

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOSCIENZE
INDIRIZZO: GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO
CICLO XXII

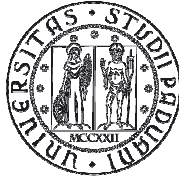
**L'orologio circadiano di *Drosophila melanogaster* in
condizioni naturali e in regimi artificiali perturbati**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Paolo Bonaldo

Supervisore: Ch.mo Prof. Rodolfo Costa

Dottorando: Stefano Montelli



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: BIOSCIENZE
INDIRIZZO: GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO
CICLO XXII

L'orologio circadiano di *Drosophila melanogaster* in condizioni naturali e in regimi artificiali perturbati

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Paolo Bonaldo

Supervisore: Ch.mo Prof. Rodolfo Costa

Dottorando: Stefano Montelli

Defining the circadian clock of *Drosophila melanogaster* in natural and shift-work regimes

The *Drosophila* clock is based on a system of interconnected feedback loops where some positive elements (the proteins CLOCK (CLK) and CYCLE (CYC)) induce the synthesis of the negative elements (the proteins PERIOD (PER) and TIMELESS (TIM)) which in turn inhibit the action of the positive ones in a 24 hour cycle (Zordan *et al.*, 2003). These loops are controlled by post transcriptional and translational regulation. The clock is mostly reset by external stimuli, like light and temperature (*Zeitgeber*) (Lin *et al* 2001; Dunlap, 1999). Different *per* and *tim* transcripts have been reported to be regulated by temperature. For *per* a thermal sensitive splicing of 89 bases in the 3' UTR (Untranslated region) of the mRNA generates the *per*^{unspliced} and the *per*^{spliced} mRNA. The splicing induces an earlier evening activity at cold temperature (Collins *et al.*, 2004; Majercak *et al.*, 2004). A thermal sensitive splicing in *tim* originates two transcripts: *tim*^{normal} and *tim*^{cold}. In *tim*^{cold} the last intron of 858 bases is not removed via splicing at cold temperature (Boothroyd *et al.*, 2007).

Till now all the previous studies concerning the circadian clocks have been carried out in laboratory, which cannot reflect the complexity of the stimuli that are present in the natural environment. This work provides new insights at behavioural and molecular level about circadian clocks in natural regimes.

The observations carried in natural conditions highlighted that a number of established findings from the laboratory may not be relevant in the wild, and that natural conditions appear to compensate for many of the defects observed in the laboratory in clock mutants (*per*⁰¹, *tim*⁰¹, *tim*⁰³, *per*⁰¹; *tim*⁰¹, *per*^S, *per*^L, *clk*^{jerk}, *Pdf*⁰¹, *cry*⁰), revealing a surprising independence of rhythmic behaviour from core clock genes. All clock genotypes can show morning (M) and evening (E) peaks, and starting at moderate temperatures, they show an additional peak, called afternoon 'anti-siesta'. The M component appears to be mostly a temperature-dependent response to dim light levels during the twilights. The evening activity is related to the photoperiod. The E component appear more modulated by the clock: many clock mutants show evening anticipation revealing the effects of a residual clock programme or at least the capability to activate a physiological response. Moreover, from the analysis of the transcriptional profiles of *per* and *tim* in natural conditions it has been observed that the proportion of the *per*^{spliced} and *tim*^{cold} mRNA increases as the temperature decreases.

D. melanogaster is also considered a good model to study sleep. Sleep in mammals is a phenomenon depending on the interaction between the homeostatic and the circadian systems. A sleep-like state characterized by posture, behavioural quiescence and elevated stimulation threshold, all characters which are used to define the sleep state in mammals, has been identified in *Drosophila* (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000). Recent studies have pointed out the deleterious effects generated by the disturbance of sleep and circadian clock on the health of shift-workers (Cho, 2001; Knutsson, 2003; Esquirol *et al.*, 2009; Puttonen *et al.*, 2010). To investigate the effects of a chronic impairment of sleep, at behavioural and molecular level, we used *Drosophila* as a model. To this purpose different shift-work regimes were superimposed to a fly population by means of a "shift-work machine" in which the "working activity" consists in maintaining the equilibrium contrasting continuous mechanical shocks. The effects of the shift-work regimes were studied by monitoring locomotor activity, mortality, anatomical and behavioural traits in controls and in shift-workers.

The overall results show behavioural and anatomical effects induced by the shift-work. On the basis of these findings it can be suggest that *Drosophila* should be considered as a useful model to investigate on the effects of chronic perturbations of the endogenous clock.

L'orologio circadiano di *Drosophila melanogaster* in condizioni naturali e in regimi artificiali perturbati

L'orologio circadiano di *Drosophila melanogaster* è basato su un sistema di loop molecolari interconnessi dove elementi "positivi" (le proteine CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC)) inducono la trascrizione di elementi "negativi" (le proteine PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM)) che a loro volta sono in grado di inibire la loro stessa trascrizione generando un periodo di circa 24 ore (Zordan *et al.*, 2003). Questi loop circadiani sono regolati sia a livello trascrizionale che traduzionale e possono interagire con l'ambiente ricevendo stimoli luminosi e termici (*Zeitgeber*) in grado di sincronizzare l'orologio con i ritmi ambientali esterni (Lin *et al.* 2001; Dunlap, 1999). I geni *period* e *timeless* originano diverse varianti di splicing dell'mRNA. Lo splicing temperatura sensibile di un introne di 89 paia di basi nella regione 3' UTR (Untranslated region) del gene *period* determina la formazione di due tipi di mRNA: *per^{unspliced}* e *per^{spliced}*. La forma *per^{spliced}* è prevalente a basse temperature e si accumula più rapidamente rispetto alla forma *per^{unspliced}*, accelerando tutto il meccanismo molecolare circadiano. In conseguenza di ciò in condizioni di laboratorio (LD12:12) a basse temperature (18°C) la fase dell'attività locomotoria serale delle mosche è anticipata (Collins *et al.*, 2004; Majercak *et al.*, 2004). Anche per il gene *timeless* sono state individuate due varianti di splicing dell'mRNA: *tim^{normal}* e *tim^{cold}*. Nella variante *tim^{cold}* viene ritenuto, a basse temperature, l'ultimo introne di 858 paia di basi. Anche in questo caso si tratta di uno splicing temperatura regolato (Boothroyd *et al.*, 2007).

Finora l'orologio circadiano è stato studiato in condizioni di laboratorio, condizioni che non riflettono la complessità e la variabilità degli stimoli presenti nell'ambiente esterno. Questo lavoro di tesi ha affrontato per la prima volta lo studio dell'orologio endogeno circadiano di *Drosophila melanogaster* in condizioni naturali mediante un'analisi a livello comportamentale e molecolare. Le osservazioni condotte hanno mostrato come il modello dell'orologio circadiano definito dagli esperimenti di laboratorio sia difficilmente applicabile in condizioni naturali e come molti aspetti dell'attività locomotoria, un fenotipo controllato dall'orologio endogeno, benché osservati in condizioni di laboratorio nelle linee mutanti per i principali geni orologio siano assenti in natura. Molti dei genotipi mutanti analizzati (*per⁰¹*, *tim⁰¹*, *tim⁰³*, *per⁰¹tim⁰¹*, *per^S*, *per^L*, *clk^{jerk}*, *Pdf⁰¹*, *cry⁰*) si sono dimostrati ritmici in condizioni naturali con una chiara attività mattutina e serale. La componente mattutina del comportamento è risultata essere, in condizioni naturali, una risposta regolata dal variare dei parametri ambientali esterni (luce e temperatura), mentre l'attività serale è apparsa maggiormente controllata dall'orologio endogeno. A livello molecolare è stato osservato un andamento ciclico dell'espressione dei geni *period* e *timeless* in condizioni naturali e la proporzione delle diverse varianti di splicing della trascrizione dei due geni sul totale dell'mRNA espresso è risultata temperatura dipendente sia in condizioni di laboratorio che in natura.

D. melanogaster è anche un ottimo modello per lo studio del sonno e dei suoi disturbi. Il sonno nei mammiferi è il risultato dell'interazione tra un processo omeostatico e uno circadiano. Tutte le caratteristiche proprie del sonno come la postura, la diminuzione del livello di attenzione e l'insorgere di una soglia di risveglio sono state riconosciute e ridefinite nelle mosche (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000). Studi recenti hanno inoltre dimostrato come la deregolazione cronica del sonno si traduca in conseguenze negative per la salute aumentando il rischio di cancro e di molte malattie legate al sonno (Cho, 2001; Knutsson, 2003; Esquirol *et al.*, 2009; Puttonen *et al.*, 2010). La seconda parte del mio lavoro di tesi ha cercato di definire un modello per

applicare e studiare gli effetti della turnazione nel lavoro (shift-work cronico) nelle mosche. E' stata costruita un'apparecchiatura per mimare con le mosche regimi artificiali di shift-work. Le analisi condotte hanno mostrato che lo shift-work cronico nelle mosche produce effetti negativi sulla sopravvivenza e su alcuni fenotipi comportamentali associati alla percezione visiva del movimento. Nel loro insieme i risultati ottenuti hanno dimostrato come *Drosophila* possa essere considerata un buon modello per questo tipo di studi.

Referenze:

Boothroyd C.E., Wijnen H., Naef F., Saez L., Young M. (2007) Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. PLoS Genetics, **3**, 492-506.

Cho K. (2001) Chronic "jet-lag" produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. Nature Neuroscience, **4**, 567-568.

Collins H.B., Rosato E., Kyriacou C.P. (2004) Seasonal behaviour in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. Proceedings of the National Academy of Sciences, **101**, 1945-1950.

Dunlap J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. Cell, **96**, 271-290.

Esquirol Y., Bongard V., Mabile L., Jonnier B., Soulat J.M., Perret B. (2009) Shift work and metabolic syndrome: respective impacts of job strain, physical activity, and dietary rhythms. Chronobiol Int., **26**, 544-59.

Hendricks J.C., Finn S.M., Panckeri K.A., Chavkin J., Williams J.A., Sehgal A., Pack A. (2000) Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. Neuron, **25**, 129-138.

Lin F.J., Song W., Meyer-Bernstein E., Naidoo N., Sehgal A. (2001) Photic signalling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. Molecular and Cellular Biology, **21**, 7287-7294.

Knutsson A. (2003) Health disorders of shift-workers. Occupational Medicine, **53**, 103-108.

Majercak J., Chen W.F., Edery I. (2004) Splicing of the *period* Gene 3'-Terminal intron is regulated by light, circadian clock and phospholipase C. Molecular and Cellular Biology, **24**, 3359-3372.

Puttonen S., Härmä M., Hublin C. (2010) Shift work and cardiovascular disease - pathways from circadian stress to morbidity. Scand J Work Environ Health. In press.

Shaw P.J., Cirelli C., Greenspan R.J., Tononi G. (2000) Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. Science, **287**, 1834-1837.

Zordan M.A., Sandrelli F., Costa R. (2003) A concise overview of circadian timing in *Drosophila*. Frontiers in Bioscience, **1**, 870-877.

Capitolo 1

Introduzione

Un comportamento ritmico è un fenomeno privilegiato per chi osserva e vuole intrappolare nella matematica il movimento. La scienza sperimentale è nata con l'osservazione e la descrizione del moto ciclico dei pianeti. Le prime formule fisiche hanno permesso di anticipare con precisione in quale posizione ci dobbiamo aspettare un pianeta del sistema solare in un determinato momento dell'anno.

L'idea del ritmo può essere data efficacemente dall'onda armonica. Essa rappresenta la ritmicità con le sue due principali caratteristiche: il periodo (T) e la fase (ϕ). Il periodo rappresenta il tempo necessario affinché un ciclo completo di oscillazione venga completato, mentre la fase è un particolare istante nello svolgersi del moto periodico che viene di solito rapportato al tempo zero di inizio del moto stesso.

Gli organismi viventi sono costantemente sottoposti a variazioni cicliche nell'ambiente in cui devono sopravvivere e riprodursi. La capacità di anticipare queste variazioni viene considerata un possibile vantaggio adattativo per aumentare la propria fitness riproduttiva e spiega l'evoluzione in tutti gli esseri viventi, dai batteri (cianobatteri) ai mammiferi, di meccanismi molecolari endogeni in grado di organizzare temporalmente numerose attività metaboliche e comportamentali.

Le variazioni cicliche a cui sono sottoposti i viventi possono essere circadiane (dal latino circa diem, di 24 ore circa), ma anche ultradiane (con un periodo inferiore alle 24 ore) e infradiane (con un periodo superiore alle 24 ore), come i ritmi lunari, i ritmi delle maree e i ritmi stagionali. Orologi endogeni in grado di dettare ritmi ultradiani come ad esempio oscillazioni biochimiche in estratti cellulari, la glicolisi in popolazioni di lievito, il rilascio di alcuni ormoni o l'alternarsi ciclico delle fasi REM e nonREM del sonno giocano un ruolo nell'organizzazione temporale interna della fisiologia degli organismi. Orologi circadiani e infradiani sono utili per preparare per tempo lo stato fisiologico dell'organismo rispetto all'ambiente locale esterno ove esso vive. Sono legati a questo tipo di meccanismi fenomeni come l'ibernazione, le migrazioni, la riproduzione, l'istinto di ricerca del cibo.

Le prime osservazioni sistematiche di attività cicliche nel mondo vivente si possono far risalire a Carl von Linné (1707-1778) il quale descrisse l'apertura e la chiusura ritmica dei petali in varie specie di fiori. L'osservazione di un comportamento ritmico non è tuttavia sufficiente per avere la certezza che esso sia generato da un meccanismo in grado di dettare il tempo. Il ritmo può essere imposto da fattori esterni e non durare più di un ciclo in condizioni costanti (in questo caso il ritmo è dettato da orologi detti a clessidra). Solo il persistere di un ritmo in condizioni costanti dimostra l'esistenza di un oscillatore in grado di autosostenersi e fu un astronomo, il francese Jean Jacques de Mairan, che nel 1729 osservò come la pianta *Mimosa pudica* muoveva le foglie ritmicamente anche in condizioni di buio costante. Orologi endogeni molecolari sono stati descritti ovunque nei viventi: in batteri (Mitsui, 1986), singole cellule eucariote (Sweeney e Hastings, 1957), insetti (Beling, 1929), uccelli (Kramer, 1952) e mammiferi come roditori (Richter, 1922), scimmie (Simpson e Gaibraith, 1906) e l'uomo (Aschoff e Wever, 1962).

1.1 Gli orologi endogeni circadiani

La maggior parte degli studi si è finora focalizzata sui meccanismi molecolari alla base della regolazione della ritmicità circadiana mentre minori sono i risultati e le

conoscenze circa la ritmicità biologica ultradiana o infradiana. Una data importante nello studio della ritmicità circadiana è il 1971. In quell'anno Seymour Benzer e Ronald Konopka pubblicarono uno studio in cui la schiusa pupale e l'attività locomotoria di *Drosophila melanogaster*, fenotipi comportamentali ritmici (con un periodo di circa 24 ore) dell'insetto, risultavano direttamente legati a un singolo gene, chiamato *period*. I due ricercatori isolarono tre diverse mutazioni a questo locus, ottenute via EMS (etilmetanosulfonato): una era in grado di accorciare il periodo portandolo a 19 ore, una seconda mutazione allungava il periodo fino a 29 ore e la terza infine rendeva le mosche aritmiche (Konopka e Benzer, 1971).

Il comportamento è un insieme di caratteri quantitativi: la seconda metà del novecento è stata dominata dal tentativo di identificare un legame diretto e semplice tra il programma genetico che si era scoperto alla base del funzionamento di ogni organismo vivente e la complessità del fenotipo comportamentale. Di grande impatto fu a questo riguardo la relazione diretta trovata da Benzer e Konopka tra *period* e i comportamenti ritmici: manipolando un solo gene si poteva ottenere un determinato effetto nel comportamento!

Gli orologi endogeni circadiani sono caratteristiche innate degli organismi e sono meccanismi molecolari localizzati a livello cellulare dove sono in grado di autosostenersi. Anche in organismi molto lontani da un punto di vista filogenetico gli orologi circadiani mostrano caratteristiche comuni:

- Capacità di rispondere e sincronizzarsi con stimoli ambientali esterni, soprattutto la luce ma anche la temperatura (*Zeitgeber*, dal tedesco, *Zeit* = tempo, *geber* = che dà) (Aschoff *et al.*, 1965). In presenza di tali stimoli, l'orologio segue uno *Zeitgeber Time*; è importante distinguere tra stimoli ambientali che agiscono con effetti "indiretti" sull'orologio endogeno e che determinano variazioni della quantità di attività, come la risposta di masking alla luce (positiva o negativa), e stimoli ambientali che, al contrario, modificano in modo sostanziale l'orologio molecolare (gli *Zeitgeber*) generando una resincronizzazione dello stesso (entrainment);
- Capacità di autosostenersi e misurare il tempo circadiano CT (*Circadian Time*,) in condizioni costanti o di *free running*, vale a dire in assenza di *Zeitgeber*. In condizioni di *free running* la lunghezza di un ciclo (periodo) riflette esclusivamente il funzionamento dell'orologio endogeno e può essere diversa rispetto a quella misurata in condizioni ambientali cicliche determinate da *Zeitgeber*. Essa può variare tra specie e specie, ma anche tra singoli individui all'interno di una specie;
- Temperatura-compensazione. L'orologio è in grado di mantenere un periodo di oscillazione costante a diverse temperature. Questa caratteristica è molto importante e non banale dato che un orologio endogeno è costituito sostanzialmente da reazioni chimiche che sono a loro volta strettamente correlate alla temperatura. In assenza di questa capacità un orologio endogeno che detta un certo ritmo a 20 gradi ne detterebbe uno più veloce a 25 gradi perché le reazioni chimiche sono più veloci a temperature più alte.

L'esistenza di un orologio biologico circadiano in tutti i taxa, a partire dagli invertebrati sino ai vertebrati, suggerisce che essa sia una struttura molecolare apparsa molto presto nel percorso evolutivo. E' oggi generalmente accettato che un orologio si sia evoluto in maniera indipendente almeno quattro volte nel corso dell'evoluzione in procarioti, funghi, piante e animali. Nonostante l'eterogeneità evolutiva gli orologi endogeni

circadiani dei diversi organismi presentano tutti un meccanismo comune di funzionamento basato sul sistema di retroazione negativa ciclica.

In una visione schematica, gli orologi circadiani sono costituiti da tre componenti fondamentali (Fig. 1):

- le vie di input: rappresentano tutte le vie di percezione degli stimoli ambientali (*Zeitgeber*), quali ad esempio luce e temperatura, e la loro trasmissione all'orologio endogeno, o oscillatore;
- un oscillatore: il “*core*” dell'orologio in grado di generare ritmicità. Esso è costituito da elementi molecolari, molti dei quali espressi in modo ritmico, con un periodo di circa 24 ore. A livello molecolare, l'oscillatore circadiano è basato su uno o più “*loop*” di trascrizione/traduzione a retroazione negativa interconnessi tra loro. Tale “*loop*” è costituito da elementi positivi, che attivano la trascrizione di geni orologio, i quali codificano elementi negativi, che agiscono da inibitori della loro stessa trascrizione. Ipotesi passate descrivevano il “*core*” dell'orologio con oscillazioni del metabolismo energetico (Winfree, 1967; Cummings, 1975) oppure coinvolgevano gli organelli cellulari: si pensava che certe molecole (in particolare ioni inorganici) potessero essere attivamente trasportate all'interno di organelli fino a raggiungere una concentrazione soglia che induceva la modifica della membrana dell'organello stesso permettendo la fuoriuscita passiva dello ione e il ripristino delle condizioni iniziali in 24 ore (Njus *et al.*, 1974; Sweeney, 1974)
- le vie di output: l'insieme delle “vie” che influenzano e guidano i fenotipi circadiani quali l'attività di altri geni (clock controlled genes, *ccg*) e, più in generale, il comportamento e il metabolismo dell'intero organismo.

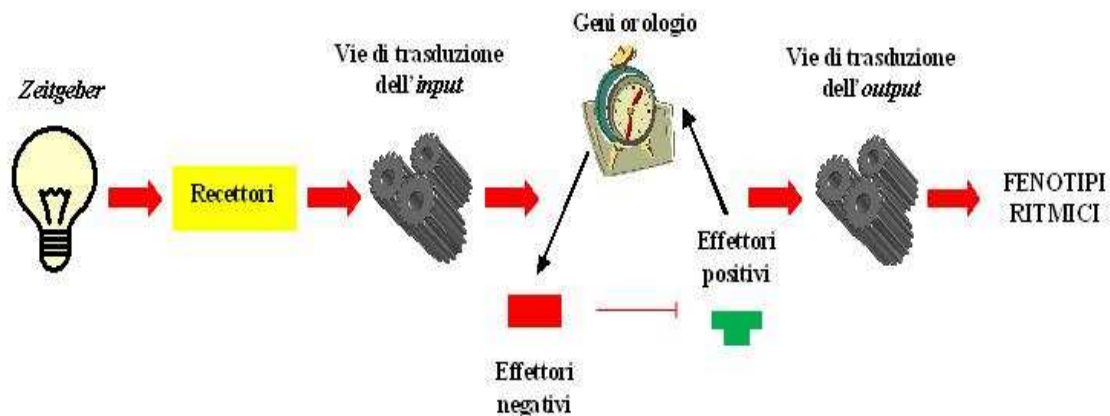


Fig. 1: Rappresentazione schematica delle componenti dell'orologio circadiano: *input*, oscillatore centrale (*core*) ed *output*. Le vie di *input* sono rappresentate dalle vie di trasduzione dei segnali ambientali (*Zeitgeber*), percepiti mediante uno o più recettori di segnale che innescano una cascata di eventi, i quali sincronizzano l'oscillatore centrale. A livello molecolare, l'orologio centrale è basato su un meccanismo di trascrizione/traduzione a retroazione negativa, che prevede l'intervento sia di elementi positivi, attivatori della trascrizione dei geni orologio, che di elementi negativi, i quali inibiscono la loro stessa trascrizione. Il ritmo generato dall'oscillatore si traduce in fenotipi ritmici mediante le vie di trasduzione dell'*output*. Le diverse componenti dell'orologio circadiano sono tuttavia interconnesse tra loro (modificata da Roenneberg e Merrow, 2003).

Gli orologi circadiani sono ubiquitari e si trovano a vari livelli di organizzazione e complessità. In organismi eucarioti complessi, quali ad esempio insetti o mammiferi, essi sono distribuiti in molti tessuti ed organi; tuttavia si distinguono “orologi centrali” (*pacemaker*), espressi ad esempio negli animali nel sistema nervoso centrale, e “orologi periferici”, espressi negli altri tessuti del corpo. L’esistenza di orologi periferici pone la questione di quale sia la loro funzione locale ed eventualmente di come possano influenzare l’orologio “centrale” localizzato nel cervello (Levine, 2004; Stanewsky, 2003). La funzione biologica per molti orologi periferici non è conosciuta, ma è noto che alcuni di essi controllano ritmi locali. Una importante differenza tra gli orologi periferici degli insetti e quelli dei mammiferi consiste nel fatto che i primi percepiscono gli stimoli luminosi e sono capaci di rispondervi in modo indipendente dall’orologio centrale del cervello, mentre nei mammiferi vi è una organizzazione strettamente gerarchica tra centro (localizzato nei nuclei suprachiasmatici (SCN), circa 20000 neuroni siti al centro della regione ipotalamica del cervello) e periferia (Stanewsky, 2003).

1.2 Tempo “Zeitgeber” e Tempo “Circadiano”

Relativamente alla modalità di misurazione sperimentale del tempo, bisogna distinguere tra le condizioni di Tempo “Zeitgeber” (ZT) e Tempo Circadiano (CT). La differenza tra le due modalità di misurazione del tempo dipende dalla presenza o assenza di stimoli (segnali provenienti dall’ambiente esterno) all’orologio biologico circadiano. Il tempo ZT (Fig. 2) prevede quindi che sia disponibile uno stimolo esterno in grado di indurre la sincronizzazione dell’orologio endogeno. Un fattore ambientale è definito *Zeitgeber* se rispetta quattro caratteristiche:

- 1) in sua assenza il periodo del ritmo é quello intrinseco dettato dall’orologio endogeno
- 2) in sua presenza il periodo risulta quello dettato dallo *Zeitgeber* stesso
- 3) genera un angolo di fase costante con il ritmo endogeno interno nel momento in cui si passa dall’uno all’altro o viceversa
- 4) detta la fase iniziale del ritmo nel passaggio dalle condizioni di *Zeitgeber* a quelle di free running

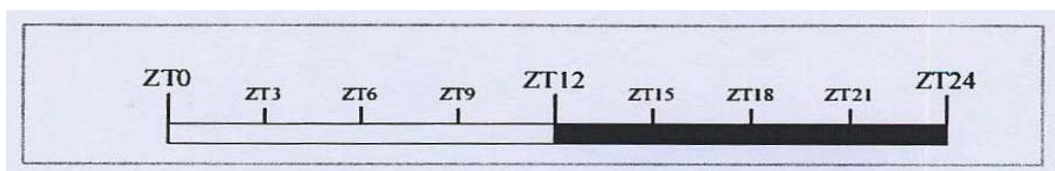


Fig. 2: *Zeitgeber Time* in condizioni di alternanza luce/buio (LD 12:12). La barra bianca rappresenta il periodo di luce, quella nera il periodo di buio. Per convenzione, il momento di accensione della luce è definito ZT 0.

Nella modalità di tempo CT (Fig. 3) l’orologio viene invece lasciato operare in assenza di stimoli esterni, ovvero in condizioni di luce e temperatura costanti, in una condizione definita “free-running”. In condizioni sperimentali di CT, gli organismi sono sottoposti

a regimi di luce:buio continui (*Light: Light* o **LL**; *Dark:Dark* o **DD**) e a temperatura costante.

Generalmente in laboratorio gli individui sono mantenuti in termostati con un ciclo di luce:buio (*Light:Dark* o **LD**) di 12 ore (12:12), mantenendo costante la temperatura. In questo caso lo *Zeitgeber* è la luce. In un ciclo LD 12:12, si definisce ZT 0 il momento di accensione della luce, mentre ZT 12 quello di spegnimento della luce. E' possibile instaurare inoltre cicli in cui lo *Zeitgeber* è rappresentato dalla temperatura (Liu *et al.*, 1997; Sidote *et al.*, 1998); si mantengono gli organismi in condizioni di luce:buio costante 24 ore su 24, mentre la temperatura viene fatta oscillare tra due valori.

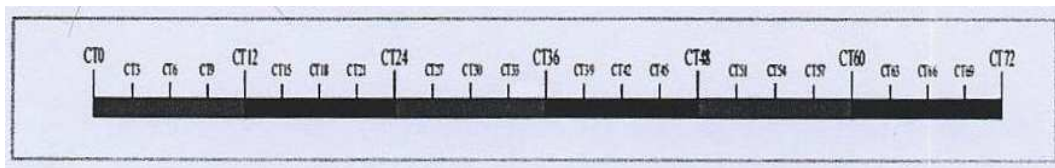


Fig. 3: Tempo Circadiano in condizioni di buio costante DD (nell'esempio, 3 giorni in DD). Le barre in grigio scuro rappresentano il giorno soggettivo, quelle nere il periodo di buio. Per convenzione, si indica l'inizio delle condizioni costanti con CT 0.

Recentemente è stata introdotta anche la definizione di *Zeitnehmer* (ZN) (Roenneberg e Merrow, 2002). Questo termine si usa per identificare l'influenza di una componente interna (core o output) del meccanismo dell'orologio endogeno sulla sincronizzazione dello stesso.

1.3 Fenotipi ritmici in *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster rappresenta un ottimo organismo modello in quanto possiede un ciclo vitale di soli 10-14 giorni a 25°C; è facilmente maneggiabile in laboratorio dove può essere allevata in gran numero; è un organismo altamente differenziato, con una morfologia complessa ed un ciclo di sviluppo caratterizzato da diverse fasi. Inoltre, attualmente sono disponibili numerosi mutanti per geni differenti ed il suo genoma, costituito da circa 165 milioni di basi e contenente oltre 14000 geni, è stato quasi completamente sequenziato nel 2000. Dal punto di vista dello studio dei ritmi circadiani due sono i fenotipi che sono stati maggiormente caratterizzati: la "schiusa pupale" e l'attività locomotoria dell'adulto:

- schiusa pupale: è lo sfarfallamento dell'adulto dall'involucro pupale. Avviene ritmicamente con un picco di schiusa all'alba in condizioni di LD 12:12 che si mantiene in condizioni di DD sotto il controllo dell'orologio endogeno. Il significato ecologico di questo ritmo starebbe nel fatto che nelle prime ore del giorno l'ambiente è in genere più fresco e umido, condizione in cui si minimizza il pericolo di disseccamento per i nuovi nati (Qiu e Hardin, 1996).
- attività locomotoria: è la misura della quantità di attività dell'adulto nei vari momenti del giorno. In condizioni di LD 12:12 alla temperatura costante di 23°C l'attività locomotoria è ritmica bimodale con un picco di movimento attorno all'accensione della luce ("morning peak") ed uno attorno allo spegnimento ("evening peak") separati da un periodo di "siesta" (Fig. 4). Questa ritmicità viene collegata al vantaggio che trarrebbero le mosche nell'evitare le ore calde centrali della giornata concentrando l'attività nei momenti generalmente più

freschi dell'alba e del tramonto. Di notte le mosche sono generalmente quasi inattive. Questo ritmo si mantiene in condizioni di DD sotto il controllo dell'orologio endogeno anche se il "morning peak" viene spesso perduto e l'attività risulta unimodale con il permanere ritmico dell'"evening peak".

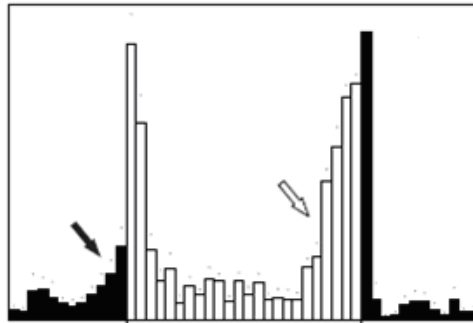


Fig. 4: Andamento bimodale dell'attività locomotoria di esemplari wild-type di *Drosophila melanogaster*; le barre bianche rappresentano il periodo di luce (da ZT0 a ZT12), quelle nere il periodo di buio. Le frecce nera e bianca indicano gli anticipi, rispettivamente, al mattino ed alla sera (adattata da Grima *et al.*, 2004).

Negli ultimi anni sono stati documentati in *Drosophila* altri processi che avvengono con ritmo circadiano, come le risposte olfattive, che risultano più elevate durante la notte (Krishnan *et al.*, 1999); l'accoppiamento (che avviene in momenti diversi del giorno per specie diverse, così da accentuare l'isolamento riproduttivo riducendo il rischio di ibridazioni interspecifiche) (Sakai e Ishida, 2001); la ovideposizione (che avviene prevalentemente al crepuscolo così da evitare l'essiccamento delle uova (Sheeba *et al.*, 2001; Howlader e Sharma, 2006).

1.4 L'orologio molecolare in *Drosophila melanogaster*

Benchè i dati raccolti stiano via via mettendo in crisi il modello a retroazione negativa che è stato descritto e accettato alla fine degli anni novanta del secolo scorso, esso resta ancora il modo più efficace per descrivere l'orologio endogeno da un punto di vista molecolare in *Drosophila melanogaster* (Weber, 2008). Il "core" cioè l'oscillatore centrale vero e proprio consiste di due principali loop a retroazione negativa interconnessi tra loro. Il primo (Fig. 5) coinvolge gli elementi positivi CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC) (Allada *et al.*, 1998; Rutila *et al.*, 1998), fattori trascrizionali contenenti domini di interazione con il DNA (basic-helix-loop-helix, bHLH) e domini di dimerizzazione PAS (PER-ARNT-SIM, dai nomi delle proteine dove tali domini furono inizialmente trovati) e gli elementi negativi PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM), proteine in grado di inibire la loro stessa trascrizione (Dunlap, 1999). Il gene *clock* (*clk*) è trascritto ritmicamente con un picco di espressione attorno all'alba, mentre *cycle* (*cyc*) mantiene livelli di trascrizione costanti. Verso la metà del giorno soggettivo CLK e CYC dimerizzano in un complesso in grado di legare delle particolari sequenze di DNA (dette E-box, CACGTG) (Kyriacou e Rosato, 2000) presenti nei promotori dei geni *period* (*per*) e *timeless* (*tim*) (nonché dei geni *vri* (*vri*) e *PAR domain 1ε* (*Pdp1ε*) che saranno discussi in seguito) attivandone la trascrizione. L'attivazione dell'espressione di *per* e *tim* da parte dell'eterodimero CLK/CYC porta ad un progressivo aumento del loro

mRNA che raggiunge un massimo all'inizio della notte soggettiva (Hardin *et al.*, 1990; Zerr *et al.*, 1990). Il picco delle proteine tradotte a partire da questi due ultimi mRNA si verifica alla fine della notte soggettiva (Curtin *et al.*, 1995) poiché PER è regolata a livello post-traduzionale. PER viene fosforilata e degradata dall'azione della chinasi DOUBLETIME (DBT) (Price *et al.*, 1998), omologa della Casein Kinase 1 ϵ (CK1 ϵ) di mammifero, mentre è la proteina fosfatasi 2A (PP2A) a defosforilarla. La fosforilazione di PER e TIM è controllata anche dalla proteina SLIMB, una ubiquitin ligasi appartenente alla via degradativa che coinvolge il complesso SCF (Ko *et al.*, 2002; Grima *et al.*, 2002). Durante la notte TIM si accumula e può così legare il complesso PER/DBT, stabilizzandolo e permettendone l'accumulo. Il complesso PER/TIM/DBT così formato tende ad entrare nel nucleo favorito anche dall'azione di altre chinasi importanti che agiscono su PER, come la Casein chinasi 2 (CK2) (Akten *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2002 e 2005), e su TIM, come SHAGGY (SGG) codificata dal gene *shaggy*, omologo della *Glycogen synthetase kinase* (*Gsk*) di mammifero (Martinek *et al.*, 2001). TIM è defosforilata dalla proteina fosfatasi 1 (PP1) (Fang *et al.*, 2007). È stato a lungo oggetto di discussione se PER e TIM entrino nel nucleo separatamente o come complesso. Recentemente studi effettuati su cellule S2 (Schneider, 1972) sfruttando la tecnica FRET (fluorescence resonance energy transfer, Meyer *et al.*, 2006) sembrano indicare che il complesso PER/TIM/DBT si dissocia e le proteine entrano nel nucleo separatamente. Ciò sembra essere confermato dal fatto che PER è in grado di dimerizzare grazie ai domini PAS anche con sé stessa sostituendosi come omodimero all'eterodimero PER/TIM nella regolazione del ciclo circadiano (Landskron *et al.*, 2009). Verso l'inizio del giorno soggettivo PER e TIM entrano nel nucleo e agiscono su CLK portando a una progressiva riduzione dell'effetto attivatore del dimero CLK/CYC sui promotori di *per* e *tim* la cui trascrizione risulta inibita (Darlington *et al.*, 1998). Questa inibizione porta a una diminuzione di PER, che torna ad essere velocemente degradata in conseguenza anche dell'effetto della luce su TIM i cui livelli scendono rapidamente a causa della degradazione luce dipendente mediata da CRYPTOCHROME (CRY), fotorecettore della luce blu (Lin *et al.*, 2001). La via di degradazione di TIM mediata da CRY coinvolge il proteasoma ed è regolata anche dalla proteina JETLAG (Koh *et al.*, 2006). A questo punto l'effetto di PER e TIM su CLK cessa e può ricominciare il ciclo.

Il secondo loop interconnesso al primo (Fig. 6) coinvolge *vri* e *Pdp1 ϵ* , la cui trascrizione come già menzionato è attivata dal dimero CLK/CYC verso metà del giorno soggettivo e giunge a un massimo rispettivamente all'inizio e a metà della notte (Blau e Young., 1999; Cyran *et al.*, 2003). VRI si accumula rapidamente nel citoplasma ed entra nel nucleo dove agisce su specifiche sequenze nei promotori di *clk* e *Pdp1 ϵ* (V/P-box) inibendone la trascrizione. Quando i livelli di VRI scendono, aumentano quelli di PDP1 ϵ che si sostituisce a VRI sui V/P-box attivando la trascrizione di *clk* e ricominciando il ciclo. In sintesi, questo secondo loop genera la ciclicità nell'espressione dell'mRNA del gene *clk* (Glossop *et al.*, 1999). Come inibitore della trascrizione di *clk* è stata coinvolta anche la proteina CLOCKWORK ORANGE (CWO) (Kadener *et al.*, 2008a). Recenti studi su *Pdp1 ϵ* hanno permesso di mettere in luce come esso sia ulteriormente regolato dalla chinasi DBT e come abbia un ruolo anche come vero e proprio output dell'orologio (Zheng *et al.*, 2009; Benito *et al.*, 2007).

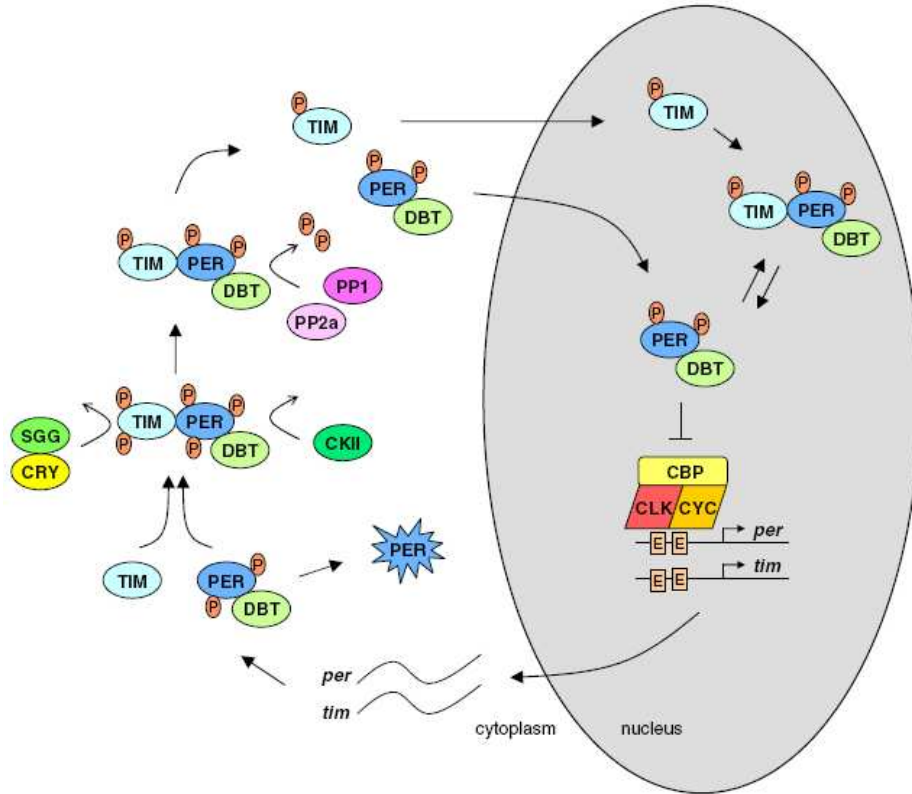


Fig. 5: Modello del *loop* PER/TIM: espressione e regolazione post-traduzionale di PER e TIM (tratta da Weber, 2008).

