n_2=10$ ,  $p=0.0147$ ), and this difference was even more pronounced under immune challenge, when higher doses (45 and 450 ng) were applied (Fig. 5B) (Mann-Whitney test, 4.5 ng dsRNA  $U=44.0$ ,  $n_1=10$ ,  $n_2=10$ ,  $p=0.6764$ ; 45 ng dsRNA  $U=8.0$ ,  $n_1=10$ ,  $n_2=10$ ,  $p=0.0007$ ; 450 ng dsRNA  $U=2.0$ ,  $n_1=10$ ,  $n_2=10$ ,  $p<0.0001$ ). On the contrary, intra-hemocoelic injection of *102 Sl* dsRNA did not affect *102 Sl* transcript levels, as demonstrated by qRT-PCR experiments performed on whole larvae (Fig. 6). These data are consistent with the results of the encapsulation assay reported above.

### 3.3 dsRNA uptake by midgut cells and its haemocoelic spread

To demonstrate that *102 Sl* dsRNA is able to cross the gut barrier, we first monitored the entry of fluorescently labeled *102 Sl* dsRNA in midgut cells. One hour after ingestion of Cy3-dsRNA, a clear fluorescent signal was present in the cytoplasm of midgut cells of *S. littoralis* larvae (Fig. 7 A, B). The signal was more than 5 fold higher than in control midguts (Fig. 7 C, D) (Student's *t*-test:  $t=6.23$ ,  $df=41$ ,  $P<0.001$ ). These results clearly demonstrate that Cy3-dsRNA is able to permeate the apical membrane of midgut cells.

To assess the passage of dsRNA into the hemocoel, we measured the transcription rate of the *102 Sl* gene in the hemocytes and fat body, two tissues known to play important roles in the immune responses in many insects. The qRT-PCR analysis of RNA extracted from these tissues confirmed that the *102 Sl* gene is transcribed by far more intensely in the hemocytes, where it was significantly down-regulated following oral administration of *102 Sl* dsRNA (One-Way ANOVA,  $F_{3, 16}=14.55$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig. 8).

## 4 Discussion

The results reported in this study further corroborate and expand our recent experimental findings on the role of a XendoU protein (P102) in the modulation of the immune response by tobacco budworm larvae (Falabella et al., 2012). We have previously shown that the amyloid fibrils generated by P102 promote strictly localized polymerization of quinone precursors during capsule melanization. Moreover, reduced encapsulation of foreign objects coated by polyclonal antibodies raised against P102 provided indirect evidence that this protein is involved in the cellular immune reaction. Thus, functional studies on P102 and its homologues in related species may help unravelling the mechanisms that bridge and cross-modulate the humoral and cellular components of

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

the defence response in insects, only partially defined so far (Cerenius et al., 2010; Kan et al., 2008).

Here we have characterized a close homologue of the *I02* gene in the related noctuid moth *S. littoralis*. We identified in this latter species a gene encoding a protein that shows high sequence identity and structural similarity with P102 and shares with it high expression level in the hemocytes. The functional analysis of P102 *Sl*, which has been performed by RNAi gene silencing, provides direct evidence on its role in controlling the immune response. Indeed, the reported results clearly show that this protein is at the same time required for proper capsule formation and melanization, even though the details of the underlying molecular mechanism await to be elucidated. Since the experimental data gathered so far support similar functions for P102 from *H. virescens* and P102 *Sl*, we can reasonably reaffirm the speculation proposed for *H. virescens* (Falabella et al., 2012) and suggest that the activation of the proteolytic cascade controlling melanogenesis is in some way dependent on the interaction with the structural scaffold offered by the P102 amyloid layer. This would allow the toxic compounds generated during melanin synthesis to be kept strictly localized on the surface of the invader (Falabella et al. 2012; Nappi et al., 2009; Piao et al., 2005). This is a very important functional constraint, which might also be relevant for spatial restriction of cytokine signals mediating cellular communication during capsule formation. Indeed, the change of hemocyte behavior, from non-adhesive to adhesive, cannot be generalized, but cell activation and recruitment must occur only where required. If and how this involves the active molecular scaffold offered by amyloids generated by P102 proteins remains to be investigated. These studies will likely further substantiate the concept that the ordered protein aggregates known as amyloids can play important functional roles in living organisms and are not only associated with serious diseases (Fowler et al., 2007).

1 The results of our RNAi experiments, besides the important functional information provided, have  
2 interesting implications for dsRNA delivery in lepidoptera and its possible use for pest control. The  
3  
4 effective silencing of *102 Sl* gene by RNAi following oral intake of the *102 Sl* dsRNA, and, in  
5  
6 contrast, the complete failure of RNAi following hemocoelic injection, indicate that in this species  
7  
8 the delivery of dsRNAs along with food should be feasible, and opens new routes to potential  
9  
10 applications for pest control. The oral activity is not a novel finding, as effective RNAi mediated  
11  
12 gene silencing following oral administration of dsRNA has been reported in several insect species  
13  
14 (Yu et al., 2013; Huvenne and Smagghe, 2010). In particular, for the related species *Spodoptera*  
15  
16 *exigua*, the transient suppression of the  $\beta$ *Se1* ( $\beta$ 1 integrin subunit) gene was obtained in larvae fed  
17  
18 with cabbage pieces soaked in a dsRNA solution (Surakasi et al., 2011). Moreover, in the  
19  
20 diamondback moth, *Plutella xylostella*, the droplet feeding method was successfully used to  
21  
22 knockdown a cytochrome P450 gene (Bautista et al., 2009). These findings are further corroborated,  
23  
24 and reinforced from an applied perspective, by experimental data demonstrating that transgenic  
25  
26 plants expressing hairpin dsRNAs targeting insect genes show enhanced resistance to phytophagous  
27  
28 species, in different insect orders, including Lepidoptera (Baum et al., 2007; Mao et al., 2011;  
29  
30 Pitino et al., 2011; Zha et al., 2011; Xue et al., 2012).

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39 However, these positive results are counterbalanced by several failures (see for a review Yu et al.,  
40  
41 2013). The resulting inconsistency, when different species, or even developmental stages, are  
42  
43 considered, is also observed when alternative delivery methods are used, such as hemocoelic  
44  
45 injection, which appears to show a large variation of success in different species of lepidoptera  
46  
47 (Terenius et al., 2011). The total lack of efficacy of hemocoelic injections in provoking RNAi  
48  
49 observed in our study is, therefore, not surprising. This problem may be partly a consequence of  
50  
51 low persistence of dsRNA molecules in the hemolymph, due to degradation mediated by nucleases  
52  
53 (Garbutt et al., 2012). Indeed, the dynamic balance between degradation rates and uptake efficiency  
54  
55  
56  
57  
58  
59



