

Differenti stress fisici provocano risposte biologiche diverse in *Drosophila melanogaster*

Antonella Friscini¹, Vincenzo Nassisi², Domenico Delle Side², Ernesto Giuffreda², Ettore De Giorgio¹, Sergio Pimpinelli³, Valeria Specchia¹, Maria Pia Bozzetti¹

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università del Salento, Lecce, Italy, maria.bozzetti@unisalento.it

² Dipartimento di Matematica e Fisica, Università del Salento, Lecce, Italy

³ Dipartimento di Biologia e Biotecnologia, Sapienza, Università di Roma, Roma, Italy

Abstract

Alcuni stress ambientali, come i cambi di temperatura, possono interferire con la fertilità e la vitalità degli organismi viventi. Noi abbiamo verificato gli effetti di differenti stress fisici sull'organismo modello *Drosophila melanogaster*. In particolare abbiamo analizzato il processo biologico di silenziamento genico delle sequenze ripetute e degli elementi genetici mobili, che sono coinvolti nella stabilità dei genomi (piRNA pathway) dopo aver sottoposto i moscerini a shock termico, a radiofrequenza di 900 MHz in modo continuo e impulsato, e ad un campo magnetico impulsato da 400 mT. Abbiamo verificato che differenti stress fisici possono indurre risposte biologiche diverse, alterando anche la struttura della cromatina dei cromosomi politenici.

Introduzione

In natura, cambi nelle condizioni ambientali possono interferire con determinati processi biologici di base ed avere serie ricadute sulla fertilità e sulla vitalità degli organismi viventi. A seguito di questi cambiamenti gli organismi vanno incontro ad adattamenti fisiologici per rispondere alle diverse condizioni ambientali. Alcuni tipi di stress possono avere anche effetti deleteri, che a tutt'oggi, non sono ancora completamente chiari. Nel lavoro, qui presentato, noi analizziamo gli effetti di differenti tipi di stress fisici come lo shock

termico, radiofrequenza (900 MHz in modo continuo e impulsato) e campi magnetici impulsati sul moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*. E' stato dimostrato che differenti tipi di stress possono interferire con la stabilità dei genomi e con la fertilità in *Drosophila* e in Mammiferi, attraverso il movimento di elementi trasponibili (Vasilyeva et al., 1999; Specchia et al., 2010; Casacuberta et al., 2013; Piacentini et al. 2014).

Noi abbiamo testato gli effetti dei diversi stress fisici su descritti, sia sul silenziamento genico mediato dai piccoli RNA denominati piRNA (Piwi-RNA o piRNA) di sequenze ripetute e trasposoni nelle gonadi dei moscerini, sia sulle modificazioni della cromatina dei cromosomi politenici. A seguito di un cattivo funzionamento del pathway regolativo mediato dai piRNA (piRNA pathway), le gonadi di entrambi i sessi mostrano l'attivazione di differenti classi di elementi trasponibili, che sono la causa principale della instabilità genomica e di vari gradi di sterilità (Li et al. 2009, Nagao et al. 2010). Oltre a regolare i trasposoni, il piRNA pathway ha un ruolo nel silenziamento delle sequenze ripetute *Stellate* regolate da piRNA prodotti dal locus *crystal* e, se il piRNA pathway non funziona correttamente negli spermatociti dei maschi sono presenti degli aggregati cristallini a forma di ago o di stella, costituiti dalla proteina di *Stellate* (Bozzetti et al. 1995). Il sistema *crystal-Stellate* fornisce quindi un semplice sistema genetico di "sorveglianza" sul piRNA pathway nelle gonadi maschili. Con l'utilizzo di questo sistema il nostro gruppo ha identificato molti "modificatori" dell'interazione tra *crystal* e *Stellate*, che hanno un ruolo nel piRNA pathway (Schmidt et al. 1999, Aravin et al. 2001, Aravin et al. 2003, Vagin et al. 2006, Specchia et al. 2008, Specchia et al. 2010, Bozzetti et al. 2012, Piacentini et al. 2014). Uno dei geni più interessanti che abbiamo identificato è *hsp83*, un gene che viene attivato dallo shock di temperatura e che rappresenta un collegamento tra lo stress ed il piRNA pathway (Specchia et al. 2010).