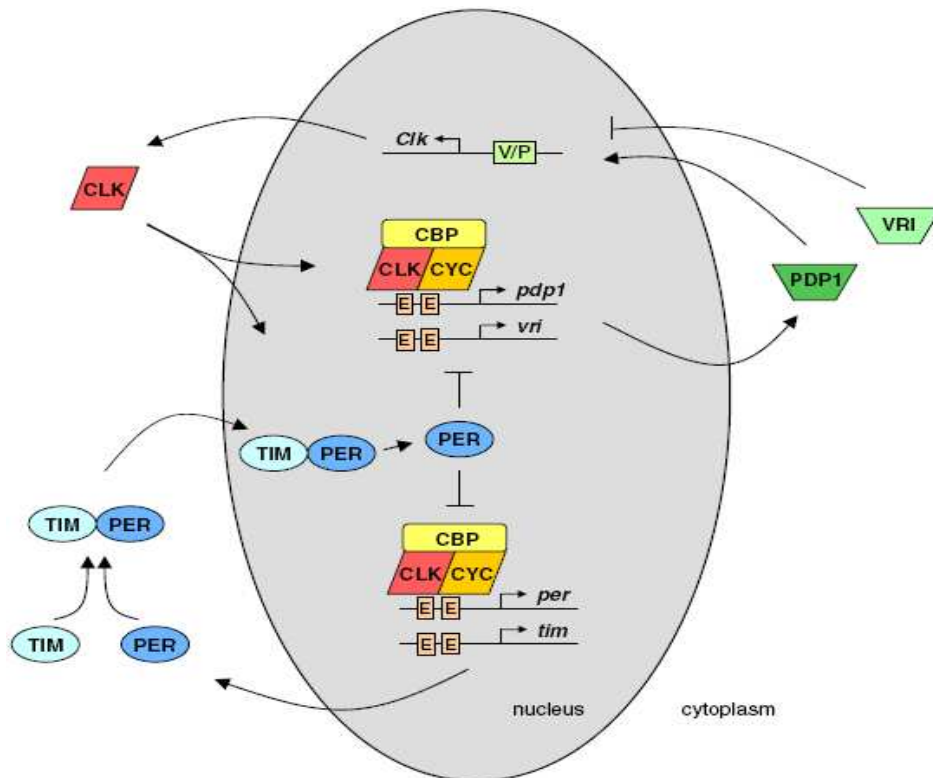


Fig. 6: Modello del *loop* CLK/CYC (tratta da Weber, 2008)

1.5 I geni *period* e *timeless* in *Drosophila melanogaster*

Le principali molecole coinvolte nella regolazione del “core” dell’orologio endogeno circadiano di *Drosophila* sono elencate in Tab. 1.1 assieme ad alcune loro caratteristiche. Di seguito è inoltre riportata una descrizione più approfondita per i geni *period* e *timeless*.

Componente	Caratteristiche biochimiche	Espressione	Ruolo nel sistema circadiano	Referenze
<i>period (per)</i>	Contiene un dominio PAS Ma nessun dominio legante il DNA	L’ mRNA è espresso ciclicamente così come la proteina	Interazione con TIM. Regolazione negativa di CLK e CYC	Konopka e Benzer, 1971; Bargiello e Young, 1984; Jackson <i>et al.</i> , 1986; Citri <i>et al.</i> , 1987
<i>timeless (tim)</i>	Contiene due domini ARM/HEAT	L’ mRNA è espresso ciclicamente così come la proteina	Interazione e stabilizzazione di PER. Regolazione negativa di CLK e CYC	Sehgal <i>et al.</i> , 1994; Vosshal <i>et al.</i> , 1994; Myers., 1995; Rosato <i>et al.</i> , 1997
<i>clock (clk)</i>	Contiene domini bHLH e PAS	L’ mRNA è espresso ciclicamente	Interazione con CYC. Attivazione della trascrizione di <i>per</i> , <i>tim</i> , <i>vri</i> e <i>pdp1ε</i>	Allada <i>et al.</i> , 1998; Darlington <i>et al.</i> , 1998
<i>cycle (cyc)</i>	Contiene domini bHLH e PAS	Costitutiva	Interazione con CLK. Attivazione della trascrizione di <i>per</i> , <i>tim</i> , <i>vri</i> e <i>pdp1ε</i>	Rutila <i>et al.</i> , 1998; Darlington <i>et al.</i> , 1998; Blau, 2001
<i>par domain protein 1ε (PDP1)</i>	Contiene un dominio Par e domini b-Zip	L’ mRNA è espresso ciclicamente così come la proteina	Attivatore di <i>clk</i>	Cyran <i>et al.</i> , 2003
<i>vri (vri)</i>	Contiene domini b-Zip	L’ mRNA è espresso ciclicamente così come la proteina	Repressore di <i>clk</i>	Blau e Young, 1999
<i>cryptochrome (cry)</i>	Fotorecettore della luce blu	L’ mRNA è espresso ciclicamente. La proteina cicla in LD mentre accumula in DD	Mediazione tra il segnale luminoso e il “core” dell’orologio. Interazione con TIM luce dipendente. Coinvolta nel funzionamento degli orologi periferici.	Emery <i>et al.</i> , 1998; Stanewsky <i>et al.</i> , 1998; Dissel <i>et al.</i> , 2004; Rosato <i>et al.</i> , 2001
<i>Doubletime (dbt)</i>	Casein chinasi 1ε	Costitutiva	Fosforilazione di PER	Price <i>et al.</i> , 1998; Kloss <i>et al.</i> , 1998
<i>Shaggy (sgg)</i>	Chinasi	Costitutiva	Fosforilazione di TIM	Martinek <i>et al.</i> , 2001

<i>Slimb (slmb)</i>	Fa parte della famiglia Delle proteine Fbox/WD40	Costitutiva	Degradazione di PER e TIM	Grima <i>et al.</i> , 2002; Ko <i>et al.</i> , 2002
Casein kinase 2 (CK2)	Chinasi	Costitutiva	Fosforilazione di PER e TIM	Lin <i>et al.</i> , 2002

Tab. 1.1: Elenco dei principali geni coinvolti nel “core” dell’orologio biologico circadiano in *Drosophila melanogaster*.

1.5.1 *period*

A dare inizio agli studi sull’orologio biologico a livello molecolare fu la scoperta del gene *period (per)*, avvenuta in *Drosophila melanogaster* circa 40 anni fa (Konopka e Benzer, 1971). Il mutante isolato (*per*⁰) presentava, in condizioni di *free running*, un fenotipo aritmico nell’attività locomotoria e nella schiusa pupale, i due principali fenotipi ritmici osservabili. Nel 1984 il gene *per* venne clonato e sequenziato indipendentemente da due gruppi (Bargiello e Young, 1984; Reddy *et al.*, 1984). Le prime analisi della sequenza portarono a identificare alti livelli di omologia con geni responsabili della formazione di proteoglicani. Per anni questo abbaglio indirizzò la ricerca verso una direzione errata fino al momento in cui furono scoperte altre omologie della sequenza con fattori trascrizionali che portarono poi ad identificare la vera funzione della proteina. A livello molecolare fu evidenziato che tale gene veniva trascritto ritmicamente e che i livelli dell’*mRNA* e del suo prodotto proteico mostravano oscillazioni circadiane (Hardin *et al.*, 1990). Fondamentali furono gli esperimenti in cui in mutanti *per*^S e *per*^L si osservò come l’anticipo e il ritardo di fase del ritmo circadiano corrispondesse ad un comportamento molecolare equivalente per l’*mRNA* di *period*. Il livello dell’*mRNA* di *per* presenta normalmente un picco massimo subito dopo il tramonto, a ZT 13, ed un minimo in piena notte, a ZT 21; la proteina presenta un picco massimo a metà notte (ZT 19) ed un minimo al tramonto (ZT 12). L’espressione ciclica di *per* è abolita sia in caso di sovraespressione di PERIOD (PER) (Zeng *et al.*, 1994), sia nei mutanti nulli *per*⁰ che producono costitutivamente livelli medio-alti di *mRNA*, ma non di proteina (Hardin *et al.*, 1990; Sehgal *et al.*, 1994). Ciò suggerisce chiaramente che l’espressione di *per* è sotto il controllo del suo stesso prodotto proteico. Si tratta di un gene pleiotropico, in quanto alcuni mutanti di *per* presentano cambiamenti pronunciati non solo in attività circadiane, come l’attività locomotoria degli adulti (Konopka e Benzer, 1971), ma anche nella ritmicità presente in alcune componenti acustiche del canto di corteggiamento dei maschi, che rappresenta un’attività ritmica con un periodo di circa un minuto (ritmo ultradiano: attività ritmica con un periodo inferiore alle 24 ore) (Kyriacou e Hall, 1980).

Mediante la tecnica di trasformazione in *Drosophila* (Rubin e Spradling, 1982) è stato possibile inserire in individui *per*⁰ extracopie dell’allele selvatico di *period* e osservare un recupero della ritmicità circadiana dell’attività locomotoria dose dipendente (più transgeni erano inseriti, maggiore era la percentuale di mosche che recuperavano il fenotipo wild-type) (Baylies *et al.*, 1987).

per, in *Drosophila*, mappa sul cromosoma X, in posizione 3B 1-2 ed è costituito da 8 esoni (il primo e l'ultimo dei quali non codificanti) e 7 introni; l'*mRNA* è di 4.5 Kb e viene tradotto in una proteina di 1218 amminoacidi (aa). La proteina PER è composta di domini specifici: in corrispondenza della regione N-terminale si trova un dominio di 14 aa detto Segnale di Localizzazione Nucleare (*Nuclear Localization Signal*, NLS) (Young, 1998). Più a valle di questo dominio è stata evidenziata la presenza di una sequenza di 270 aa conosciuta come dominio PAS (suddivisibile nelle regioni PAS A e PAS B) che rappresenta una regione di dimerizzazione proteica (Dunlap, 1999). A valle del dominio PAS è sito il Dominio di Localizzazione Citoplasmatico (*Cytoplasmatic Localization Domain*, CLD), di 40 aa, regione fondamentale dell'interazione tra PER e TIM. Il dominio *Thr-Gly* (TG) segue il dominio CLD: è una regione in cui gli amminoacidi Treonina (o Serina) e Glicina si ripetono in *tandem* in un dominio che nelle popolazioni naturali di *Drosophila melanogaster* varia notevolmente. L'analisi della struttura di tale dominio e dei fenotipi di numerose varianti alleliche ad esso associate hanno evidenziato una precisa relazione fra la lunghezza della regione TG ed il fenomeno della temperatura-compensazione, la capacità dell'orologio di mantenere uno stesso periodo al variare della temperatura. A valle del dominio TG troviamo la regione S/M (*Short Mutable domain*) di 70 aa: mutazioni a livello di questo dominio alterano il normale periodo di attività locomotoria, accorciandolo.

L'*mRNA* del gene *per* sembra essere regolato sia dalla temperatura che dalla luce. Sono state descritte due varianti di *mRNA* di *per*, differenti l'una dall'altra per la presenza di un introne di 89 paia di basi, sito nella regione 3' UTR (*Untranslated region*) del messaggero (Tipo A), o per la sua assenza determinata da uno splicing temperatura sensibile (Tipo B) (Cheng *et al.*, 1998). È stato dimostrato che esemplari di *Drosophila* wild-type, esposti ad una temperatura costante di 18°C, presentano un livello di *mRNA* di tipo B almeno 3 ordini di grandezza superiore rispetto al livello di *mRNA* di tipo A. L'*mRNA* di tipo A è invece più abbondante in moscerini esposti a temperature più elevate (29°C). Questi risultati confermano che lo splicing dell'introne è stimolato dalle basse temperature (Majercak *et al.*, 1999). La conseguenza dello splicing dell'*mRNA* di *per* è l'anticipato accumulo della proteina PER. Questo ha degli effetti anche sul comportamento del moscerino, che mostra un picco anticipato di attività serale: a basse temperature *Drosophila* può muoversi anche ben prima del tramonto; invece, quando le temperature sono più elevate al fine di evitare l'essiccazione, l'insetto tende a muoversi più tardi la sera, quando l'ambiente è più fresco (Majercak *et al.*, 1999).

Anche la luce è in grado di regolare la trascrizione di *period*, agendo sullo stesso fenomeno di splicing sopra descritto. Con fotoperiodi corti l'*mRNA* di tipo B risulta più abbondante rispetto a quello di tipo A a pari temperatura, anticipando l'accumulo di *per* e conseguentemente la fase dell'attività serale delle mosche (Majercak *et al.*, 2004). Tenendo conto che basse temperature e fotoperiodi corti sono fenomeni stagionali associati, la regolazione dello splicing di *period* sembra essere un fenomeno molecolare che suggerisce l'esistenza di un meccanismo sensore in grado di percepire il cambiamento stagionale. Questo fenomeno regolativo di splicing si mantiene nei mutanti orologio *per*⁰ e *tim*⁰ mentre sembra che la mutazione del gene *norpA* (*no receptor potential A*) generi livelli costantemente elevati della forma B (Majercak *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2004). Dal punto di vista molecolare la temperatura è in grado di

regolare il meccanismo di splicing in quanto l'assemblaggio di spliceosomi attivi a questo sito di splicing del pre-mRNA di *per* sembra favorito a basse temperature consentendo una maggiore formazione e quindi un più veloce accumulo dell'mRNA stesso (Fig. 7).

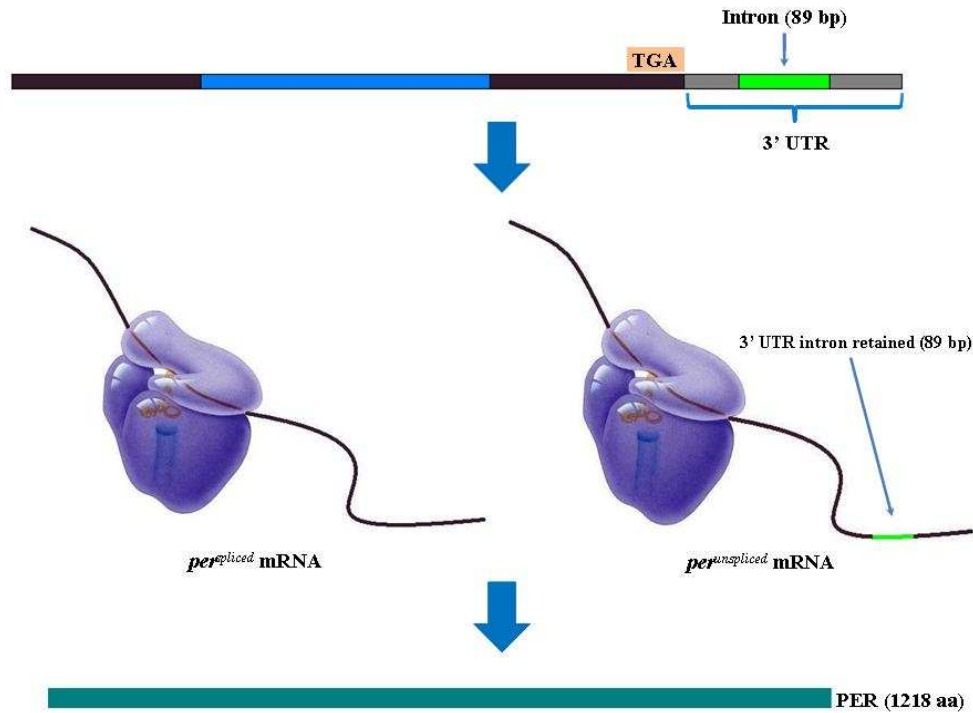


Fig. 7: Rappresentazione della regolazione trascrizionale del gene *period* in *Drosophila*. Lo splicing temperatura-sensibile di un introne di 89 paia di basi sito nella regione 3' UTR (*Untranslated region*) fa sì che siano possibili due forme di mRNA (*per^{spliced}* e *per^{unspliced}*). A basse temperature prevale la forma *per^{spliced}* in grado di accumulare rapidamente con il conseguente anticipo della fase del picco di attività locomotoria serale. La proteina PER trascritta è unica.

1.5.2 *timeless*

timeless (*tim*) è un gene autosomico che mappa sul cromosoma 2, in posizione 23 F5-6. Il prodotto proteico TIMELESS (TIM) di 1398 aa è, come PER, una componente centrale del *core* dell'orologio circadiano di *Drosophila melanogaster*.

tim è stato identificato nel 1994 in seguito all'isolamento e all'analisi di mutanti, ottenuti per mutagenesi indotta da elementi P. In questi mutanti veniva meno la ritmicità, sia nell'attività locomotoria che nella schiusa pupale (Sehgal *et al.*, 1994).

tim è stato clonato e sequenziato in due laboratori differenti nello stesso anno mediante clonaggio posizionale (Myers *et al.*, 1995) e grazie ad un esperimento di doppio ibrido in lievito, in cui il dominio PAS di PER è stato impiegato come "esca" per isolare TIM (Gekakis *et al.*, 1995). L'espressione ciclica di *tim* è abolita sia in caso di sovraespressione di TIM (Zeng *et al.*, 1994), sia nei mutanti nulli *tim⁰* che producono costitutivamente livelli medio-alti di mRNA, ma non di proteina (Hardin *et al.*, 1990; Sehgal *et al.*, 1994). Ciò suggerisce chiaramente che l'espressione di *tim*, come quella di *per*, è sotto il controllo del suo stesso prodotto proteico.

Una prima peculiarità di TIM è la mancanza, nella sua sequenza, di un dominio PAS. L'analisi comparata del gene *tim* in diverse specie di *Drosophila* ha permesso di individuare alcune zone conservate, tra cui una regione all'N-terminale di 32 aa indispensabile per la funzione di TIM; una prima regione di interazione con PER, dove si trova il segnale NLS; una seconda regione di interazione con PER (Gekakis *et al.*, 1995). Verso l'estremità C-terminale si trova un dominio CLD. Sono stati identificati nella sequenza anche domini ARMADILLO (ALD, Stanewsky, 2002) generalmente associati a interazioni con proteine del citoscheletro (Hatzfeld, 1999).

Anche *tim* come *per* è trascritto ritmicamente e mostra le stesse oscillazioni circadiane sia a livello di mRNA che di proteina (So e Rosbash, 1997). TIM forma un complesso eterodimerico con PER che precede la traslocazione delle proteine nel nucleo. TIM è stabile al buio mentre è degradata via proteasoma in presenza di luce attraverso l'azione di CRY.

tim è regolato a livello trascrizionale dalla temperatura. A basse temperature brevi impulsi (flash) di luce localizzati in modo specifico a metà della notte, quando l'mRNA di *tim* è in via di accumulo, sono in grado di stimolare la trascrizione di *tim*. Questa "gated response" di *tim* alla luce permette di anticipare l'attività serale durante la stagione più fredda (Chen *et al.*, 2006). *tim* inoltre presenta due varianti di splicing della trascrizione, *tim*^{normal} e *tim*^{cold}. In *tim*^{cold} non viene rimosso a basse temperature, tramite splicing temperatura dipendente, l'ultimo introne di 858 paia di basi, generando un codone di terminazione precoce. Per questo, la proteina TIM^{COLD} è più corta mancando di 33 residui amminoacidici rispetto alla forma TIM^{NORMAL} e sembra che la percentuale di *tim*^{cold}, sul totale dell'mRNA, aumenti in risposta all'abbassamento della temperatura (Boothroyd *et al.*, 2007); tuttavia, ad oggi, non si conosce la principale funzione della proteina TIM^{COLD} (Fig. 8). È importante ricordare che nella porzione N-terminale di *tim* (vedi anche paragrafo 1.12) sono stati individuati in natura due alleli diversi. È stato identificato un polimorfismo di lunghezza nella regione codificante in 5' del gene *tim* (Sandrelli *et al.*, 2007; Tauber *et al.*, 2007). Tale polimorfismo consiste nella possibile inserzione di una guanina (G) in posizione 294 del gene. Quando è presente la guanina la sequenza di *tim* è tale per cui vi sono due siti alternativi di inizio della traduzione poco distanti tra loro (ATG) e di conseguenza due possibili proteine (chiamate "long", di 1421aa, e "short", di 1389 aa), che differiscono di 23 aminoacidi, possono essere tradotte (allele *ls-tim*). Quando la guanina non è presente tra i due ATG si forma uno codone di terminazione che impedisce alla forma lunga di *tim* di formarsi mentre la forma corta viene normalmente tradotta (allele *s-tim*). In generale abbiamo quattro possibili forme proteiche di TIMELESS: "long" TIM^{NORMAL} e "short" TIM^{NORMAL}; "long" TIM^{COLD} e "short" TIM^{COLD}.

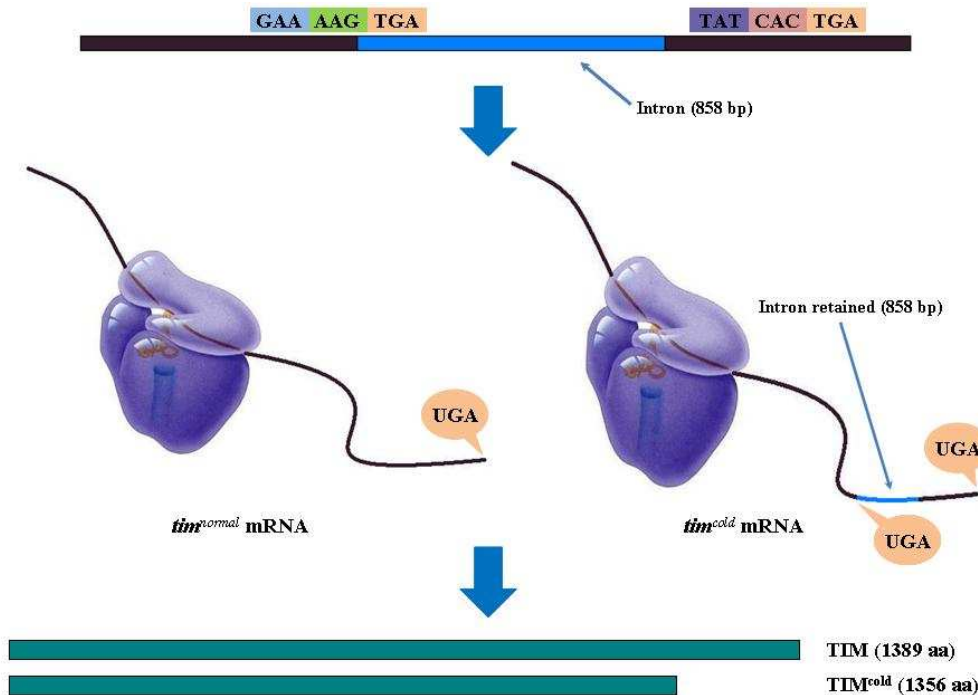


Fig. 8: Rappresentazione della regolazione trascrizionale della regione C-terminale del gene *timeless* in *Drosophila*. Lo splicing temperatura-sensibile dell'ultimo introne di 858 paia di basi fa sì che siano possibili due forme di mRNA (*tim^{normal}* e *tim^{cold}*). A basse temperature prevale la forma *tim^{cold}*. Ognuno dei due mRNA dà origine a una specifica proteina (TIM^{NORMAL} e TIM^{COLD}). La funzione di TIM^{COLD} non è nota.

1.6 Le vie di input (luce)

Una delle caratteristiche fondamentali dell'orologio endogeno circadiano è quella di non essere isolato dall'ambiente esterno ma di poter ricevere importanti segnali da esso al fine di regolare la sua fase in funzione delle variazioni dell'ambiente stesso. Una delle vie privilegiate con cui l'ambiente comunica con i meccanismi molecolari endogeni è la luce. Si possono distinguere due tipi di effetti della luce. Il primo è un effetto transiente, che non condiziona l'orologio circadiano endogeno ma si traduce in un aumento o una diminuzione dell'attività locomotoria in risposta ad una rapida variazione luminosa (effetto di masking positivo o negativo). Il secondo è la capacità della luce di agire da *Zeitgeber* regolando l'orologio endogeno attraverso specifici pathway molecolari che coinvolgono i fotorecettori del sistema visivo (fenomeno di entrainment).

Drosophila melanogaster possiede due occhi composti, tre ocelli e due organi extraoculari di Hofbauer-Buchner in grado di percepire la luce. Negli occhi composti i fotorecettori responsabili della percezione dello stimolo luminoso sono le rodopsine che attivate formano un complesso con proteine G in grado di attivare la fosfolipasi C (PLC), una proteina, codificata dal gene *norpA*, che a sua volta agisce su canali del calcio chiamati Transient Receptor Potential (TRP) fino a coinvolgere nella cascata del segnale i neuroni orologio (Hardie, 2001; Pak e Leung, 2003). Questo tipo di organi sono importanti per la sincronizzazione dell'orologio alla luce rossa (Hanai *et al.*, 2008) e ai fotoperiodi estremi (Rieger *et al.*, 2003). Gli organi extraoculari di Hofbauer-

Buchner derivano per metamorfosi dall'unica struttura di ricezione larvale detta organo di Bolwing. Essi sono associati ad alcuni dei neuroni principali che regolano l'orologio (i neuroni laterali ventrali) e ricevono segnali luminosi tramite la rodopsina 6 (Bolwig, 1946; Hofbauer e Campos Ortega, 1990; Yasuyama e Meinertzhagen, 1999). Gli ocelli sono strutture semplici, poste all'esterno della testa che esprimono rodopsina 2.

Tutti questi organi sono in grado di percepire il segnale luminoso e di "inviarlo" ai neuroni orologio resettando la fase del "clock" che è così sottoposto a entrainment. Tuttavia, il principale fotorecettore in grado di agire in questo modo sull'orologio endogeno di *Drosophila* è la proteina monomeric CRYPTOCHROME (CRY) (Stanewsky *et al.*, 1998) tradotta a partire dal gene omonimo trascritto in molti neuroni orologio. CRYPTOCHROME è una proteina con una struttura simile alle fotoliasi, le proteine capaci di riparare il DNA da danni indotti dai raggi UV (Todo, 1999), ma è in realtà un fotorecettore della luce blu (picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di 420 nm) contenente come cromofori una flavina (FAD) e il metiltetraidrofolato (MTHF) (Thompson e Sancar, 2002). Dal punto di vista evolutivo si pensa che la sua funzione originaria fosse principalmente quella di fotoliasi e che sia stata successivamente coinvolta nell'orologio endogeno a partire da alcuni organismi acquatici che necessitavano di isolare la fase S di replicazione cellulare durante la notte. La sua sensibilità a lunghezze d'onda basse (le più capaci di penetrare in profondità nell'acqua) e la sua sensibilità ai raggi UV come fotoliasi in grado di riparare il DNA tramite trasferimento elettronico ciclico fotoindotto ne hanno fatto, con ogni probabilità, il punto di partenza ideale per evolversi poi in questi organismi come fotorecettore della luce blu in grado di regolare l'orologio molecolare. Una prova importante a favore di questa ipotesi sarebbe il ritrovamento di un criptocromo in grado di agire allo stesso tempo come fotoliasi e fotorecettore circadiano nello stesso organismo.

CRY è degradata dalla luce (Lin *et al.*, 2001) via proteasoma (Sathyanarayanan *et al.*, 2008) ma prima di venire degradata è in grado di legare in modo luce dipendente TIM (Ceriani *et al.*, 1999) e anche PER (Rosato *et al.*, 2001) nei neuroni orologio mediante una modifica conformazionale della sua parte C-terminale. Esprimendo una proteina CRY Δ mancante di 20 aminoacidi nella parte C-terminale è possibile ottenere una forma costitutivamente attiva in grado di legare TIM alla luce e al buio (Dissel *et al.*, 2004). Il risultato del legame tra CRY e TIM è la degradazione proteasoma dipendente di TIM che coinvolge anche JETLAG (Koh *et al.*, 2006). Un eventuale stimolo luminoso somministrato durante la fase di buio è così in grado di agire direttamente sul "core" dell'orologio endogeno nei neuroni orologio premettendo l'"entrainment" vale a dire il reset dell'orologio endogeno che può così ripartire come se il giorno fosse iniziato in quel momento. Numerosi esperimenti hanno confermato il ruolo di CRY: mosche mantenute in LL diventano aritmiche a causa della continua degradazione di TIM da parte di CRY mentre mosche *cry^b* e *cry⁰*, in cui la proteina CRY rispettivamente possiede una mutazione che la rende quasi del tutto inattiva o è del tutto assente, si mantengono ritmiche pur rimanendo sensibili all'entrainment in regimi di luce/buio probabilmente a causa delle altre vie di ricezione dello stimolo luminoso dell'apparato visivo (Emery *et al.*, 2000; Dolezelova *et al.*, 2007). Un altro fenomeno che rende conto del ruolo di CRY è la curva di risposta di fase (PRC) che descrive l'avanzamento o il ritardo di fase del ritmo circadiano in funzione del momento durante la notte in cui

viene somministrato uno stimolo luminoso. In breve se un impulso luminoso è dato all'inizio della notte (ZT15) CRY degrada TIM prima che inizi ad accumulare ritardandone l'accumulo e generando un ritardo di fase, se invece lo stimolo è dato alla fine della notte (ZT 21) TIM verrà degradato quando è già nel nucleo, anticipando un processo che sta per iniziare a causa dell'inizio del giorno con un conseguente anticipo di fase. Come atteso, in mosche mutanti *cry^b* si ritrovano PRC molto più deboli rispetto a mosche wild-type.

Per rendere le mosche totalmente insensibili alla luce bisogna eliminare tutto il sistema visivo oculare ed extraoculare e il fotorecettore CRY. Mosche mutanti per il gene *glass* (*glass^{60j}*) (mutazione che elimina tutte le componenti del sistema visivo) e allo stesso tempo *cry^b* risultano insensibili all'entrainment (Helfrich-Forster *et al.*, 2001).

1.7 Le vie di input (temperatura)

L'ambiente è in grado di intervenire sul meccanismo molecolare dell'orologio endogeno anche attraverso la temperatura. In *Drosophila* sono stati condotti degli studi sui fenomeni da heat shock indotti da esposizione transiente a 37°C. E' stato dimostrato che sottoponendo le mosche a una mezz'ora a 37°C si è in grado di generare una risposta di fase nell'attività locomotoria simile a quella ottenibile attraverso l'esposizione luminosa ed è stato suggerito che CRY possa essere coinvolta anche in questo tipo di regolazione (Sidote *et al.*, 1998; Kaushik *et al.*, 2007).

Inoltre, la temperatura compensazione risulta attenuata in mutanti al contempo per *cry^b* e *per^L*, forse per il coinvolgimento di un complesso CRY/PER/TIM nella regolazione di tale processo (Konopka, 1989; Kaushik *et al.*, 2007). Esperimenti in mosche mutanti *cry⁰* non hanno però confermato questo dato (Dolezelova *et al.*, 2007).

Drosophila possiede inoltre recettori termici nelle antenne, grazie ai quali in un gradiente termico le mosche tendono a distribuirsi uniformemente attorno ai 25°C. Questa è una sensibilità alla temperatura che non coinvolge l'orologio endogeno. E' noto che i recettori delle antenne non sono importanti nella regolazione del "clock" in quanto sia mosche in cui sono state rimosse chirurgicamente le antenne, sia mutanti dove le antenne sono trasformate in gambe (*spineless^{aristapedia}*), sia mutanti della via molecolare responsabile di questa sensibilità alla temperatura (*bizzarre*) non mostrano comportamenti ritmici diversi rispetto al wild-type (Sayeed e Benzer, 1996; Zars *et al.*, 2001).

La temperatura è in grado di agire sull'orologio endogeno anche regolando i meccanismi di splicing alternativo di alcuni geni orologio. Sono state descritte due varianti di mRNA di *per*, differenti l'una dall'altra per la presenza di un introne di 89 paia di basi situato nella regione 3' UTR (*Untranslated region*) del messaggero (Tipo A), o per la sua assenza, determinata da uno splicing temperatura sensibile dell'mRNA (Tipo B) (Cheng *et al.*, 1998; Majercak *et al.*, 1999). Altri studi hanno mostrato come questo meccanismo di splicing sia ulteriormente regolato anche dalla luce e da alcuni geni orologio (Majercak *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2004). Anche *tim* presenta due varianti di splicing della trascrizione, *tim^{normal}* e *tim^{cold}*. In *tim^{cold}* non viene rimosso a basse temperature, tramite splicing temperatura dipendente, l'ultimo introne di 858 paia

di basi, generando un codone di terminazione precoce. La proteina TIM^{COLD} è più “corta”, di 33 residui aminoacidici, rispetto alla forma TIM^{NORMAL} (Boothroyd *et al.*, 2007).

La temperatura è in grado di agire direttamente come *Zeitgeber* sull’orologio endogeno. Inizialmente venne osservato come transizioni termiche generavano rapidi aumenti dell’attività locomotoria in wild-type e mutanti per geni orologio (Wheeler *et al.*, 1993). Si dimostrò poi che in condizioni di luce costante e cicli di temperatura caldo/freddo con differenze termiche anche di solo due gradi la proteina PER è indotta a ciclare nei neuroni orologio in modo sincrono con la fase dei cicli termici (Matsumoto *et al.*, 1998). Venne scelto di osservare il comportamento in condizioni di LL poiché in queste condizioni l’orologio endogeno luce regolato non è in grado di funzionare a causa dell’azione di CRY. Inoltre sono stati prodotti alcuni dati che sembrano indicare che CRY non influenzi la ritmicità indotta da temperatura (mutanti *cry^b* in DD con cicli caldo/freddo presentano normali cicli in fase di PER e TIM come i wild-type) (Stanewsky *et al.*, 1998).

Mosche wild-type e mutanti per geni orologio sono state testate anche in cicli caldo/freddo con differenti periodi (da 8 a 32 ore) sia in luce che in buio costante. Solo nei wild-type e non nei mutanti (*per⁰*, *tim⁰*, *clock^{jerk}*, *cyc⁰*) l’attività locomotoria ha mostrato ritmi in fase con i diversi periodi caldo/freddo anche se solamente in condizioni di LL (Yoshii *et al.*, 2002) e non in DD. In LL la ritmicità indotta dalla temperatura sembra essere più evidente forse per un eventuale ruolo non chiarito di CRY assente in LL ma presente in DD. E’ stato anche dimostrato che in luce costante, con una variazione termica di dieci gradi (30°C/20°C) mosche wild-type hanno mostrato un picco di attività ritmico ogni 21,5 ore a differenza dei principali mutanti orologio *per⁰*, *tim⁰*, *clock^{jerk}* e *cyc⁰¹*. (Yoshii *et al.*, 2007).

Si sono poi ricercati geni specifici, in grado di bloccare l’effetto di entrainment temperatura dipendente. Allo scopo sono stati utilizzati degli screening su linee aventi una luciferasi guidata dal promotore di *per* come reporter. L’assenza di sincronizzazione del ciclare del segnale della luciferasi con i vari cicli caldo/freddo testati sia in luce che buio costante è stato scelto come indizio della mutazione cercata. Con questa metodologia è stato trovato il mutante del gene *nocte* (*no circadian temperature entrainment*) che non presenta difetti nel funzionamento dell’orologio circadiano luce regolato. Il locus *nocte* si trova sul gene X e codifica una proteina di 2300 aminoacidi di funzione sconosciuta. Una mutazione in grado di manifestare lo stesso fenotipo coinvolge il gene *norppA* già noto per il suo coinvolgimento nella fototrasduzione del segnale luminoso e nell’entrainment luce regolato (Glaser e Stanewsky, 2005). Recentemente è stato osservato come una sottoespressione di *nocte* limitata a determinati recettori neuronali chiamati organi ch, sia in grado di determinare la perdita della capacità di sincronizzarsi per effetto di cicli di temperatura (Glaser *et al.*, 2009)

Ulteriori studi sono stati condotti per verificare quali neuroni orologio siano direttamente coinvolti nell’entrainment temperatura indotto. Con mutanti *Pdf⁰¹* (*Pdf*, *Pigment dispersing factor*, è una delle principali molecole conosciute che regola l’output dell’orologio endogeno) o eliminando mediante apoptosi indotta le cellule che esprimono *Pdf* (vale a dire i neuroni orologio laterali), l’orologio è in grado di sincronizzarsi perfettamente a cicli di temperatura imposti (Busza *et al.*, 2007).

Analogamente in mutanti *disco* che eliminano gran parte del sistema visivo e i neuroni orologio ma mantengono i neuroni orologio dorsali e gli LPN (neuroni laterali posteriori) si mantiene la capacità di sincronizzazione termica (Zerr *et al.*, 1990; Yoshii *et al.*, 2005). In esperimenti ove cicli di luce/buio sono stati sovrapposti a cicli termici con uno sfasamento di sei ore rispetto ai primi, si è osservato come TIM cicli seguendo la fase dei cicli termici nei neuroni dorsali e nei neuroni laterali posteriori (LPN) che sembrano dunque svolgere un ruolo cruciale nel regolare l'orologio mediante segnali termici (Miyasako *et al.*, 2007).

1.8 Le vie di output

Il “core” dell'orologio endogeno circadiano è in grado di “misurare” il tempo e dettare tutta una serie di trasformazioni molecolari (output) che regolano a loro volta i fenotipi circadiani. I “clock controlled genes” (ccg) vengono identificati attraverso la ricerca di mutazioni in grado di impedire che venga mantenuto un fenotipo ritmico circadiano nel contesto di un “core” molecolare perfettamente funzionante dove i geni orologio vengono trascritti e tradotti correttamente. Uno dei principali geni responsabili dell'output in *Drosophila* è il gene *Pdf* (*Pigment dispersing factor*). PDF è stato studiato inizialmente nei granchi (Rao e Riehm, 1993) dove genera una dispersione di granuli nel sistema visivo. L'espressione del gene è costitutiva ma controllata da *clk* e *cyc* (Renn *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000) mentre la proteina è costituita da un peptide segnale seguito dai 18 aa del PDF maturo e da un segnale di α amidazione (Shirasu *et al.*, 2003). L'espressione è ciclica a livello delle terminazioni assonali di alcuni importanti neuroni orologio mentre si mantiene costante nei loro corpi cellulari (Park *et al.*, 2000). PDF è espresso prevalentemente nei neuroni orologio laterali ventrali ed opera un ruolo cruciale nel coordinare le oscillazioni delle molecole nei diversi neuroni del network circadiano (Peng *et al.*, 2003) (Fig. 9). I mutanti nulli *Pdf⁰¹* mostrano un'attività locomotoria pressoché normale in condizioni di LD 12:12 caratterizzata però da un debole picco mattutino e un avanzamento del picco serale. In DD i mutanti mantengono la ritmicità per qualche giorno diventando poi aritmici. Il gene *Pdf* non ha omologie con geni di mammifero, ma il suo recettore *pdfr* (Hyun *et al.*, 2005; Lear *et al.*, 2005; Mertens *et al.*, 2005) presenta similarità con VPAC2, il recettore di VIP (vasoactive intestinal polipeptide) in mammifero, essenziale per il mantenimento delle ritmicità nel topo.