1 of the absorbing tissues may influence the final success of RNAi mediated silencing of targeted  
2 genes. This is likely true also when dsRNA molecules are administered orally. In this case, it is  
3  
4 reasonable to speculate that, once internalized into gut cells, the dsRNA is transported into the  
5  
6 hemocoel where it can successfully reach the tissues expressing the target gene. In *C. elegans*,  
7  
8 where RNAi was first discovered, the transmembrane proteins SID-1 and SID-2 play important  
9  
10 roles in dsRNA uptake (Winston et al., 2002; McEvan et al., 2012), but the relevance of *sid-1* and  
11  
12 *sid-2* gene orthologs and/or endocytosis processes in insect RNAi is still debated. It is also currently  
13  
14 unclear if the silencing signal is amplified in insects, as it happens in *C. elegans* and plant RNAi  
15  
16 (Pak and Fire, 2007). The lack of consolidated knowledge in insects of both these aspects makes, at  
17  
18 the present, highly unpredictable the degree of success of RNAi methodologies used in functional  
19  
20 genomics studies or novel pest control strategies. To overcome these problems, it is mandatory to  
21  
22 understand how the RNAi molecular machinery works in insects, and the differences among the  
23  
24 different taxonomic entities, which appear to be quite puzzling and relevant (Price and Gatehouse,  
25  
26 2008; Huvenne and Smagghe, 2010; Xue et al., 2012; Yu et al., 2013). For *S. littoralis*, based on the  
27  
28 results we report here, we can conclude that midgut uptake and spread within the hemocoel of the  
29  
30 *102 Sl* dsRNA is possible, at least under the experimental conditions used in our study. Our method  
31  
32 of introducing dsRNA into the gut via a syringe appears to be particularly suitable for functional  
33  
34 studies, as this allows accurate control of the amount of dsRNA delivered. Nevertheless, the  
35  
36 feasible development of pest control technologies for *S. littoralis*, based on the oral uptake of  
37  
38 dsRNAs, will require additional work to define more realistic and efficient delivery methods.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49 The possibility of successfully targeting the *102 Sl* gene appears to be particularly interesting from  
50  
51 an applied point of view. Indeed, the immunosuppression resulting from its silencing could be used  
52  
53 as a strategy for strengthening the control activity by natural antagonists. The exploitation of  
54  
55 biological control agents is, in principle, a sustainable and highly desirable method of pest control .  
56  
57  
58  
59

1 However, effectiveness and host specificity of natural antagonists is remarkably conditioned by  
2 insect innate immunity. Therefore, the use of RNAi for reducing the immune competence of pest  
3 insects may enhance the impact of natural enemies, and may also improve the efficacy of  
4 commercial bionsecticides, which could be successfully applied at lower doses or on less sensitive  
5 target species/developmental stages.  
6  
7  
8  
9  
10

### 11 ***Acknowledgements***

12 This work was supported by the PON R&C 2007-2013 grant financed by the Italian Ministry of  
13 University and Research (MIUR) in cooperation with the European Funds for the Regional  
14 Development (FESR), project GenopomPro, coordinated by the Università di Napoli Federico II,  
15 Dipartimento di Agraria, and by the project Safe & Smart (Cluster Agroalimentare Nazionale -  
16 CTN01\_00230\_248064).  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

### 36 ***5 References***

37  
38  
39 Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G.R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck,  
40 G., Munyikwa, T., Pleau, M., Vaughn, T., Roberts, J., 2007. Control of coleopteran insect pests  
41 through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 1322-1326.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48 Bautista, M.A., Miyata, T., Miura, K., Tanaka, T., 2009. RNA interference-mediated knockdown of  
49 a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval  
50 resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 38-46.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 Beck, M.H. and Strand, M.R., 2007. A novel polydnavirus protein inhibits the insect prophenoloxidase activation pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 19267-19272.

2  
3  
4  
5  
6  
7  
8 Cerenius, L., Kawabata, S., Lee, B.L., Nonaka, M., Söderhäll, K., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends in Biochemical Sciences, 35, 575-583.

9  
10  
11 Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends in Immunology, 29, 263-271.

12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezen, J.M., Poirié, M., 2009. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. Developmental and Comparative Immunology, 33, 681-689.

Eleftherianos, I., Boundy, S., Joyce, S.A., Aslam, S., Marshall, J.W., Cox, R.J., Simpson, T.J., Clarke, D.J., French-Constant, R.H., Reynolds, S.E., 2007. An anti-biotic produced by an insect-pathogenic bacterium suppresses host defences through phenoloxidase inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104, 2419-2424.

Falabella, P., Riviello, L., Pascale, M., Di Lelio, I., Tettamanti, G., Grimaldi, A., Iannone, C., Monti, M., Pucci, P., Tamburro, A.M., de Eguileor, M., Gigliotti, S., Pennacchio, F., 2012. Functional amyloids in insect immune response. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 42, 203-211.

Fowler, D.M., Koulov, A.V., Alory-Jost, C., Marks, M.S., Balch, W.E., Kelly, J.W., 2006. Functional amyloid formation within mammalian tissue. PLoS Biology, 4, 100-107.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E., Kelly, J.W., 2007. Functional amyloid e from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 32, 217-224.

Garbutt, J.S., Belle's, X., Richards, E.H., Reynolds, S.E., 2013. Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, 59, 171–178.

Huvenne, H., Smaghe, G., 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potentials of RNAi for pest control: a review. *Journal of Insect Physiology*, 56, 227-235.

Kan, H., Kim, C.H., Kwon, H.M., Park, J.W., Roh, K.B., Lee, H., Park, B.J., Zhang, R., Zhang, J., Söderhäll, K., Ha, N.C., Lee, B.L., 2008. Molecular control of phenoloxidase-induced melanin synthesis in an insect. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 25316-25323.

Kounatidis, I., Ligoxygakis, P., 2012. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biology*, 2(5), 120075.

Laneve, P., Gioia, U., Ragno, R., Altieri, F., Di Franco, C., Santini, T., Arceci, M., Bozzoni, I., Caffarelli, E., 2008. The tumor marker human placental protein 11 is an endoribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 34712-34719.

Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, 25, 697-743.