In questo articolo, noi presentiamo i risultati relativi agli effetti di diversi stress fisici sul piRNA pathway, in particolare sulla regolazione del sistema *crystal-Stellate* nelle gonadi maschili, sull'attivazione degli elementi trasponibili nelle gonadi maschili e femminili. Riportiamo inoltre gli effetti di un campo magnetico impulsato da 400 mT, sulla struttura della cromatina dei cromosomi differenti tipi di stress.

Materiali e metodi

Gli individui di *Drosophila* sono cresciuti a 25 °C, su un mezzo di coltura costituito da polenta di composizione standard (per un litro di coltura: zucchero 110 gr, farina di mais 100gr, agar 8gr, lievito 100 gr, nipagina 3 gr sciolta in 16 ml di etanolo assoluto).

Stress termico

I barattoli contenenti 200 maschi e 40 femmine, appena sfarfallati, del ceppo selvatico *Oregon-R*, sono tenuti per 1 ora a 37 °C e subito spostati a 4 °C per 1 ora; questo trattamento viene ripetuto per 3 volte. Dopo lo shock, gli individui sono tenuti a 25 °C per 20 min (Heavy Heat Shock, Vasilyeva et al. 1999), e poi analizzati per la presenza dei cristalli e per l'attivazione degli elementi trasponibili.

Stress con Radiofrequenza a 900 MHz

Il generatore di radiofrequenza (RF) è un RHODE&SCHWARZ SM300, la sua frequenza massima è di 3 GHz e la potenza di uscita è di 20 mW. Due barattoli contenenti i moscerini sono stati sottoposti all'azione della RF a 900 MHz per 5 giorni consecutivi, attraverso una linea di trasmissione *ad hoc*, alla temperatura di 20°C e umidità costante. Altri due barattoli sono stati tenuti alle stesse condizioni di temperatura ed umidità senza l'azione della RF ed usati come controllo. L'applicazione della radiofrequenza è stata operata in modo continuo ed impulsato, con impulsi della durata di 500 ms e con frequenza di ripetizione di 1 Hz e successivamente analizzati.

Stress con Campo Magnetico

Nel Laboratorio del prof. Vincenzo Nassisi è stata messa a punto una macchina in grado di generare un campo magnetico impulsato. Essa è composta da un generatore di alta tensione, un condensatore da alto voltaggio per immagazzinare la carica necessaria a generare un rapido impulso di alta corrente, una "spark-gap" per chiudere velocemente il

circuito di scarica su un solenoide entro il quale si genera il campo magnetico e un toro di Rogowski per diagnosticare la corrente di scarica (Nassisi et al. 1979). Larve al III stadio di *Drosophila melanogaster* sono state sottoposte all'azione del campo magnetico impulsato per 2 ore e 30 min. Si è posizionato il solenoide in posizione verticale e si è inserito un supporto cilindrico in PVC di 5 cm di altezza. In questo modo, il contenitore con le larve risulta posizionato nel centro del solenoide dove il campo magnetico è più alto. Attraverso un "trigger" (un generatore di impulsi di corrente) esterno collegato alla "spark-gap", si è fatto in modo che l'impulsatore fornisca la corrente necessaria con una frequenza di 1 Hz per tutta la durata dell'esperimento.

Estrazione di RNA totale da gonadi di *Drosophila* e sintesi della prima strand di cDNA

I testicoli e gli ovari, sia degli individui controllo che degli individui sottoposti ai vari tipi di stress, sono stati dissezionati in soluzione Ringer (NaCl 47 mM, KCl 183 mM, Tris-HCl 10 mM pH 6,8). Per l'estrazione sono stati utilizzati 30 mg di tessuto (che corrispondono a circa 70 coppie di testicoli e circa 40 coppie di ovari). Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il Kit RNAqueous-4PCR della ditta Ambion. Dopo trattamento con DNasi I, la sintesi della prima strand di cDNA è stata effettuata utilizzando il Kit SuperScript first-strand synthesis system (Invitrogen).