Tra le altre molecole coinvolte nell'output dell'orologio endogeno in *Drosophila* segnaliamo la protein chinasi dipendente dal cAMP (PKA) i cui mutanti in DD sono aritmici pur mantenendo una normale oscillazione di PER (Levine *et al.*, 1994; Majercak *et al.*, 1997). Anche mutanti per il gene *dunce* che codifica una fosfodiesterasi cAMP specifica possiedono un periodo ridotto dell'attività locomotoria in condizioni di buio costante e sono meno sensibili all'entrainment luce mediato (Levine *et al.*, 1994). La mutazione del gene *dfmr1* (*Drosophila fragile X mental retardation*), omologo del gene associato nell'uomo alla sindrome dell'X fragile, denota comportamenti ritmici anomali con alternanza di iperattività locomotoria e momenti di inattività (Dockendorff *et al.*, 2002). Mutanti nulli per *Nf1*, gene della Ras GTPasi neurofibromina, sono

aritmici implicando la via del segnale Ras/MAPK nell'orologio circadiano. I livelli di MAPK (mitogen-activated protein kinase) risultano ridotti anche nei mutanti *per⁰*, *tim⁰* e *Pdf⁰¹* (Williams *et al.*, 2001a).

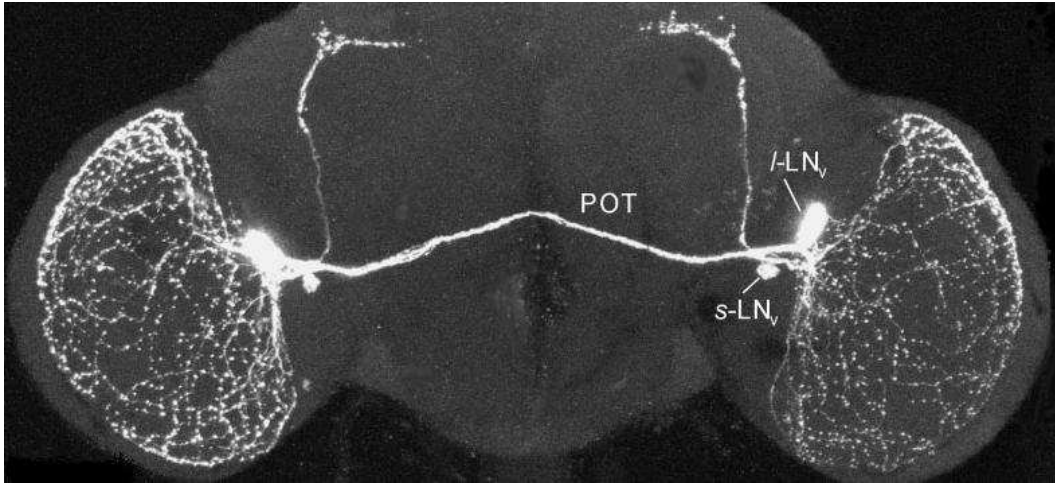


Fig. 9: Immagine al microscopio confocale di un cervello di adulto di *Drosophila melanogaster* marcato con un anticorpo specifico per la proteina PDF. In evidenza il reticolo neurale che collega i principali neuroni circadiani ventrali e dorsali. I-LN_v, neuroni laterali ventrali grandi; s-LN_v, neuroni laterali ventrali piccoli; POT, tratto ottico posteriore (Helfrich-Forster., 2003).

Un altro gene coinvolto nell'output dell'orologio, con effetti però sul fenotipo circadiano della schiusa pupale, è *lark*. LARK è una proteina con una regione di legame per l'RNA i cui livelli oscillano nelle 24 ore con un massimo a metà del giorno e un minimo a metà della notte (McNeil *et al.*, 1998). Individui eterozigoti con una sola copia di *lark* funzionante mostrano un'anticipazione della schiusa pupale mentre individui con più copie di *lark* nel loro genoma ritardano la schiusa (McNeil *et al.*, 1998; Newby e Jackson, 1996). LARK sembra interagire con FMRP (fragile X mental retardation protein) regolando il comportamento circadiano (Sofola *et al.*, 2008). Un'altra molecola dell'output è EBONY, espressa prevalentemente nella glia del sistema nervoso, spesso in prossimità di terminazioni nervose aminergiche. Mutanti per il gene *ebony* hanno comportamenti circadiani alterati che sono recuperati esprimendo il gene in modo specifico nella glia (Suh e Jackson, 2007).

In Tab. 1.2 elenchiamo ora le principali molecole note per essere coinvolte nell'output dell'orologio endogeno circadiano di *Drosophila melanogaster* assieme ad alcune loro caratteristiche.

Gene	Caratteristiche biochimiche	Espressione	Ruolo/fenotipo	Referenze
<i>Pigment dispersing factor (PDF)</i>	Peptide secreto	L'mRNA è espresso costitutivamente. La proteina si accumula ciclicamente nelle terminazioni assonali dei neuroni orologio laterali ventrali	Output principale del sistema endogeno circadiano	Park e Hall, 1998; Park <i>et al.</i> , 2000; Helfrich-Forster <i>et al.</i> , 2000
<i>Pigment dispersing factor receptor (PDFR)</i>	Proteina transmembrana	L'mRNA è espresso costitutivamente.	Recettore del PDF	Hyun <i>et al.</i> , 2005; Lear <i>et al.</i> , 2005; Mertens <i>et al.</i> , 2005
<i>Lark</i>	Proteina legante l'RNA	L'mRNA è espresso costitutivamente, la proteina ciclicamente	Controlla la schiusa pupale	Newby e Jackson, 1993; Newby e Jackson, 1996; McNeil <i>et al.</i> , 1998
<i>Ebony (eb)</i>	B-alanil dopamina sintetasi	L'espressione dell'mRNA e della proteina sono cicliche in condizioni di LD e DD	Regolatore dell'attività locomotoria	Suh e Jackson, 2007
<i>dunce (dnc)</i>	cAMP fosfodiesterasi	Non è noto se sia ciclica	Mutazioni in questo locus provocano difetti nel meccanismo di entrainment ed accorciano il periodo dell'attività locomotoria	Levine <i>et al.</i> , 1994; Majercak <i>et al.</i> , 1997
<i>Protein Kinasi A (PKA)</i>	Chinasi dipendente dal cAMP	Non è stata rilevata alcuna espressione ciclica	Regolatore dell'attività locomotoria	Levine <i>et al.</i> , 1994; Majercak <i>et al.</i> , 1997
<i>dCREB2</i>	Fattore trascrizionale	L'espressione dell'mRNA e della proteina sono cicliche	I mutanti hanno un periodo più corto nell'attività locomotoria	Belvin <i>et al.</i> , 1999
<i>Drosophila fragile X-related gene (dfmr1)</i>	Proteina legante l'RNA	L'espressione della proteina è costitutiva	I mutanti sono aritmici e hanno ridotta attività di corteggiamento	Dockendorff <i>et al.</i> , 2002; Inoue <i>et al.</i> , 2002

<i>Neurofibromatosis1 (Nf1)</i> Ras/MAPK pathway	Ras-GTPasi	Non è noto se sia ciclica	I mutanti nulli di <i>Nf1</i> mostrano difetti nel ritmo dell'attività locomotoria e un aumento dell'attività della via MAPK	The <i>et al.</i> , 1997; Williams <i>et al.</i> , 2001a
<i>Takeout (to)</i>	La proteina putativa è simile alla proteina legante l'ormone giovanile	L'espressione dell'mRNA e della proteina sono cicliche	I mutanti nulli di <i>to</i> mostrano difetti nel ritmo dell'attività locomotoria e muoiono velocemente in risposta al digiuno	Sarov-Blat <i>et al.</i> , 2000; So <i>et al.</i> , 2000
<i>Slowpoke (slo)</i>	Canale per il potassio, calcio dipendente	L'espressione dell'mRNA e della proteina sono cicliche	I mutanti sono aritmici e hanno ridotta attività di corteggiamento	Peixoto e Hall, 1998; Atkinson <i>et al.</i> , 2000; Ceriani <i>et al.</i> , 2002
<i>Numb</i>	Contiene un dominio legante la fosfotirosina	L'mRNA è espresso ciclicamente	Periodo accorciato dell'attività locomotoria	Zwalen <i>et al.</i> , 2000; Santolini <i>et al.</i> , 2000; Stempfl <i>et al.</i> , 2002
<i>Regular (rgr)</i>	Contiene un dominio C ₂ H ₂ zinc-finger	L'mRNA è espresso ciclicamente	Non noto	Scully <i>et al.</i> , 2002
<i>Clock regulated gene-1 (Crg-1)</i>	Contiene un dominio legante il DNA HNF3/fork	L'mRNA è espresso ciclicamente	Non noto	Rouyer <i>et al.</i> , 1997

Tab. 1.2: Principali geni coinvolti nell'output dell'orologio endogeno circadiano di *Drosophila melanogaster*.

1.9 Orologi molecolari in altri organismi

1.9.1 I mammiferi

L'orologio endogeno circadiano dei mammiferi presenta numerose analogie con quello precedentemente descritto per *Drosophila*. Consiste anch'esso di due loop principali. Il primo loop si compone di due elementi positivi chiamati CLOCK e BMAL1 (brain and muscle ARNT-like protein 1), omologhi di CLOCK e CYC di *Drosophila* (King *et al.*, 1997; Gekakis *et al.*, 1998; Takahata *et al.*, 1998). Questi elementi positivi contengono domini bHLH-PAS e sono in grado di accumulare nel citoplasma formando eterodimeri che traslocano poi nel nucleo dove legano le sequenze E-box degli elementi negativi codificati dai geni *period* (ne esistono tre diversi in topo, *per1*, *per2*, *per3*) e *cryptochrome* (due in topo, *cry1* e *cry2*) i cui prodotti proteici sono a loro volta in grado di dimerizzare ed entrare nel nucleo per inibire l'azione positiva del dimero CLOCK/BMAL1 chiudendo il ciclo in 24 ore (Reppert e Weaver, 2002). Il ciclo può ricominciare grazie alla specifica azione su PER e CRY di chinasi quali le casein chinasi 1 δ ed ϵ (Lee *et al.*, 2001; Reppert e Weaver, 2001). Il secondo loop coinvolge la regolazione della trascrizione del gene *bmal1* ad opera delle proteine REV-ERB α e β (Retinoic acid related orphan nuclear receptor) e ROR α , b e c (Preitner *et al.*, 2002). Questi fattori trascrizionali agiscono rispettivamente da repressore ed attivatore della trascrizione di *bmal1* agendo in competizione sulle stesse sequenze del promotore (dette ROR elements, RORE) e sono a loro volta attivati dal dimero CLOCK/BMAL1 (Sato *et al.*, 2004).

Un altro sistema di regolazione individuato a carico del dimero CLOCK/BMAL1 coinvolge le proteine DEC1 e DEC2, fattori di trascrizione in grado di inibire la formazione del dimero e regolati a loro volta dal dimero stesso in un terzo loop a retroazione negativa (Honma *et al.*, 2002; Kawamoto *et al.*, 2004). Un ultimo loop individuato di recente vede l'attivazione da parte di CLOCK/BMAL1 del gene *nampt* che codifica un enzima che controlla la biosintesi del NAD⁺, in grado a sua volta di regolare l'attività deacetilasica di SIRT1 che agisce sulla trascrizione di CLOCK e BMAL1 (Nakahata *et al.*, 2008; Nakahata *et al.*, 2009; Ramsey *et al.*, 2009). Questo ultimo loop ha permesso di integrare direttamente la funzione dell'orologio endogeno con le funzioni metaboliche cellulari considerando che SIRT1 è un regolatore del metabolismo energetico attraverso PPAR- γ e PGC1 α (Lagouge *et al.*, 2006) (Fig.10).

In relazione alle omologie presenti tra l'orologio molecolare di *Drosophila* e quello di mammifero la differenza più discussa riguarda il ruolo di TIM, che nel mammifero non sembra essere coinvolto nella generazione della ritmicità circadiana, sostituito da CRY che ha perduto la proprietà di fotorecezione. D'altra parte *tim* di mammifero presenta maggiore omologia non tanto con il gene *tim* di *Drosophila*, coinvolto nella regolazione dell'orologio circadiano quanto con *tim2*, paralogo di *tim* in *Drosophila*, che sembra essere coinvolto in alcuni aspetti della fotorecezione circadiana ma anche nel mantenimento dell'integrità cromosomica (Benna *et al.*, 2010).

Anche l'orologio circadiano di mammifero è in grado di subire entrainment attraverso stimoli luminosi che vengono percepiti attraverso il tratto retino ipotalamico dai neuroni

orologio principali situati nei nuclei suprachiasmatici (SCN) e causano l'attivazione della trascrizione di PER attraverso una risposta che coinvolge gli elementi di legame dell'AMP ciclico (CREB).

L'output dell'orologio circadiano di mammifero sembra dipendere dalla proteina CLOCK stessa. Recenti studi hanno dimostrato come tale proteina agisca anche come acetil trasferasi istonica (HAT). Con questa sua attività CLOCK è in grado di trasformare eterocromatina inattiva in eucromatina attiva permettendo l'attivazione di "clock controlled genes". Inoltre è stato dimostrato che con questa sua attività acetil trasferasica CLOCK è in grado di regolare anche la trascrizione degli stessi geni orologio *per* e *cry*, essenziali per il mantenimento della ritmicità circadiana (Doi *et al.*, 2006).

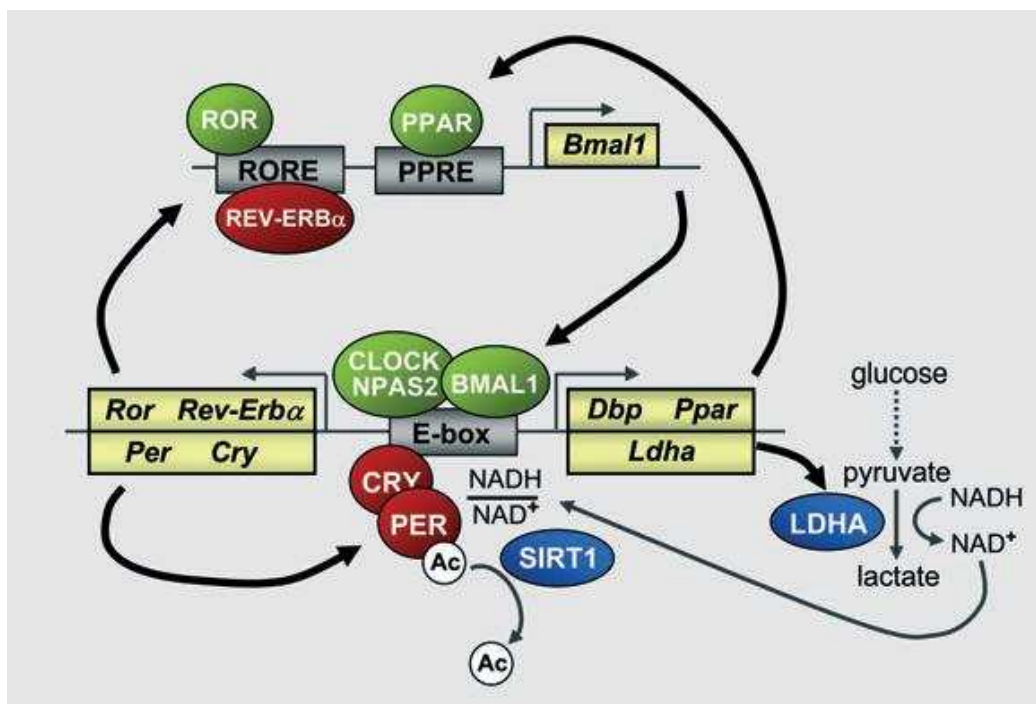


Fig. 10: Modello dell'orologio circadiano endogeno di mammifero. Il dimero CLK/BMAL1 induce la trascrizione di numerosi geni tra cui *per1*, *per2*, *per3*, *cry1*, *cry2*, *rev-erba* e *rora*. Le proteine PER e CRY rientrano nel nucleo come complesso e inibiscono la loro stessa trascrizione attraverso la repressione dell'attività di CLK/BMAL1. Questo loop circadiano principale è associato ad altri loop secondari che coinvolgono la regolazione della trascrizione di CLK attraverso i geni *dec* o geni regolatori del metabolismo come *sirt1* e *pgc1-a*.

1.9.2 *Synechococcus elongatus*

Un caso particolare costituisce l'orologio biologico circadiano dei procarioti. Non si riteneva che un orologio circadiano potesse essere utile nei procarioti poiché non si capiva quale ruolo adattativo potesse avere misurare un tempo circadiano per esseri viventi con un ciclo vitale spesso più breve di 24 ore. Dopo aver messo in luce che due processi incompatibili come la fotosintesi dell'ossigeno e la fissazione dell'azoto fossero possibili anche in cianobatteri unicellulari si scoprì anche come i due processi venissero isolati temporalmente grazie a un meccanismo molecolare endogeno in grado

di dettare il tempo: la fotosintesi è regolata in modo da prodursi durante la fase diurna mentre la fissazione dell'azoto avviene durante la notte (Mitsui *et al.*, 1986). Questo orologio endogeno procariote si è poi dimostrato regolare anche l'espressione genica (Liu *et al.*, 1995), la divisione cellulare (Mori e Johnson, 2000) e la condensazione cromosomica (Smith e Williams, 2006).

Il "core" dell'orologio endogeno dei procarioti (studiato in particolare in *Synechococcus elongatus*) è costituito da tre proteine fondamentali chiamate Kai A, B e C. Esse sono tradotte a partire dal gene *kaiA* e dal gene *kaiBC* che esprime un messaggero dicistronico in grado di tradurre sia Kai B che Kai C. L'accumulo dei tre mRNA è ciclico. I livelli della proteina Kai A sono costanti durante le 24 ore mentre Kai B e C ciclano con un picco a metà della notte soggettiva (Xu *et al.*, 2000). I tre geni *kai* e i loro rispettivi prodotti proteici sono regolati secondo il classico meccanismo a retroazione negativa che genera un loop molecolare circadiano, tuttavia è stato dimostrato che per questo orologio endogeno il ciclare della trascrizione non è un fattore necessario per regolare i fenotipi circadiani (Ishiura *et al.*, 1998). L'orologio dei cianobatteri dipende dalle modificazioni post-traduzionali delle tre proteine Kai (Xu *et al.*, 2003). Durante il giorno soggettivo Kai A induce la progressiva autofosforilazione di Kai C che può così formare un complesso con Kai A ed accumularsi. Arrivata la notte l'accumulo di Kai A/Kai C fosforilato è bloccato da Kai B che lega il complesso inducendo la defosforilazione di Kai C e la dissociazione delle tre proteine che, libere, possono avviare il ciclo successivo (Iwasaki e Kondo, 2004) (Fig. 11). Sono state identificate anche le vie di input che regolano questo oscillatore circadiano: la proteina LdpA (*light-dependent period*) regola la fase del ritmo attraverso strutture ferro-zolfo sensibili alle variazioni dello stato redox dell'organismo indotte dalle modificazioni di luminosità (Katayama *et al.*, 2003) mentre la proteina CiKA (*circadian input kinase*) è sensibile alle variazioni di temperatura (Schmitz *et al.*, 2000). Tra le proteine facenti parte dell'output dell'orologio procariote è invece nota SasA (*Synechococcus adaptive sensor*) che agisce attraverso il fattore trascrizionale RpaA (*regulator of phycobilisome*) (Takai *et al.*, 2006). Le proteine dell'input e dell'output interagiscono direttamente con l'oscillatore centrale intervenendo nello stato di fosforilazione di Kai C e formando un complesso che è stato definito periodosoma (Ivleva *et al.*, 2005; Ivleva *et al.*, 2006).

La scoperta nei procarioti di un orologio endogeno in grado di autosostenersi grazie alle sole modificazioni post-traduzionali ha aperto un dibattito molto acceso sulla necessità o meno della regolazione trascrizionale dei geni orologio negli organismi eucarioti più complessi (Dong e Golden, 2008). Già all'inizio del secolo si dimostrò che in *Drosophila* l'espressione costitutiva di *per* e *tim* non disturbava la ritmicità dell'attività locomotoria (Yang e Seghal, 2001). Esperimenti più recenti condotti da Rosbash e collaboratori (Kadener *et al.*, 2008b) hanno però mostrato come il ciclare dell'mRNA di *per* e *tim* in *Drosophila* sia importante per la regolazione della lunghezza del periodo e dell'ampiezza della ritmicità. Nell'orologio procariote la regolazione dell'mRNA sarebbe ininfluente per la minore complessità dell'organismo stesso.

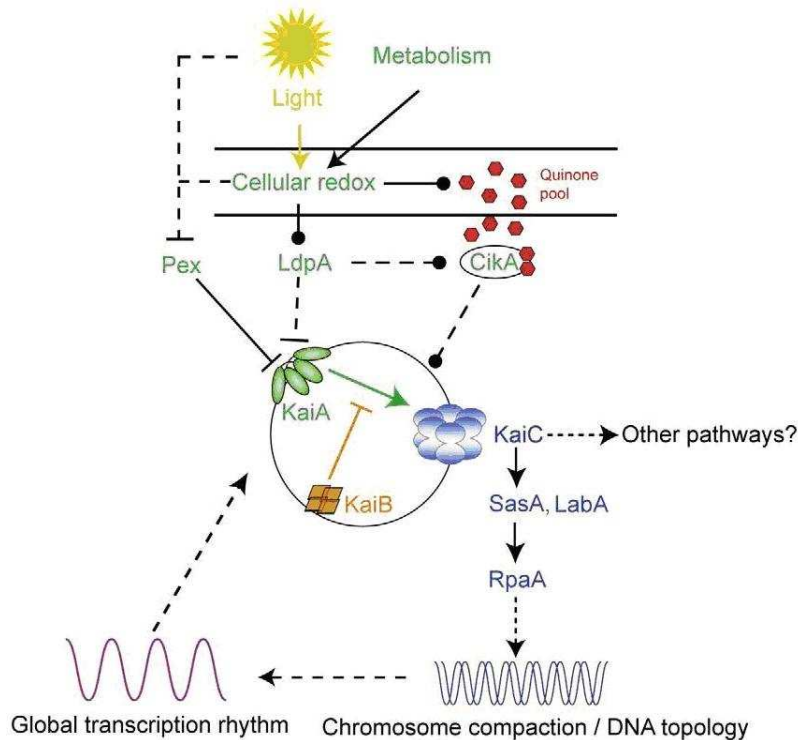


Fig. 11: Modello dell'orologio circadiano endogeno di *Synechococcus elongatus*. Le proteine Kai A, B, C in presenza di ATP sono in grado di generare la fosforilazione ciclica di Kai C. L'orologio endogeno dei procarioti è l'unico esempio di orologio molecolare in cui la trascrizione ciclica dei geni coinvolti non sembra necessaria per il corretto funzionamento dell'orologio stesso (Dong e Golden, 2008).

1.10 Organizzazione anatomica dei neuroni orologio nel cervello di *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila* il *master clock*, vale a dire l'orologio endogeno principale (*pacemaker*), è localizzato nel sistema nervoso centrale ed è organizzato in un network di circa 150 neuroni orologio che si differenziano a livello morfologico e funzionale. Questi neuroni vengono generalmente suddivisi per ogni emisfero cerebrale in 6 gruppi: 3 gruppi di neuroni dorsali (DN1, DN2 e DN3) e 3 gruppi di neuroni laterali (i neuroni laterali dorsali (LNd) e i neuroni laterali ventrali grandi e piccoli (l-LNv, s-LNv)). A questi si deve aggiungere un nuovo gruppo di neuroni circadiani che esprimono *per* e *tim* ma la cui funzione specifica è ancora poco nota, i neuroni laterali posteriori (LPN) (Yoshii *et al.*, 2005; Miyasako *et al.*, 2007) (Fig. 12). Per alcuni di questi gruppi di neuroni orologio vi è una ulteriore differenziazione:

- gli s-LNv sono cinque neuroni di cui quattro in grado di esprimere la proteina PDF (Kaneko *et al.*, 1997) e ITP (ion transport peptide) mentre il quinto è capace di esprimere solo il neuropeptideF piccolo (sNPF) (Johard *et al.*, 2009);
- gli LNd sono sei neuroni di cui solo tre in grado di esprimere CRY e altri tre (non gli stessi tre) in grado di esprimere il neuropeptide F (NPF) (Picot *et al.*, 2007). Uno di quelli che esprime NPF esprime anche ITP, mentre in quelli che esprimono CRY è stata trovata coespressione di sNPF (Johard *et al.*, 2009);

- i DN1 sono 17 neuroni di cui due in grado di esprimere CRY e l'IPN-amide ma non GLASS (chiamati DN1a) ed altri due in grado di esprimere specificamente solo CRY (indicati come DN1p) (Shafer *et al.*, 2006; Klasfeld *et al.*, 2004);
- i DN3 sono circa 40 neuroni di cui solo due CRY positivi (Helfrich-Forster *et al.*, 2007)

Le proiezioni dei neuroni circadiani si strutturano in un reticolo di prolungamenti sulla superficie dei lobi ottici che si connettono lungo la regione dorsale del cervello (Helfrich-Förster, 2005).

L'attività locomotoria è un fenotipo circadiano complesso che in condizioni di alternanza di dodici ore di luce e dodici ore di buio a temperatura costante si presenta con due picchi di attività principali in corrispondenza delle transizioni luminose identificabili come il mattino e la sera. Il complesso network neuronale descritto controlla in maniera indipendente l'attività mattutina da quella serale. I picchi del mattino e della sera sono in grado di modificare la loro fase in relazione al fotoperiodo (cioè l'allungarsi e l'accorciarsi del giorno durante l'anno) grazie all'azione di due oscillatori indipendenti in grado di decelerare (morning oscillator) od accelerare (evening oscillator) all'aumentare delle ore di luce (Pitterdigh, 1967; Pitterdigh e Daan, 1976). In *Drosophila* due subset neuronali distinti all'interno del network sopra descritto sono stati associati al controllo dell'attività mattutina e serale: i quattro s-LN_v che esprimono PDF sono responsabili dell'attività mattutina (morning oscillator) mentre gli LN_d e l's-LN_v PDF negativo regolano l'attività serale (evening oscillator) (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004). L'orologio endogeno è stato suddiviso in due distretti neuronali fondamentali (***Morning clock cells*** e ***Evening clock cells***) ciascuno con un orologio molecolare funzionante capace di regolare in modo indipendente l'attività mattutina o quella serale (Grima *et al.*, 2004). Le *M-cells* rappresentano inoltre il *master clock* capace di mantenere la ritmicità circadiana in condizioni di buio costante (*free running*) anche in assenza di un orologio molecolare funzionante nelle *E-cells*. Altri esperimenti hanno mostrato poi come un orologio molecolare funzionante solo nelle *E-cells*, ma non nelle *M-cells*, sia in grado di mantenere la periodicità in condizioni di luce costante. Questo ha fatto presupporre che gli orologi molecolari delle *M-cells* e delle *E-cells* potessero darsi il cambio nel regolare la ritmicità primeggiando i primi con fotoperiodi brevi in prevalenza di buio (stagione invernale), i secondi con fotoperiodi lunghi, tipicamente estivi (Stoleru *et al.*, 2007). Si è dimostrato come sia possibile regolare la fase del ritmo circadiano, agendo specificamente sulle *M-cells*, in esperimenti in cui le mosche sono sottoposte a fotoperiodi brevi e come si debba invece intervenire sulle *E-cells* qualora si lavori con fotoperiodi lunghi. Si è potuto ottenere un orologio molecolare funzionante in condizioni di luce costante grazie alla scoperta di una specifica funzione della proteina SHAGGY nelle *E-cells*, dove tale proteina è in grado di inibire la degradazione luce indotta di TIM da parte della flavoproteina CRY (Naidoo *et al.*, 1999). Questi studi spingono a considerare l'orologio endogeno non più solo come un meccanismo utile ad anticipare le variazioni ambientali circadiane, ma come un vero e proprio sistema in grado di regolare il comportamento in relazione alla lunghezza del giorno nelle diverse stagioni.

Studi recenti hanno indagato l'attività locomotoria di *Drosophila* e il funzionamento dell'orologio endogeno in condizioni di particolari regimi luce/buio dove al posto di una

notte completamente buia si mima la presenza di luce lunare (0.003 - 0.03 lux). Wild-type e mutanti per geni orologio mostrano un significativo spostamento dell'attività durante la fase notturna leggermente illuminata. La fase dell'attività mattutina subisce un avanzamento mentre la fase serale ritarda. Il processo è orologio indipendente e sembra dovuto ad effetti di masking. A livello molecolare regimi di luce/luce lunare causano il variare della fase nel ciclo di PER e TIM in alcuni neuroni orologio attraverso un processo mediato dalle rodopsine ma indipendente da CRY (Bachleitner *et al.*, 2007; Kempinger *et al.*, 2009; Rieger *et al.*, 2009).

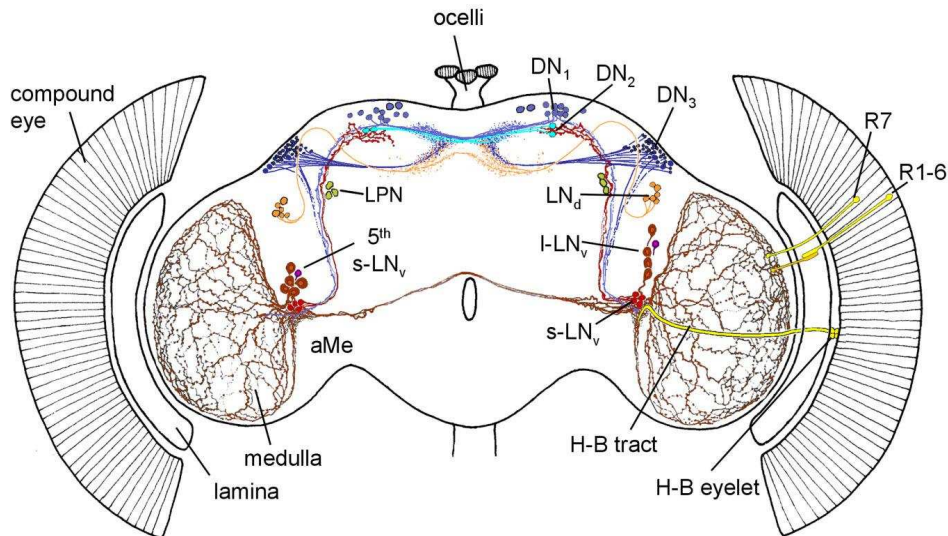


Fig. 12: Rappresentazione del sistema nervoso centrale (SNC) e dei principali cluster neuronali del master clock di *Drosophila melanogaster* (DN, LN_d, LN_v, LPN). Sono rappresentate inoltre le principali vie di ricezione degli stimoli luminosi (occhi composti, ocelli e organo di Hofbauer-Buchner).

1.11 Orologi periferici in *Drosophila melanogaster*

I due principali fenotipi circadiani in *Drosophila*, l'attività locomotoria e la schiusa pupale, sono controllati dall'attività molecolare di neuroni orologio siti nel cervello della mosca. Esistono però tutta una serie di tessuti nei quali sono stati identificati degli oscillatori indipendenti che vengono chiamati "orologi periferici" (Plautz *et al.*, 1997). Nei mammiferi è noto come gli orologi periferici siano orologi "schiavi" dell'orologio principale presente nel sistema nervoso centrale che detta la fase del ritmo, mentre in *Drosophila* gli orologi periferici sembrano indipendenti dal master clock e capaci di regolare alcuni fenotipi circadiani come l'attività fisiologica del nervo antennale (Krishnan *et al.*, 1999), la sensibilità agli odori (Krishnan *et al.*, 1999) e il rilascio dello sperma (Beaver *et al.*, 2002).

L'orologio periferico più studiato è quello associato alle vie di input sensorie delle antenne. L'attività del nervo antennale è ritmica e questa ritmicità è persa in mutanti *per⁰* e anche in contesto *per⁰* in cui l'orologio principale funziona correttamente (Frish *et al.*, 1994). Questo orologio periferico non funziona anche in mutanti *cry^b* facendo ipotizzare un ruolo particolare per CRY nella struttura molecolare degli orologi periferici (Hardin *et al.*, 1994; Krishnan *et al.*, 2001).

1.12 Varianti alleliche di geni orologio

Si ritiene che la specie *Drosophila melanogaster* si sia originata nell'Africa sub sahariana e si sia poi diffusa in tutto il mondo circa 10-15 mila anni fa (David e Capy, 1988). Le mosche si sono dovute adattare a diverse condizioni di temperatura e fotoperiodo con una conseguente possibile evoluzione dei diversi geni orologio. Alcuni esempi di questa evoluzione sono stati ritrovati in natura.

Il gene *per* in *Drosophila melanogaster* presenta regioni ripetitive ACNGGN che codificano una serie di ripetizioni Thr-Gly altamente polimorfiche in lunghezza (Costa e Kyriacou, 1998). Ogni tripletta Thr-Gly forma un β -turn (Castiglione-Morelli *et al.*, 1995). Il numero di ripetizioni possibili riscontrate negli alleli naturali varia da 14 a 24, tuttavia le forme più frequenti in Europa e Australia possiedono 14, 17, 20 o 23 ripetizioni (Costa *et al.*, 1992; Sawyer *et al.* 2006). La distribuzione degli alleli più frequenti (con 17 o 20 ripetizioni) segue un cline latitudinale dove la variante Thr-Gly₁₇ prevale nel sud Europa rispetto alla variante Thr-Gly₂₀ che predomina nel nord (Costa *et al.*, 1992). Studi comportamentali hanno svelato come la variante allelica di *period* contenente 20 ripetizioni Thr-Gly abbia un periodo di 23.7 ore in free running e sia maggiormente temperatura compensata rispetto alla variante che ne contiene solo 17 che presenta un periodo di circa 24 ore ma che si accorcia notevolmente alle basse temperature (Sawyer *et al.*, 1997). La diffusione della variante Thr-Gly₂₀ nel nord Europa è stata spiegata come un adattamento alle temperature più fredde e variabili tipiche di quelle latitudini mentre la seconda variante si è potuta diffondere meglio a basse latitudini europee caratterizzate da temperature più stabili durante l'anno.

E' stato identificato un polimorfismo di lunghezza nella regione codificante in 5' del gene *tim* di *Drosophila* (Fig. 13). Tale polimorfismo consiste nella possibile inserzione di una guanina (G) in posizione 294 del gene. Quando è presente la guanina la sequenza di *tim* è tale per cui vi sono due siti alternativi di inizio della traduzione poco distanti tra loro (ATG) e di conseguenza due possibili proteine (chiamate "long", di 1421aa, e "short", di 1389 aa), che differiscono di 23 aminoacidi, possono essere tradotte (allele *ls-tim*). Quando la guanina non è presente tra i due ATG si forma un codone di terminazione che impedisce alla forma lunga di *tim* di formarsi mentre la forma corta viene normalmente tradotta (allele *s-tim*). Le due varianti alleliche si distribuiscono in un cline latitudinale per il quale la variante *ls-tim* è maggiormente presente nel sud Europa mentre la variante *s-tim* si ritrova con maggiore frequenza nel nord Europa. Alle due varianti alleliche è stata associata una diversa capacità delle femmine di entrare in diapausa: in risposta all'abbassarsi della temperatura femmine di genotipo *ls-tim* sono in grado di entrare in diapausa maggiormente, anche con fotoperiodi più lunghi, mostrando una minore sensibilità alla luce. Questa insensibilità alla luce è stata confermata anche dimostrando una ridotta risposta di fase a stimoli luminosi del genotipo *ls-tim* rispetto a *s-tim* che è stata messa in relazione a una maggiore affinità di legame tra la variante S-TIM e CRY. L'allele *ls-tim* consentirebbe quindi un miglior adattamento a climi nordici dove temperature basse sono presenti anche a fotoperiodi lunghi (è necessario entrare in diapausa anche con fotoperiodi lunghi!) e sembra infatti che il genotipo stia via via diffondendo verso nord (Sandrelli *et al.*, 2007; Tauber *et al.*, 2007).

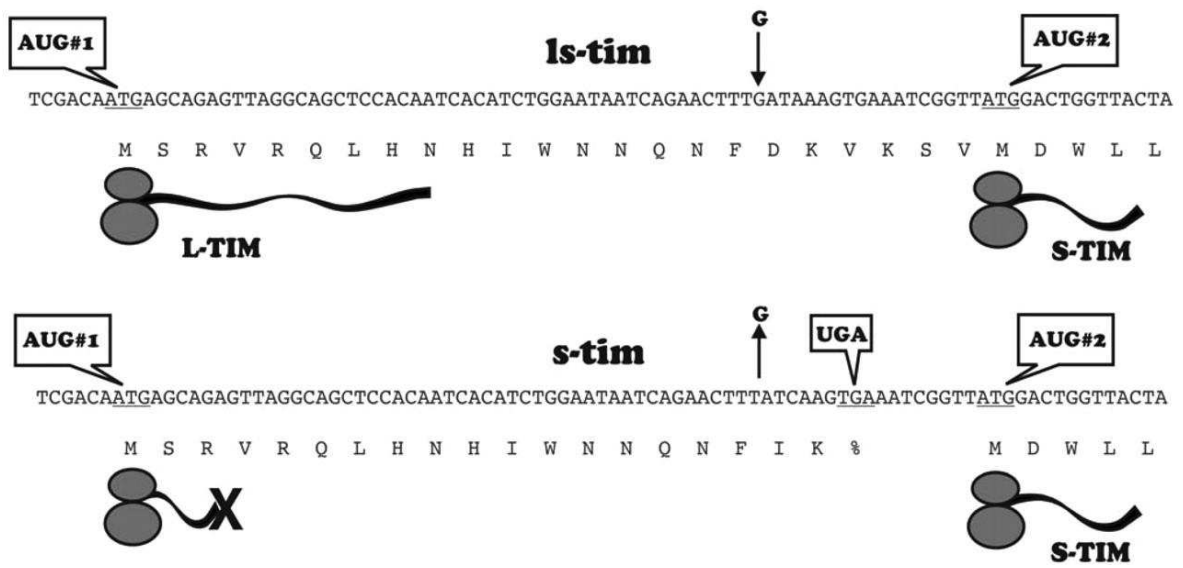


Fig. 13: Rappresentazione schematica del processo di traduzione della porzione N-terminale della proteina TIM in presenza o assenza della guanina (G) in posizione 294.