Li, Y., Jian-Feng, L., Feng, C., Ke, X., Fu, W., 2007. Role of venom and ovarian proteins in immune suppression of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae parasitized by *Macrocentrus cingulum* (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid. *Insect Science*, 14, 93-100.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Lu, Z., Beck, M.H., Wang, Y., Jiang, H., Strand, M.R., 2008. The viral protein Egf1.0 is a dual activity inhibitor of prophenoloxidase-activating proteinases 1 and 3 from *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 21325-21333.
- Mao, Y.B., Cai, W.J., Wang, J.W., Hong, G.J., Tao, X.Y., Wang, L.J., Huang, Y.P., Chen, X.Y., 2007. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25, 1307-1313.
- Mao, Y.B., Tao, X.Y., Xue, X.Y., Wang, L.J., Chen, X.Y., 2011. Cotton plants expressing *CYP6AE14* double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. *Transgenic Research*, 20, 665–673.
- McEvan, D.L., Weisman, A.S., Hunter, C.P.. 2012. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. *Mol. Cell*, 47, 746–754.
- Nappi, A., Poirié, M., Carton, Y., 2009. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Advances in Parasitology*, 70, 99-121.
- Nappi, A.J., Christensen, B.M., 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 443-459.
- Pak, J., Fire, A., 2007. Distinct populations of primary and secondary effectors during RNAi in *C. elegans*. *Science*, 315, 241–244.
- Pennacchio, F. & Strand, M.R., 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 51, 233-258.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Piao, S., Song, Y.L., Kim, J.H., Park, S.J., Park, J.W., Lee, B.L., Oh, B.H., Ha, N.C., 2005. Crystal structure of a clip domain serine protease and functional roles of the clip domains. *EMBO Journal*, 24, 4404-4414.
- Pitino, M., Coleman, A.D., Maffei, M.E., Ridout, C.J., Hogenhout, S.A., 2011. Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS ONE*, 6, e25709. doi:10.1371/journal.pone.0025709.
- Price, D.R.G., Gatehouse, J.A., 2008. RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology*, 26, 393-400.
- Renzi, F., Caffarelli, E., Laneve, P., Bozzoni, I., Brunori, M., Vallone, B., 2006. The structure of the endoribonuclease XendoU: from small nucleolar RNA processing to severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 12365-12370.
- Strand, M.R., 2012. Polydnavirus gene expression profiling: what we know now. In: Beckage Nancy. *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens*. p. 139-147, Elsevier, ISBN: 9780123848581, doi: 10.1016/B978-0-12-384858-1.00022-9.
- Surakasi, V.P., Mohamed, A.A., Kim, Y., 2011. RNA interference of  $\beta$ 1 integrin subunit impairs development and immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 57 (11), 1537-1544.
- Terenius, O., Papanicolaou, A., Garbutt, J.S., Eleftherianos, I., Huvenne, H., Kanginakudru, S., Albrechtsen, M.A.C., Aymeric, J.-L., Barthel, A., Bebas, P., Bitra, K., *et al.*, 2011. RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 57, 231-245.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Turner, C.T., Davy, M.W., MacDiarmid, R.M., Plummer, K.M., Birch, N.P. and Newcomb, R.D., 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15, 383-391.

Veiga, A.B., Ribeiro, J.M., Guimarães, J.A., Francischetti, I.M., 2005. A catalog for the transcripts from the venomous structures of the caterpillar *Lonomia obliqua*: identification of the proteins potentially involved in the coagulation disorder and hemorrhagic syndrome. *Gene* 355: 11-27.

Winston, W.M. , Molodowitch, C., Hunter, C.P., 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 295, 2456–2459.

Xue-Yi Xue, Ying-Bo Mao, Xiao-Yuan Tao, Yong-Ping Huang and Xiao-Ya Chen, 2012. New approaches to agricultural insect pest control based on RNA interference. In: *Advances in Insect Physiology*, 42, 73-117.

Yu, N., Christiaens, O., Liu, J., Niu, J., Cappelle, K., Caccia, S., Huvenne, H., Smagghe, G., 2013. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions. *Insect Science*, 20, 4-14.

Zha, W., Peng, X., Chen, R., Du, B., Zhu, L., He, G., 2011. Knockdown of Midgut Genes by dsRNA-Transgenic Plant-Mediated RNA Interference in the Hemipteran Insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS ONE*, 6(5), e20504. doi:10.1371/journal.pone.0020504.

## Figure captions

### Fig. 1. Predicted secondary structure and sequence conservation of *S. littoralis* P102.

Secondary structure prediction of *S. littoralis* P102 was carried out with the EMBOSS: Garnier algorithm; the InterProScan tool identified a potential signal-peptide and a XendoU protein domain (A). Alignment of *S. littoralis*, *H. virescens* (gb/CBY85302.1), *L. obliqua* (gb/AAV91433.1), *Papilio xuthus* (gb/BAM17994.1), *Danaus plexippus* (gb/EHJ66341.1) and *Bombyx mori* (gb/XP\_004930143.1) protein sequences was performed using the ClustalW algorithm; black and grey shading indicates identity and high conservation of amino acids, respectively (B). All bioinformatic analyses were performed using Geneious v6.1.6 (Biomatters, available from [www.geneious.com](http://www.geneious.com)).

**Fig. 2. 102 *Sl* transcript levels in larval tissues.** 102 *Sl* gene expression was significantly higher in the hemocytes compared with the other tissues analyzed. Error bars indicate standard deviation; statistically significant differences are denoted with different letters ( $P < 0.05$ ).

**Fig. 3. 102 *Sl* protein expression in larval hemocytes.** A single product of the expected size was identified in protein extracts from *Spodoptera littoralis* larval hemocytes by western blot analyses, using the anti-P102 antiserum (A). Intracellular localization of P102 (green) around the nuclei (red) of hemocytes of *S. littoralis* larvae (B, C, D) demonstrated that P102 *Sl* is enriched in well delimited cytoplasmic spaces. Bars: 48  $\mu\text{m}$  in B-D and 6  $\mu\text{m}$  in the insets showing magnified images of a single hemocyte.



1  
2 **Fig. 4. Encapsulation assay in *S. littoralis* larvae treated with *102 Sl* dsRNA.** Chromatography  
3 beads injected into *S. littoralis* control larvae were encapsulated and totally melanized (A), while  
4 beads injected into larvae treated with *102 Sl* dsRNA were not encapsulated (B). Bars: 150  $\mu$ m.  
5  
6

7  
8 The encapsulation index was significantly reduced in *102 Sl* dsRNA treated larvae compared with  
9 controls, when dsRNAs were orally delivered (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$  (C), while haemocoelic  
10 microinjection did not induce any change in the immune response (D). Error bars indicate standard  
11 deviation.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

22 **Fig. 5. *102 Sl* transcript levels in *S. littoralis* larvae orally treated with dsRNAs.** The *102 Sl*  
23 gene was down-regulated to a various extent by *102 Sl* dsRNA treatment, both in absence of  
24 immune challenge (A) and in experimental larvae subjected to immune challenge after dsRNA  
25 administration (B). Error bars indicate standard deviation; asterisks denote statistically significant  
26 differences (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.0001$ ).  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