Immunofluorescenza su spermatociti

I testicoli sono dissezionati in una soluzione di Ringer (182 mM KCl, 46 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) e immediatamente visualizzati ad un microscopio a contrasto di fase Zeiss. I testicoli sono poi fissati con metanolo, lavati con PBST (PBS+1% Triton X-100+0.5% acido acetico) per 15 min. A questo primo lavaggio, segue un secondo lavaggio di 15 min con PBS

1X per 5 min e successivamente incubati per tutta la notte a 4 °C, con l'anticorpo primario policlonale anti-Stellate diluito 1:50, ottenuto nel nostro laboratorio. I testicoli sono poi lavati con PBST ed incubati con un anticorpo secondario anti-mouse coniugato con FITC (1:100, Jackson, Immunoresearch), per 2 ore a temperatura ambiente, al buio in camera umida. I testicoli sono poi lavati e colorati con il DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato) ad una concentrazione di 100 µg/ml), come descritto in Bozzetti et al. 1995. Si procede infine al montaggio dei vetrini con una goccia di ANTIFADE che consente l'adesione del coprioggetto e impedisce la disidratazione del campione. I vetrini così preparati possono essere osservati al microscopio a fluorescenza Optiphot-2 della NIKON®. Le immagini sono state acquisite tramite CCD camera CHOU collegata al microscopio ed elaborate col programma PHOTOSHOP®.

Soluzioni:

PBS 10X (per 1 litro):

- 80 gr NaCl;
- 2 gr KCl;
- 11,5 gr Na₂HPO₄•2H₂O;
- 2 gr KH₂PO₄;

sciogliere in acqua distillata e autoclavare per 20 min alla pressione di 1 Atmosfera.

ANTIFADE (per 10 ml) :

- 0,223 g DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane);
- 800 µl H₂O;
- 200 µl 1M Tris-HCl pH 8.0;
- 9 ml glicerolo

Preparazione dei cromosomi politenici per l'immunofluorescenza

È stata utilizzata l'immunofluorescenza indiretta sui cromosomi politenici come descritto in Piacentini et al. 2003. Ghiandole salivari sono state dissezionate nella soluzione di Cohen e Gotchell (soluzione G) contenente 0,5% di Nonidet P-40 ed incubate in una soluzione di formaldeide per 25 min per il fissaggio. I preparati vengono incubati

con l'anticorpo monoclonale di topo, anti-HP1a C1A9, diluito 1:50 e tenuti overnight a 4 °C in camera umida. I vetrini sono in seguito lavati per 3 volte con TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.15, 150 mM NaCl and 0.05% Tween 20) ed incubati con l'anticorpo secondario anti-mouse coniugato con il fluorocromo Cy3, per 1 ora a temperatura ambiente in camera umida. I vetrini son poi lavati 3 volte con TBST a 4 °C e poi colorati con DAPI a 0,01 µg/ml, e montati con ANTIFADE.

Le immagini dei cromosomi sono state acquisite tramite CCD camera CHOU collegata ad un microscopio a fluorescenza Optiphot-2 della NIKON®, ed elaborate col programma PHOTOSHOP®.

Risultati

Stress e cristalli

Per valutare se alcuni stress fisici avessero degli effetti sulla regolazione del sistema *crystal-Stellate*, abbiamo analizzato i testicoli di individui sottoposti a: shock termico (come descritto nei Materiali e Metodi), radiofrequenza a 900 MHz continua e ed impulsata (come descritto in Materiali e Metodi e Nassisi et al. 2012) e ad un campo magnetico impulsato di intensità massima pari a 400 mT. In Figura 1, sono mostrati gli spermatozoi di moscerini sottoposti ai diversi stress fisici. È possibile vedere che, sia lo shock termico che la radiofrequenza continua e impulsata, determinano la comparsa di cristalli fatti dalla proteina di Stellate negli spermatozoi e quindi alterano la regolazione del sistema *crystal-Stellate* (Figura 1 A-C). Al contrario, sembra che l'effetto del campo magnetico non determini lo stesso tipo di risposta, infatti, negli spermatozoi di maschi sottoposti all'azione del campo magnetico, non sono evidenti i cristalli fatti dalla proteina di Stellate (Figura 1D).