Il progetto di ricerca

L'attività locomotoria in *Drosophila melanogaster* è uno dei fenotipi circadiani importanti regolati dall'orologio endogeno ed è usato da oltre trent'anni per dissezionare i pathway molecolari che regolano la ritmicità endogena del moscerino (Rosato e Kyriacou, 2006). Questi studi sono stati condotti sino ad ora in laboratorio in condizioni controllate, registrando l'attività locomotoria di mosche mantenute a temperatura costante o variabile (con transizioni rettangolari) e sottoposte a diversi fotoperiodi luminosi nei quali la transizione dalla luce al buio (e viceversa) è pressoché istantanea (Dunlap, 1999; Rieger *et al.*, 2003; Glaser e Stanewsky, 2005). Nessun dato di attività è mai stato analizzato registrando il movimento delle mosche in un ambiente naturale, dove la temperatura varia costantemente durante il giorno e dove le transizioni luminose sono lente e progressive. D'altra parte in natura il buio notturno non è molto spesso una totale oscurità a causa della presenza della luce lunare e il variare dello spettro luminoso durante le fasi dell'alba e del tramonto potrebbe influenzare l'orologio endogeno in modo non facilmente valutabile in esperimenti di laboratorio. Svelati i principali pathway molecolari circadiani in laboratorio risulta fondamentale oggi andare ad indagare se questi si confermano in ambiente naturale che, come detto, si discosta non poco dalle condizioni di laboratorio. Il mio lavoro di tesi si inserisce all'interno di un progetto europeo chiamato Euclock (Entrainment of the circadian clock; Sub-project 3: Entrainment in flies; Workpackage 3.1: Natural entrainment) che coinvolge diversi laboratori in Europa con l'obiettivo di studiare in natura i ritmi endogeni in diversi organismi modello. Questa tesi è stata condotta nell'ambito di una collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. C.P. Kyriacou dell'Università di Leicester (U.K.). L'obiettivo è stato quello di indagare l'orologio circadiano endogeno di *Drosophila melanogaster* in condizioni naturali. Sono stati studiati i fenotipi comportamentali di linee naturali wild-type e dei principali "mutanti orologio" conosciuti durante stagioni diverse caratterizzate da diverse condizioni di fotoperiodo e temperatura. In particolare è stato analizzato in dettaglio il comportamento e l'anticipo delle attività mattutina e serale in relazione alle condizioni ambientali esterne. A livello molecolare sono stati tracciati i profili trascrizionali per i geni *per* e *tim* in condizioni di laboratorio a diverse temperature costanti e in diverse condizioni ambientali naturali, analizzando anche il variare "temperatura dipendente" della proporzione delle due diverse varianti di splicing della trascrizione note per i due geni (Majercak *et al.*, 1999; Majercak *et al.*, 2004; Boothroyd *et al.*, 2007).

Drosophila melanogaster è stata recentemente utilizzata anche come modello per lo studio del sonno e dei suoi disturbi. Il sonno nei mammiferi è il risultato dell'interazione tra un processo omeostatico e uno circadiano. Tutte le caratteristiche proprie del sonno in mammifero come la postura, la diminuzione del livello di attenzione e l'insorgere di una soglia di risveglio sono state riconosciute e ridefinite per le mosche (Hendricks *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2000). Studi recenti hanno inoltre dimostrato come la deregolazione cronica del sonno si traduca in conseguenze negative per la salute aumentando il rischio di cancro e di molte malattie legate al sonno (Cho, 2001; Knutsson, 2003; Rafnsson *et al.*, 2001; Esquirol *et al.*, 2009; Puttonen *et al.*, 2010). La seconda parte del mio lavoro di tesi ha cercato di definire un modello per applicare e studiare gli effetti della turnazione nel lavoro (shift-work cronico) nelle mosche. È stata costruita un'apparecchiatura per mimare con le mosche regimi artificiali di shift-work. Le analisi condotte hanno mostrato che lo shift-work cronico nelle mosche produce effetti negativi sulla sopravvivenza e su alcuni fenotipi

comportamentali associati alla percezione visiva del movimento. Nel loro insieme i risultati ottenuti hanno dimostrato come *Drosophila* possa essere considerata un buon modello per questo tipo di studi.

Capitolo 2

Attività locomotoria in condizioni naturali

2.1 Introduzione

L'attività locomotoria di *Drosophila* è stata studiata negli ultimi quarant'anni in laboratorio per ottenere informazioni a livello genetico e molecolare circa il funzionamento dell'orologio endogeno circadiano. Le condizioni sperimentali di laboratorio prevedono solitamente cicli di luce/buio rettangolari, vale a dire regimi luminosi in cui il passaggio dalla situazione luminosa a quella buia e viceversa è istantaneo, e condizioni di temperatura costante. In natura invece i moscerini sono sottoposti a variazioni continue e complesse dei parametri ambientali.

I dati riportati in questo capitolo descrivono per la prima volta il comportamento locomotorio di *Drosophila melanogaster* in un ambiente naturale. Le registrazioni sono state effettuate in diverse stagioni a partire dal mese di Marzo fino a Novembre, al fine di indagare il maggior numero di situazioni termiche e luminose naturali (fotoperiodi diversi). I mesi invernali sono stati esclusi in quanto a basse temperature *Drosophila* entra in diapausa. L'attività è stata registrata in due diverse località: Padova e Leicester (Inghilterra). Gli effetti di regimi naturali di luce e temperatura sono stati valutati su maschi wild-type (WTALA, Canton S e HU) e sulle principali linee mutanti per geni orologio già caratterizzate in laboratorio. Per la linea wild-type WTALA sono stati analizzati anche gli effetti della luce lunare (confrontandoli con le conclusioni cui si era giunti mimando tali condizioni in laboratorio; Bachleitner *et al.*, 2007; Kempinger *et al.*, 2009; Rieger *et al.*, 2009) e le conseguenze della socialità (interazioni maschio/maschio, maschio/femmina, femmina/femmina; Fujii *et al.*, 2007).

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Linee di *Drosophila melanogaster*

Le linee di *Drosophila melanogaster* utilizzate negli esperimenti sono state le seguenti:

Linee selvatiche:

- WTALA (Wild Type ALto Adige): linea selvatica ottenuta a partire da femmine fecondate di *D. melanogaster* prelevate nei mesi di Settembre/Ottobre 2004 in differenti località in Alto Adige a quote comprese tra i 250 e i 590 metri s.l.m. alla latitudine di 46°N (Tab. 2.1).

Area di campionamento	Sito di campionamento (altitudine s.l.m.)	Numeri di linee isofemminili	Sub-totale
Val Venosta Merano (BZ)	Naturno (590 metri)	7	20
	Foresta (Lagundo) (380 metri)	3	
	Foresta-2 (460 metri)	2	
	Postal (280 metri)	8	
Bassa Val Venosta	Bolzano (250 metri)	17	17

Tab. 2.1: Linea WTALA (Wild Type ALto Adige): è una popolazione “naturale” allestita per gli esperimenti di laboratorio e in condizioni naturali, a partire da due femmine fecondate per ciascuna delle linee isofemminili indicate in tabella.

- Canton S: linea derivata da mosche raccolte a Canton, in Ohio (U.S.A.), negli anni Trenta del secolo scorso (Bridges e Brehme, 1944); è una linea utilizzata normalmente come controllo wild-type.
- HU: linea derivata da mosche raccolte a Houten, in Olanda, tra Agosto e Novembre 2000 alla latitudine di circa 52°N (Tauber *et. al.*, 2007).

Linee mutanti:

Molte linee mutanti sono state create mutagenizzando la linea wild-type Canton S. Tuttavia, dato il fatto che ormai da decenni le linee si riproducono in laboratorio e sono state incrociate molto spesso anche con linee bilanciatrici, il loro background genetico può considerarsi eterogeneo.

- w^{1118} : linea caratterizzata dalla perdita di funzione del gene *white* (Zachar e Bingham, 1982).
- per^{01} : linea caratterizzata dalla perdita di funzione del gene *period*. Una sostituzione nucleotidica a livello del quarto esone genera un codone di terminazione prematuro (Yu *et al.*, 1987).
- per^S : linea caratterizzata da una mutazione missenso che genera una sostituzione dell'aminoacido 589 della proteina PER (Ser → Asn) (Yu *et al.*, 1987). Le mosche per^S hanno un periodo di circa 19 ore in condizioni di buio costante (Konopka e Benzer, 1971) e mostrano un onset dell'"evening peak" anticipato rispetto al wild-type in condizioni LD 12:12 (Hardin *et al.*, 1990).
- per^L : linea caratterizzata da una mutazione missenso (Val 243 → Asp) nella regione del domino PAS di PERIOD. In condizioni di buio costante queste mosche hanno un periodo di circa 29 ore (Konopka e Benzer, 1971; Baylies *et al.*, 1987).
- tim^{01} : linea mutante con perdita di funzione del gene *timeless*. Una delezione di 64 basi nell'esone 7 genera un frame-shift di lettura con la formazione di un codone di terminazione prematuro. La linea è in grado di esprimere una forma troncata della proteina TIM di circa 700 aminoacidi (Myers *et al.*, 1995).
- tim^{03} : linea mutante con perdita di funzione del gene *timeless*. La mutazione è stata ottenuta attraverso una mutagenesi via EMS (etilmetanosulfonato). La linea non esprime la proteina TIM (Stanewsky *et al.*, 1998, Stempfl *et al.*, 2002).
- $per^{01};tim^{01}$: linea generata in laboratorio contenente le mutazioni per perdita di funzione su entrambi i geni orologio *per* e *tim* (Collins *et al.*, 2005).
- $clock^{jerk}$: linea mutante del gene orologio *clock*. Il gene contiene una mutazione che genera un codone di terminazione prematuro. Aritmica in condizioni di buio costante (Allada *et al.*, 1998).
- Pdf^{01} : linea mutante del gene *Pdf* (*Pigment-dispersing factor*). Il gene contiene una mutazione non senso nella regione codificante (Renn *et al.*, 1999).
- cry^0 : linea caratterizzata dalla perdita di funzione del gene *cryptochrome*. L'intera regione genica di *cry* è stata rimpiazzata con mini-*white*⁺ mediante ricombinazione omologa (Dolezelova *et al.*, 2007).
- $w; UAS-cycA103; +$: linea transgenica contenente un elemento P inserito nel secondo cromosoma in grado di far esprimere una forma mutata del gene *cycle* attraverso l'incrocio con una linea driver esprimente la proteina GAL4. La proteina CYCA eventualmente espressa manca del dominio di legame con il DNA ed è in grado di legare CLOCK ma non di agire da attivatore trascrizionale. In sostanza la sua espressione nelle cellule blocca il corretto funzionamento dell'orologio in esse agendo come un dominante negativo (Tanoue *et al.*, 2004).
- $yw, UAS-hid, UAS-reaper; +; +$: linea transgenica contenente un elemento P inserito nel cromosoma sessuale X in grado di far esprimere i geni *head involution defective* (*hid*) e *reaper* attraverso l'incrocio con una linea driver

esprime la proteina GAL4. *hid* e *reaper* sono geni pro-apoptotici di *Drosophila* in grado di indurre morte cellulare programmata ove espressi (Hsu *et al.*, 2002).

- *yw; pdfGal4*; +: linea transgenica in grado di esprimere la proteina GAL4 sotto la guida del promotore del gene *pdf* (principalmente nei neuroni laterali ventrali).
- *yw; timGal4*; +: linea transgenica in grado di esprimere la proteina GAL4 sotto la guida del promotore del gene *timeless* (sostanzialmente in tutti i neuroni orologio noti).

2.2.2 Mantenimento delle linee di *Drosophila*

I ceppi di *Drosophila* sono mantenuti in tubi di polistirolo cristallizzato atossico (diametro: 3.5 cm, altezza: 8 cm) tappati con gommapiuma, contenenti circa 10 ml di terreno nutritivo così composto:

- 12 g di agar;
- 44 g di estratto di lievito;
- 44 g di zucchero;
- 1 l di acqua.

Le colture sono state mantenute in un incubatore ad una temperatura di 23°C e in condizioni di illuminazione di circa 1000 lux con ciclo LD 12:12.

2.2.3 Registrazione dell'attività locomotoria

Singoli maschi di non più di quattro giorni di vita sono stati inseriti in piccoli tubi di vetro di 0.4 cm di diametro e 6.5 cm di lunghezza. L'estremità inferiore del tubo è chiusa dalla presenza di 1-2 cm di terreno nutritivo mentre l'estremità superiore è tappata con cotone. Questi tubi sono inseriti nei canali dei monitor per la registrazione dell'attività locomotoria del sistema DAMSystem© (*Drosophila* Activity Monitoring System©) (Trikinetics Inc, Waltham, MA, USA). Le schede di registrazione (DAM, *Drosophila* Activity Monitor©) contengono 32 tubini ciascuna e sono connesse, tramite gli appositi cavi, ad un computer, utile per la gestione dell'esperimento e l'immagazzinamento dei dati. Un raggio infrarosso attraversa ogni canale di ciascun monitor e ogni volta che una mosca muovendosi interrompe il normale flusso del raggio, viene registrato un evento di attività locomotoria. Gli eventi di attività locomotoria sono raccolti ogni cinque minuti e poi sommati ogni trenta minuti (1 bin=30 minuti). I monitor sono stati posizionati all'interno di incubatori termostatici equipaggiati con luci in grado di accendersi e spegnersi secondo diversi programmi in accordo con i regimi luce/buio cui sottoporre le mosche durante l'esperimento. Per raccogliere dati in condizioni naturali una stazione di registrazione è stata posta nell'ambiente esterno lontano da luci artificiali e protetta dagli agenti atmosferici. I monitor sono stati protetti dalla luce solare diretta. Per valutare l'eventuale incidenza di segnali di locomozione "spuri" in ogni monitor alcuni canali, scelti casualmente e sempre diversi, sono stati lasciati vuoti per verificare che non segnalassero attività.

2.2.4 Registrazione dei parametri ambientali

Ogni esperimento di registrazione di attività locomotoria, in laboratorio o in condizioni naturali, prevede anche il monitoraggio dell'intensità della luce (misurata in lux) e della temperatura (°C). Un monitor ambientale (DEnM, Trikinetics Inc) è stato utilizzato a questo scopo. La temperatura media diurna è stata calcolata come media dei valori di temperatura registrati dal monitor ambientale DEnM durante i bin con intensità luminosa maggiore di zero. La temperatura media notturna è stata calcolata come media dei valori di temperatura registrati dal monitor ambientale DEnM durante i bin con intensità luminosa uguale a zero. Il fotoperiodo è stato calcolato come il numero di ore aventi intensità luminosa maggiore di zero.

2.2.5 Analisi dei dati

I dati di attività locomotoria registrati dal *software* TriKinetics (DAMsystem 2.1.3) sono stati convertiti in un foglio elettronico Excel utilizzando il programma *Parser*, scritto dal Prof. M.A. Zordan (Dipartimento di Biologia, Università di Padova). Una volta importati in Excel, i dati sono stati organizzati secondo il numero di scheda, il numero dei canali ed il genotipo a cui si riferiscono. In ogni foglio contenente i dati provenienti dalle schede di registrazione, oltre al tempo che segna il corso dell'esperimento, sono state riportate le informazioni riguardanti la quantità di luce e la temperatura media relative a ciascun intervallo di tempo. Per ogni intervallo di tempo considerato (*bin*) è stata calcolata l'attività locomotoria media (considerando nella media solo le mosche sopravvissute fino alla fine dell'esperimento di registrazione dell'attività), che è stata poi riportata in forma grafica per visualizzarne l'andamento, in relazione alle variabili ambientali e al tempo. Nelle analisi svolte sono stati impiegati *bin* da 30 minuti. L'andamento dell'attività di ogni singola mosca è stato riportato in grafico in modo da poter essere utilizzato per determinare l'onset, il picco e l'offset del "morning" e dell'"evening peak" come esemplificato in Fig. 2.1.

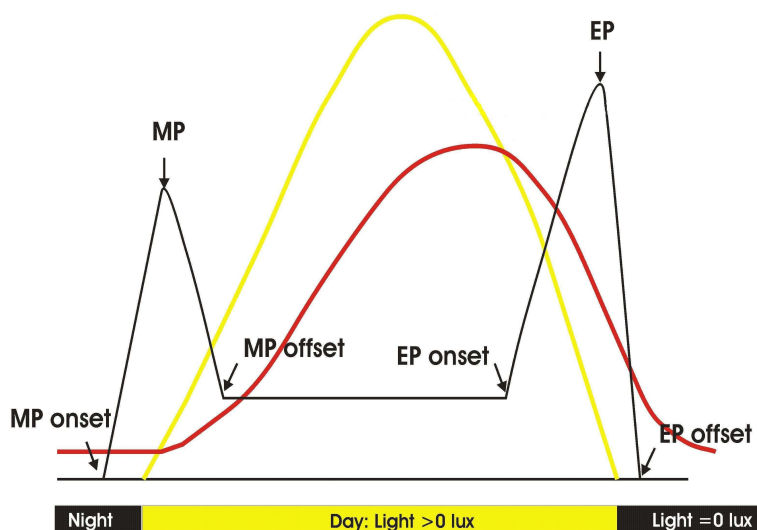


Fig. 2.1: Rappresentazione schematica dell'attività locomotoria registrata in condizioni naturali. L'attività locomotoria è rappresentata in nero, la temperatura in rosso, la luce in giallo. L'onset, il picco e l'offset sono stati determinati per l'attività mattutina (morning) e serale (evening) in ogni mosca, per ogni genotipo considerato.

Le analisi della ritmicità di ogni genotipo analizzato sono state eseguite usando algoritmi statistici: l'autocorrelazione e il "CLEAN" (Rosato e Kyriacou, 2006). L'autocorrelazione evidenzia se il numero di eventi ottenuti in due momenti separati da un certo intervallo di tempo sono correlati. In quest'analisi se si considera un intervallo di 1 bin di tempo (30 minuti), i dati ottenuti al bin 1 vengono correlati a quelli ottenuti al bin 1 e successivi, quelli al bin 2 con quelli al bin 2 e successivi e così via. Nel caso in cui tra gli eventi registrati esista un periodo di 24 ore, allora il numero di eventi presenti al bin 1 dovrà essere maggiormente correlato con il numero di eventi avvenuti ai bin 1 + n*48 (corrispondenti a tutte le 24 ore successive, essendo ogni bin di 30 minuti), il numero di eventi del bin 2 con quello degli eventi dei bin 2 + n*48 e così via. Si ottengono così dei coefficienti di correlazione che vengono rappresentati graficamente in un correlogramma in funzione del tempo (Fig. 2.2). In tale grafico si può osservare che la correlazione varia in modo ciclico, mostrando picchi massimi in corrispondenza del periodo con cui oscillano i dati. In rosso sono indicate le linee che rappresentano il limite di significatività (95%) al di sopra del quale la correlazione è significativa. L'algoritmo CLEAN (fornito da J. Lehar, MIT, Cambridge, Mass., U.S.A.) si basa sull'analisi spettrale di Fourier. Questo tipo di analisi si pone l'obiettivo di cercare delle regolarità cicliche nelle serie di dati, partendo dal presupposto che esse contengano una ciclicità. A questo scopo la serie dei dati viene randomizzata cento volte per generare dei limiti di confidenza (95% e 99%). L'analisi spettrale mostra i dieci picchi di ritmicità più significativi (Fig. 2.2) e solo le mosche con un singolo picco di ritmicità al di sopra del limite di confidenza del 99% sono considerate nel calcolo del periodo medio di un genotipo. Le mosche con più picchi di significatività al di sopra del 99% hanno ritmi multipli. Le mosche prive di picchi di significatività sono considerate aritmiche. Solamente le singole mosche che presentavano una ritmicità evidenziabile allo stesso tempo con l'autocorrelazione e con il CLEAN sono state considerate nel calcolo del periodo del genotipo considerato.

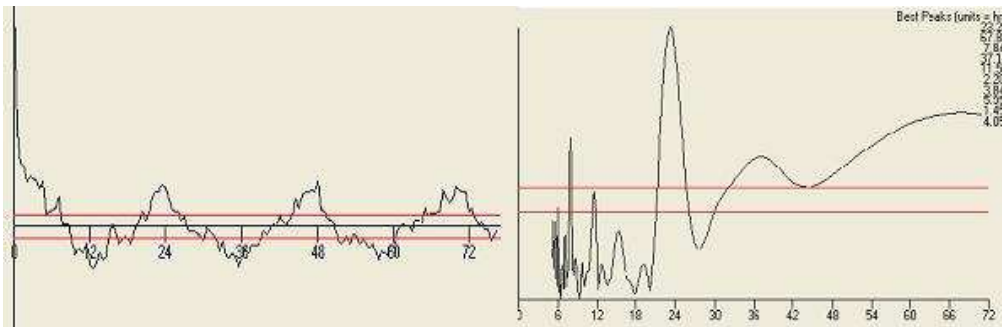


Fig. 2.2: Grafici ottenuti utilizzando il metodo dell'autocorrelazione (a sinistra) oppure il CLEAN (a destra).

2.2.6 Analisi statistiche

Tutti i grafici sono stati realizzati tramite i programmi Microsoft® Excel 2003 o OriginPro 8.0. Le analisi statistiche sono state condotte usando il programma Statistica 8 (StatSoft®). In appendice 3 è riportata una breve descrizione dei test statistici utilizzati.

2.3 Risultati

2.3.1 In condizioni naturali l'attività locomotoria presenta "morning" ed "evening peak" a temperature medio-alte mentre è unimodale a basse temperature

Le registrazioni condotte in laboratorio su mosche wild-type in condizioni di LD 12:12 mostrano profili di attività diversi a seconda della temperatura a cui sono condotti gli esperimenti. Per temperature costanti di 23°C o più, l'attività è sostanzialmente bimodale con un aumento progressivo della locomozione che avviene poco prima delle due transizioni luminose anticipandole e dando origine a due picchi principali di attività detti "morning" ed "evening peak". Nel periodo diurno che separa questi due picchi è generalmente osservabile una "siesta" che è stata interpretata come una propensione innata delle mosche a cercare di evitare il movimento nelle ore più calde della giornata. L'attività delle mosche si concentrerebbe quindi attorno alle zone più "fresche" del giorno (il mattino e la sera) al fine di evitare il pericolo dell'essiccazione. L'attività registrata in regimi LD 12:12 ad una temperatura più bassa e costante di 18°C risulta prevalentemente unimodale, con la perdita del "morning peak" e uno "shift" della fase dell'"evening peak" verso sinistra cioè verso il periodo luminoso. Il freddo ridurrebbe quindi il bisogno delle mosche di evitare le ore pomeridiane (Blau e Ruthenfluh, 1999). In condizioni naturali questo fenomeno sembrerebbe sostanzialmente confermato come risulta dal confronto di grafici di attività locomotoria registrati nelle diverse stagioni (Fig. 2.3).

Le registrazioni di attività locomotoria effettuate durante il periodo estivo a Padova (Fig. 2.3A), ove le temperature oscillano generalmente tra i 20-22°C di notte e i 35-38°C di giorno, hanno mostrato chiaramente un picco mattutino ed uno serale con un incremento aggiuntivo pomeridiano dell'attività (vedi paragrafo 2.3.3). Questo fenomeno è risultato assente nelle registrazioni estive effettuate a Leicester (S. Bhutani, tesi di dottorato 2009) ove le temperature si mantengono basse (in media attorno ai 20°C) indicando come questo fenomeno sia dovuto più alle particolari condizioni termiche che al fotoperiodo.

2.3.2 Attività locomotoria di mosche wild-type e mutanti in condizioni naturali

L'attività locomotoria di mosche wild-type e mutanti è stata registrata per tre anni in stagioni diverse, dal 2007 al 2009. I dati sono stati elaborati come descritto nei Materiali e Metodi. In condizioni naturali il passaggio graduale dal giorno alla notte e viceversa non può essere responsabile di fenomeni di aumento o diminuzione improvvisi di attività come accade invece in condizioni di laboratorio dove le istantanee transizioni luce/buio e buio/luce danno luogo al fenomeno descritto come masking (Rieger *et al.*, 2003). Questo fenomeno è responsabile in condizioni di laboratorio della ritmicità che viene riscontrata in molti "mutanti orologio" sottoposti a regimi di luce/buio. Essendo esso assente in condizioni naturali è stata condotta un'analisi via CLEAN e autocorrelazione per valutare la ritmicità delle mosche e per verificare se le mosche dei diversi genotipi fossero o meno in grado di sincronizzarsi ai diversi fotoperiodi e alle diverse temperature in diversi periodi dell'anno. La Tab. 2.2 riassume la percentuale di mosche per ogni genotipo caratterizzate da un comportamento aritmico (più esperimenti sono stati sommati insieme).

Genotipo	N	Percentuale di individui aritmici (%)
WTALA	300	0.7
HU	137	2.2
<i>per</i> ⁰¹	278	5.0
<i>tim</i> ⁰¹	145	21.4
<i>clock</i> ^{jerk}	226	50.0
<i>per</i> ⁰¹ <i>tim</i> ⁰¹	100	5.0
<i>per</i> ^S	75	8.0
<i>per</i> ^L	71	19.7
<i>Pdf</i> ⁰¹	77	5.0
<i>cry</i> ⁰	99	3.9
<i>yw, UAS-hid, UAS-reaper; pdfGal4/+; +/+</i>	53	11.3
<i>yw; pdfGal4/UAS-cycΔ103; +/+</i>	81	0.0
<i>yw; timGal4/UAS-cycΔ103; +/+</i>	143	14.7

Tab. 2.2: Percentuale di mosche aritmiche per ogni genotipo osservate in condizioni naturali. L'analisi è stata condotta tramite CLEAN e autocorrelazione (N: numero di mosche analizzate).

Dalla tabella è possibile osservare che i genotipi risultati più aritmici sono i mutanti *clock*^{jerk} (50%), seguiti dalle mosche *tim*⁰¹ e *per*^L (20%) e le *yw; timGal4/UAS-cycΔ103; +/+* e le *yw, UAS-hid, UAS-reaper; pdfGal4/+; +/+* (10-15%), mentre tutti gli altri genotipi (mutanti e wild-type) sono sostanzialmente ritmici (più del 90% di ritmicità). In sintesi in condizioni naturali, salvo per alcuni “mutanti orologio”, come *clock*^{jerk}, le mutazioni a livello dei geni orologio non influenzano, se non modestamente, la ritmicità. Il sistema UAS-GAL4, usato per esprimere determinati geni in specifici gruppi cellulari (Duffy, 2002), si è dimostrato essere efficace anche a basse temperature, in mosche mantenute in condizioni di LD 12:12 a 10°C di temperatura (S. Bhutani, tesi di dottorato 2009) e si è quindi scelto di utilizzarlo anche per esperimenti in condizioni naturali caratterizzati da basse temperature (come ad esempio nelle registrazioni di attività locomotoria condotte in primavera e in autunno).

In Fig. 2.3 sono riportati i profili di attività locomotoria media di alcuni genotipi analizzati in diverse condizioni dell'anno. L'attività è rappresentata dalle barre blu, la temperatura in rosso e l'intensità luminosa in giallo. E' possibile osservare come l'attività dei mutanti e quella dei wild-type siano simili, tuttavia è necessario analizzare l'attività mosca per mosca per capire se effettivamente i mutanti abbiano o meno differenze rispetto ai wild-type per quanto riguarda la posizione dell'onset e del picco del mattino e della sera.

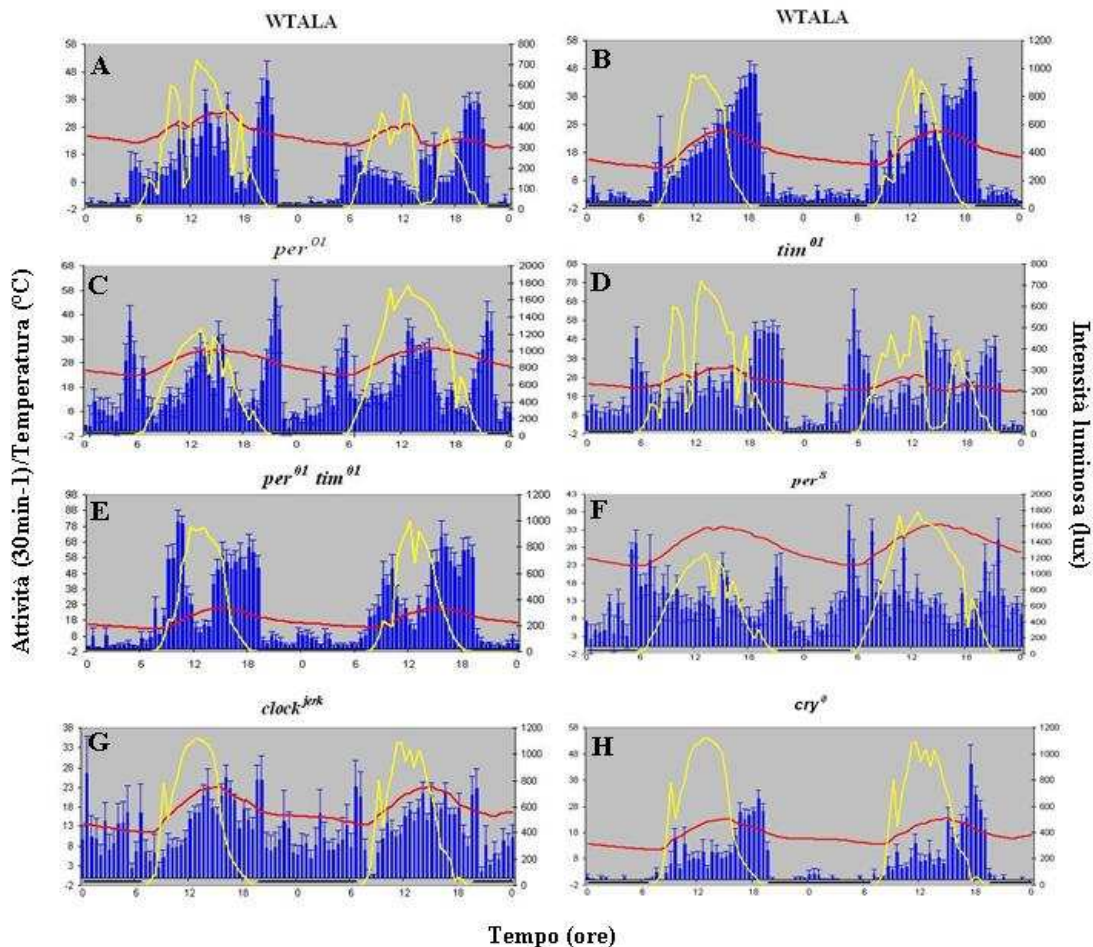


Fig. 2.3: Profili di attività locomotoria media (\pm SEM): l'attività è rappresentata dalle barre blu; la temperatura è rappresentata in rosso (asse principale); l'intensità luminosa in giallo (asse secondario); la linea nera rappresenta le ore di buio. (A) WTALA 13-14 Luglio 2008 (n=19); (B) WTALA 13-14 Ottobre 2008 (n=24); (C) *per*⁰¹ 20-21 Giugno 2007 (n=22); (D) *tim*⁰¹ 13-14 Luglio 2008 (n=23); (E) *per*⁰¹*tim*⁰¹ 13-14 Ottobre 2008 (n=23); (F) *per*^S 20-21 Giugno 2007 (n=17); (G) *clock*^{jerk} 24-25 Settembre 2008 (n=20); (H) *cry*⁰ 24-25 Settembre 2008 (n=13). Esempi di attività locomotoria media registrata in condizioni naturali nella stazione di Padova.

2.3.3 Il picco pomeridiano (“Afternoon peak”)

Le registrazioni di laboratorio effettuate con linee wild-type a temperature medio alte (29°C) mostrano un classico andamento bimodale con i due picchi, mattutino e serale, separati dalla “siesta” (Majercak *et. al.*, 1999). In condizioni naturali le registrazioni estive caratterizzate da elevate temperature (ad esempio il 27 Agosto 2008, con temperature comprese nell'intervallo 21-33°C, Fig. 2.4), hanno mostrato dopo l'esaurirsi dell'attività mattutina un progressivo aumento di attività durante le ore più calde del giorno, in pieno pomeriggio. Questo comportamento (sostanzialmente un'attività trimodale) è risultato evidente osservando sia i grafici di attività locomotoria media che l'attività di singole mosche: il picco pomeridiano è stato definito “afternoon peak” (indicato dalla freccia in un esempio di attività di singola mosca (Fig. 2.4A) e in un esempio di attività media (Fig. 2.4B). Analizzando, per la linea wild-type WTALA, il comportamento in diverse registrazioni in condizioni naturali, in diversi periodi dell'anno, mosca per mosca, circa la presenza o assenza di questo picco pomeridiano è stato possibile mettere in evidenza come la percentuale di mosche che possiedono

l'”afternoon peak” aumenti in relazione alla temperatura media diurna. In particolare, se la temperatura media supera i 29°C tutte le mosche hanno attività trimodale (Fig. 2.5).

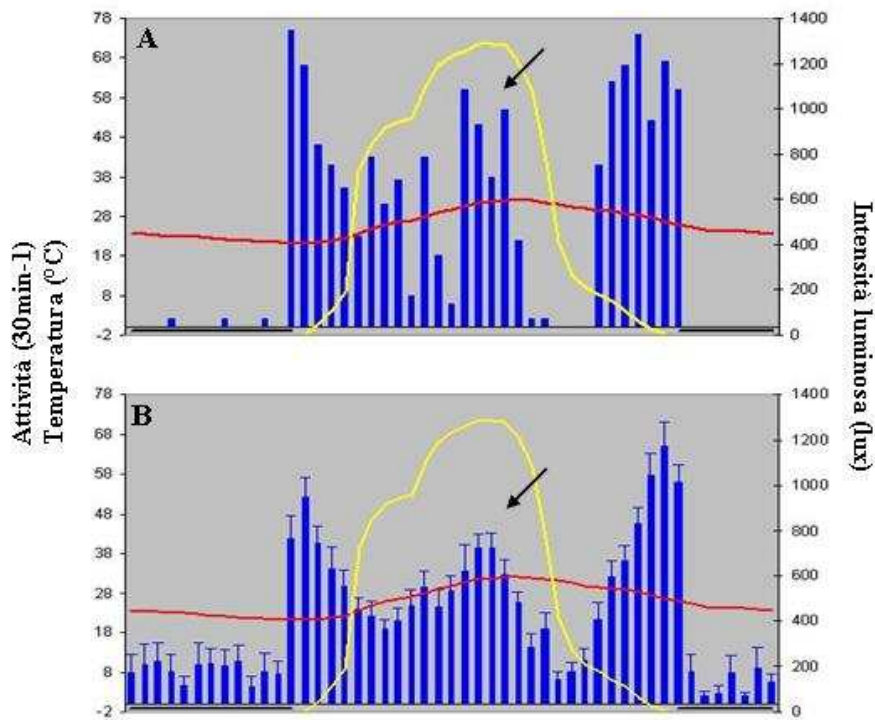


Fig. 2.4: Profili di attività di mosche WTALA in cui è indicato l'”afternoon peak”. (A) attività di un singolo maschio, (B) attività media di 17 mosche (\pm SEM). Il picco pomeridiano (freccia) è ben distinto dai due picchi mattutino e serale ed è collocato durante la parte più calda della giornata. La linea rossa rappresenta la temperatura (asse principale), la linea gialla rappresenta l'intensità luminosa (asse secondario), la linea nera rappresenta le ore di buio.

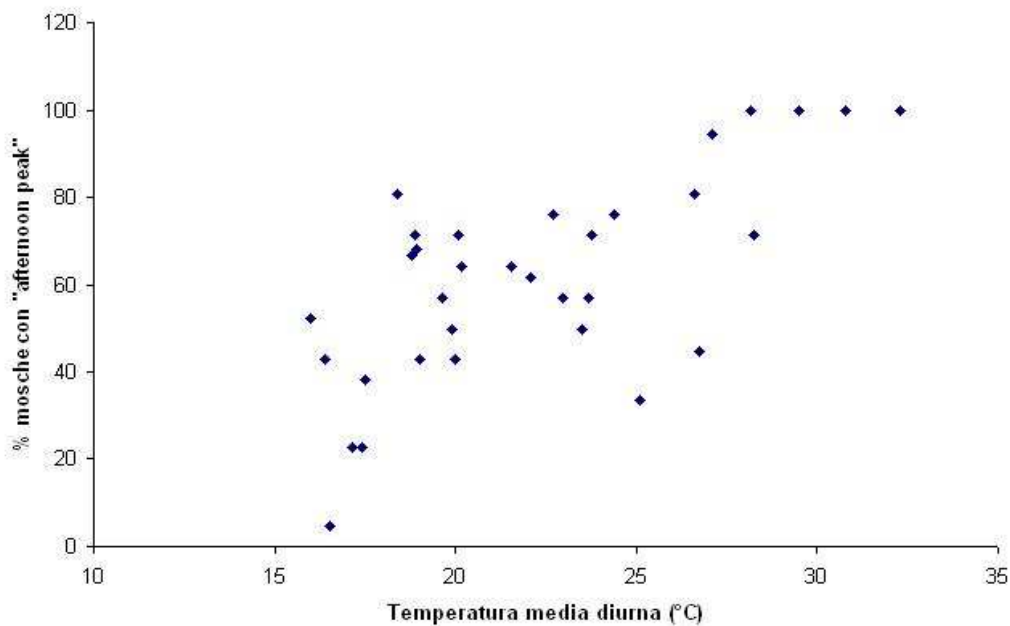


Fig. 2.5: La percentuale di mosche che presentano un 'afternoon peak' aumenta all'aumentare della temperatura media diurna. Con temperature medie diurne superiori ai 29°C tutte le mosche sono risultate trimodali. Sono stati analizzati 33 giorni. Per ogni giorno sono stati analizzati tra 15 e 24 individui.

La scoperta di un'attività trimodale modulata dalla temperatura in condizioni naturali solleva qualche curiosità circa la frequenza e la collocazione del fenomeno della "siesta". E' stata quindi analizzata nel comportamento medio di diversi giorni di mosche WTALA la distanza, in termini di tempo, tra il minimo di attività durante il pomeriggio e il momento in cui la temperatura del giorno è al suo massimo. Come conseguenza un valore negativo di questa distanza indica che la "siesta" avviene prima del momento in cui si registra la temperatura massima del giorno mentre valori positivi indicano che la "siesta" avviene nella parte più tarda della giornata. Tale parametro in condizioni naturali è risultato dipendere dalla temperatura media diurna ($R^2=0.68103$, $p<0.0001$). La "siesta" tende a spostarsi verso sera all'aumentare della temperatura in conseguenza del progressivo insorgere dell'"afternoon peak" (Fig. 2.6). Già in esperimenti condotti in laboratorio si era dimostrato come la posizione della "siesta" fosse modulata dalla temperatura ritardando all'aumentare della stessa a causa dello splicing alternativo di *per* (Chen *et al.*, 2007; Collins *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2008; Majercak *et al.*, 1999).