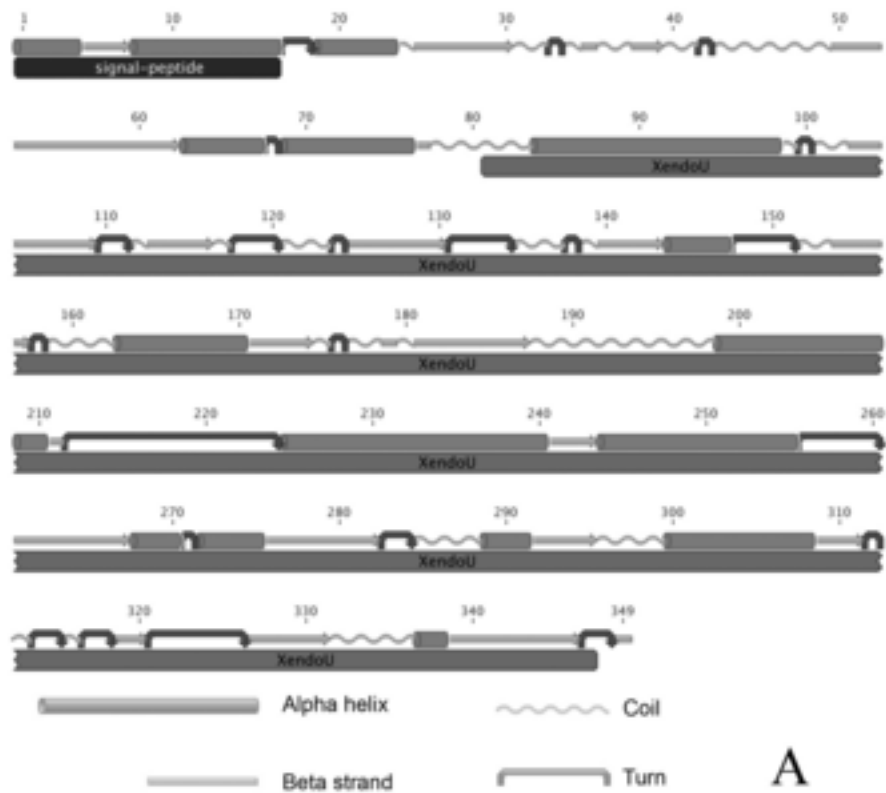
38 **Fig. 6. *102 Sl* transcript levels in *S. littoralis* larvae treated with dsRNA by intra-hemocoelic**  
39 **injection.** *102 Sl* gene expression was not affected when the *102 Sl* dsRNA was delivered into the  
40 hemocoel by means of a microsyringe. Error bars indicate standard deviation.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50 **Fig. 7. dsRNA localization in midgut cells of *S. littoralis* larvae.** Brightfield (A, C) and confocal  
51 laser-scanning micrographs (single optical sections) (B, D) of whole-mount midguts of larvae fed  
52 with Cy3-*102 Sl* dsRNA solubilized in PBS (green) (A, B) or with PBS (C, D). Nuclei were stained  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59

with Hoeschst (blue). Bars: 20  $\mu\text{m}$ . The inset in B shows a magnified view (6X, bar: 3  $\mu\text{m}$ ) of the area indicated by the arrow.

**Fig. 8. *102 Sl* transcript levels in hemocoelic tissues of larvae treated with dsRNAs.** Significant down-regulation of the *102 Sl* gene was observed in hemocytes, but not in fat body, where *102 Sl* gene expression was low. Error bars indicate standard deviation; different letters indicate significant differences ( $P < 0.0001$ ).