Stress e attivazione dei trasposoni

Per valutare gli effetti degli stessi stress fisici descritti in precedenza, sul pathway che

regola il silenziamento degli elementi genetici mobili o elementi trasponibili nelle gonadi di entrambi i sessi, abbiamo determinato l'espressione dei trasposoni (sia germinali che somatici) nelle gonadi di individui sottoposti all'azione di vari tipi di stress, attraverso la "quantitative real time PCR" (qRT-PCR) che permette di verificare la variazione (incremento o riduzione) del trascritto di uno specifico gene rispetto al trascritto dello stesso gene in tessuti non sottoposti allo stress. Come risulta evidente dall'analisi della Tabella 1, le risposte ai diversi tipi di stress sull'attivazione dei trasposoni sono diverse. Si ha indubbiamente attivazione dei trasposoni sia germinali che somatici sia con lo shock termico, che con la radiofrequenza a 900 MHz continua, mentre gli effetti sui trasposoni, della radiofrequenza a 900 MHz impulsata sono evidenti nelle gonadi femminili, ma sono pressoché assenti nelle gonadi maschili. Gli effetti sull'espressione dei trasposoni, del campo magnetico impulsato da 400 mT, non sono stati analizzati, anche in considerazione del fatto che, a seguito di questo tipo di stress, i moscerini non avevano mostrato attivazione delle sequenze ripetute di Stellate, data l'assenza dei cristalli della proteina di Stellate, negli spermatozoi dei maschi sottoposti al campo magnetico.

Effetto del Campo Magnetico sui cromosomi politenici

È stato dimostrato che l'applicazione di un campo magnetico statico può indurre la formazione di specifiche regioni di decondensazione (puffs) in particolare in corrispondenza delle regioni codificanti per le proteine heat shock (Goodman et al. 1992a, Goodman et al. 1992b, Goodman and Blank 1998). Abbiamo voluto verificare se ci fossero effetti sulla condensazione dei cromosomi, a seguito dell'applicazione del campo magnetico impulsato da 400 mT. A questo scopo abbiamo sottoposto larve Oregon-R al III stadio, al campo magnetico ad impulsi

come descritto nei Materiali e Metodi, e abbiamo poi effettuato un esperimento di immunocolorazione dei cromosomi con il DAPI, un colorante fluorescente specifico per la cromatina e con un marcatore proteico specifico della cromatina: la proteina HP1. Questa proteina è presente sui cromosomi politenici sia nelle regioni eterocromatiche che in specifiche regioni eucromatiche (Piacentini et al. 2003, Piacentini et al. 2009). L'analisi dei cromosomi politenici riportata in Figura 2, mostra che i cromosomi delle larve sottoposte all'azione del campo magnetico impulsato mostrano dei cromosomi più decondensati rispetto al controllo (Figura 2 A-C) ed in particolare si può notare che la proteina HP1, che nel controllo colora intensamente il cromocentro (Figura 2 A-B), regione dove sono presenti le sequenze eterocromatiche, è meno localizzata in questa regione specifica dopo lo stress (Figura 2 C-D).

Conclusioni

E' noto che alcuni stress fisici determinino delle risposte biologiche che proteggono processi cellulari importanti ma potrebbero, allo stesso tempo, essere alla base di cambiamenti genomici. Gli effetti di alcuni tipi di stress fisici sono più noti di altri, anche se i meccanismi molecolari alla base di questi effetti non sono ancora completamente chiariti. Abbiamo voluto testare gli effetti di alcuni specifici stress fisici sul silenziamento genico mediato dai piRNA, delle sequenze ripetute e dei trasposoni, che è alla base della stabilità genomica. Gli stress fisici saggati in questo lavoro sono i seguenti: lo shock termico, la radiofrequenza a 900 MHz continua e impulsata ed un campo magnetico impulsato da 400 mT.

Abbiamo dimostrato che lo shock termico e le radiofrequenze inducono la formazione dei cristalli fatti dalla proteina di Stellate, che sono sintomatici di un cattivo funzionamento del piRNA pathway nelle gonadi maschili; il

campo magnetico impulsato non ha invece prodotto effetti in tal senso. Lo shock termico e la radiofrequenza, oltre alla presenza dei cristalli, determinano l'attivazione degli elementi trasponibili nelle gonadi di entrambi i sessi. L'aumentata espressione degli elementi trasponibili è un sintomo di un loro possibile movimento nel genoma delle cellule delle gonadi e, tale movimento potrebbe essere la causa di mutazioni "de novo" e quindi di una instabilità genomica.