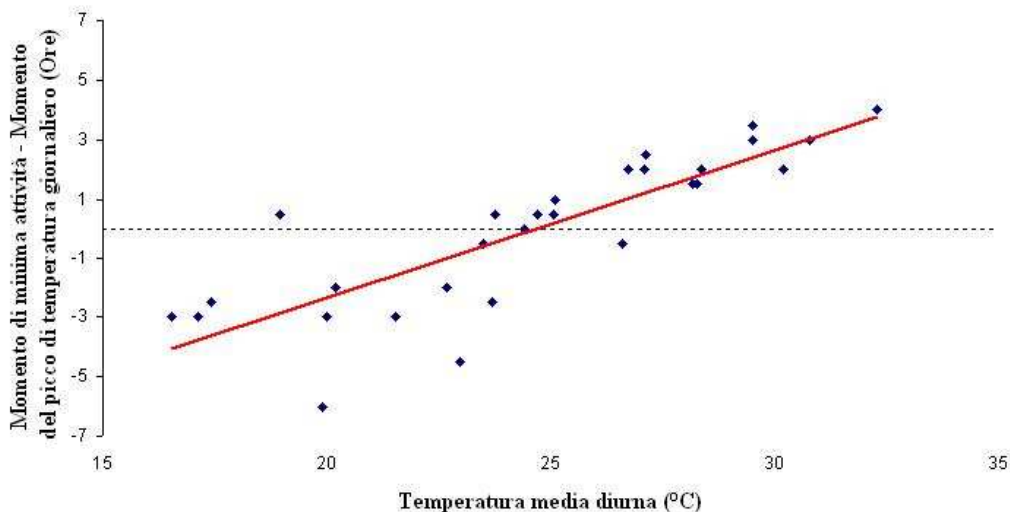


Fig. 2.6: In grafico è rappresentata la correlazione tra la temperatura media diurna e la posizione della "siesta" qui indicata come differenza tra il momento di minima attività durante il pomeriggio e il momento del giorno in cui si ha la temperatura massima ($R^2=0.68103$, $p<0.0001$). Sono stati analizzati 29 giorni. Per ogni giorno analizzato l'attività media rappresenta l'attività di 15-24 individui.

2.3.4 Effetto della luce lunare sull'attività locomotoria notturna della linea WTALA in condizioni di laboratorio e in condizioni naturali

L'attività di singoli maschi WTALA è stata registrata in laboratorio cercando di riprodurre al meglio le condizioni di una tipica giornata estiva a Padova (LD 16:8 e cicli di temperatura 30:22°C). Parte della registrazione è stata effettuata su mosche mantenute in classiche condizioni di luce/buio mentre allo stesso tempo una parte delle mosche veniva registrata in identiche condizioni di fotoperiodo ma con una fase notturna caratterizzata da una leggera illuminazione (meno di 1 lux di intensità) al fine di mimare la presenza di luce lunare (Fig. 2.7). La proporzione media di attività locomotoria notturna sul totale dell'attività giornaliera (da qui indicata come proporzione media di attività notturna) è stata calcolata nelle due situazioni e confrontata con un'analisi ANOVA. E' risultato che in presenza di luce lunare la proporzione media di attività notturna delle mosche aumenta ($p<0.0001$) e il picco di attività serale anticipa a differenza di quanto riscontrato da Bachleitner e colleghi

(Bachleitner *et al.*, 2007) che al contrario ne descrivono un avanzamento all'interno della fase notturna. L'anticipo del picco serale, riscontrato nell'esperimento, ha escluso la possibilità che la presenza di luce lunare mimì un fotoperiodo lungo poichè in tal caso ci si aspetterebbe un avanzamento dello stesso (Majercak *et al.*, 1999).

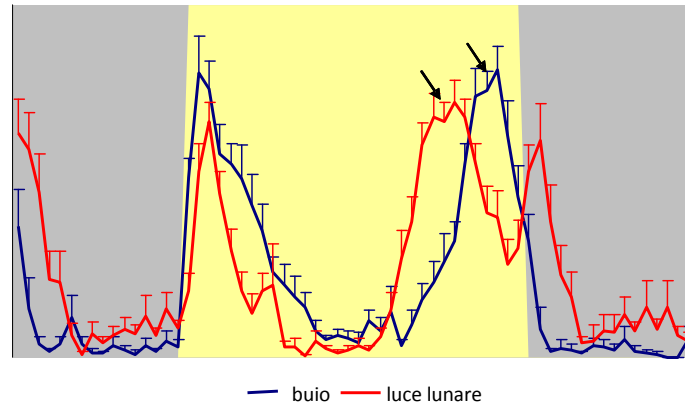


Fig. 2.7: Profilo di attività locomotoria media (30min-1) di maschi WTALA (\pm SEM) in una tipica giornata estiva italiana mimata in laboratorio (LD16:8, temperatura 30:22°C). L'attività è stata registrata con (n=17, in rosso) o senza (n=17, in blu) bassi livelli di illuminazione (\ll 1 lux) durante la fase notturna. I maschi sottoposti a "luce lunare" aumentano la proporzione media di attività notturna ($p < 0.0001$) e anticipano il picco serale (indicato dalle frecce).

E' stato successivamente verificato se le osservazioni fatte a partire dagli esperimenti condotti in laboratorio si confermassero anche in esperimenti condotti in condizioni naturali. E' stata confrontata l'attività di maschi WTALA registrata durante notti di luna nuova e notti di luna piena. Le informazioni riguardanti le fasi lunari durante l'anno sono state ricavate dall'Osservatorio Navale degli Stati Uniti (USNO), Database Online del Dipartimento di Astronomia. Per minimizzare la differenza nella variazione di fotoperiodo tra le due registrazioni, esse sono state realizzate dal punto di vista temporale il più ravvicinate possibile. Le regressioni lineari che descrivono la proporzione media di attività notturna, in presenza di luna nuova o di luna piena, in funzione della temperatura media notturna sono state confrontate con un test di Student. I dati sono stati anche analizzati con un'analisi della covarianza (ANCOVA), usando la temperatura media notturna come covariata, poichè in condizioni naturali la proporzione media di attività notturna è funzione della temperatura media notturna (S. Bhutani, tesi di dottorato 2009). I dati riportati in Fig. 2.8 hanno mostrato come in condizioni naturali non ci siano differenze significative tra la proporzione media di attività notturna registrata in presenza o in assenza di luce lunare. ($p_{\text{pendenza}} = 0.9772$, $p_{\text{intercetta}} = 0.8699$, $p_{\text{ANCOVA}} = 0.84239$).

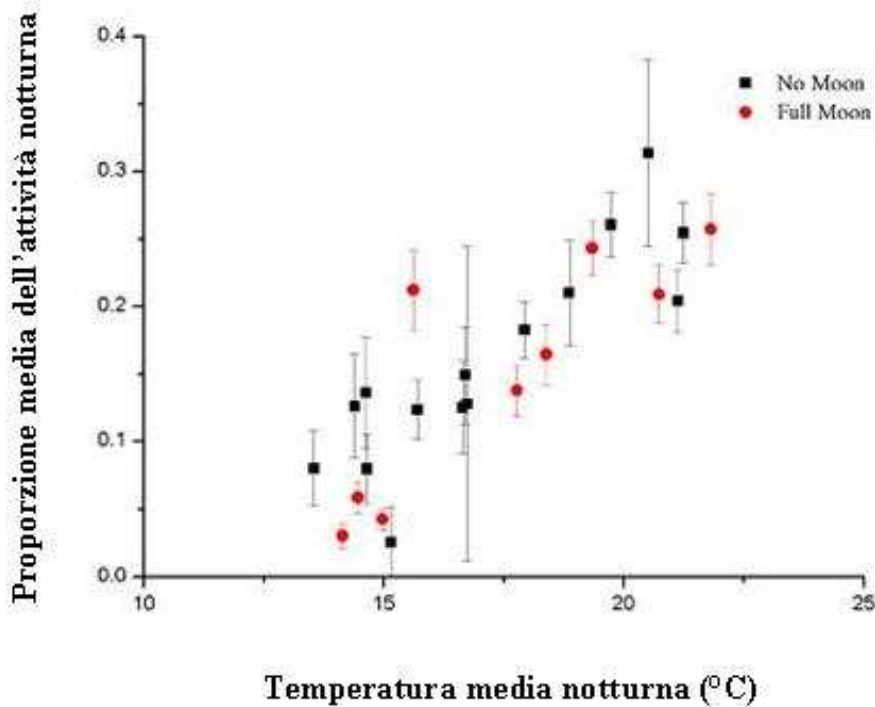


Fig. 2.8: Proporzione media di attività notturna in presenza di luna piena (rosso) e luna nuova (nero) in funzione della temperatura media notturna. Le rette di regressione non mostrano differenze significative usando come test un t di Student applicato all'intercetta o alla pendenza. Anche l'analisi dei dati tramite ANCOVA non mostra differenze significative ($p_{pendenza} = 0.9772$, $p_{intercetta} = 0.8699$, $p_{ANCOVA} = 0.84239$). Sono stati analizzati 24 giorni. Per ogni giorno sono state analizzate una media di 15 mosche.

2.3.5 Effetto della socialità sull'attività locomotoria notturna in condizioni naturali e di laboratorio

Si è voluto esaminare se l'attività locomotoria media dei maschi o delle femmine in presenza di altri individui dello stesso sesso o dell'altro sesso subiva variazioni consistenti. A questo scopo si sono confrontati dati di attività ricavati mettendo nei tubi di registrazione singoli maschi (M), singole femmine (F), coppie di maschi (MM), un maschio e una femmina (MF) e coppie di femmine (FF). RegISTRAZIONI di questo tipo sono state condotte sia in laboratorio che in condizioni naturali a Padova e a Leicester. Studi recenti hanno dimostrato che mettendo all'interno di un'arena bidimensionale maschi e femmine in condizioni di LD12:12 a 25°C i due diversi sessi tendono a stare vicini e a muoversi molto di più di notte che di giorno (Fujii *et al.*, 2007). Questo dato è stato verificato registrando l'attività locomotoria di coppie di MF, MM e FF in laboratorio in regime luminoso LD 12:12 con cicli di temperatura 25:20°C (Fig. 2.9). Durante la notte è stata mimata la presenza di luce lunare. I profili di attività locomotoria ottenuti per singoli maschi e singole femmine sono riportati in Fig. 2.9 A e B. La proporzione media di attività notturna di coppie MF è stata confrontata con coppie di MM e FF usate come controllo di riferimento. Le coppie MF hanno mostrato un aumento significativo della proporzione media di attività notturna rispetto ai controlli (ANOVA: $p_{MF/MM} < 0.0001$, $p_{MF/FF} < 0.0001$). Questo dato ha confermato quanto già era stato osservato da Fujii *et al.*, 2007.

Lo stesso esperimento è stato ripetuto variando il fotoperiodo (passando da LD12:12 a LD 16:8) e l'oscillazione della temperatura (passando da 25:20°C a 30:22°C) in modo da mimare un contesto simile a un tipico giorno estivo a Padova. Di notte è stata sempre mimata la presenza di luce lunare. In queste condizioni non è stata trovata alcuna differenza significativa nella proporzione media dell'attività notturna tra le coppie MF, MM (ANOVA: $p=0.9595$) o FF ($p=0.2232$) (Fig. 2.10 A, B e C). Tuttavia escludendo dall'analisi le prime quattro ore della notte per eliminare l'errore dovuto all'incremento di attività che si ha nel passaggio improvviso dalla luce al buio e che risulta altamente disomogeneo nei tre campioni, è stato possibile tornare a verificare una differenza significativa (via analisi ANOVA) nella proporzione media dell'attività notturna tra coppie di diverso sesso e coppie dello stesso sesso ($p<0.0001$).

La proporzione media dell'attività notturna delle tre diverse combinazioni sociali è stata quindi confrontata in condizioni naturali. Registrazioni sono state effettuate in diverse stagioni a Leicester (Fig. 2.11 A, B e C) e a Padova (Fig. 2.11 D, E e F) e poichè in condizioni naturali la proporzione media di attività notturna è funzione della temperatura media notturna, il confronto tra le varie coppie è stato effettuato con un'analisi ANCOVA utilizzando la temperatura media notturna come covariata. Non è stata riscontrata alcuna differenza significativa tra la proporzione media dell'attività notturna dei diversi tipi di coppie all'interno del transetto di temperature in cui sono state effettuate le registrazioni (per MM ($p=0.0519$) e per FF ($p=0.2232$)). Le coppie eterosessuali sono risultate particolarmente notturne solo in condizioni di laboratorio.

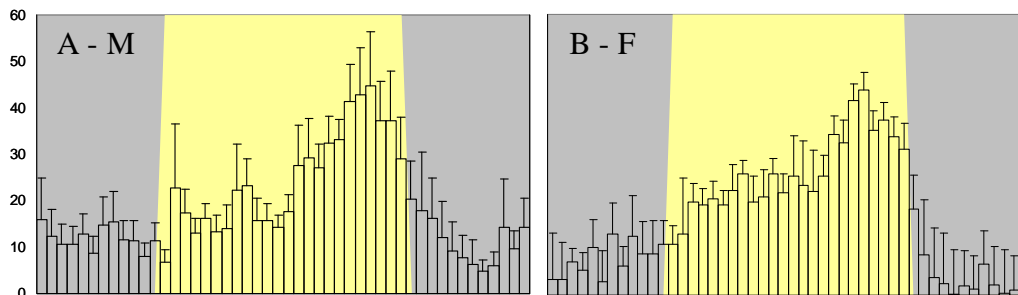


Fig. 2.9: Profili di attività (30min-1) locomotoria media (\pm SEM) di varie combinazioni sociali registrati in condizioni di laboratorio LD 12:12, con cicli 25:20°C di temperatura e mimando la presenza di luce lunare durante la notte. (A) Singoli maschi ($n=18$), (B) Singole femmine ($n=18$), (C) MF ($n=19$), (D) MM ($n=17$), (E) FF ($n=19$). Le coppie maschio/femmina mostrano un aumento statisticamente significativo della proporzione media di attività notturna rispetto alle coppie di controllo maschio/maschio e femmina/femmina ($p_{MF/MM} < 0.0001$, $p_{MF/FF} < 0.0001$).

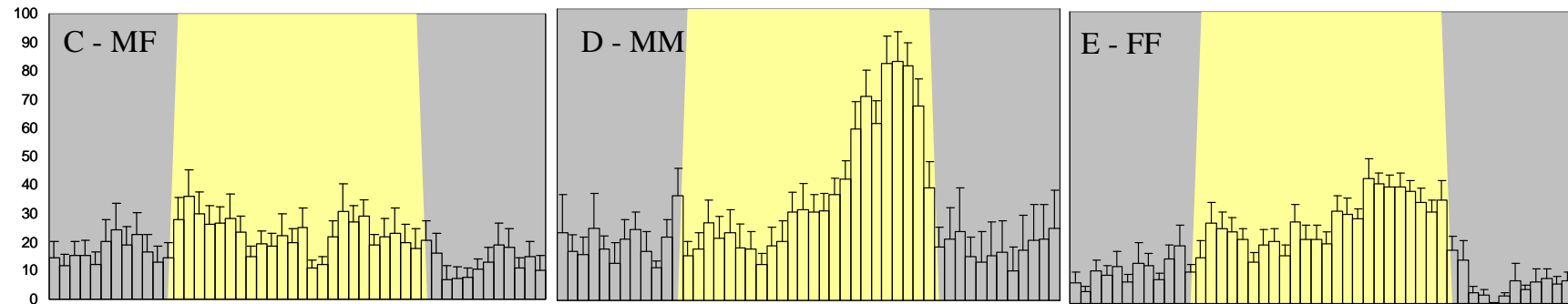


Fig. 2.9 (continua)

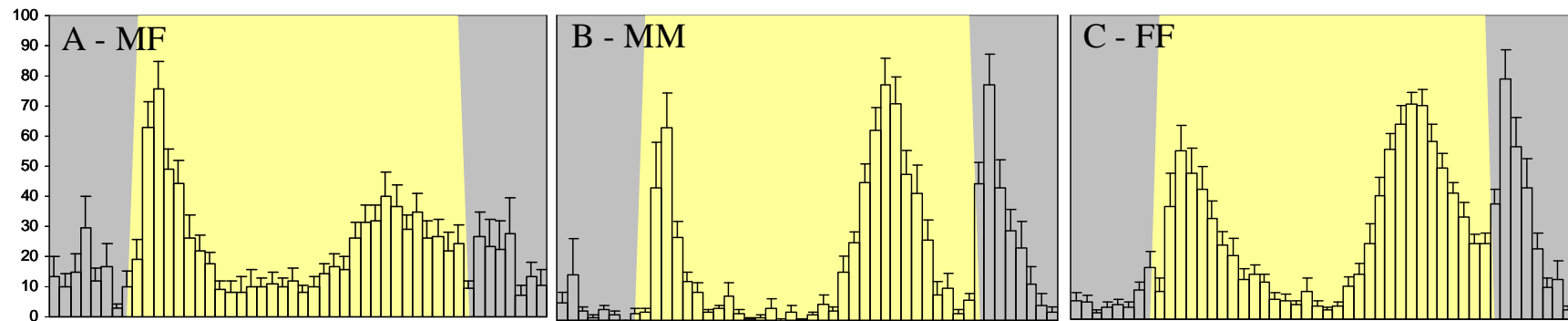


Fig. 2.10: Profili di attività (30min-1) locomotoria media (\pm SEM) di varie combinazioni sociali registrati in condizioni di laboratorio LD 16:8, con cicli 30:22°C di temperatura e mimando la presenza di luce lunare durante la notte. A) MF (n=13), (B) MM (n=15), (C) FF (n=18). Non si riscontrano differenze significative nella proporzione media di attività notturna tra i diversi tipi di coppie ($p_{MF/MM} = 0.9595$, $p_{MF/FF} = 0.2232$).

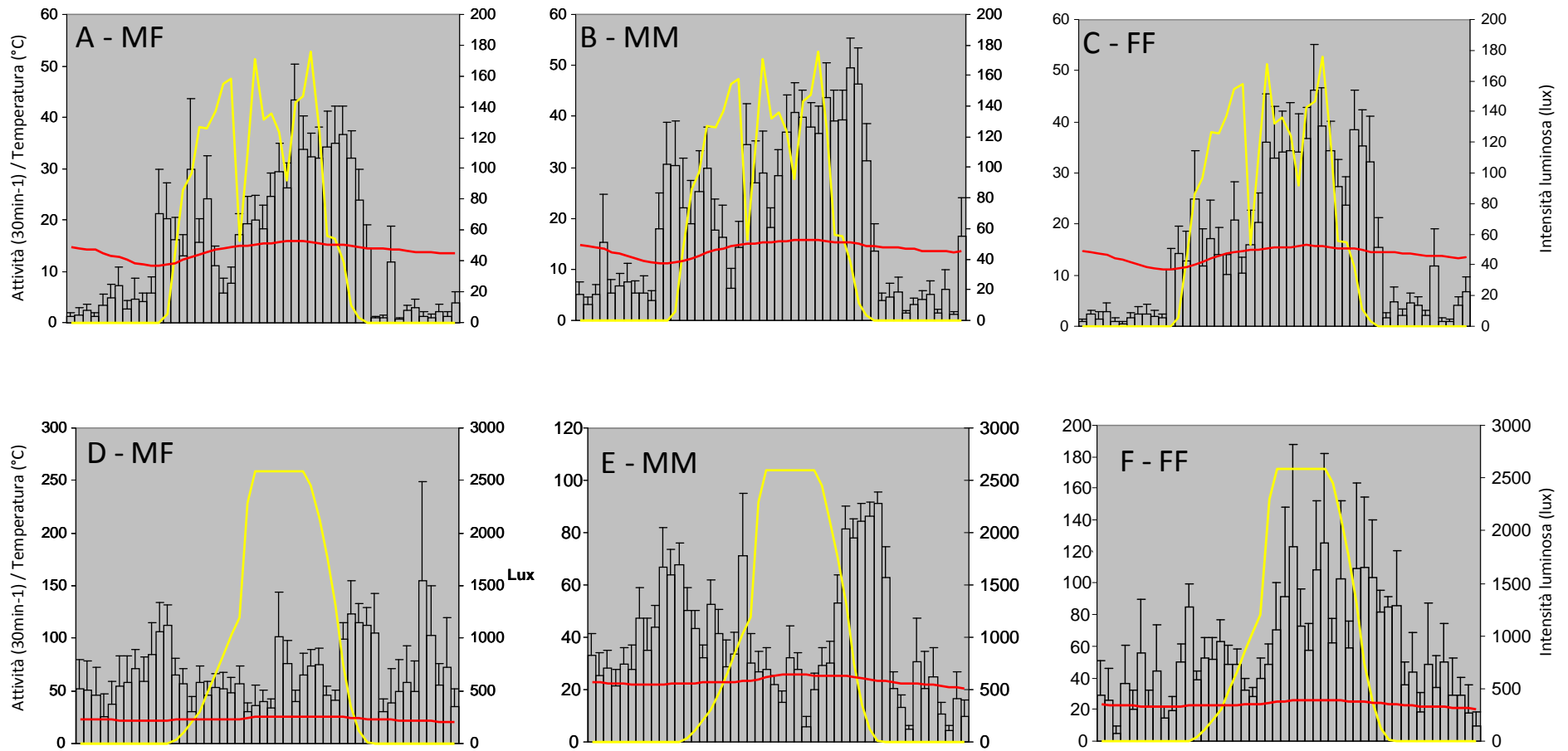


Fig. 2.11: Profili di attività locomotoria media (\pm SEM) di varie combinazioni sociali registrati in condizioni naturali. (A) MF - Leicester (n=25), (B) MM - Leicester (n=26), (C) FF - Leicester (n=24), (D) MF - Padova (n=6), (E) MM - Padova (n=9) and (F) FF - Padova (n=5). L'analisi ANCOVA non mostra differenze significative per la proporzione media di attività notturna tra i diversi tipi di coppie in condizioni naturali all'interno delle temperature considerate ($p_{MF/MM} = 0.0519$, $p_{MF/FF} = 0.2232$). La linea rossa rappresenta la temperatura (asse principale), la linea gialla rappresenta l'intensità luminosa (asse secondario).

2.4 Discussione

In questo capitolo è stata descritta per la prima volta l'attività locomotoria di una popolazione naturale di *Drosophila melanogaster* campionata in Alto Adige (WTALA) registrata in condizioni naturali in diverse stagioni dell'anno in due località differenti, Padova in Italia e Leicester in Inghilterra. L'attività locomotoria ha mostrato chiaramente un picco mattutino ed uno serale quando le temperature medie giornaliere sono superiori ai 20°C mentre al di sotto di queste temperature l'attività è divenuta unimodale con la perdita del picco mattutino. Queste osservazioni generali hanno suggerito che in condizioni naturali i pattern locomotori sono in parte in accordo con quanto riscontrato in laboratorio dove a 23-25°C costanti l'attività di mosche wild-type in regime di LD12:12 è bimodale mentre diventa via via unimodale nelle stesse condizioni a basse temperature costanti (18°C).

Dal raffronto dei pattern di attività locomotoria in condizioni naturali e in laboratorio una delle maggiori differenze riscontrate è stato l'insorgere di un picco aggiuntivo che si posiziona tra il "morning" e l'"evening peak" (detto per questo "afternoon peak") in particolare nelle registrazioni estive con temperatura media diurna elevata. Le analisi condotte hanno dimostrato come la percentuale di mosche che manifesta il picco pomeridiano aumenti con la temperatura e che a temperature medie diurne superiori ai 29°C tutte le mosche hanno attività trimodale. Questo effetto può essere diretta conseguenza di un'accelerata fisiologia dell'insetto oppure un tentativo delle mosche all'interno dei tubi di registrazione di "fuggire al calore". In laboratorio il periodo di "siesta" durante il giorno è stato interpretato come un comportamento innato, modulato dalla temperatura, che le mosche mettono in atto per evitare le parti più calde della giornata al fine di non rischiare l'essiccamento. L'osservazione di un'iperattività pomeridiana in presenza di elevate temperature è un fenomeno del tutto nuovo e apparentemente in contraddizione con quanto riscontrato negli esperimenti di laboratorio. È stato poi dimostrato come anche in condizioni naturali la posizione della "siesta" sia regolata dalla temperatura.

In questo capitolo sono inoltre stati descritti pattern di attività locomotoria di alcuni "mutanti orologio" ed è stato messo in evidenza come wild-type e mutanti siano in grado di mantenere un elevato grado di sincronizzazione con l'ambiente esterno. In condizioni di laboratorio l'effetto di masking rende molti "mutanti orologio" ritmici in condizioni di LD ma in condizioni naturali l'assenza di una transizione luminosa rettangolare ha come conseguenza l'assenza del masking. L'elevata ritmicità riscontrata in molti "mutanti orologio" in condizioni naturali è risultata per questo un fenomeno inaspettato.

Esperimenti condotti in laboratorio hanno già dimostrato che bassi livelli di illuminazione durante il periodo notturno, tesi a mimare la presenza di luce lunare, comportano "shift" di fase dell'attività locomotoria serale delle mosche. A livello molecolare è stato inoltre dimostrato come il ciclo di PER e TIM in presenza di luce notturna subisca un'alterazione a livello del quinto neurone laterale ventrale piccolo (5th sLN_v) con un ritardo della fase concorde al ritardo di fase osservato nell'attività (Bachleitner *et al.*, 2007). Gli esperimenti da noi condotti in laboratorio hanno in parte confermato gli effetti della luce notturna sull'attività delle mosche, tuttavia, al contrario, l'attività in condizioni naturali non ha mostrato alcuna variazione in condizioni di presenza o assenza di luce lunare. D'altra parte, dati molecolari raccolti in condizioni naturali hanno mostrato che il ciclo di PER e TIM nel quinto neurone ventrale laterale piccolo non varia di fase, ancora una volta in accordo con quanto si è osservato per l'attività locomotoria (P. Menegazzi, comunicazione personale).

Recentemente è stato messo in evidenza in esperimenti di laboratorio come la presenza di stimoli sociali, in particolare la presenza di individui del sesso opposto, sia in grado di trasformare le mosche da insetti con attività prevalentemente diurna ad insetti notturni (Fujii *et al.*, 2007). Questa ipotesi è stata verificata confrontando l'attività locomotoria di diversi tipi di coppie, dello stesso sesso (MM, FF) e di sesso diverso (MF), sia in condizioni di laboratorio che in condizioni naturali. Ancora una volta negli esperimenti condotti in laboratorio è stato possibile osservare come coppie di diverso sesso abbiano un'attività prevalentemente notturna e significativamente diversa da quella delle coppie dello stesso sesso mentre tali differenze non sono state confermate in condizioni naturali. Questo capitolo mette in evidenza come molte osservazioni ricavate da analisi in laboratorio non si confermino in condizioni naturali. L'attività locomotoria assume un aspetto generale molto simile a quanto riscontrabile in laboratorio ma con importanti differenze. Questo ci ha spinto ad indagare nello specifico, come descritto nel prossimo capitolo, il comportamento a livello dei picchi mattutino e serale per comprendere se l'orologio in condizioni naturali sia ancora in grado di regolare l'anticipo dell'attività al mattino e alla sera.

Capitolo 3

Analisi dell'attività locomotoria mattutina e serale in condizioni naturali

3.1 Introduzione

L'orologio endogeno circadiano di *Drosophila melanogaster* è stato ampiamente caratterizzato a livello molecolare. Molti studi sono stati possibili grazie all'analisi di mutanti per i principali geni responsabili della ritmicità. Alcuni di questi mutanti mostrano un fenotipo aritmico in condizioni di buio costante (*per*⁰¹, *tim*⁰¹, *clock*^{jerk} e *Pdf*⁰¹) (Dunlap, 1999; Renn *et al.*, 1999), altri un fenotipo ritmico in condizioni di luce costante dove mosche wild-type sono invece aritmiche (*cry*^b e *cry*⁰) (Stanewsky *et al.*, 1998; Dolezelova *et al.*, 2007). E' stato studiato anche il comportamento dei mutanti in condizioni di alternanza di luce/buio. Esso presenta spesso anomalie a livello della fase del ritmo o nella capacità di anticipare le transizioni luminose (mattina e sera) (Grima *et al.*, 2004).

E' stato dimostrato che in condizioni di LD12:12 a 25°C l'anticipo della transizione luminosa mattutina è regolato da un oscillatore molecolare indipendente ("morning clock") rispetto a un secondo che regola invece l'anticipo della transizione luminosa serale ("evening clock"). Due distinti network neuronali sono stati associati ai due oscillatori e in particolare l'orologio del mattino sembra essere localizzato nei neuroni laterali ventrali (LNV) che esprimono PDF mentre l'orologio della sera sembra essere regolato dai neuroni laterali dorsali (LND) (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004).

In condizioni naturali le mosche sono sottoposte a variazioni ambientali continue sia di tipo luminoso che termico. Il passaggio dal giorno alla notte e viceversa non è istantaneo, come in laboratorio, ma graduale. Per riuscire a definire il momento da considerare come alba o tramonto, in relazione al quale riferire un eventuale anticipo delle mosche, abbiamo utilizzato le definizioni geofisiche di alba e tramonto, secondo le quali questi due fenomeni attraversano tre distinte fasi: l'alba (o tramonto) astronomica, nautica e civile. L'alba astronomica è definita come il momento in cui il sole si trova a 18° sotto l'orizzonte con un'illuminazione fino a 0.0006 lux. L'alba nautica si ha quando il sole forma un angolo di 12° con un'illuminazione di 0.06 lux. L'alba civile corrisponde al momento in cui il sole forma un angolo di 6° sotto l'orizzonte con un'illuminazione fino a 6 lux. Il passaggio da una fase all'altra dipende dalla latitudine e dalla stagione. Per esempio a Leicester (Inghilterra) in determinati periodi dell'anno l'alba astronomica non è identificabile. Poiché 0.06 lux rappresenta una quantità di luce che può essere ragionevolmente percepita dagli insetti (Bachleitner *et al.*, 2007; Kempinger *et al.*, 2009), l'alba nautica è stata scelta come momento rispetto al quale verificare un eventuale anticipo dell'attività mattutina delle mosche.

Tutte le analisi dell'attività mattutina presentate in questo capitolo fanno riferimento al tempo intercorso tra l'inizio dell'attività locomotoria del mattino (M-onset) e l'alba nautica. Questo parametro è stato misurato in mosche wild-type e in mutanti per i principali geni orologio già caratterizzati in laboratorio allo scopo di indagare circa il funzionamento dell'orologio endogeno circadiano in condizioni naturali. Lo stesso metodo di analisi usato per descrivere il comportamento mattutino è stato applicato nell'analisi del comportamento serale (E-onset). In questo caso, tuttavia, si è usato come punto di riferimento il momento della giornata in cui si è verificato il picco massimo di temperatura (T-peak).

3.2 Materiali e metodi

I profili di attività locomotoria per mosche wild-type e mutanti sono stati analizzati in dettaglio per comprendere il comportamento dell'attività locomotoria mattutina ("morning peak") e serale ("evening peak") in condizioni naturali. Le linee oggetto di studio in questo capitolo sono elencate in Tab. 3.1. Le linee *yw; pdfGal4; +/+* e *yw; timGal4; +/+* non sono state considerate nell'analisi dell'attività serale.

Numero	Genotipo
1.	WTALA
2.	HU
3.	Canton S
4.	<i>per</i> ⁰¹
5.	<i>tim</i> ⁰¹
6.	<i>tim</i> ⁰³
7.	<i>clock</i> ^{jerk}
8.	<i>per</i> ^S
9.	<i>per</i> ^L
10.	<i>per</i> ⁰¹ <i>tim</i> ⁰¹
11.	<i>Pdf</i> ⁰¹
12.	<i>cry</i> ⁰
13.	<i>yw, UAS-hid, UAS-reaper; pdfGal4/+; +/+</i>
14.	<i>yw; pdfGal4/UAS-cycΔ103; +/+</i>
15.	<i>yw; timGal4/UAS-cycΔ103; +/+</i>
16.	<i>yw; pdfGal4; +/+</i>
17.	<i>yw; timGal4; +/+</i>

Tab. 3.1: Linee usate per l'analisi dell'attività locomotoria mattutina (M-onset) e serale (E-onset) in condizioni naturali. Per una descrizione più approfondita è possibile consultare il paragrafo 2.2.1.

3.2.1 Morning onset, peak e offset

Il momento dell'onset, del picco e dell'offset dell'attività locomotoria mattutina è stato stimato per tutti i genotipi studiati mosca per mosca per ogni giorno di esposizione in condizioni naturali, considerando solo le mosche risultate ritmiche. Per effettuare questa analisi sono stati seguiti i seguenti criteri:

- L'inizio dell'attività, per essere considerato tale, si colloca dopo un lungo periodo di inattività notturna.
- L'inizio dell'attività deve essere caratterizzato da una continuità di movimento senza interruzioni (inattività) più lunghe di 30 minuti (1 bin).
- La presenza di un aumento progressivo dell'attività seguito da una sua graduale diminuzione individua il "morning peak".
- La presenza di attività durante la notte è stata considerata attività notturna.
- La finestra temporale in cui generalmente è possibile osservare attività mattutina varia da 3 ore prima a 3 ore dopo la registrazione di un'intensità luminosa di almeno 1 lux.

Nel caso in cui una mosca non rispettasse nessuno dei criteri sopra indicati essa è stata definita come priva di attività mattutina. I giorni in cui meno di quattro mosche sul totale di quelle esaminate (normalmente sono state analizzate tra le 15 e le 24 mosche per giorno) hanno esibito "morning peak" sono stati esclusi dalle analisi.

In Fig. 3.1 (A e B) sono riportati due esempi di attività registrate per singoli individui maschi WTALA. Le frecce indicano il "morning onset".

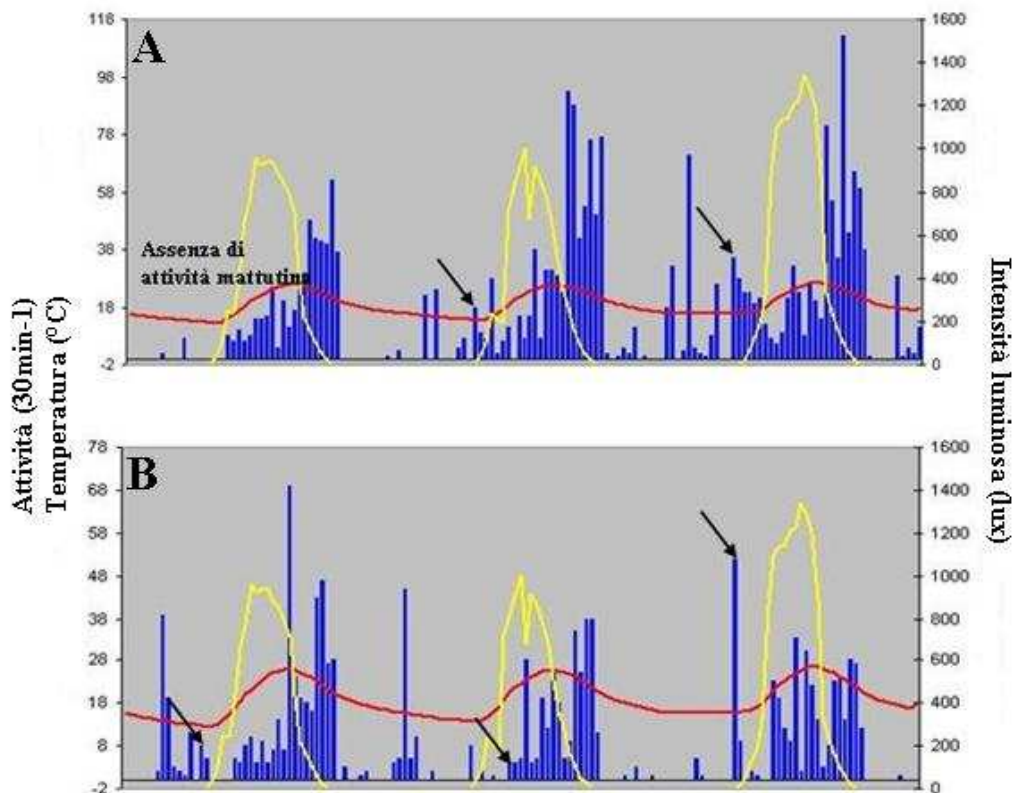


Fig. 3.1: Profili di attività di singoli individui maschi WTALA. (A) L'attività mattutina non è presente nel primo giorno di osservazione. (B) L'attività mattutina è presente in tutti e tre i giorni. Le frecce indicano il "morning onset". In blu è rappresentata l'attività locomotoria di singoli individui della linea WTALA, in rosso viene rappresentata la temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (asse principale); in giallo è rappresentata l'intensità luminosa (lux) (asse secondario).

E' stato calcolato il momento medio della posizione dell'onset del "morning peak" di ogni genotipo in ogni giorno considerato e questo valore è stato sottratto al valore dell'alba nautica. Di conseguenza il "morning onset" risulta descritto come numero di minuti prima (valori negativi) o dopo (valori positivi) l'alba nautica e viene indicato in ordinata nelle figure come "M-onset – Alba Nautica".

3.2.2 Parametri Ambientali

- La temperatura media notturna è stata calcolata come temperatura media di tutti i bin da trenta minuti caratterizzati da un'intensità luminosa pari a 0, secondo quanto registrato dal monitor ambientale Trikinetics (DEnM) posto vicino ai monitor di registrazione dell'attività locomotoria. La temperatura media diurna è stata calcolata come temperatura media di tutti i bin da trenta minuti caratterizzati da un'intensità luminosa maggiore di 0, secondo quanto registrato dal monitor ambientale Trikinetics (DEnM) posto vicino ai monitor di registrazione dell'attività locomotoria.
- Il fotoperiodo è stato calcolato come il numero di ore in cui l'intensità luminosa, secondo quanto registrato dal monitor ambientale, è diversa da 0.
- L'alba nautica è stata considerata riferendosi al sito ufficiale dell'Osservatorio Navale degli Stati Uniti (USNO), Astronomy Application Department Online Database (<http://aa.usno.navy.mil/>). Le coordinate geografiche usate per Leicester sono 52°40'N 1°0'W, (time zone 0), mentre quelle usate per Padova sono 45°41'N 12°15'E, (time zone 1).

3.2.3 Evening onset, peak e offset

Per tutti i genotipi studiati, il momento dell'onset, del picco e dell'offset dell'attività locomotoria serale è stato calcolato mosca per mosca, per ogni giorno di ogni esperimento, considerando solo le mosche risultate ritmiche. Per effettuare questa analisi sono stati seguiti i seguenti criteri:

- L'inizio dell'attività, per essere considerato tale, si colloca dopo un periodo di inattività diurna o deve mostrare un chiaro aumento rispetto ad un'attività media diurna più o meno costante.
- L'inizio dell'attività deve essere caratterizzato da una continuità di movimento senza interruzioni (inattività) più lunghe di 30 minuti (1 bin).
- La presenza di un chiaro e progressivo aumento dell'attività, seguito da una sua graduale diminuzione, individua l'"evening peak".
- La presenza di attività nel mezzo del pomeriggio, se seguita da un altro picco di attività successivo, è stata considerata come un "afternoon peak", mentre il secondo picco è stato considerato come l'"evening peak".