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

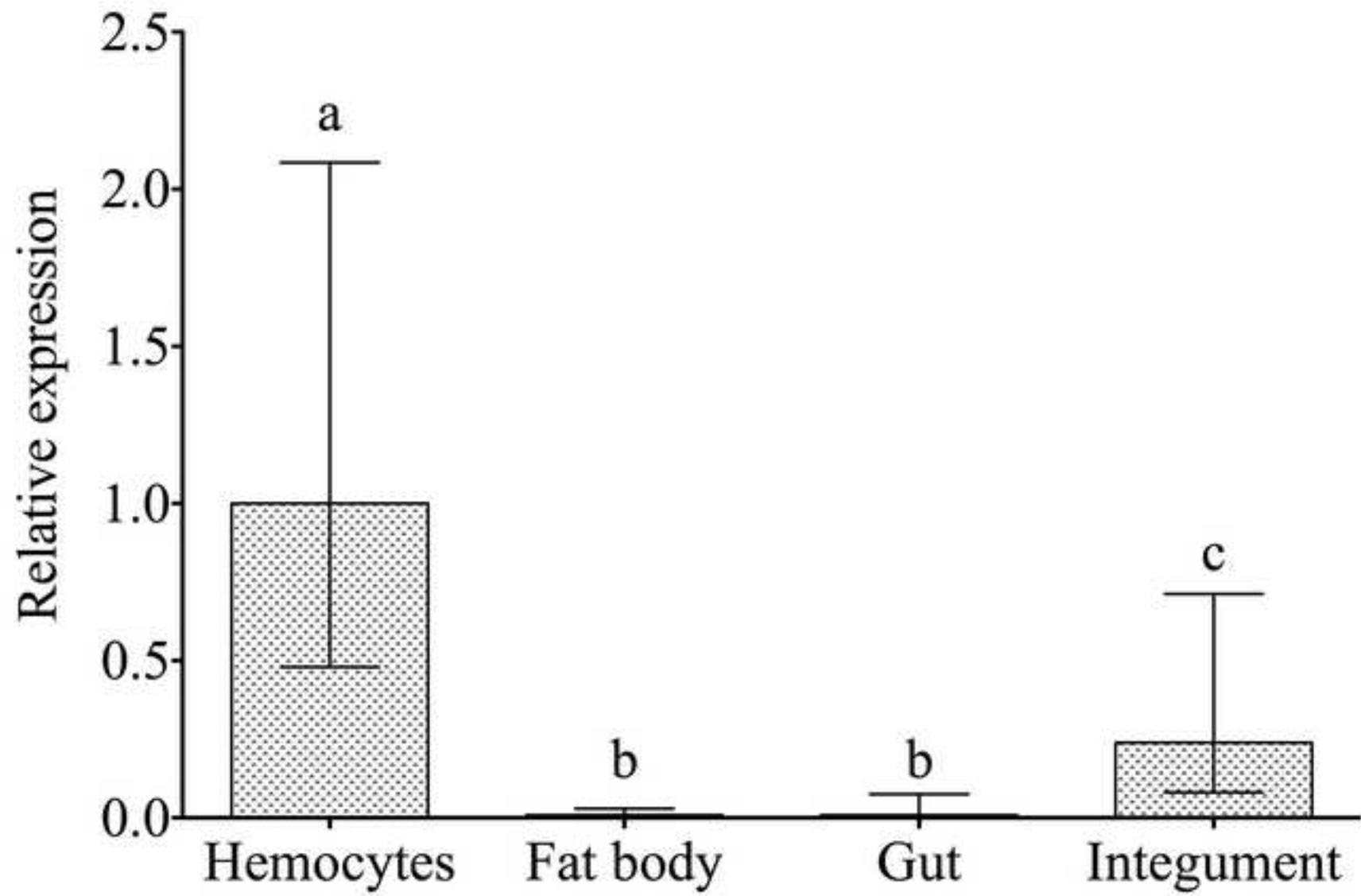


A

Species	Residue Range	Sequence
R_virescens	1-50	M L A L L L L G C E N Y C H A D D L A S A A A G Q I F R D I L P N L I S N S V T G Q Q G N T A N T E Q D I G T V V G G
S_littoralis	1-50	M I V L L L L V C L A K S H A D D F C D A A G Q I F R D I L P N L I S N S V T G Q Q G N T A N T E Q D I G T V V G G
L_obliqua	1-50	-----
P_xuthus	1-50	M V T L L L L L A A A G H A D D L A S A A A G Q I F R D I L P N L I S N S V T G Q Q G N T A N T E Q D I G T V V G G
D_plexippus	1-50	M L A L L L L F V V V S O A D D I A S A A G Q I F R D I L P N L I S N S V T G Q Q G N T A N T E Q D I G T V V G G
R_mori	1-50	M I T L I F V V V F G V C H A D D I S A A A G Q I F R D I L P N L I S N S V T G Q Q G N T A N T E Q D I G T V V G G
R_virescens	61-100	V V D Y A K K S Y E S L L R Q V D D S T T D D L L A V S E E M F N A D I N N A L A F E T S O V N L O G E T S P H S Y K S D
S_littoralis	61-100	V V D Y A K K S Y E S L L R Q V D D S T T D D L L A V S E E M F N A D I N N A L A F E T S O V N L O G E T S P H S Y K S D
L_obliqua	61-100	-----M L R Q V D D S T T D D L L A V S E E M F N A D I N N A F E T S O V N L O G E T S P H S Y K S D
P_xuthus	61-100	V V D Y A K K S Y E S L L R Q V D D S T T D D L L A V S E E M F N A D I N N A L A F E T S O V N L O G E T S P H S Y K S D
D_plexippus	61-100	V V D Y A K K S Y E S L L R Q V D D S T T D D L L A V S E E M F N A D I N N A F E T S O V N L O G E T S P H S Y K S D
R_mori	61-100	V V D Y A K K S Y E S L L R Q A D D S T T D D L L A V S E E M F N A D I N N A F E T S O V N L O G E T S P H S Y K S D
R_virescens	121-160	R P A N L L S P P E R V V H G P T I R F P A L F D R Y R K N V I R F E P V T P N E E T E Q V R F I N T I L A T C P F
S_littoralis	121-160	R P S N L L S P P E R V V H G P T I R F P A L F D R Y R K N V I R F E P V T P N E E T E Q V R F I N T I L A T C P F
L_obliqua	121-160	E A T S L L N V P E R V V H G P T I R F P A L F D R Y R K N V I R F E P V T P N E E T E Q V R F I N T I L A T C P F
P_xuthus	121-160	E A T S L L N V P E R V V H G P T I R F P A L F D R Y R K N V I R F E P V T P N E E T E Q V R F I N T I L A T C P F
D_plexippus	121-160	E A T S L L N V P E R V V H G P T I R F P A L F D R Y R K N V I R F E P V T P N E E T E Q V R F I N T I L A T C P F
R_mori	121-160	E A T S L L N V P E R V V H G P T I R F P A L F D R Y R K N V I R F E P V T P N E E T E Q V R F I N T I L A T C P F
R_virescens	181-220	R S L M S F L V S K C L T O M H E Y N S O V E L L E K I M F T K Y A R R M T G L C K C S C A F E N I P N A E L K S M D V
S_littoralis	181-220	R S L M S F L V S K C L T O M H E Y N S O V E L L E K I M F T K Y A R R M T G L C K C S C A F E N I P N A E L K S M D V
L_obliqua	181-220	R S L M S F L V S K C L T O M H E Y N S O V E L L E K I M F T K Y A R R M T G L C K C S C A F E N I P N A E L K S M D V
P_xuthus	181-220	R S L M S F L V S K C L T O M H E Y N S O V E L L E K I M F T K Y A R R M T G L C K C S C A F E N I P N A E L K S M D V
D_plexippus	181-220	R S L M S F L V S K C L T O M H E Y N S O V E L L E K I M F T K Y A R R M T G L C K C S C A F E N I P N A E L K S M D V
R_mori	181-220	R S I I T F L V S K C L T O M H E Y N S O V E L L E K I M F T K Y A R R M T G L C K C S C A F E N I P N A E L K S M D V
R_virescens	241-280	L G L R S W L F F A K R E D D K R A N Y L G Y I D K L D L S G K G I L K Q S V L S E T K D A P E S H F V G T S P E
S_littoralis	241-280	L G L R S W L F F A K R E D D K R A N Y L G Y I D K L D L S G K G I L K Q S V L S E T K D A P E S H F V G T S P E
L_obliqua	241-280	L G L R S W L F F A K R E D D K R A N Y L G Y I D K L D L S G K G I L K Q S V L S E T K D A P E S H F V G T S P E
P_xuthus	241-280	L G L R S W L F F A K R E D D K R A N Y L G Y I D K L D L S G K G I L K Q S V L S E T K D A P E S H F V G T S P E
D_plexippus	241-280	L G L R S W L F F A K R E D D K R A N Y L G Y I D K L D L S G K G I L K Q S V L S E T K D A P E S H F V G T S P E
R_mori	241-280	L G L R S W L F F A K R E D D K R A N Y L G Y I D K L D L S G K G I L K Q S V L S E T K D A P E S H F V G T S P E
R_virescens	301-340	L E V A L Y T L C F H A R F D R P C L A Y N N V A F P S Q T K T S E S D V L I I D T A Y P F E ---
S_littoralis	301-340	L E L S L Y T L C F H A R F D R P C L A Y N N V N F P S Q T K T S E S D V L I I D T A Y P F E ---
L_obliqua	301-340	L E S A L Y T L C F H A R F D R P C L A Y N N V A F P S Q T K T S E S D V A I P I D T A Y P L H E N S
P_xuthus	301-340	L E R A L Y T L C F H A R F D R P C L A Y N N V A F P S Q T K T S E S D V A E N S E I D T A Y P F E ---
D_plexippus	301-340	L E V A L Y T L C F H A R F D R P C L A Y N N I P F P S Q T K T S E S D V A E N L V V I D T A Y P V F ---
R_mori	301-340	L E R A L Y T L C F H A R F D R P C L A F N N I P F P S Q T K T S E S D V A E N L P V I D T A Y P T W ---

B

Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)



**Figure 3**  
[Click here to download high resolution image](#)

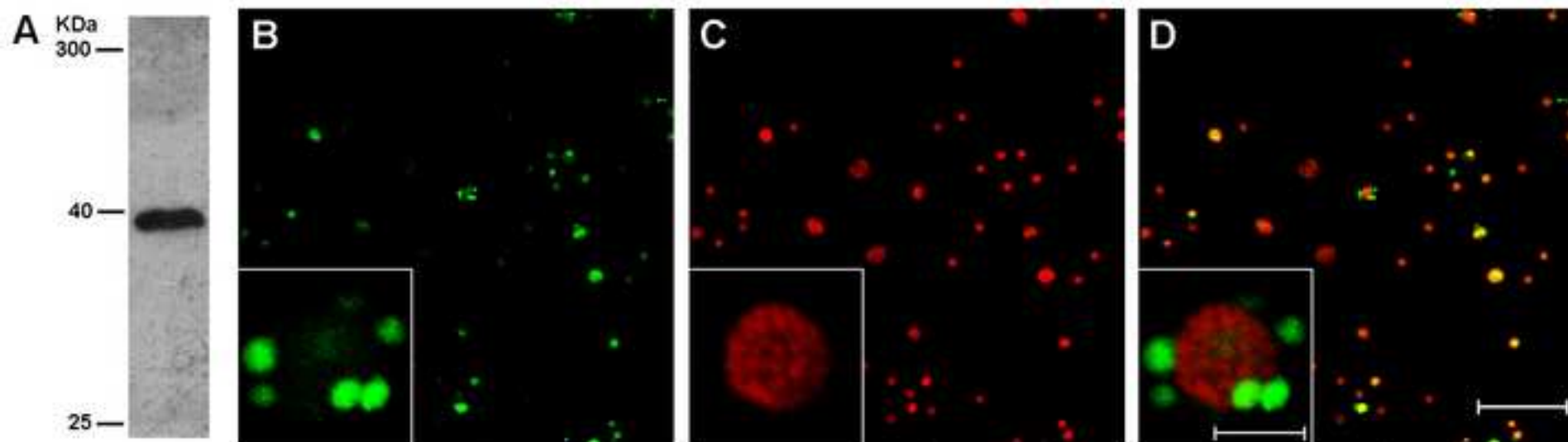


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)