Con l'applicazione del campo magnetico impulsato non abbiamo invece osservato questo tipo di effetto, abbiamo quindi voluto analizzare preliminarmente la struttura cromatinica dei cromosomi politenici di larve sottoposte a questo specifico stress. Abbiamo verificato una maggiore decondensazione dei cromosomi ed una minore concentrazione della proteina HP1 a livello del cromocentro, sede delle sequenze eterocromatiche. La proteina HP1 è un componente fondamentale della cromatina caratteristica del suo stato condensato eterocromatico, ma recentemente è stata anche associata a regioni attivamente trascritte dell'eucromatina (Piacentini et al. 2003, Piacentini et al. 2009). La decondensazione dei cromosomi politenici ed una diversa localizzazione della proteina HP1 nel cromocentro potrebbero essere un sintomo di una variazione nello stato trascrizionale della cromatina con possibili conseguenze sull'espressione genica.

L'aver riscontrato risposte diverse a seconda del tipo di stress ci induce ad approfondire questi studi per avere maggiori informazioni sui meccanismi molecolari alla base della stabilità genomica e delle risposte a vari tipi di stress.

Referenze

Aravin AA, Lagos-Quintana M, Yalcin A, Zavolan M, Marks D, et al., *Dev Cell* (2003) 5:

337-350

Aravin AA, Naumova NM, Tulin AV, Vagin VV, Rozovsky YM, et al., *Curr. Biol.* (2001) 11:1017-1027

Bozzetti MP, Fanti L, Di Tommaso S, Piacentini L, Berloco M, et al., *Genet Res Int.* (2012) 324293

Bozzetti MP, Massari S, Finelli P, Meggio F, Pinna LA, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92:6067-6071

Casacuberta E, González J., *Mol Ecol.* (2013) 22:1503-1517

Goodman R, Weisbrot D, Uluc A, Henderson A., (a) *Bioelectromagnetics* (1992) 13:111-118

Goodman R, Weisbrot D, Uluc A, Henderson A., (b) *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* (1992) 28: 311-318

Goodman R, Blank M., *Cell Stress Chaperones* (1998) 3:79-88

Li C, Vagin VV, Lee S, Xu J, Ma S, et al., *Cell* (2009) 137:509-521

Nagao A, Mituyama T, Huang H, Chen D, Siomi MC, et al., *RNA* (2010) 16:2503-2515

Nassisi V., Alifano P., Talà A., Velardi L., *J Appl Phys* (2012) 112: 014702

Piacentini L, Fanti L, Berloco M, Perrini B, Pimpinelli S., *J Cell Biol.* (2003) 161:707-714

Piacentini L, Fanti L, Negri R, Del Vescovo V, Fatica A, et al., *PLoS Genet.* (2009) 5(e1000670)

Piacentini L, Fanti L, Specchia V, Bozzetti MP, Berloco M, et al., *Chromosoma* (2014) 123:345-354

Schmidt A, Palumbo G, Bozzetti MP, Tritto P, Pimpinelli S, et al., *Genetics* (1999) 151:749-760

Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, et al., *Nature* (2010) 463: 662-665

Specchia V, Benna C, Mazzotta GM, Piccin A, Zordan MA, et al., *Genetics* (2008) 178:1271-1282

Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD., *Science* (2006) 313:320-324

Vasilyeva LA, Bubenshchikova EV, Ratner VA., *Genet Res.* (1999) 74:111-9

Legenda delle Figure

Figura 1- Spermatoцитi di maschi colorati con l'anticorpo anti-Stellate, sottoposti all'azione di vari tipi di stress: A) Heat shock, B) radiofrequenze costanti a 900 MHz, C) radiofrequenze ad impulsi a 900 MHz, D) Campo magnetico impulsato da 400 mT. A) e C) ingrandimento 20X, B) e D) ingrandimento 40X

Figura 2- Immunofluorescenza di cromosomi politenici di larve al III stadio di: A) larve controllo colorate con DAPI; B) larve controllo colorate con anti-HP1; C) larve sottoposte a campo magnetico impulsato colorate con DAPI; D) larve sottoposte a campo magnetico impulsato colorate con anti-HP1. Le frecce bianche indicano il cromocentro.