Nel caso in cui una mosca non rispettasse nessuno dei criteri sopra indicati essa è stata definita come priva di attività serale. I giorni in cui meno di quattro mosche sul totale di quelle esaminate (normalmente sono state analizzate tra le 15 e le 24 mosche per giorno) hanno esibito "evening peak" sono stati esclusi dalle analisi.

In Fig. 3.2 (A e B) sono riportati due esempi di attività registrate per singoli maschi WTALA. Le frecce indicano l'“evening onset”.

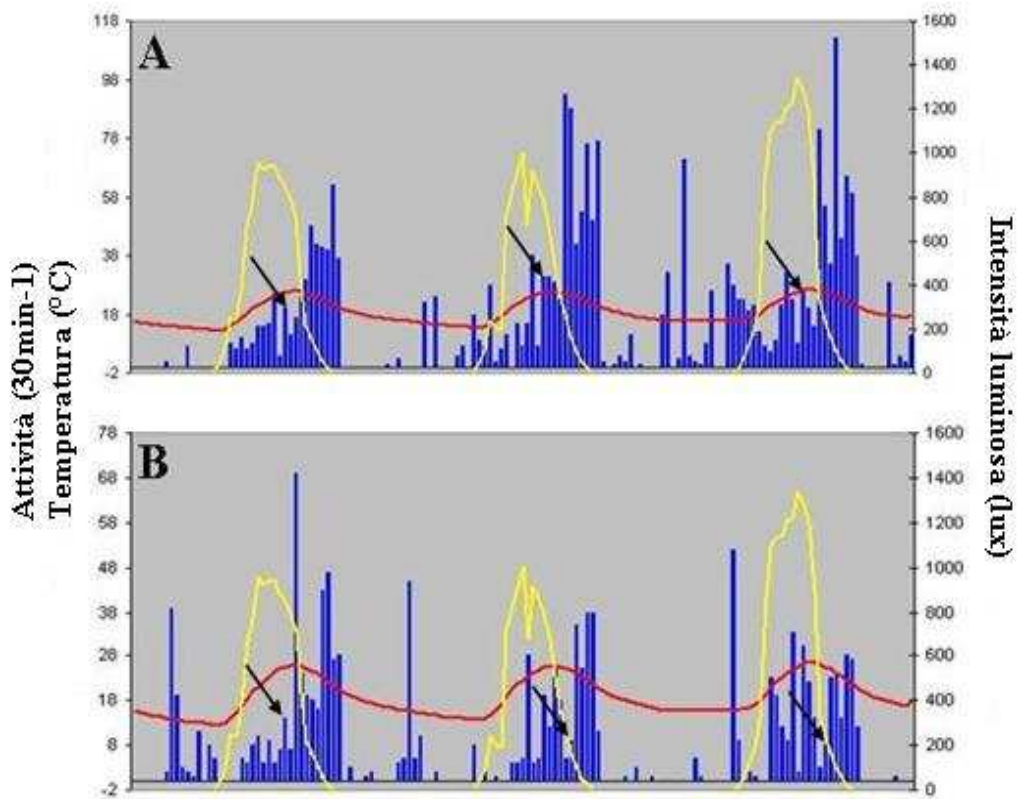


Fig. 3.2: Profili di attività di singoli maschi WTALA. Le frecce indicano l'onset dell'“evening peak”. In blu è rappresentata l'attività locomotoria di singoli individui della linea WTALA, in rosso è rappresentata la temperatura (°C) (asse principale); in giallo è rappresentata l'intensità luminosa (lux) (asse secondario).

3.2.4 Analisi statistiche

Tutti i grafici sono stati realizzati tramite i programmi Microsoft® Excel 2003 o OriginPro 8.0. Le analisi statistiche sono state condotte usando il programma Statistica 8 (StatSoft®). In appendice 3 è riportata una breve descrizione dei test statistici utilizzati.

3.3 Risultati

3.3.1 Profilo stagionale del “morning onset” nell'attività locomotoria mattutina della linea WTALA

E' stata calcolata la fase del “morning onset” in relazione all'alba nautica in diversi periodi nel corso dell'anno. In Fig. 3.3 viene rappresentato il numero di minuti con cui il M-onset anticipa (valori negativi) o ritarda (valori positivi) l'inizio del giorno. In blu sono mostrati i dati ricavati dalle registrazioni effettuate a Leicester, mentre in arancio sono riportati i dati raccolti a Padova. Le registrazioni sono state effettuate in un numero maggiore di mesi a Padova in quanto le condizioni climatiche sono più favorevoli a

basse latitudini. Durante i mesi invernali non sono state effettuate registrazioni in quanto a basse temperature *Drosophila melanogaster* entra in diapausa per superare la stagione avversa.

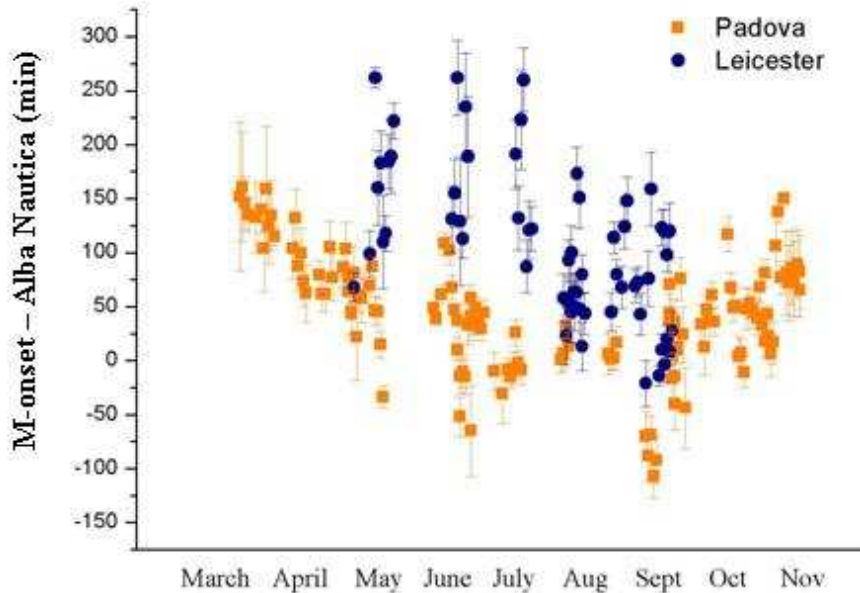


Fig. 3.3: Rappresentazione grafica del variare della fase dell'inizio dell'attività mattutina nelle varie stagioni (min \pm SEM) a Leicester (blu) e Padova (arancio). La fase anticipa durante l'estate con fotoperiodi lunghi e temperature elevate. Sono stati analizzati 192 giorni, per ogni giorno sono stati analizzati tra 15 e 24 individui.

Dal grafico è risultato che le mosche ritardano la loro attività mattutina rispetto all'alba nautica nelle stagioni primaverile ed autunnale mentre anticipano il M-onset rispetto alla stessa alba nella stagione estiva, probabilmente in risposta alle diverse temperature mattutine che caratterizzano le diverse stagioni (più alte in estate e più basse nelle altre stagioni). Questa risposta dell'attività mattutina genera la forma ad U del grafico, più evidente nei dati di Padova che in quelli di Leicester che mancano delle stagioni "estreme" caratterizzate da temperature troppo basse per consentire l'esposizione delle mosche in condizioni naturali compatibili con un'attività locomotoria apprezzabile.

3.3.2 L'inizio dell'attività locomotoria mattutina (M-onset) è fortemente sensibile alla temperatura nelle linee wild-type e mutanti

La dipendenza stagionale dell'inizio dell'attività mattutina ha suggerito di verificare se la posizione del "morning onset" fosse legata alla temperatura (a tal proposito è stata considerata la temperatura media notturna). In Tab. 3.2 viene riportato il valore R^2 che indica il valore di correlazione tra la posizione del M-onset e la temperatura media notturna. È stata trovata una correlazione, riportata graficamente in Fig. 3.4 (in blu i dati rilevati a Leicester, in rosso quelli rilevati a Padova), molto forte ($p < 0.0001$) sia per le linee wild-type (WTALA, HU e Canton S) sia per tutte le linee mutanti analizzate con l'unica eccezione della linea *tim*⁰¹ per la quale la significatività è risultata meno eclatante ($p < 0.05$). La correlazione è stata confermata per mutanti di geni fondamentali per il funzionamento dell'orologio a livello molecolare come *per*⁰¹, *clock*^{jerk}, *cry*⁰ e nel

doppio mutante $per^{01}tim^{01}$. La relazione trovata è stata confermata anche per la linea tim^{03} , mutante con perdita di funzione del gene tim , come in tim^{01} (Stempfl *et al.*, 2002), indicando che probabilmente a determinare il comportamento anomalo del mutante tim^{01} è il background genetico o una residua funzione della parte N-terminale della proteina TIM presente solo in tim^{01} (vedi paragrafo 2.2.1).

Questa relazione con la temperatura è stata osservata anche in mosche dove l'orologio endogeno è stato alterato a livello dei neuroni responsabili dell'anticipo dell'attività mattutina ($yw, UAS-hid, UAS-reaper; pdfGal4/+; +/+$ e $yw; pdfGal4/UAS-cyc\Delta103; +/+$) (Fig. 3.4). A questo scopo è stato utilizzato il sistema UAS-GAL4 guidando l'espressione di una forma deleta di CYC (CYC Δ) sotto il controllo del promotore del gene Pdf (specifico dei neuroni responsabili del "morning clock"). Inoltre sotto il controllo dello stesso promotore sono stati espressi due geni in grado di indurre apoptosi in *Drosophila* (*head involution defective* (hid) e *reaper*) per osservare se l'assenza dei neuroni orologio aveva lo stesso effetto della semplice deregolazione dell'orologio molecolare. D'altra parte anche esprimendo CYC Δ sotto il controllo del promotore del gene tim , espresso generalmente in tutti i neuroni orologio, la dipendenza dalla temperatura del M-onset non è risultata variare.

Genotipo	R ²	p-value	N
WTALA	0.5086	<0.0001	192
Canton S	0.4182	<0.0001	39
HU	0.5457	<0.0001	49
per^{01}	0.4427	<0.0001	157
tim^{01}	0.0388	0.0283	99
tim^{03}	0.7427	<0.0001	37
$per^{01}tim^{01}$	0.4863	<0.0001	71
$clock^{jerk}$	0.5799	<0.0001	53
cry^0	0.4610	<0.0001	76
Pdf^{01}	0.5044	<0.0001	72
per^S	0.6710	<0.0001	58
per^L	0.4730	<0.0001	43
$yw, UAS-hid, UAS-reaper; pdfGal4/+; +/+$	0.4530	<0.0001	24
$yw; pdfGal4/UAS-cyc\Delta103; +/+$	0.6563	<0.0001	36
$yw; timGal4/UAS-cyc\Delta103; +/+$	0.1827	0.0048	37
$yw; pdfGal4; +/+$	0.427	<0.0001	26
$yw; timGal4; +/+$	0.5388	<0.0001	25

Tab. 3.2: In tabella sono riportati i valori di R² e di p che descrivono la correlazione tra la posizione del M-onset e la temperatura media notturna nei diversi genotipi esaminati. N: numero di giorni analizzati. Normalmente sono state analizzate tra le 15 e le 24 mosche per giorno.

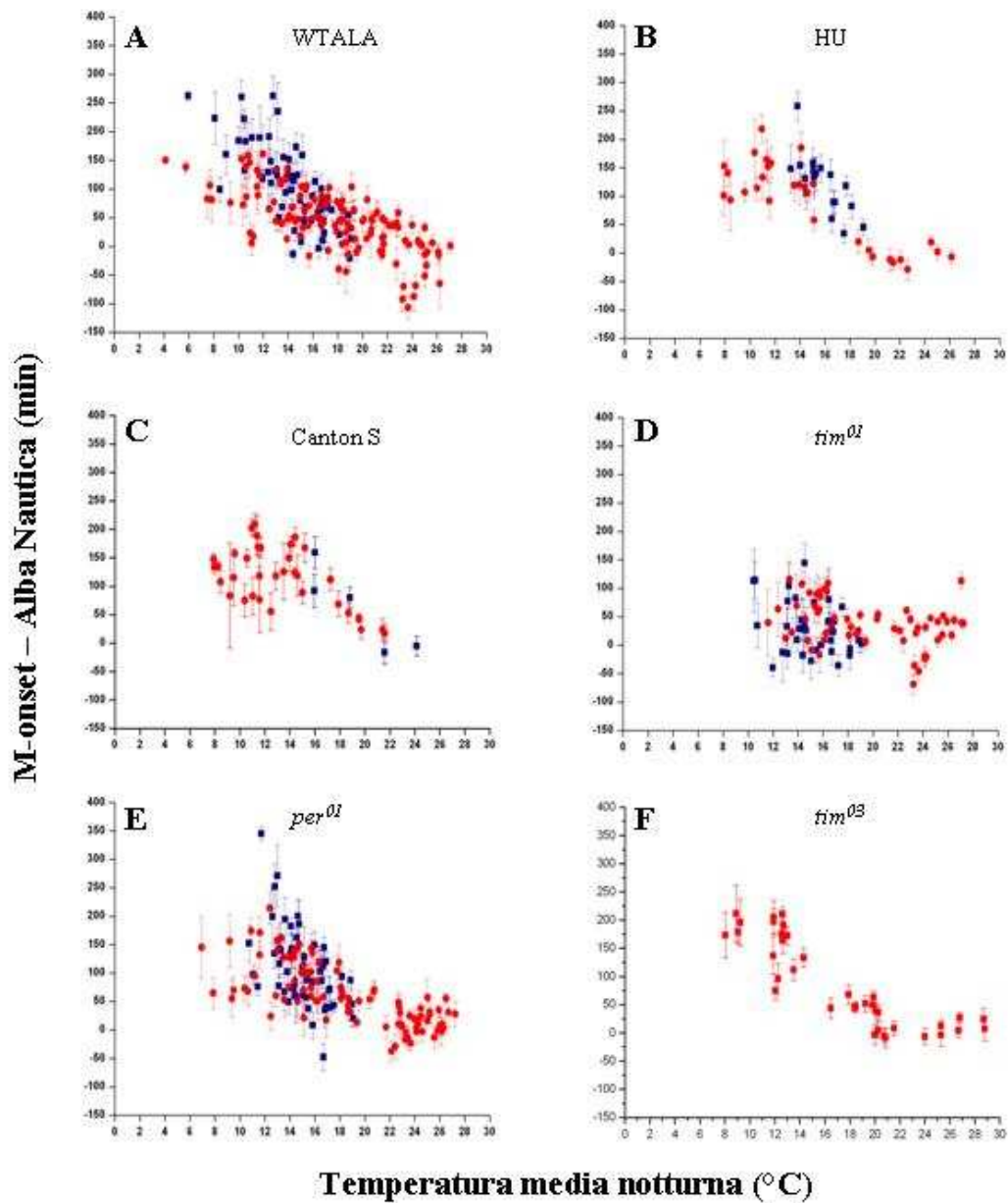


Fig. 3.4: Posizione del “morning onset” (min \pm SEM) in funzione della temperatura media notturna nell’attività locomotoria di linee wild-type e mutanti. (A) WTALA (192), (B) HU (49), (C) Canton S (39), (D) *tim⁰¹* (99), (E) *per⁰¹* (157), (F) *tim⁰³* (37), (G) *clock^{jerk}* (53), (H) *per⁰¹tim⁰¹* (71), (I) *cry0* (76), (L) *yw;pdfGal4;+/+* (26), (M) *Pdf⁰¹* (72), (N) *yw;timGal4;+/+* (25), (O) *per^S* (58), (P) *per^L* (43), (Q) *yw;pdfGal4/UAS-cyc1103;+/+* (36), (R) *yw;timGal4/UAS-cyc1103;+/+* (37), (S) *yw,UAS-hid,UAS-reaper;pdfGal4/+; +/+* (24). Tra parentesi è indicato il numero di giorni esaminati per ogni genotipo; per ogni giorno sono stati analizzati tra 15 e 24 individui. Dati rilevati a Leicester in blu, dati rilevati a Padova in rosso.

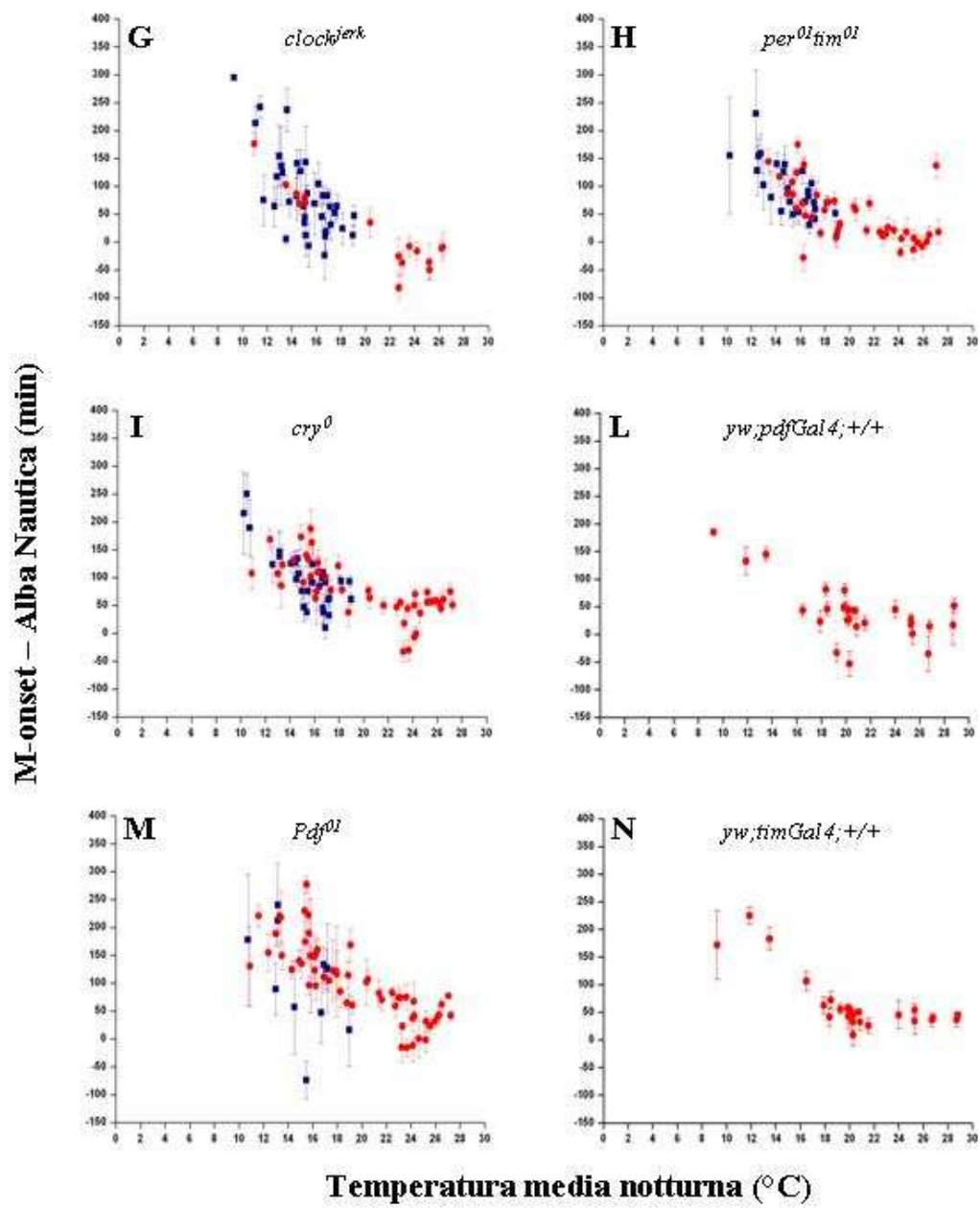


Fig. 3.4 (continua)

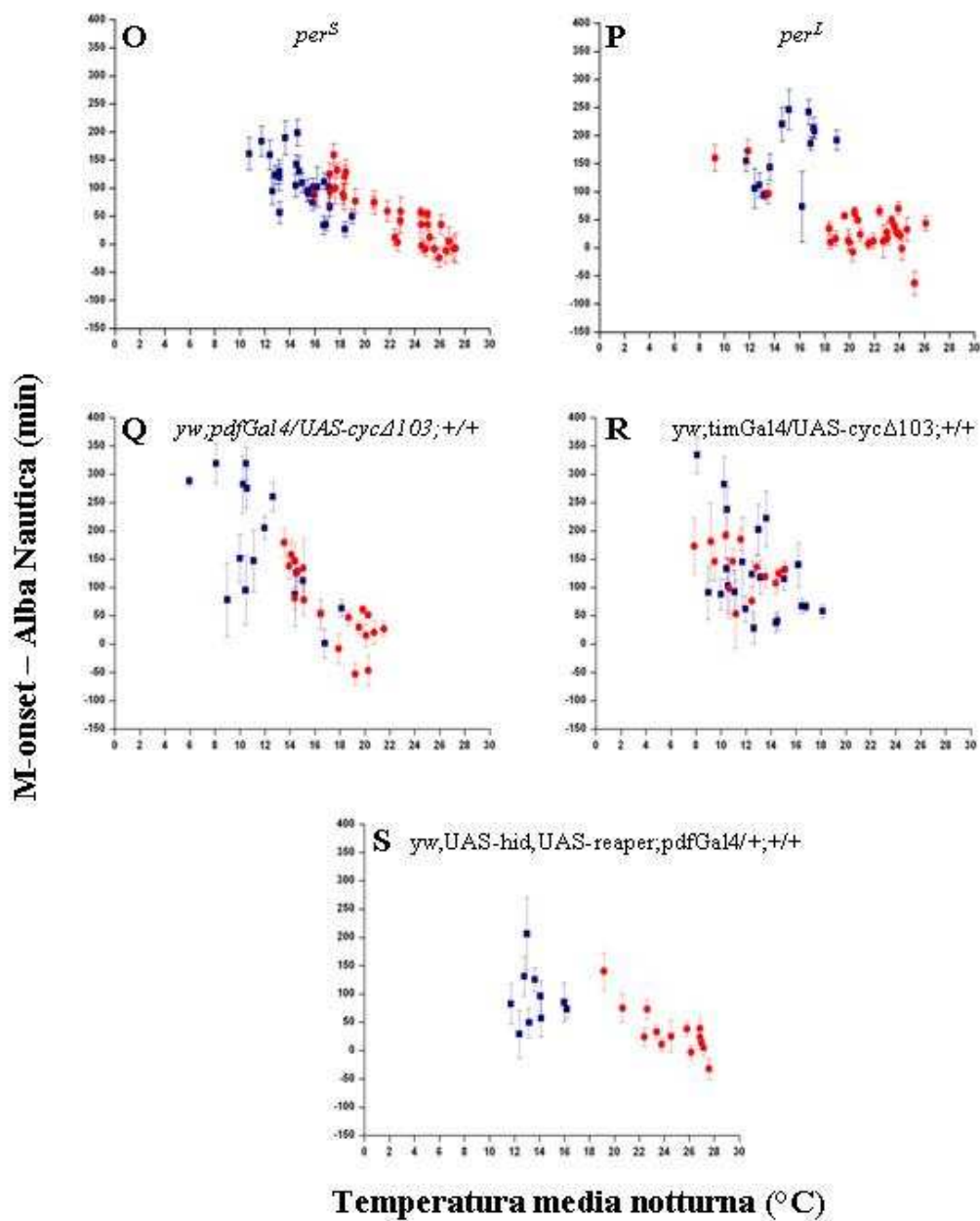


Fig. 3.4 (continua)

3.3.3 Confronto tra le curve di regressione lineare ottenute per le linee wild-type e mutanti

Per comprendere se l'inizio dell'attività mattutina (M-onset) nelle linee wild-type e nei mutanti si distribuisse in modo simile al variare della temperatura, i dati sono stati analizzati tramite test statistici. Sono stati confrontati i dati riguardanti le linee wild-type tramite un'analisi della covarianza (ANCOVA) dove la temperatura media notturna è stata usata come covariata. La fase del M-onset della linea HU è risultato statisticamente diverso da quello della linea WTALA. Dalla Fig. 3.5 è risultato che la linea HU ritarda l'inizio dell'attività rispetto alla linea WTALA a pari temperatura. Ciò potrebbe

dipendere dal diverso background genetico. La linea Canton S ha mostrato un comportamento simile alla linea HU. I mutanti sono stati quindi confrontati con i wild-type e considerati significativamente diversi solo se il comportamento risultava differente da tutti i riferimenti di controllo (WTALA, Canton S e HU).

Le pendenze delle rette di regressione delle linee mutanti sono state confrontate con quelle dei wild-type mediante un test di Student e i diversi pool di dati (wild-type e mutanti) sono stati analizzati tramite ANCOVA (usando la temperatura media notturna come covariata) per determinare se i mutanti iniziassero a muoversi prima o dopo i wild-type a pari temperatura.

Il test di Student (Tab. 3.3) ha mostrato che, tra tutte le linee analizzate, solo la linea mutante *tim*⁰¹ e gli individui con genotipo *yw; pdfGal4/UAS-cyc1103; +/+* sono significativamente diversi rispetto ai wild-type. Gli altri mutanti, *per*⁰¹, *clock*^{jerk}, *per*⁰¹*tim*⁰¹, *tim*⁰³, *cry*⁰, *Pdf*⁰¹, *per*^S e *per*^L non hanno mostrato differenze statisticamente significative così come gli individui con genotipo *yw*, *UAS-hid*, *UAS-reaper*; *pdfGal4/+*; + e *yw; timGal4/UAS-cyc1103; +/+*, e le linee *yw; pdfGal4; +/+* e *yw; timGal4; +/+*.

Genotipo	Pendenza (p-value)			ANCOVA (p-value)		
	WTALA	HU	Canton S	WTALA	HU	Canton S
WTALA	---	0.6044	0.4381	---	0.0025*	0.0186*
HU	0.6044	---	0.3180	0.0025*	---	0.7085
Canton S	0.4381	0.3180	---	0.0186*	0.7085	---
<i>per</i> ⁰¹	0.2078	0.1817	0.9911	0.0001*	0.6657	0.7809
<i>tim</i> ⁰¹	0.0001*	0.0001*	0.0002*	0.0023*	0.0001*	0.0001*
<i>tim</i> ⁰³	0.5026	0.8679	0.2158	0.0001*	0.3732	0.2891
<i>per</i> ⁰¹ <i>tim</i> ⁰¹	0.3162	0.2175	0.9958	0.003*	0.5616	0.5427
<i>clock</i> ^{jerk}	0.0139*	0.1528	0.0277*	0.8186	0.0604	0.2279
<i>cry</i> ⁰	0.0605	0.0515	0.5513	0.0001*	0.1566	0.2671
<i>Pdf</i> ⁰¹	0.5911	0.9715	0.3185	0.0001*	0.0003*	0.0001*
<i>per</i> ^S	0.7538	0.4421	0.5957	0.0001*	0.79	0.1206
<i>per</i> ^L	0.0814	0.3520	0.1013	0.0001*	0.083	0.104
<i>yw, UAS-hid, UAS-reaper; pdfGal4/+; +</i>	0.0652	0.0426*	0.2961	0.009*	0.9866	0.6269
<i>yw; pdfGal4/UAS-cyc1103; +/+</i>	0.0001*	0.0009*	0.0002*	0.0013*	0.5364	0.2122
<i>yw; timGal4/UAS-cyc1103; +/+</i>	0.4359	0.7879	0.4494	0.0182*	0.7871	0.7240
<i>yw; pdfGal4; +/+</i>	0.1614	0.1134	0.5383	0.0733	0.5956	0.3129
<i>yw; timGal4; +/+</i>	0.3159	0.2071	0.7682	0.0001*	0.1576	0.4089

Tab. 3.3: In tabella sono riportati i valori di significatività (p) delle analisi statistiche effettuate per confrontare la fase del M-onset delle linee wild-type e quella delle linee mutanti. Le pendenze delle rette di regressione sono state confrontate con un test t di Student e i diversi pool di dati sono stati analizzati con un'analisi ANCOVA (la temperatura media notturna è stata usata come covariata). I dati significativamente diversi dai wild-type sono indicati come *; in rosso sono evidenziati i dati per le linee che hanno mostrato differenze significative con tutti e tre i wild-type.

L'analisi ANCOVA (Tab. 3.3) ha indicato invece che, tra tutte le linee analizzate, solo le linee *tim*⁰¹ e *Pdf*⁰¹ hanno un comportamento significativamente diverso rispetto alle

linee wild-type. La maggior parte dei mutanti per i geni orologio analizzati ha rivelato quindi un comportamento simile al wild-type in condizioni naturali. In natura la presenza di un orologio molecolare funzionante sembrerebbe avere un'importanza di secondo piano rispetto ad altri meccanismi di regolazione che “decidono” per l'inizio dell'attività mattutina. In Fig. 3.5 è riportata una rappresentazione grafica delle regressioni lineari ottenute con i dati dei vari genotipi descritti in Fig. 3.4. Dal grafico è stato osservato che la linea *Pdf⁰¹* ritarda l'inizio dell'attività locomotoria mattutina rispetto alle linee wild-type.

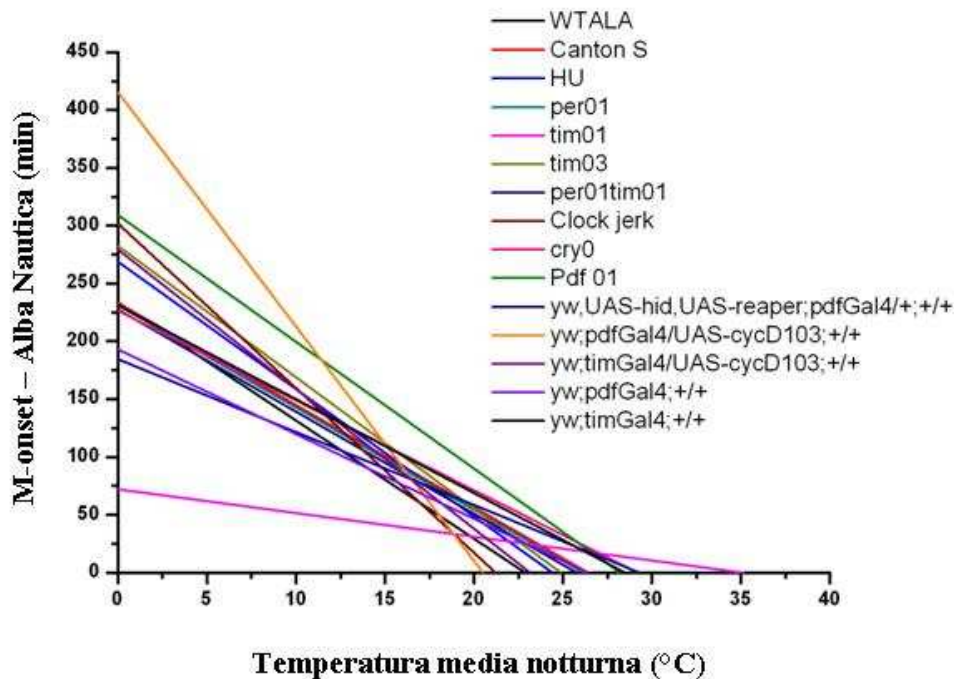


Fig. 3.5: Curve di regressione lineare di ogni genotipo analizzato per l'inizio dell'attività locomotoria mattutina. Si nota l'evidente comportamento anomalo della linea *tim⁰¹*.

3.3.4 Attività locomotoria mattutina in condizioni di buio “artificiale”

Il comportamento simile delle linee wild-type e delle linee mutanti per quanto riguarda il M-onset mattutino ci ha suggerito di indagare se l'anticipo dettato dall'orologio circadiano in condizioni controllate in laboratorio non sia sostituito in natura da una risposta evocata da intensità luminose molto basse, tipiche dell'alba nautica o astronomica. A questo scopo l'attività delle mosche è stata registrata per tre giorni in condizioni naturali dopodiché, al quarto giorno, le mosche sono state mantenute in natura ma coperte durante la notte da un telo nero rimosso solo dopo le otto di mattina in modo che non potessero percepire la luce dell'alba. L'inizio (M-onset) dell'attività locomotoria mattutina è stato analizzato in queste specifiche condizioni per le linee wild-type e per i mutanti. In Fig. 3.6 viene riportato un esempio dell'attività locomotoria di un singolo maschio WTALA in condizioni naturali normali nel giorno di registrazione a sinistra e in natura ma coperto con il telo nel giorno di registrazione successivo a destra. Come indicato dalle frecce, l'attività mattutina inizia in questo caso prima della rimozione del telo e tale comportamento è stato osservato per tutti i genotipi analizzati.

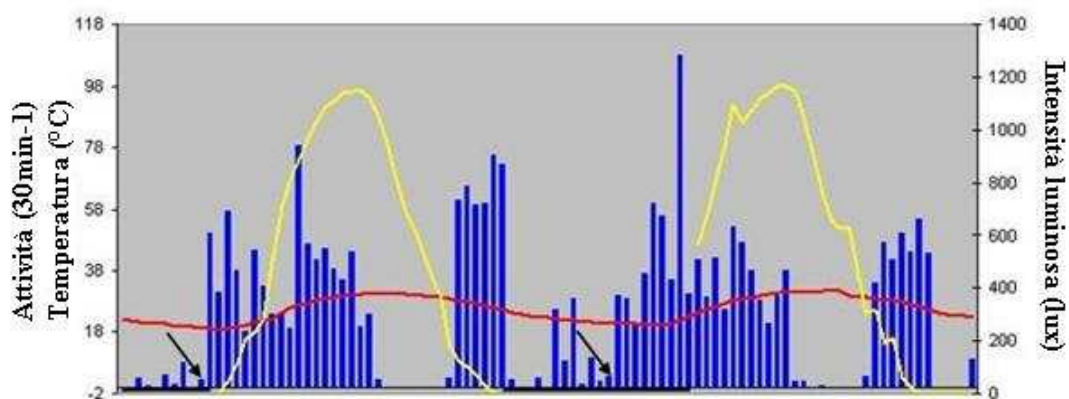


Fig. 3.6: Profilo di attività di un singolo maschio WTALA: nel giorno di registrazione a sinistra l'attività locomotoria è registrata in condizioni naturali mentre nel giorno successivo, al mattino, le mosche sono coperte da un telo nero. L'inizio dell'attività mattutina nei due giorni è indicato dalle frecce. La temperatura è rappresentata in rosso (asse principale) mentre l'intensità luminosa è rappresentata in giallo (asse secondario). La linea nera rappresenta le ore di buio.

In un secondo tipo di esperimento programmato per osservare il comportamento delle mosche in condizioni naturali al buio l'attività locomotoria è stata registrata per tre giorni in condizioni naturali dopodiché metà delle mosche per ogni genotipo sono state mantenute in natura ma coperte con un telo nero per più giorni mentre l'altra metà ha continuato ad essere monitorata in condizioni naturali. L'inizio dell'attività locomotoria mattutina è stato analizzato nelle due condizioni per i diversi genotipi. In Fig. 3.7 è riportato un esempio di attività di un singolo maschio WTALA in condizioni naturali e al buio in natura.

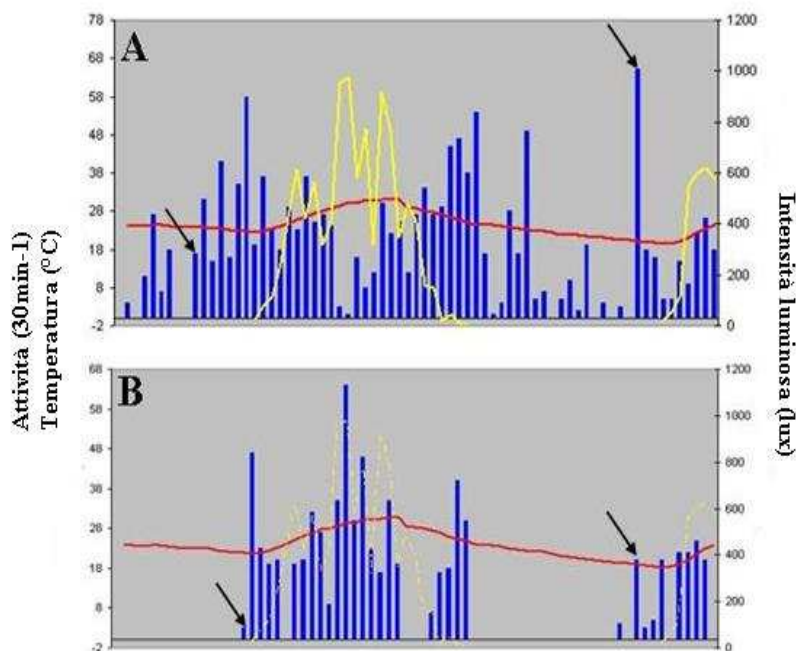


Fig. 3.7: Attività locomotoria di un singolo maschio WTALA in (A) condizioni naturali (B) condizioni naturali al buio. L'inizio dell'attività mattutina è indicato dalla freccia. La temperatura è rappresentata in rosso (asse principale) mentre l'intensità luminosa è rappresentata in giallo (asse secondario). La linea tratteggiata in B indica la luce che sarebbe stata presente in assenza della copertura.

E' stato confrontato l'inizio dell'attività mattutina in condizioni "naturali coperte" (buio) e "scoperte" (luce naturale) analizzando il momento in cui inizia l'attività al "coperto" con il giorno prima o il giorno stesso in normali condizioni naturali. Sono state analizzate le linee WTALA (A), *per*⁰¹ (B), *tim*⁰¹ (C), *clock*^{jerk} (D), *per*⁰¹*tim*⁰¹ (E), *cry*⁰ (F) e *Pdf*⁰¹ (G) (Fig. 3.8).