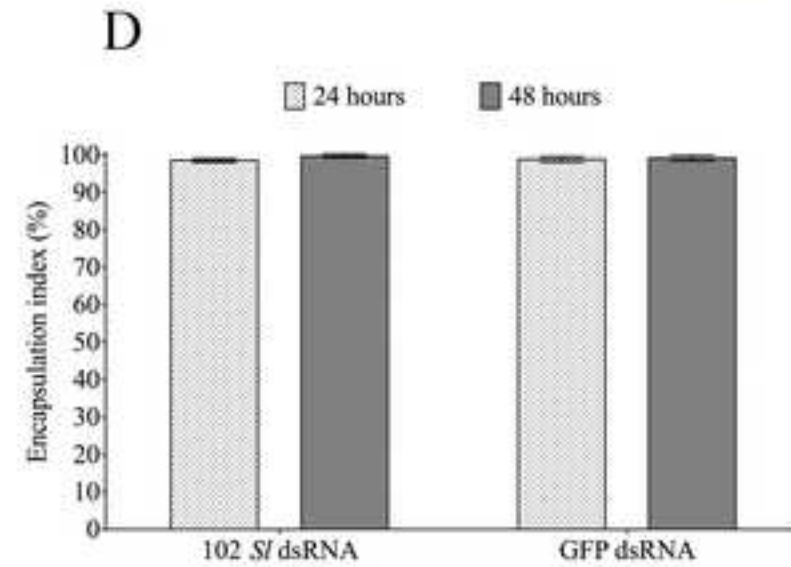
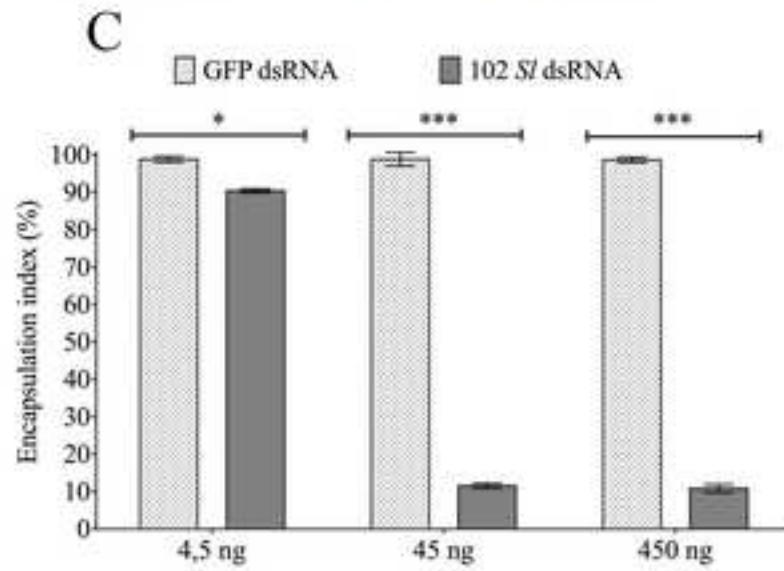
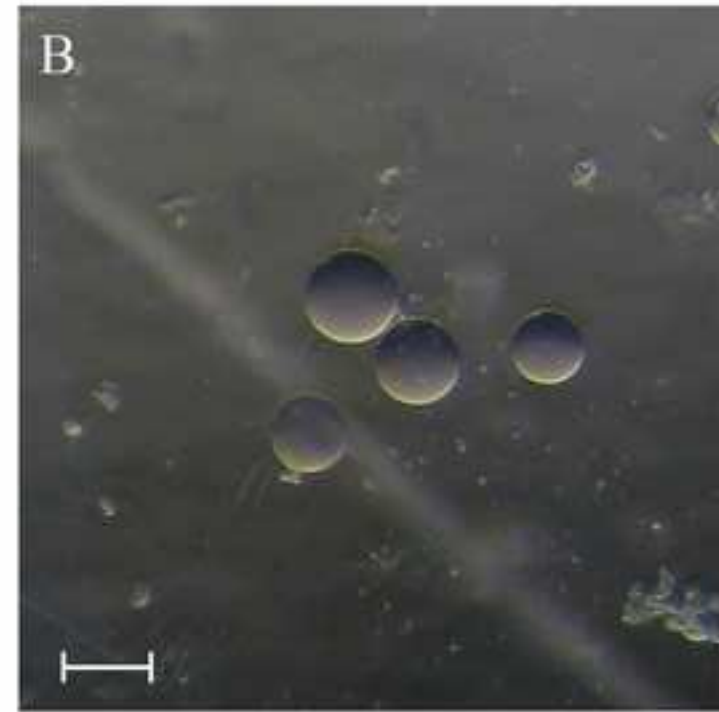
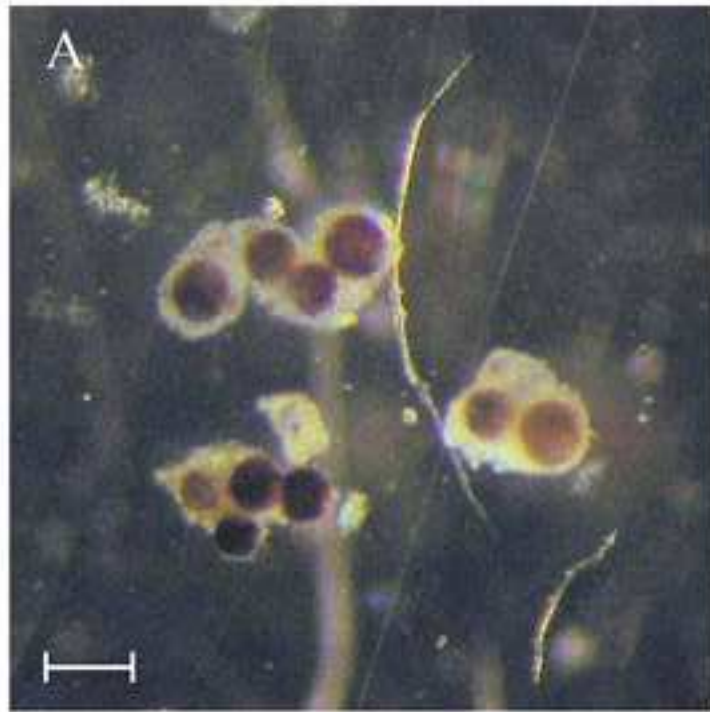


Figure 5  
[Click here to download high resolution image](#)