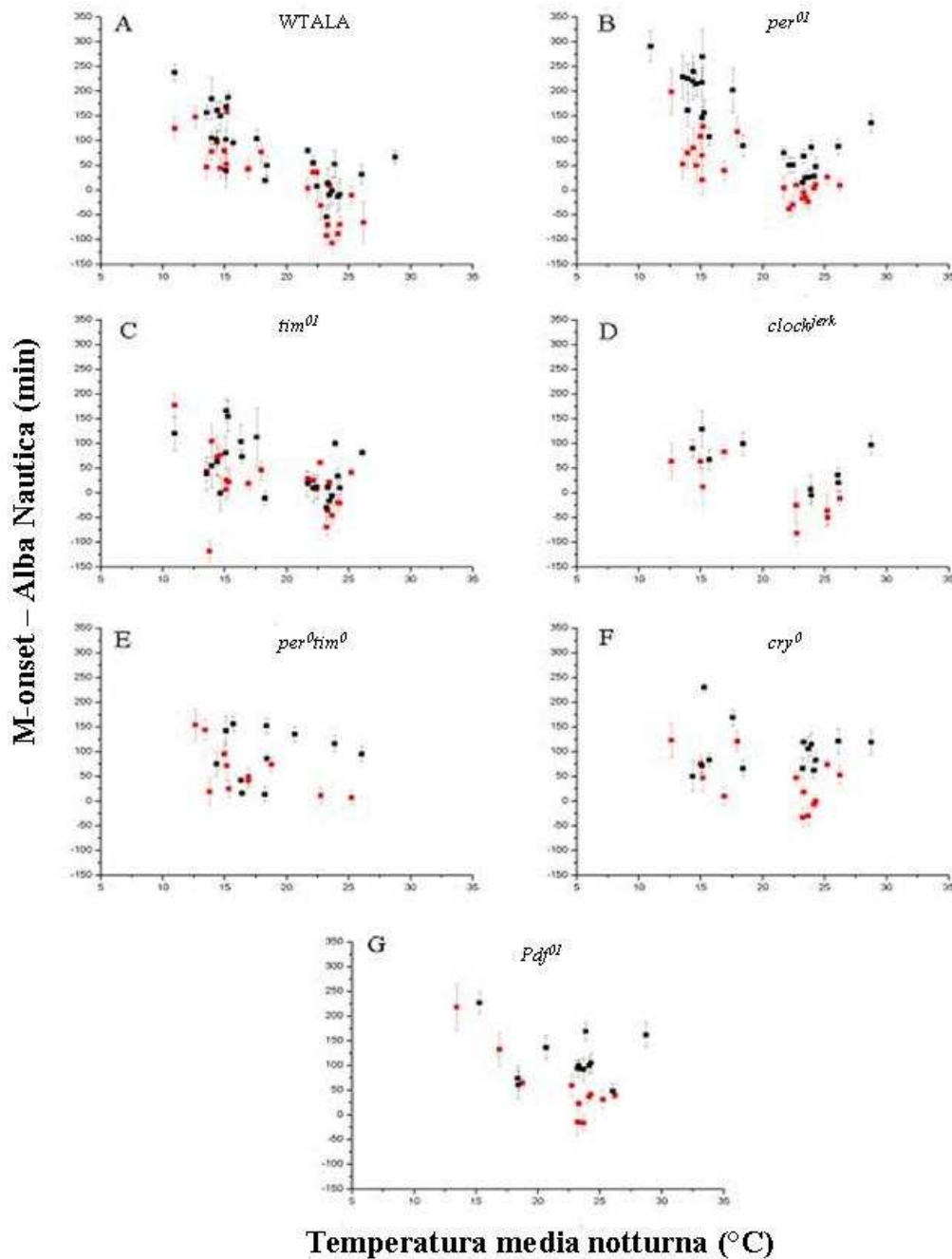


Fig. 3.8: Confronto tra la posizione del "morning onset" (in ordinata) in condizioni "naturali scoperte" (rosso) e in condizioni "naturali coperte" (nero) in relazione alla temperatura media notturna (in ascissa). (A) WTALA (25, 27); (B) *per*⁰¹ (23, 26); (C) *tim*⁰¹ (22, 23); (D) *clock*^{jerk} (9, 9) (E) *per*⁰¹*tim*⁰¹ (11, 11); (F) *cry*⁰ (13, 14); (G) *Pdf*⁰¹ (11, 12). Per ogni genotipo indicato, il primo numero tra parentesi rappresenta i giorni esaminati in condizioni "naturali scoperte" mentre il secondo numero rappresenta i giorni esaminati in condizioni "naturali coperte". Normalmente sono state analizzate tra le 15 e le 24 mosche per giorno.

I dati ottenuti sono stati analizzati come in precedenza, verificando se vi è una regressione lineare significativa. I pool di dati ottenuti per ogni genotipo considerato in questa analisi sono stati poi esaminati confrontando mediante un'analisi ANCOVA (la temperatura media notturna è stata usata come covariata) i dati raccolti per un dato genotipo in condizioni “naturali scoperte” con quelli raccolti per lo stesso genotipo in condizioni “naturali coperte”. I risultati sono riassunti in Tab 3.4. Solo per le linee WTALA, per^{01} e tim^{01} la quantità di dati raccolti è stata tale da poter portare a considerazioni supportate dalla statistica. Per le linee WTALA e per^{01} la relazione tra l'inizio dell'attività locomotoria mattutina e la temperatura media notturna si è confermata molto forte sia in condizioni “naturali scoperte” che in condizioni “coperte”. La stessa correlazione, nella linea tim^{01} , si è confermata significativa in entrambe le condizioni naturali testate (“coperte” e “scoperte”) ma in modo meno netto. L'analisi ANCOVA tra ognuno dei pool di dati raccolti per le tre diverse linee (WTALA, per^{01} e tim^{01}) in condizioni “naturali scoperte” (luce naturale) e il loro corrispettivo in condizioni “naturali coperte” (al buio) ha mostrato che l'inizio dell'attività mattutina al buio è significativamente diverso a parità di temperatura rispetto a quello registrato in presenza di luce naturale. Dalla Fig. 3.8 si è notato che l'inizio dell'attività locomotoria mattutina al buio è ritardato rispetto al M-onset calcolato in condizioni di luce naturale. Tale dato suggerisce che le mosche in natura rispondono alle basse intensità luminose dell'ambiente.

Genotipo	R	p-value	N	ANCOVA (p-value)
WTALA “scoperte”	-0.8409	<0.0001	25	0.0001
WTALA “coperte”	-0.7828	<0.0001	27	
per^{01} “scoperte”	-0.7588	<0.0001	23	0.0001
per^{01} “coperte”	-0.8131	<0.0001	26	
tim^{01} “scoperte”	-0.4432	0.0342	22	0.0164
tim^{01} “coperte”	-0.4990	0.0131	23	
$clock^{jerk}$ “scoperte”	-0.7962	0.0059	9	0.0001
$clock^{jerk}$ “coperte”	-0.5419	0.1056	9	
$per^{01}tim^{01}$ “scoperte”	-0.6439	0.0238	11	0.0005
$per^{01}tim^{01}$ “coperte”	0.1277	0.6925	11	
cry^0 “scoperte”	-0.5464	0.0432	13	0.0001
cry^0 “coperte”	-0.0650	0.8180	14	
Pdf^{01} “scoperte”	-0.8646	0.0003	11	0.0001
Pdf^{01} “coperte”	-0.2043	0.5032	12	

Tab. 3.4: In tabella sono riportati i valori di R e di p che descrivono la correlazione tra la posizione del “morning onset” e la temperatura media notturna per mosche mantenute in condizioni “naturali scoperte” (luce naturale) e in condizioni “naturali coperte” (al buio). I dati sono stati anche analizzati tramite ANCOVA (la temperatura media notturna è stata usata come covariata). N: numero di giorni analizzati. Normalmente sono state analizzate tra le 15 e le 24 mosche per giorno.

A questo punto ci si può chiedere se l'inizio dell'attività ritardato al buio in condizioni naturali sia regolato dal variare della temperatura al mattino o sia una risposta dettata da un meccanismo endogeno presente sia nei wild-type che nei mutanti. Nei giorni freddi

l'inizio dell'attività locomotoria mattutina è risultato molto ritardato, indicando che le mosche attendono l'“optimum” termico per iniziare a muoversi. Tuttavia, quando fa più caldo, le mosche risultano anticipare il momento di minimo di temperatura ad indicare che è l'intensità della temperatura e non il suo variare a stimolare il movimento (Fig. 3.4 e 3.8). Non è il variare della temperatura che induce l'attività mattutina.

3.3.5 Profilo stagionale dell'onset dell'“evening peak” in condizioni naturali nella linea WTALA

La componente serale (“evening peak”) dell'attività locomotoria è stata analizzata per lo stesso insieme di dati usati nell'analisi dell'attività mattutina (escluse le linee *yw*; *pdfGal4*; +/+ e *yw*; *timGal4*; +/+). È stata analizzata la posizione dell'“evening onset” (E-onset) nella linea WTALA rispetto al primo momento del giorno con luminosità maggiore o uguale a 1 lux (light-on), parametro indicato in ordinata nelle figure come E-onset – Lights-on. L'analisi ha mostrato che sia a Padova che a Leicester la posizione dell'E-onset tende ad essere correlata al fotoperiodo, allontanandosi dall'alba all'aumentare delle ore di luce del giorno e avvicinandosi alla stessa in primavera e autunno (Fig. 3.9).

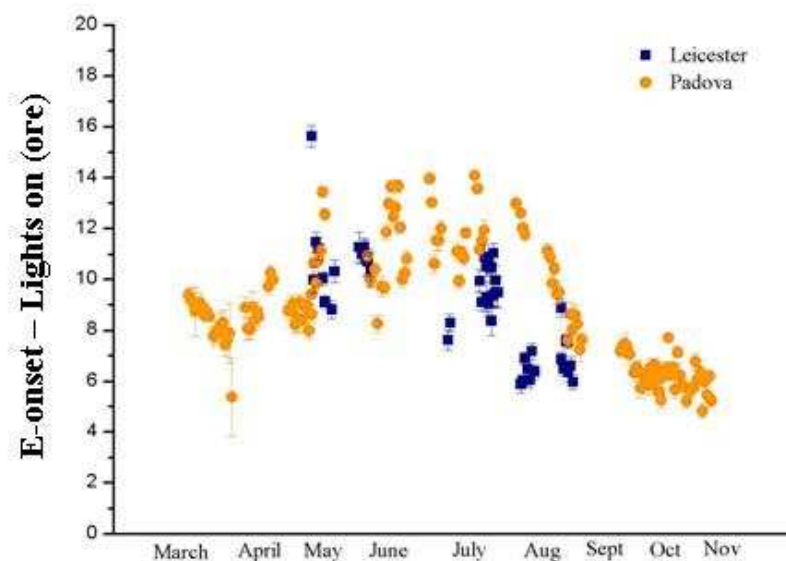


Fig. 3.9: Profilo stagionale di E-onset – Lights-on (ore \pm SEM) a Leicester e Padova per mosche WTALA. La posizione dell'“evening onset” si modifica con le stagioni, allontanandosi dall'alba durante l'estate e avvicinandosi alla stessa in primavera e autunno. Sono stati analizzati 185 giorni, per ogni giorno sono stati analizzati tra 15 e 24 individui.

La posizione dell'E-onset è stata confrontata sia con il variare del fotoperiodo, sia con la temperatura media diurna. In entrambi i casi è stata trovata una correlazione statisticamente significativa ($p < 0.0001$), tuttavia, come è possibile osservare dai grafici in Fig. 3.10 la differenza tra i dati di Leicester e Padova è minimizzata nella relazione tra l'E-onset e la temperatura suggerendo che sia quest'ultimo il fattore principale in grado di determinare la posizione dell'inizio dell'attività serale. L'E-onset, a parità di fotoperiodo è risultato anticipato a Leicester piuttosto che a Padova mostrando come sia

la diversa temperatura alle due diverse latitudini ad influenzare maggiormente tale parametro. In ragione di queste osservazioni le successive analisi sulle linee mutanti si sono principalmente concentrate sulla relazione tra la temperatura e l'E-onset.

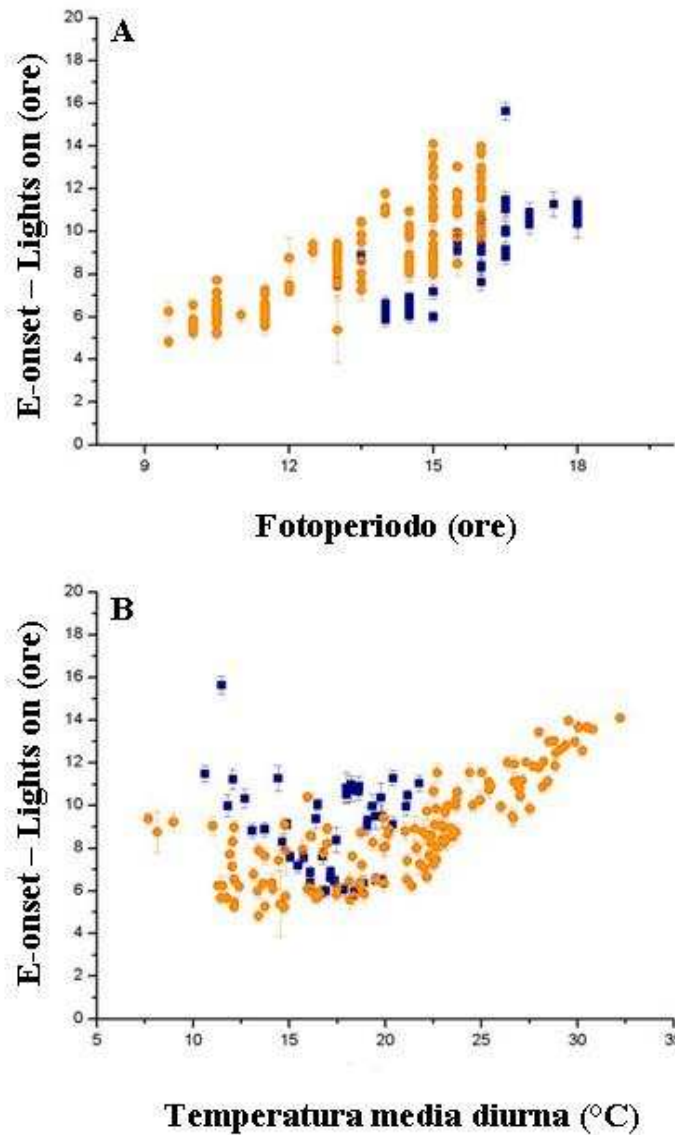


Fig. 3.10: (A) E-onset - Lights-on (ore \pm SEM) in relazione al fotoperiodo per mosche WTALA. (B) E-onset - Lights-on (ore \pm SEM) in relazione alla temperatura media diurna per mosche WTALA. A parità di fotoperiodo l'attività serale comincia prima a Leicester (blu) piuttosto che a Padova (arancio) (A). Le differenze tra Padova e Leicester osservate in A si attenuano quando l'inizio dell'attività serale viene messo in relazione con la temperatura media diurna, suggerendo che è quest'ultima il principale fattore che influenza la posizione dell'E-onset (B). Sono stati analizzati 185 giorni, per ogni giorno sono stati analizzati tra 15 e 24 individui.

3.3.6 L'attività locomotoria serale è correlata alla temperatura media diurna sia nelle linee wild-type che nei mutanti

Si è quindi indagato per capire se l'inizio dell'attività serale fosse una diretta conseguenza del decrescere della luce o della temperatura, due fenomeni che nell'ambito di una normale giornata soleggiata si verificano come eventi successivi. In

genere, a partire dalle due-tre del pomeriggio si osserva una diminuzione della quantità di luce mentre circa due ore dopo si assiste ad una diminuzione della temperatura. Avendo osservato dalle analisi sopradescritte come la temperatura sia il principale fattore a guidare l'E-onset, si è confrontato il momento dell'inizio dell'attività serale per le linee wild-type e quelle mutanti con il momento della giornata in cui si registra il massimo di temperatura (T-peak). In Tab. 3.5 viene riportato il valore R^2 che indica il valore di correlazione tra la fase dell'E-onset (calcolata come "evening-onset" – T-peak) e la temperatura media diurna. La correlazione trovata è stata riportata graficamente in Fig. 3.11 (in blu sono riportati i dati di Leicester, in rosso quelli di Padova).

Genotipo	E-onset – T-Peak		N
	R^2	p-value	
WTALA	0.3992	<0.0001	185
HU	0.33	<0.0001	47
Canton S	0.3796	<0.0001	45
<i>per</i> ⁰¹	0.3974	<0.0001	91
<i>tim</i> ⁰¹	0.3282	<0.0001	62
<i>tim</i> ⁰³	0.5563	<0.0001	31
<i>per</i> ⁰¹ <i>tim</i> ⁰¹	0.4015	<0.0001	58
<i>clock</i> ^{jerk}	0.3727	<0.0001	58
<i>cry</i> ⁰	0.7066	<0.0001	62
<i>Pdf</i> ⁰¹	0.6121	<0.0001	65
<i>per</i> ^L	0.3655	<0.0001	46
<i>per</i> ^S	0.1432	0.0019	58
<i>yw</i> , <i>UAS-hid</i> , <i>UAS-reaper</i> ; <i>pdfGal4/+</i> ; +	0.9263	<0.0001	18
<i>yw</i> ; <i>pdfGal4/UAS-cycΔ103</i> ; +/+	0.0295	0.81	34
<i>yw</i> ; <i>timGal4/UAS-cycΔ103</i> ; +/+	0.1144	0.04075	29

Tab. 3.5: In tabella sono riportati i valori di R^2 e di p che descrivono la correlazione tra la fase dell'E-onset e la temperatura media diurna nei diversi genotipi esaminati. N: numero di giorni analizzati. Normalmente sono state analizzate tra le 15 e le 24 mosche per giorno.

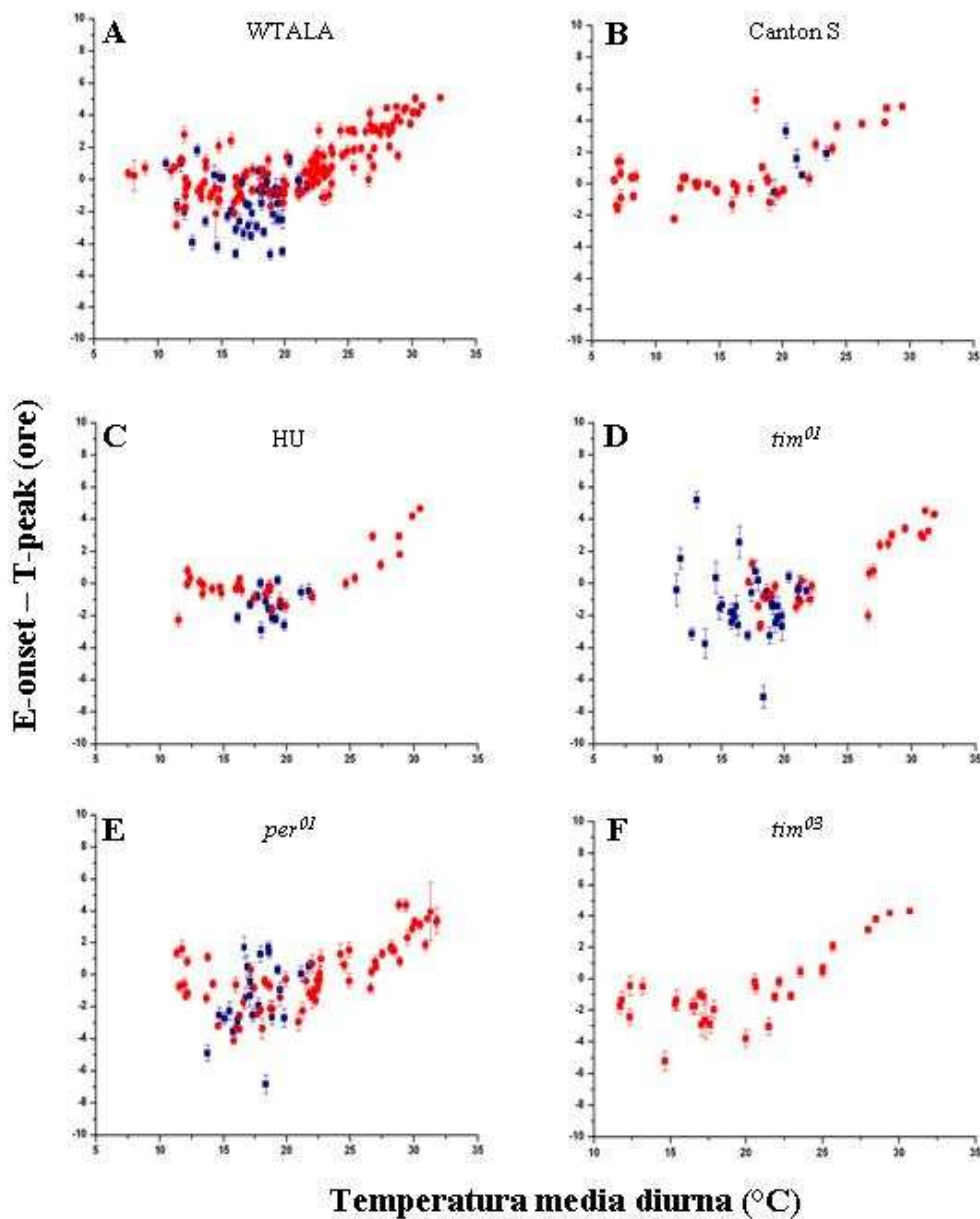


Fig. 3.11: Posizione dell'”evening onset” ($\text{min} \pm \text{SEM}$) in funzione della temperatura media diurna nell'attività locomotoria di linee wild-type e mutanti. (A) WTALA (185), (B) Canton S (45), (C) HU (47), (D) *tim*⁰¹ (62), (E) *per*⁰¹ (91), (F) *tim*⁰³ (31), (G) *per*⁰¹*tim*⁰¹ (58), (H) *Pdf*⁰¹ (65), (I) *per*^L (46), (L) *per*^S (58), (M) *cry*⁰ (62), (N) *clock*^{jerk} (58), (O) *yw;timGal4/UAS-cyc1103;+/+* (29), (P) *yw;pdfGal4/UAS-cyc1103;+/+* (34), (Q) *yw,UAS-hid,UAS-reaper;pdfGal4/+;+/+* (18). Tra parentesi è indicato il numero di giorni esaminati per ogni genotipo; per ogni giorno sono stati analizzati tra 15 e 24 individui. Dati rilevati a Leicester in blu, dati rilevati a Padova in rosso.

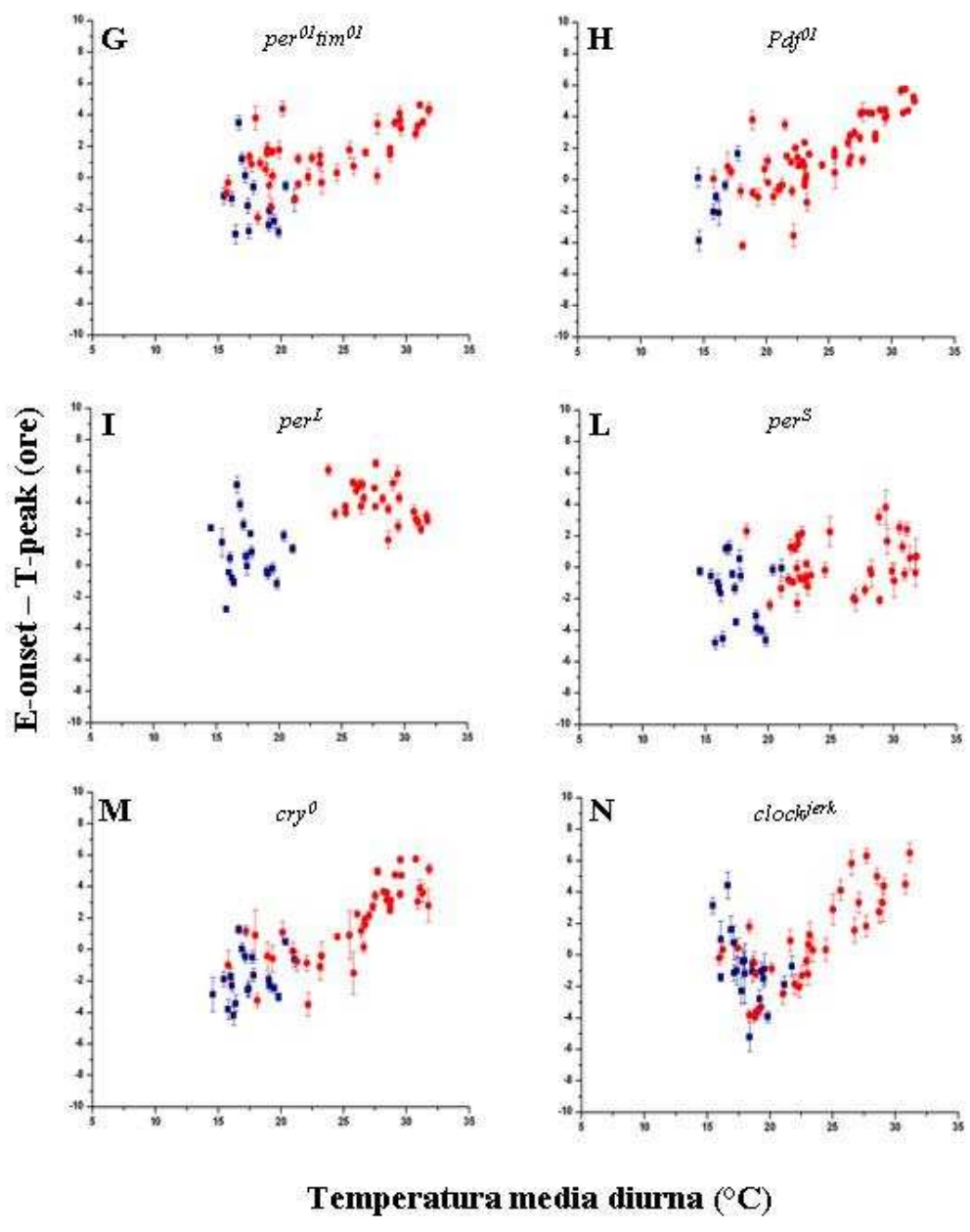


Fig. 3.11 (continua)

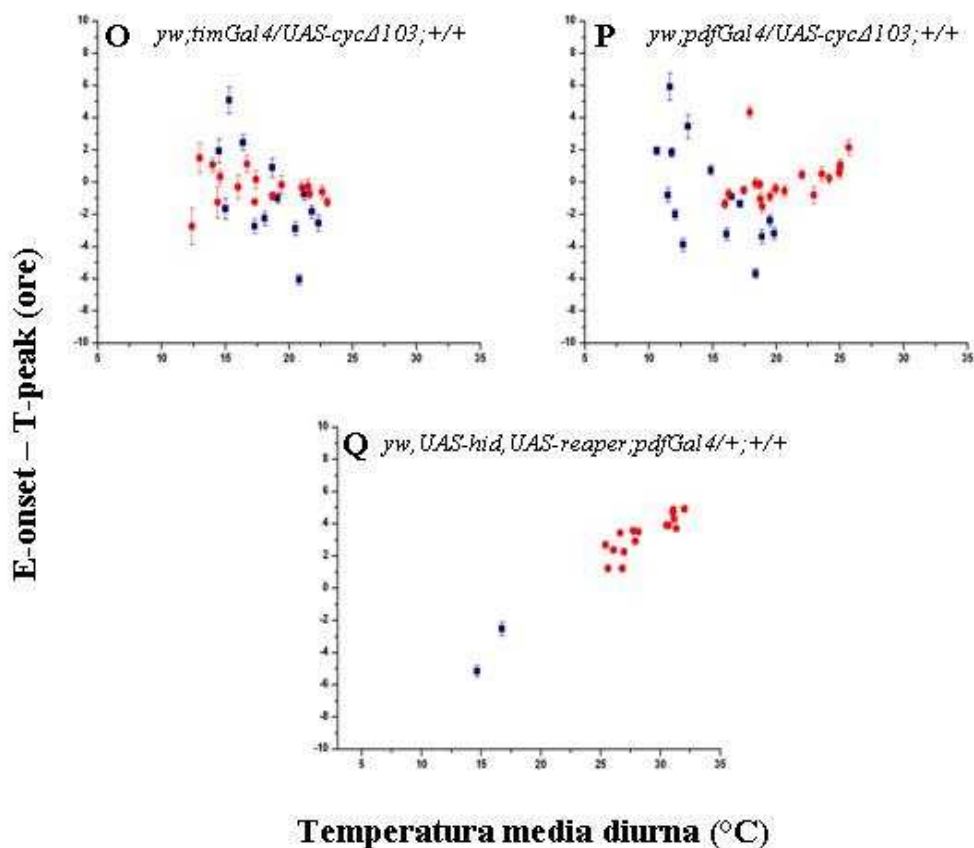


Fig. 3.11 (continua)

Tutte le correlazioni sono risultate positive per le linee wild-type (WTALA, HU e Canton S), per i principali mutanti del “core” dell’orologio (per^{01} , tim^{01} , tim^{03} , $per^{01}tim^{01}$, $clock^{jerk}$, per^S e per^L), per quelli responsabili della sincronizzazione da stimoli esterni (cry^0), per la linea mutante Pdf^{01} e per le mosche dove le cellule responsabili dell’anticipo del picco mattutino sono state eliminate tramite l’induzione via UAS-GAL4 dei geni pro-apoptotici *hid* e *reaper*. Solo per le mosche dove la forma dominante negativa CYCΔ è stata espressa nei neuroni orologio ($yw;timGal4/UAS-cyc\Delta103;+/+$ e $yw;pdfGal4/UAS-cyc\Delta103;+/+$) si è osservata una forte riduzione della significatività o la totale assenza della relazione finora riscontrata. Le mosche con questi genotipi sembrano altrettanto reattive al freddo che al caldo. Sebbene l’andamento della fase dell’E-onset si sia dimostrato temperatura dipendente, l’analisi delle curve di regressione ha mostrato un cambio di pendenza nell’intorno dei 20-22°C. Ulteriori analisi, che dovranno includere la raccolta di nuovi dati per i genotipi yw , $UAS-hid$, $UAS-reaper$; $pdfGal4/+$; +, yw ; $pdfGal4/UAS-cyc\Delta103;+/+$, yw ; $timGal4/UAS-cyc\Delta103;+/+$ e per^L , saranno necessarie al fine di definire con maggiore precisione tale effetto.

3.3.7 Inizio dell’attività serale: confronto tra le curve di regressione delle linee wild-type e mutanti

I dati raccolti per i diversi genotipi sono stati confrontati tra loro tramite un’analisi ANCOVA usando la temperatura media diurna come covariata (Tab. 3.6). In

quest'analisi la linea Canton S ha mostrato un comportamento anomalo, statisticamente diverso dagli altri wild-type, e non è stata considerata nei confronti con i mutanti. Solo le linee *per^S* e *per^L* hanno mostrato un comportamento statisticamente diverso rispetto alle linee wild-type (WTALA e HU) suggerendo che l'attività serale sarebbe maggiormente controllata rispetto all'attività mattutina dall'orologio endogeno e in particolare dall'azione della proteina PERIOD. Gli altri mutanti considerati non sono risultati significativamente diversi dal wild-type confermando che anche per l'attività serale i parametri ambientali probabilmente giocano un ruolo importante nel mascherare i difetti nella ritmicità del comportamento presenti in laboratorio nei "mutanti orologio".

Genotipo	E-onset – Tpeak ANCOVA (p)	E-onset – Tpeak ANCOVA (p)	E-onset – Tpeak ANCOVA (p)
	WTALA	HU	Canton S
WTALA	---	0.1093	0.0001*
HU	0.1093	---	0.0001*
Canton S	0.0001*	0.0001*	---
<i>per⁰¹</i>	0.0001*	0.1203	0.0001*
<i>tim⁰¹</i>	0.003*	0.319	0.0001*
<i>tim⁰³</i>	0.0022*	0.092	0.0001*
<i>per⁰¹tim⁰¹</i>	0.7089	0.3424	0.0006*
<i>clock^{jerk}</i>	0.0847	0.6837	0.0006*
<i>per^S</i>	0.0001*	0.0202*	0.0001*
<i>per^L</i>	0.0001*	0.0001*	0.3232
<i>cry⁰</i>	0.0308*	0.2215	0.0001*
<i>Pdf⁰¹</i>	0.6062	0.2541	0.0005*
<i>yw, UAS-hid, UAS-reaper; pdfGal4; +</i>	0.3699	0.2396	0.1568
<i>yw; pdfGal4/UAS- cycΔ103; +/+</i>	0.4284	0.8679	0.4284
<i>yw; timGal4/UAS-cycΔ103; +/+</i>	0.1507	0.6356	0.0008*

Tab. 3.6: In tabella sono riportati i valori di significatività (p) dell'analisi statistica effettuata per confrontare la fase dell'E-onset delle linee wild-type e quella delle linee mutanti. I diversi pool di dati sono stati confrontati con un'analisi ANCOVA (la temperatura media diurna è stata usata come covariata). I dati significativamente diversi sono indicati come *; in rosso sono evidenziati i dati per le linee che hanno mostrato differenze significative sia con la linea WTALA che con la linea HU.

3.4 Discussione

Osservando il comportamento delle linee wild-type (WTALA, HU e Canton S) e delle linee mutanti in condizioni naturali nelle diverse stagioni è risultato evidente che la luce e la temperatura influenzano fortemente sia la struttura che l'inizio dell'attività mattutina.

Osservando il grafico della posizione dell'onset del picco mattutino nelle diverse stagioni dell'anno si è notato come durante la stagione calda le mosche della linea

WTALA (Fig. 3.3) siano in grado di iniziare la loro attività anche molto prima dell'alba nautica mentre durante i mesi più freddi l'attività sia sempre ritardata anche di molte ore rispetto all'inizio del giorno. Queste osservazioni sono risultate evidenti sia per i dati raccolti a Padova che per quelli ottenuti dalle registrazioni effettuate a Leicester.

Analizzando in modo più approfondito la fase del "morning onset" (calcolata come "morning-onset" – alba nautica) si è riscontrata una correlazione tra questo dato e la temperatura media notturna per quasi tutte le linee analizzate. Più la notte è calda più l'inizio dell'attività anticipa rispetto all'alba nautica. Questa correlazione è risultata significativamente diversa se confrontiamo le due linee WTALA e HU. La linea HU, proveniente dal nord Europa, inizia l'attività in ritardo (reagendo a luminosità più intense) rispetto alla linea WTALA, costituita a partire da linee provenienti da latitudini più basse. Questo fatto può essere attribuito all'influenza del background genetico, diverso nelle due linee, che sarebbe in grado di determinare una diversa sensibilità alla luce e alla temperatura. Alcuni studi hanno mostrato come la capacità da parte di *Drosophila* di percepire la lunghezza del fotoperiodo sia importante nella regolazione dei processi che determinano l'insorgere della diapausa (Saunders *et. al.*, 1989). A basse latitudini basse temperature corrispondono a fotoperiodi invernali corti, mentre nel nord dell'Europa le stesse temperature si presentano con fotoperiodi anche più lunghi. Un modo di adattarsi a queste condizioni può essere quello di diminuire la propria sensibilità alla luce (come in questo caso nella linea HU) al fine di prevedere in anticipo al nord l'arrivo della stagione invernale (Tauber *et. al.*, 2007). D'altra parte anche la bassa sensibilità alla luce dimostrata recentemente per l'allele *ls-tim*, che sta diffondendo nel nord Europa, è in linea con questa ipotesi (Sandrelli *et. al.*, 2007).

La linea Canton S ha mostrato un comportamento simile alla linea HU e alle linee mutanti. La ragione di questo fatto risiede probabilmente in una maggiore identità di background genetico tra la linea Canton S e la maggior parte dei "mutanti orologio", presenti nei laboratori dei drosofilisti, che hanno avuto origine proprio a partire da questa linea.

Il comportamento della fase del M-onset è risultato differente dal wild-type nelle linee *tim⁰¹* e nelle mosche *yw; pdfGal4/UAS-cycΔ103; +/-*. In queste mosche l'inizio dell'attività mattutina ha mostrato una diversa sensibilità alla temperatura, ridotta nel caso delle *tim⁰¹*, maggiore nel caso del secondo genotipo. Il fenotipo della mosche *yw; pdfGal4/UAS-cycΔ103; +/-* è facilmente interpretabile ricordando che in mosche con questo genotipo risulta deregolato l'orologio a livello dei neuroni responsabili del "morning clock" che controlla l'anticipo del picco di attività mattutina in condizioni di laboratorio (Grima *et al.*, 2004). Non è stato per questo considerato sorprendente un comportamento alterato dell'attività mattutina in condizioni naturali per questo genotipo. Il fenotipo della linea *tim⁰¹* può essere interpretato ricordando che TIM è in grado di regolare l'entrainment dell'orologio endogeno tramite temperatura (Glaser e Stanewsky, 2005). E' quindi possibile che l'assenza di TIM sia in grado di modificare la risposta alla temperatura nei mutanti *tim⁰¹*. Anche la linea mutante *Pdf⁰¹* ha mostrato un comportamento significativamente diverso rispetto al wild-type nella fase del M-onset. D'altra parte tale linea anche in condizioni di laboratorio presenta difetti nella regolazione del "morning peak" (Renn *et al.*, 1999). Gli altri genotipi analizzati non hanno mostrato differenze significative rispetto al wild-type per quanto riguarda la fase del M-onset in condizioni naturali. A questo proposito è interessante notare come la linea *per⁰¹tim⁰¹* si comporti "normalmente" nonostante porti nel suo genotipo la mutazione *tim⁰¹*. Sembra che l'assenza di entrambe le proteine PER e TIM dia un effetto diverso rispetto alla mancanza di solo una di loro per quanto riguarda la regolazione

della fase del M-onset. Il comportamento del mutante *clock^{jerk}*, che non ha mostrato differenze significative rispetto al wild-type nell'attività locomotoria mattutina, corrobora il dato visto che in tale mutante non vi è trascrizione sia di *per* che di *tim* e quindi vi è l'assenza di PER e TIM come nella linea *per⁰¹tim⁰¹*. Sembra che PER sia in grado di sostituire TIM in qualche modo nella regolazione del M-onset in relazione alla temperatura. D'altra parte sono già note alcune funzioni circadiane di PER che non coinvolgono TIM, come la sua capacità di reprimere la trascrizione del dimero CLK/CYC (Rothenfluh *et al.*, 2000) e la sua capacità di formare omodimeri in grado di avere funzioni regolative circadiane (Landskron *et al.*, 2009).

Anche la linea *tim⁰³*, mutante di perdita di funzione del gene *tim*, come *tim⁰¹* (vedi paragrafo 2.2.1) non ha mostrato differenze significative nel comportamento dell'attività mattutina rispetto al wild-type. La differenza di comportamento che si è riscontrata tra *tim⁰¹* e *tim⁰³* può essere imputata al diverso background genetico. La linea *tim⁰¹* è in grado di produrre una forma tronca al C-terminale della proteina TIM, mentre in *tim⁰³* non è stata riscontrata presenza di TIM (Stanewsky *et al.*, 1998, Stempfl *et al.*, 2002). Una seconda ipotesi per spiegare la differenza di comportamento che si è riscontrata tra le linee *tim⁰¹* e *tim⁰³* potrebbe prendere in considerazione una residua capacità regolativa della forma tronca di TIM in grado di cambiare gli effetti della temperatura sul M-onset in condizioni naturali.