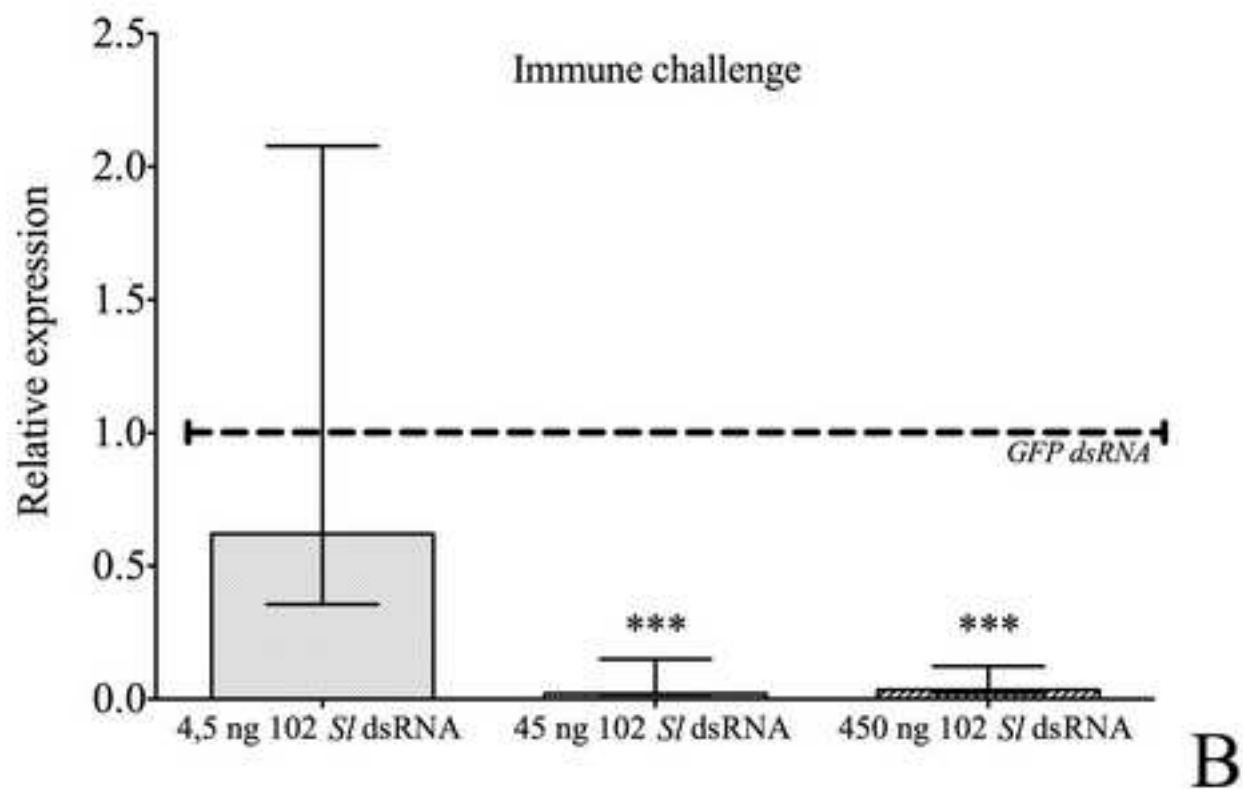
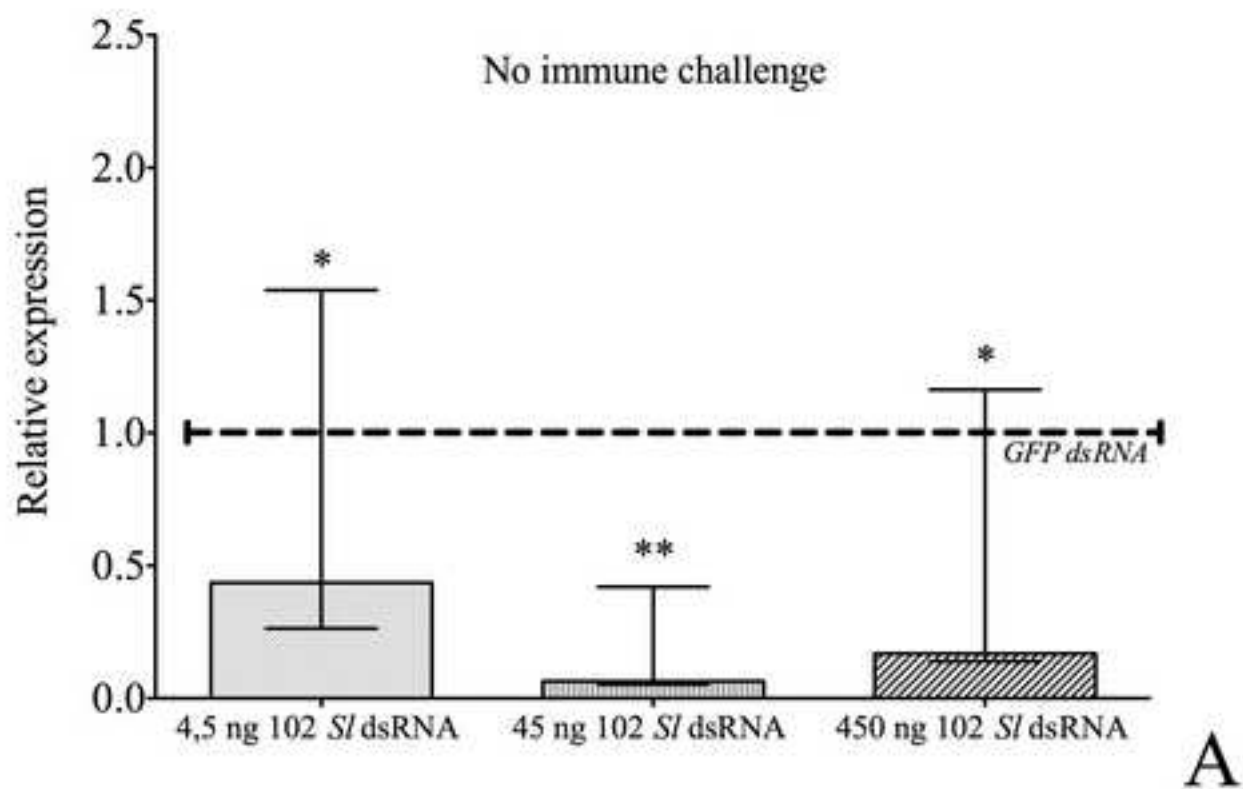


Figure 6  
[Click here to download high resolution image](#)

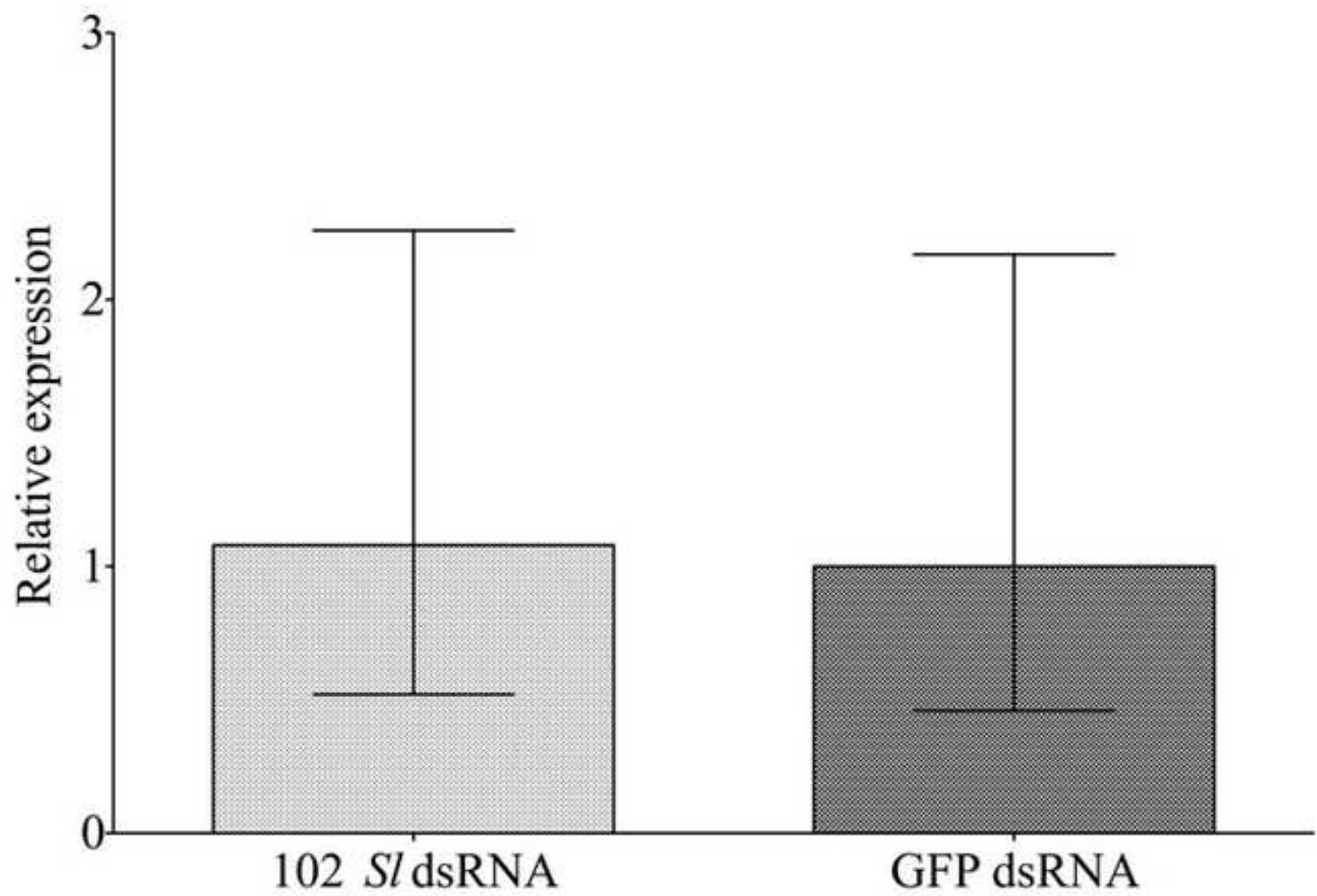




Figure 7  
[Click here to download high resolution image](#)

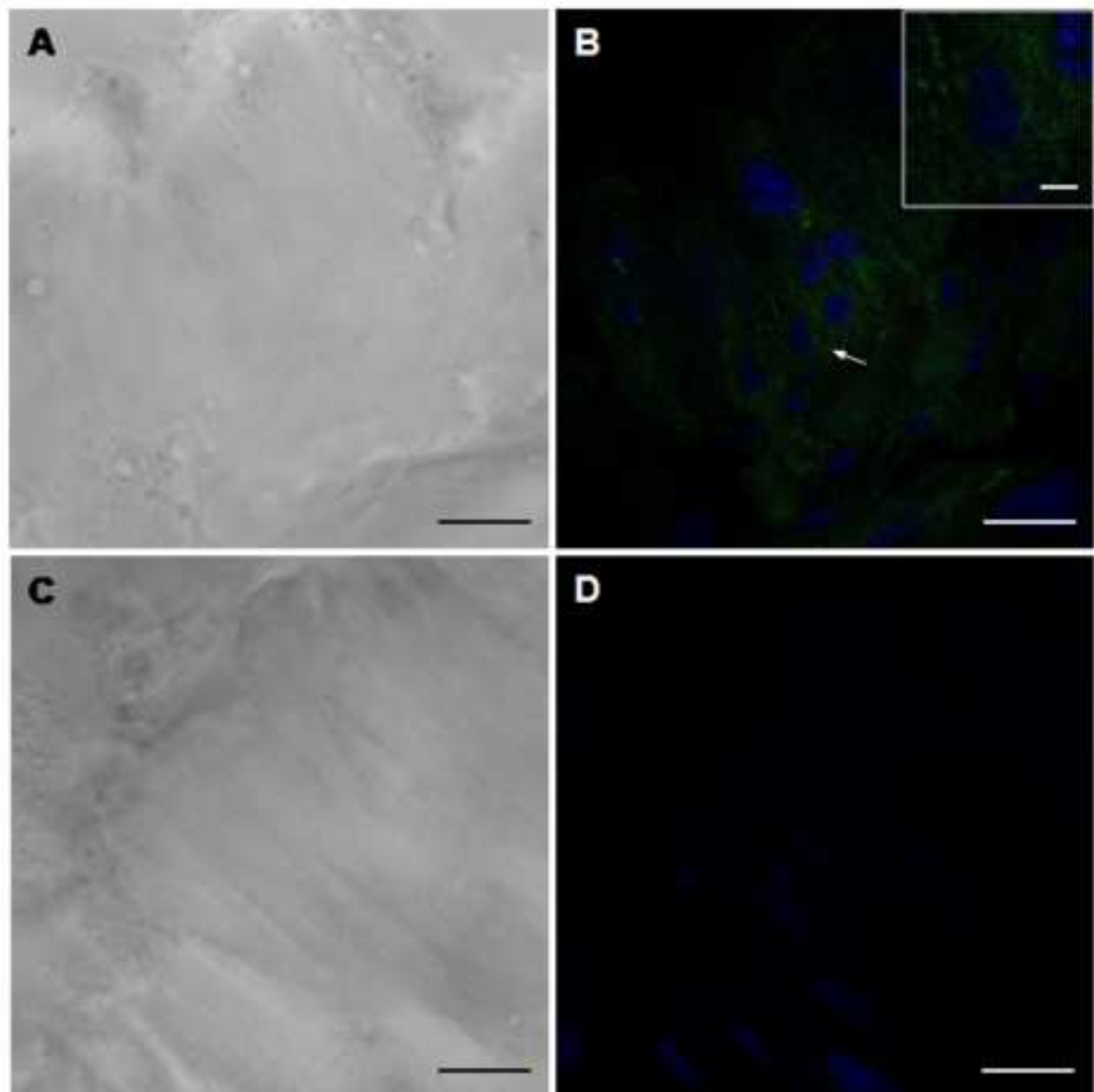


Figure 8  
[Click here to download high resolution image](#)