L'attività mattutina in condizioni naturali è risultata essere fortemente regolata anche dalla luce. I dati raccolti sottoponendo le mosche dei vari genotipi (WTALA, *per⁰¹*, *tim⁰¹*) a condizioni naturali mattutine di buio forzato hanno messo in evidenza che la regolazione dell'attività mattutina viene modificata in condizioni naturali dalla presenza/assenza di luce visto che si è riscontrato un ritardo significativo nell'inizio dell'attività locomotoria mattutina tra i dati raccolti dalle registrazioni in condizioni "naturali scoperte" e quelli in condizioni "naturali coperte" (paragrafo 3.3.4). Tenuto conto che il "morning onset" è risultato temperatura dipendente (è in grado di anticipare e ritardare rispetto all'alba nautica rispettivamente con alte e basse temperature medie notturne), l'inizio dell'attività locomotoria mattutina in condizioni "naturali coperte" non può essere attribuito all'aumento mattutino della temperatura che si ha in genere all'alba in conseguenza del sorgere del sole. In ragione di ciò l'attività locomotoria mattutina può essere regolata o da un programma fisiologico indipendente dall'orologio (valido sia nelle linee wild-type che nelle linee mutanti) o dall'orologio stesso nelle linee wild-type e da un suo residuo regolativo nelle linee mutanti. Le mosche in cui i neuroni orologio sono stati eliminati mediante apoptosi indotta (*yw*, *UAS-hid*, *UAS-reaper*; *pdfGal4/+*; +) hanno mostrato una fase del M-onset statisticamente uguale a quella delle linee wild-type, il che sembrerebbe indicare che non sia necessario un orologio endogeno per controllare l'inizio dell'attività locomotoria mattutina in condizioni naturali, tuttavia il fatto che alcuni genotipi (*tim⁰¹*, *yw*; *pdfGal4/UAS-cycΔ103*; +/+ e *Pdf⁰¹*) abbiano mostrato comportamenti statisticamente diversi rispetto al wild-type spinge a pensare che in assenza dell'orologio endogeno sopravvenga un meccanismo alternativo di regolazione, guidato probabilmente da altri meccanismi molecolari presenti in altri neuroni, mentre in presenza di un orologio in grado di funzionare, questo sia in grado di influenzare l'inizio dell'attività locomotoria mattutina. Studi recenti condotti in condizioni di laboratorio hanno messo in evidenza come *Drosophila* sia particolarmente sensibile alle basse intensità luminose muovendosi maggiormente in presenza di 10 piuttosto che di 100 o 1000 lux (Reiger *et al.*, 2007). In accordo con quanto riscontrato in laboratorio, le osservazioni condotte in condizioni

naturali hanno evidenziato come l'attività mattutina sia influenzata da intensità luminose molto basse, anche di 0.06 lux.

L'analisi dell'attività serale è stata condotta analizzando la fase dell'"evening onset" (calcolata come "evening-onset" – T-peak) nei diversi genotipi. Si è facilmente osservato come l'E-onset nei ceppi WTALA e HU sia molto vicino all'inizio del decremento di temperatura pomeridiano durante la stagione fredda mentre durante la stagione calda esso avvenga anche 6-8 ore dopo tale decremento (Fig. 3.11). Questo dato ha suggerito che non sia il solo variare dei parametri ambientali a regolare l'inizio dell'attività locomotoria serale. Studi precedenti condotti in laboratorio hanno dimostrato come la temperatura sia capace di regolare l'onset dell'attività serale. Uno splicing temperatura sensibile nella regione 3'UTR di *per* è in grado di accelerare il meccanismo dell'orologio molecolare endogeno portando a un anticipo nell'inizio dell'attività serale a basse temperature (Majercack *et al.*, 1999). Nel capitolo successivo vengono riportati dei risultati dai quali si ricava che questo splicing temperatura sensibile di *per* è presente anche in condizioni naturali. Il fatto che nelle linee wild-type si sia riscontrata una dipendenza nella fase dell'E-onset dalla temperatura (le mosche ritardano l'inizio dell'attività locomotoria serale all'aumentare della temperatura media diurna) ha suggerito che il meccanismo regolativo del gene *per*, trovato in condizioni di laboratorio, sia attivo anche in condizioni naturali, tuttavia, l'assenza di differenze significative tra la fase dell'E-onset delle linee wild-type e quella delle linee mutanti (escluse *per^S* e *per^L*) ha dimostrato che in assenza di questo meccanismo qualche pathway alternativo deve essere in grado di intervenire nel definire l'inizio dell'attività locomotoria serale.

La relazione lineare che si è riscontrata nelle linee wild-type e in molte linee mutanti tra la posizione dell'E-onset e la temperatura media diurna è risultata del tutto assente o significativamente ridotta in due particolari genotipi: *yw; pdfGal4/UAS-cyc1103; +/+* e *yw; timGal4/UAS-cyc1103; +/+*. In questi casi l'orologio endogeno è alterato rispettivamente nei neuroni orologio che controllano l'anticipo dell'attività mattutina o in tutti i principali neuroni orologio noti. Studi recenti in laboratorio hanno portato a concludere che in condizioni di buio costante siano i neuroni orologio che controllano l'attività mattutina ("morning clock") a regolare la ritmicità, mentre con fotoperiodi lunghi siano al contrario i neuroni orologio della sera ("evening clock") i maggiori responsabili della ritmicità endogena (Murad *et al.*, 2007; Picot *et al.*, 2007; Stoleru *et al.*, 2007). Il fatto che le mosche *yw; pdfGal4/UAS-cyc1103; +/+*, in grado di deregolare in modo specifico il "morning clock", abbiano mostrato un comportamento statisticamente diverso dalle linee wild-type sia nell'attività locomotoria mattutina che in quella serale (rispettivamente maggiore sensibilità alla temperatura media notturna del M-onset e assenza di una relazione tra la fase dell'E-onset e la temperatura media diurna) ha indicato come, in condizioni naturali, sia possibile modificare un fenotipo serale agendo sul "morning clock". Questo risultato ha indicato che la regolazione dell'orologio endogeno in condizioni naturali è senz'altro più complessa rispetto a quanto sinora studiato in condizioni di laboratorio.

Le linee mutanti *per^S* e *per^L* hanno mostrato una fase dell'E-onset in condizioni naturali statisticamente diversa dal wild-type. È stato dimostrato anche in condizioni di laboratorio che le linee mutanti *per^S* e *per^L* anticipano e ritardano rispettivamente la fase dell'"evening peak" rispetto al wild-type sia in alternanza di luce/buio a temperatura costante, sia in condizioni di buio costante e cicli di temperatura (Hardin *et al.*, 1990; Busza *et al.*, 2007). Anche queste osservazioni hanno suggerito che l'attività serale è maggiormente controllata dall'orologio endogeno rispetto all'attività mattutina.

Sulla base di questi dati è possibile affermare che le conclusioni riguardo alla regolazione dell'orologio endogeno circadiano cui si è giunti attraverso esperimenti condotti in condizioni di laboratorio non rendono conto della complessità del comportamento che è stato messo in evidenza dallo studio presentato in questa tesi.

Capitolo 4

Analisi trascrizionale dei geni *period* e *timeless* in condizioni naturali

4.1 Introduzione

L'orologio endogeno circadiano di *Drosophila melanogaster* è basato su una serie di loop a retroazione negativa. Nel loop principale gli elementi positivi CLK e CYC attivano la trascrizione degli elementi negativi PER e TIM che sono in grado di inibire la loro stessa trascrizione in un periodo di circa 24 ore (Dunlap, 1999). Le proteine PERIOD e TIMELESS sono state le prime ad essere identificate come facenti parti del meccanismo regolativo circadiano (Konopka e Benzer, 1971; Sehgal *et al.*, 1994). PERIOD e TIMELESS oscillano con un periodo che caratterizza la ritmicità dell'attività locomotoria (So e Rosbash, 1997). In mutanti *per^S* e *per^L* il rispettivo accorciamento e allungamento del periodo del ritmo locomotorio è accompagnato dal medesimo effetto nella ciclicità di *per* sia a livello trascrizionale che traduzionale (Hardin *et al.*, 1990). La regolazione post-traduzionale di PER è stata associata alla regolazione del periodo dell'attività locomotoria. Mutanti per DBT, la chinasi in grado di avviare la degradazione di PER, possono accorciare o allungare il periodo delle mosche in free running a seconda che riducano o accrescano l'attività della chinasi su PER (Price *et al.*, 1998). A livello trascrizionale l'mRNA del gene *per* sembra essere regolato anche dalla temperatura e dalla luce. Sono state descritte due varianti di mRNA di *per*, differenti l'una dall'altra per la presenza di un introne di 89 paia di basi (*per^{unspliced}*), sito nella regione 3' UTR (*Untranslated region*) del messaggero o per la sua assenza, determinata da splicing temperatura sensibile (*per^{spliced}*) (Cheng *et al.*, 1998). È stato dimostrato che esemplari di *Drosophila* di linee wild-type, esposti ad una temperatura di 18°C, presentano un livello di *per^{spliced}* superiore rispetto a quello di *per^{unspliced}*. Viceversa, *per^{unspliced}* è più abbondante in moscerini esposti a temperature più elevate (29°C) (Majercak *et al.*, 1999). La conseguenza dello splicing dell'mRNA di *per* è l'anticipato accumulo dell'mRNA stesso e della proteina PER. Gli effetti sul comportamento sono un picco di attività serale anticipato o ritardato rispettivamente a basse ed alte temperature. Dal punto di vista ecologico questo meccanismo molecolare sembrerebbe regolare la durata e la collocazione temporale della "siesta": a basse temperature *Drosophila* tende a muoversi ben prima del tramonto, invece, quando le temperature sono più elevate, al fine di evitare l'essiccazione, l'insetto tende a muoversi più tardi la sera, quando l'ambiente è più fresco (Majercak *et al.*, 1999). La temperatura è in grado di regolare il meccanismo di splicing in quanto l'assemblaggio di spliceosomi attivi al sito di splicing del pre-mRNA sembra favorito a basse temperature consentendo una maggiore accumulo dell'mRNA di *period* (Majercak *et al.*, 1999).

Anche la luce sembra in grado di regolare la trascrizione di *period*, agendo sullo stesso fenomeno di splicing sopra descritto. Fotoperiodi corti aumentano i livelli di *per^{spliced}* anticipando l'accumulo di PER e conseguentemente la fase dell'attività serale (Majercak *et al.*, 2004). Tenendo conto che basse temperature e fotoperiodi corti sono fenomeni stagionali associati, la regolazione dello splicing di *period* sembra essere un fenomeno molecolare che suggerisce l'esistenza di un meccanismo "sensore" in grado di percepire il cambiamento stagionale. Questo fenomeno regolativo dello splicing si mantiene nei mutanti orologio *per⁰* e *tim⁰*, mentre sembra che mutanti del gene *norpA*

(no receptor potential A) generino livelli costantemente elevati della forma *per*^{spliced} (Majercak *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2004).

Anche il gene *tim*, agendo in maniera sinergica con *per*, viene regolato e contribuisce a determinare il periodo associato all'attività locomotoria. In questo caso le regolazioni note sono però prevalentemente a livello post traduzionale e coinvolgono proteine come SHAGGY, che determina un aumento o un accorciamento del periodo in free running a seconda che sia sotto o sovraespressa (Martinek *et al.*, 2001). Altre proteine note per essere coinvolte nella regolazione della degradazione di *tim* sono SLIMB o JETLAG, ma è sufficiente considerare il ruolo di CRY nella regolazione del “clock” per comprendere che anche TIM può determinare il periodo della ritmicità circadiana (Rosato *et al.*, 2001; Grima *et al.*, 2002; Koh *et al.*, 2006). Per il gene *tim* sono state rilevate, attraverso esperimenti di Northern blot, due varianti di splicing della trascrizione del gene, *tim*^{normal} e *tim*^{cold}. In *tim*^{cold} non viene rimosso, tramite splicing, l'ultimo introne di 858 paia di basi e ciò genera un codone di terminazione precoce. A livello traduzionale si hanno quindi due proteine distinte: TIM^{COLD} e TIM^{NORMAL}. La proteina TIM^{COLD} è più corta di 33 residui amminoacidici rispetto alla forma TIM^{NORMAL}. La percentuale della variante di splicing *tim*^{cold}, sul totale dell'*mRNA* aumenta in risposta all'abbassamento della temperatura (Boothroyd *et al.*, 2007). Attualmente la funzione della proteina TIM^{COLD} non è ancora stata definita.

Nella porzione N-terminale di TIM sono stati individuati in natura due alleli diversi. E' stato infatti identificato un polimorfismo di lunghezza nella regione codificante in 5' del gene *tim*. Tale polimorfismo consiste nella possibile inserzione di una guanina (G) in posizione 294 del gene. Quando è presente la guanina la sequenza di *tim* è tale per cui vi sono due siti alternativi di inizio della traduzione poco distanti tra loro (ATG) e di conseguenza due possibili proteine (chiamate “long”, di 1421aa, e “short”, di 1389 aa), che differiscono di 23 aminoacidi, possono essere tradotte (allele *ls-tim*). Quando la guanina non è presente tra i due ATG si forma un codone di terminazione che impedisce la sintesi della forma lunga di *tim* mentre viene tradotta la forma corta (allele *s-tim*) (Fig. 4.1). In generale abbiamo quindi quattro possibili forme proteiche di TIMELESS: “long” TIM^{NORMAL} e “short” TIM^{NORMAL}, “long” TIM^{COLD} e “short” TIM^{COLD}.

In questo complesso contesto regolativo sono stati analizzati in condizioni di laboratorio e in regimi naturali i profili trascrizionali dei geni *per* e *tim* e delle loro varianti di splicing. Gli esperimenti sono stati condotti su mosche wild-type della linea WTALA in laboratorio in condizioni di LD12:12 a tre diverse temperature costanti (10, 18 e 23°C) e in natura in diverse situazioni stagionali. L'analisi è stata condotta mediante RT-PCR.

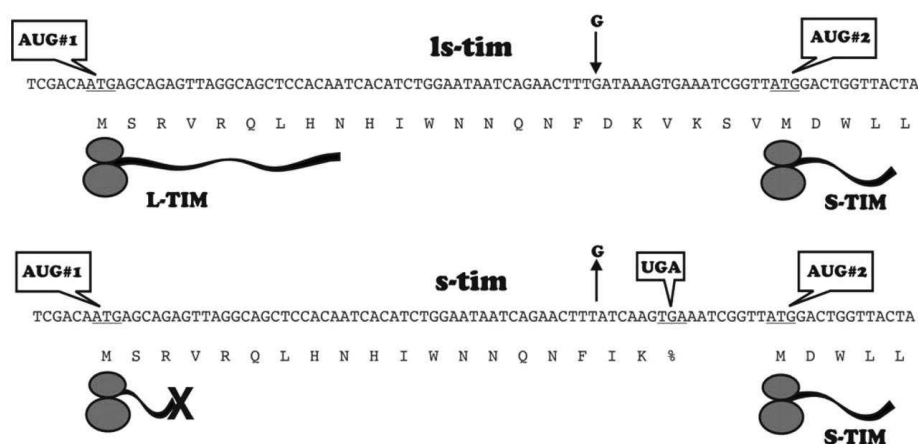


Fig. 4.1: Rappresentazione schematica del processo di traduzione della porzione N-terminale della proteina TIM in presenza o assenza della guanina (G) in posizione 294.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Campionamenti in laboratorio

Mosche del ceppo WTALA sono state mantenute in condizioni di LD 12:12 da tre a sette giorni in tre diversi incubatori alle temperature di 10, 18 o 23°C . Ad ogni temperatura, le mosche sono state successivamente campionate ogni tre ore agli ZT 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e immediatamente fissate in azoto liquido. Ogni campionamento è stato effettuato in triplo. Ogni campione era costituito da più di cinquanta teste da cui si è estratto l'RNA totale.

4.2.2 Campionamenti in condizioni naturali

Mosche del ceppo WTALA sono state mantenute in condizioni naturali, in diversi periodi dell'anno, per almeno tre giorni prima di essere campionate e fissate in azoto liquido ogni tre ore come in precedenza. Ogni campionamento è stato effettuato in triplo. Da ogni campione sono state ricavate una cinquantina di teste da cui si è estratto l'RNA totale. Durante i giorni di campionamento è stata registrata tramite il DAMSystem (Trikinetics) l'attività locomotoria di maschi appartenenti alla stessa linea WTALA campionata e i parametri ambientali di luce e temperatura.

In Tab. 4.1 sono riportate le date in cui sono stati effettuati i campionamenti:

Giorno, mese, anno del campionamento	Ore di campionamento (ogni 3 ore)	Fotoperiodo (ore)	T. massima (°C)	T. minima (°C)	T. media (°C)
27-28 Marzo 2008	Dalle ore 15.00 del 27/3 Alle ore 12.00 del 28/3	LD 12.5:11.5	12.8	7.6	8.8
6-7 Maggio 2008	Dalle ore 15.00 del 6/5 Alle ore 12.00 del 7/5	LD 15:9	23.9	10.9	18.7
21-22 Giugno 2007	Dalle ore 12.00 del 21/6 Alle ore 9.00 del 22/6	LD 16:8	34.6	24.2	28.9
24-25 Giugno 2008	Dalle ore 15.00 del 24/6 Alle ore 12.00 del 25/6	LD 16:8	34.6	24.1	28.9
12-13 Luglio 2007	Dalle ore 12.00 del 12/7 Alle ore 9.00 del 13/7	LD 16:8	28.9	17.9	23.4
20-21 Settembre 2007	Dalle ore 15.00 del 20/9 Alle ore 12.00 del 21/9	LD 13:11	26.4	11.5	17.7
23-24 Ottobre 2007	Dalle ore 12.00 del 23/10 Alle ore 9.00 del 24/10	LD 13:11	8.4	5.7	6.8
13-14 Novembre 2007	Dalle ore 6.00 del 13/11 Alle ore 3.00 del 14/11	LD 12.5:11.5	14.3	2.3	7.6

Tab. 4.1: Giorno, mese, anno ed ora di ogni campionamento effettuato in condizioni naturali. Ogni data di campionamento prevede otto raccolte in triplo nell'arco di 24 ore. Per ogni campionamento sono riportati i seguenti dati: fotoperiodo, temperatura minima, massima e media. I campionamenti sono stati effettuati dopo tre giorni di entrainment nell'ambiente naturale.

4.2.3 RT-PCR

Estrazione dell'RNA totale:

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il reagente Trizol (Invitrogen) secondo il protocollo consigliato dalla casa produttrice:

- omogeneizzazione del campione in 1 ml di Trizol ed incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente;
- aggiunta di 0.2 ml di cloroformio, agitazione e incubazione per 2 min a temperatura ambiente, quindi centrifugazione per 15 min a 13000 rpm a 4°C;
- trasferimento della fase acquosa in 0.5 ml di isopropanolo e centrifugazione con uguali modalità;
- lavaggio del pellet in etanolo 70% DEPC (DiEtilPiroCarbonato, inibitore delle RNasi) e sospensione in 10 µl di acqua DEPC;
- diluizione 1/1000 della soluzione di RNA e quantificazione allo spettrofotometro (Beckman-Coulter DU530). La quantificazione prevede la misura dell'assorbanza a 260 nm e il rapporto tra questa e l'assorbanza misurata a 280 nm per valutare l'efficienza di purificazione degli acidi nucleici dalle proteine. La concentrazione di RNA è stata poi ricavata con la formula:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l} = A_{260} * 40$$

Trattamento con DNasi:

L'RNA così estratto è stato sottoposto a un trattamento con DNasi (Promega) al fine di eliminare eventuali residui di DNA genomico all'interno del campione. La mix di reazione per ogni campione è stata preparata secondo il seguente schema:

- 8 µl di RNA in H₂O DEPC
- 1 µl Buffer di reazione 10x RNasi free
- 1 µl DNasi RNasi free

I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti dopodiché è stato aggiunto 1 µl di Dnasi stop solution per terminare la reazione. Infine i campioni sono stati trattati 10 minuti a 65°C per inattivare la DNasi.

Retrotrascrizione:

La retrotrascrizione è stata effettuata utilizzando l'enzima SuperscriptII (Invitrogen), una trascrittasi inversa di MMLV (Virus Della Leucemia Murina di Moloney), in presenza di un inibitore della RNasi di pancreas bovino (RNasi out, Invitrogen) e oligo-dT di 17 basi come primer. La mix di reazione per ogni campione è stata preparata secondo il seguente schema:

- 1 µg di RNA portato a volume in 10µl in H₂O DEPC
- 1 µl di dNTPs (10mM)
- 1 µl di oligo-dT (10µM)

A questo punto i campioni sono stati messi a 65°C per 5 minuti al fine di eliminare le strutture secondarie dell'RNA in soluzione. Essi sono poi stati trasferiti in ghiaccio e sono stati aggiunti i seguenti reagenti:

- 4 µl di buffer di reazione 5x
- 2 µl di DTT (0.1M)
- 1 µl di RNasi out
- 1 µl di SuperscriptII (100 u/µl)

La reazione è stata condotta a 42°C per un'ora; in seguito è stata portata a 75°C per 15 minuti per inattivare l'enzima.

Quattro diverse quantità di cDNA sono state retrotrascritte per osservare successivamente il progressivo incremento dell'amplificazione via PCR in relazione alla quantità iniziale di cDNA stampo di partenza: 0.25, 0.5, 0.75 e 1µg. Questa operazione serve come controllo per verificare che la retrotrascrizione sia avvenuta correttamente in tutti i campioni.

Amplificazione:

Con il cDNA retrotrascritto è stata allestita una reazione di PCR per amplificare alcune regioni "target" dei geni *period* (*per*) e *timeless* (*tim*). Nel caso di *period* si coamplificano le forme "spliced" e "unspliced", e un gene di controllo (*Cbp20*, *Cap binding protein 20*). Per *timeless* è stato coamplificato lo stesso gene di controllo con le forme *tim^{normal}* e *tim^{cold}*. Il gene di controllo è un gene il cui mRNA non cicla nelle ventiquattro ore ed è stato verificato che il suo livello di trascrizione non varia in funzione della temperatura sia amplificandolo con *period* (F=214.82, p=0.7) che con *timeless* (F=496.55, p=0.18).

Per amplificare *period* sono stati usati 4 primer (vedi Tab. 4.2), due per amplificare il controllo e due per coamplificare le due forme di *period*.

La dimensione delle bande attese e ottenute per *period* è:

- 677 pb per la forma *per^{unspliced}*;
- 588 bp per la forma *per^{spliced}*;
- 134 bp per il controllo *cbp20*

Con *timeless* sono stati usati 5 primer (Tab. 4.2), due per amplificare il controllo e tre che amplificano direttamente *tim*; di questi tre, il primer forward è comune ed è usato per l'amplificazione di entrambe le forme di *tim* (*tim^{normal}* e *tim^{cold}*) mentre i due reverse sono uno esonico e specifico per amplificare la forma "normal" e uno intronico, specifico per la forma "cold".

La grandezza delle bande attese e ottenute per *timeless* è:

- 695 pb per la forma *tim^{cold}*;
- 611 bp per la forma *tim^{normal}*;
- 134 bp per il controllo *cbp20*

Primer usati	Sequenza e posizione dei primer	Sequenza di riferimento
<i>per</i> forward	5' AAGACGGAGCCGGGCTCCAG 3' (6421-6440 bp)	NCBI accession number: X03636
<i>per</i> reverse	5' TCTACATTATCCTCGGCTTGC 3' (7201-7221 bp)	NCBI accesison number: X03636
<i>tim</i> forward	5' GTTTTTGGTGGATGGACACC 3' (13235-13254 bp)	Flybase ID=FBgn0014396
<i>tim</i> reverse esonico	5' ATGGTGGCATCTGTGTACGA 3' (11786-11805 bp)	Flybase ID=FBgn0014396
<i>tim</i> reverse intronico	5' GCAAACGTTTTCCAGTTCGT 3' (12561-12580 bp)	Flybase ID=FBgn0014396
<i>cbp20</i> forward	5' GTCTGATTCGTGTGGACTGG 3' (540-559 bp)	Flybase ID= FBgn0022943
<i>cbp20</i> reverse	5' CAACAGTTTGCCATAACCCC 3' (653-672 bp)	Flybase ID= FBgn0022943

Tab. 4.2: Primer usati nelle reazioni di PCR per i geni *period* e *timeless*.

La reazione di PCR è stata settata in modo tale da minimizzare l'amplificazione di bande non corrispondenti a quelle attese. Come temperature di annealing (T_a) sono state usate le temperature rispettivamente di 61.2°C per l'amplificazione di *period* e 63°C per

timeless. E' stato necessario testare un diverso numero di cicli di amplificazione (26, 28, 30 cicli) al fine di verificare di non superare la fase esponenziale di amplificazione della PCR, cosa che porterebbe ad errate quantificazioni del segnale, poichè quantificando le bande con PCR a saturazione, le differenze verrebbero minimizzate.

28 cicli di amplificazione sono risultati ottimali per amplificare *period* mentre sono stati usati 30 cicli per *timeless*.

Le mix di reazione (per un totale di 20µl finali) utilizzate nelle reazioni di PCR sono le seguenti:

<i>period</i>		<i>timeless</i>	
Green Buffer 5x	4 µl	Green Buffer 5x	4 µl
dNTPs (2mM)	1.6 µl	dNTPs (2mM)	1.6 µl
Primer 5' (perF) (10µM)	1µl	Primer 5' (timF) (10µM)	2µl
Primer 3' (perR) (10µM)	1µl	Primer 3' (timR intronico) (10µM)	1µl
Primer 5' (cbp20F) (10µM)	1µl	Primer 3' (timR esonico) (10µM)	1µl
Primer 3' (cbp20R) (10µM)	1µl	Primer 5' (cbp20F) (10µM)	1µl
GoTaq polimerasi	0.4 µl	Primer 3' (cbp20R) (10µM)	1µl
cDNA	1µl	GoTaq polimerasi	0.4µl
H ₂ O	9µl	cDNA	1µl
		H ₂ O	7µl

La polimerasi utilizzata è una GoTaq polimerasi della Promega.

Il programma della reazione di PCR utilizzato è stato:

amplificazione di *period*:

Denaturazione iniziale	95°C	3 minuti	} 28 cicli
Denaturazione	95°C	1 minuto	
Appaiamento dei primer	61.2 °C	1 minuto	
Estensione	72°C	45 secondi	
Estensione finale	72°C	10 minuti	

amplificazione di *timeless*:

Denaturazione iniziale	95°C	3 minuti	} 30 cicli
Denaturazione	95°C	1 minuto	
Appaiamento dei primer	63°C	1 minuto	
Estensione	72°C	45 secondi	
Estensione finale	72°C	10 minuti	

I prodotti ottenuti tramite PCR sono stati caricati in un gel di agarosio al 2% e sottoposti ad elettroforesi a 100V per 55 minuti.

Quantificazione:

Ogni amplificazione tramite PCR è stata visualizzata al transilluminatore e ne è stata salvata un'immagine con il programma Quantity One 4.6 (BIORAD) mantenendo costanti i parametri di acquisizione. Nelle immagini l'intensità delle bande ottenute è stata valutata sull'amplificazione ottenuta a partire da 0.75µg di DNA stampo usando il software ImageJ. Ogni banda è stata quantificata come prodotto della misura della sua

densità (pixel/mm²; mean gray value), corretta per il background, per la sua area (mm²). Il background di ogni immagine, valutato per ogni banda, è stato determinato solo come densità. Il valore finale che indica la quantità di RNA presente per le forme *per*^{spliced}, *per*^{unspliced}, *tim*^{normal} e *tim*^{cold} è stato ottenuto con la formula:

$$\text{Int.}_{\text{RNA(pixel)}} = \text{intensità banda (corretta per il background)} // \text{intensità banda del controllo } cbp20 \text{ (corretta per il background)}$$

La quantità di mRNA totale presente per i geni *per* e *tim* è stata calcolata come somma delle singole quantità ottenute per le rispettive varianti di splicing della trascrizione (*per*^{spliced}, *per*^{unspliced}, *tim*^{normal}, *tim*^{cold}).

Ogni campionamento è stato eseguito in triplo. Sono state effettuate tre estrazioni, tre retrotrascrizioni e tre amplificazioni indipendenti. Ogni situazione sperimentale è stata quindi descritta, per *period* e *timeless* indipendentemente, con tre valori indipendenti per ogni punto campionato. Ognuno di questi tre valori è stato normalizzato rispetto al valore massimo ottenuto all'interno dell'estrazione di cui faceva parte e i valori normalizzati sono stati mediati ed usati per realizzare i grafici dei profili di andamento dell'mRNA nelle diverse situazioni sperimentali analizzate. Sui valori normalizzati è stato calcolato l'errore standard.

4.2.4 Analisi statistiche

Tutti i grafici sono stati ottenuti usando Microsoft[®] Excel 2003 o OriginPro 8.0. Le analisi statistiche sono state condotte usando il programma Statistica 8 (StatSoft[®]) e OriginPro 8.0. In appendice 3 è riportata una breve descrizione dei test statistici utilizzati.

4.3 Risultati

4.3.1 Profili di espressione dell'mRNA dei geni *period* e *timeless* in condizioni di laboratorio (LD12:12) a 23, 18 e 10°C

Nelle Fig. 4.2 e 4.3 sono rappresentate le quantità normalizzate e mediate su tre diverse estrazioni indipendenti degli mRNA rispettivamente di *period* e *timeless*. L'analisi è stata condotta mediante RT-PCR. Gli mRNA sono stati ottenuti a partire da campioni di teste di moscerini della linea WTALA raccolti da individui mantenuti in condizioni di LD 12:12 a tre diverse temperature costanti: 23, 18 e 10°C.

Il confronto tra i valori ottenuti per le diverse temperature testate non è possibile in quanto i dati riportati sono stati ricavati a partire da quantificazioni effettuate su gel diversi e quindi non confrontabili. Negli istogrammi le diverse varianti di splicing della trascrizione sono rappresentate con colori diversi: in verde è rappresentata la forma *per*^{spliced}, in giallo *per*^{unspliced} (Fig. 4.2), in blu è rappresentata la variante *tim*^{cold} e in rosso *tim*^{normal} (Fig. 4.3).

Per il gene *period*, l'analisi statistica (ANOVA) ha messo in evidenza l'esistenza di differenze significative tra le quantità totali degli mRNA campionati a diversi ZT alle temperature di 23 (F=20.6; P=0.001) e 18°C (F=4.08; P=0.001). In particolare, i dati ottenuti indicano che l'mRNA totale di *per* ha un andamento ciclico a queste temperature e si è osservato, per entrambe le temperature, un picco di espressione all'inizio della notte. A 10°C le variazioni dell'espressione di *per* non sono risultate statisticamente significative (F=1.88; P=0.13). Analogamente, le analisi statistiche

hanno evidenziato che l'mRNA di *tim* ha un andamento ciclico a 23 (F=3.7; P=0.013) e a 18 °C (F=12.8; P=0.001) ma non a 10°C (F=2.6; P=0.053). Anche per *tim* si è osservato un picco all'inizio della notte nei profili trascrizionali ottenuti a partire da mosche mantenute a 18 e 23°C costanti. Confronti a coppie (test LSD, appendice 1) condotti sui valori ottenuti per i diversi ZT campionati a 10°C hanno mostrato tuttavia alcune differenze significative suggerendo l'esistenza di variazioni cicliche quantitative dell'mRNA di *per* e *tim* anche a 10°C.

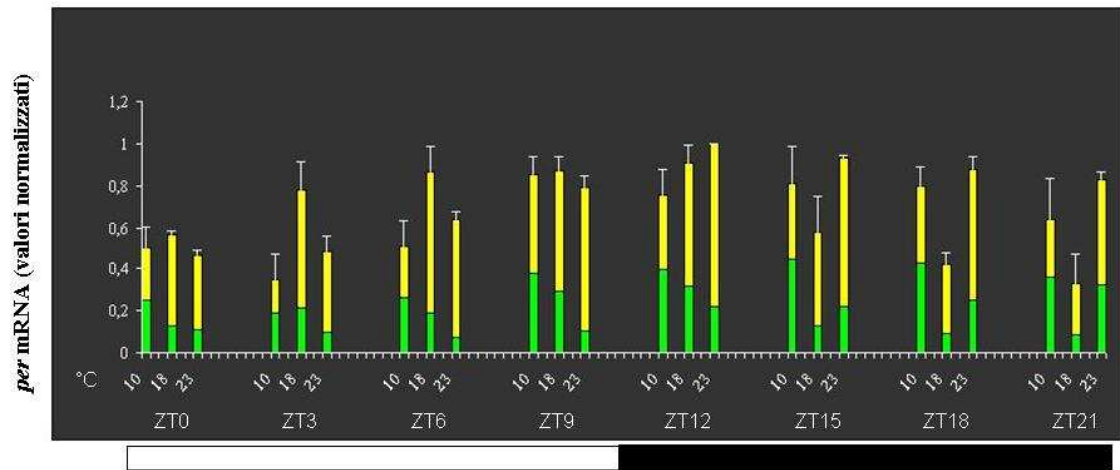


Fig. 4.2: Profili trascrizionali dell'mRNA di *period* per la linea WTALA in LD 12:12 a tre diverse temperature: 10, 18 e 23°C (\pm SEM). Le barre verdi rappresentano la variante di splicing *per*^{spliced} mentre in giallo è rappresentata la variante *per*^{unspliced}. La quantità relativa di *per*^{spliced} è maggiore a basse temperature.

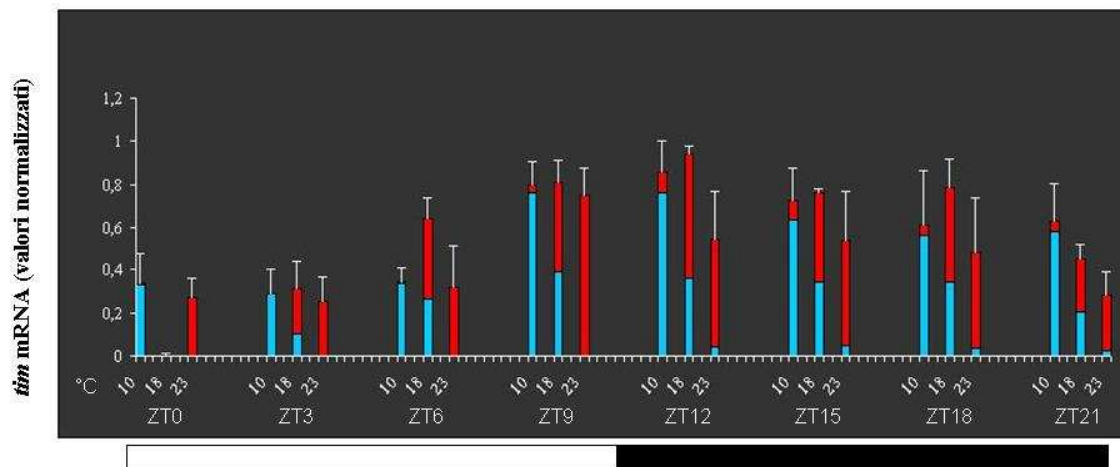


Fig. 4.3: Profili trascrizionali dell'mRNA di *timeless* per la linea WTALA in LD 12:12 a tre diverse temperature: 10, 18 e 23°C (\pm SEM). Le barre blu rappresentano la forma *tim*^{cold} mentre in rosso è rappresentata la forma *tim*^{normal}. La quantità relativa di *tim*^{cold} è maggiore a basse temperature.

Dai grafici (Fig. 4.2 e 4.3) è risultato evidente che la quantità relativa di *per*^{spliced} e *tim*^{cold} aumenta passando da 23 a 10 °C. La proporzione di *per*^{spliced} aumenta da una media del 22.4% a 23°C fino a una media del 50.2% a 10°C. La proporzione di *tim*^{cold} passa da una media del 2.2% a 23°C a una media del 36% a 18°C fino a diventare prevalente a 10°C, dove rappresenta una media del 93% del totale. Il variare della quantità relativa delle due varianti di splicing (*per*^{spliced} e *tim*^{cold}) in funzione della

temperatura è risultato statisticamente significativo ($per^{spliced}$: $F=68.29$, $P<0.001$; tim^{cold} : $F=369.29$, $P<0.001$) (Fig. 4.4).

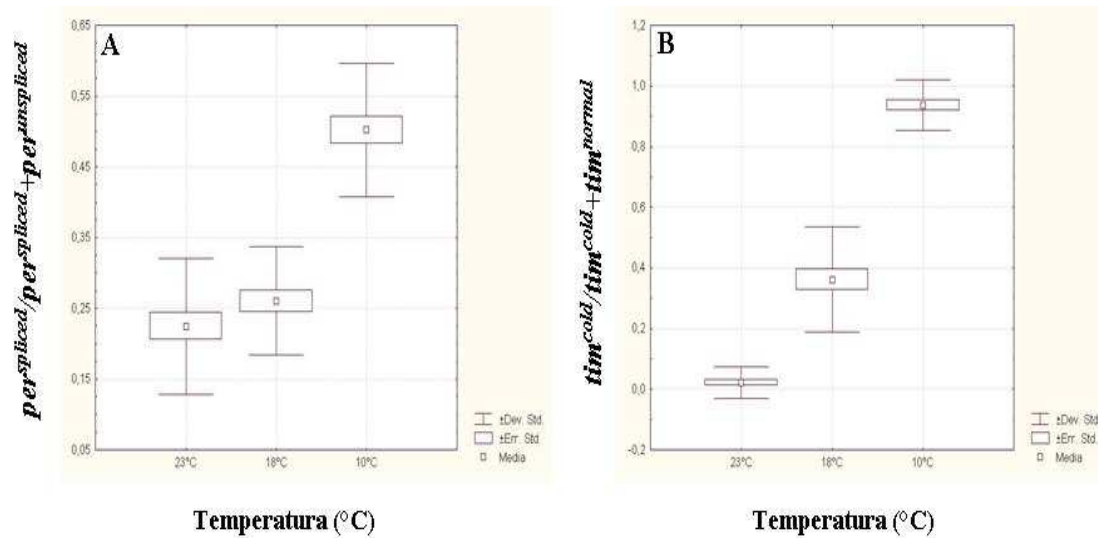


Fig. 4.4: L'analisi statistica (ANOVA) dimostra come, in condizioni di laboratorio, la proporzione di $per^{spliced}$ (A) ($F=68.29$, $P<0.001$) e quella di tim^{cold} (B) ($F=369.29$, $P<0.001$) sul totale di mRNA trascritto aumentino significativamente con il diminuire della temperatura.

Studi realizzati da Majercak e collaboratori (1999) hanno dimostrato che il livello di espressione dei geni *per* e *tim* dipende dalla temperatura. L'espressione di *per* è risultata maggiore in mosche mantenute in LD12:12 alla temperatura di 18°C rispetto a quanto misurato in mosche mantenute, sempre in LD 12:12, a 25 o 29°C. L'espressione di *tim*, al contrario, è risultata inferiore in mosche mantenute in regime LD12:12 a 29°C rispetto a quanto misurato nelle stesse mantenute a 25 o 18°C (Majercak *et al.*, 1999).

Al fine di verificare se quanto osservato da Majercak *et al.* (1999) sulla linea Canton S fosse presente anche sulla linea da noi studiata, è stata condotta mediante RT-PCR un'analisi comparativa dell'espressione dell'mRNA totale dei geni *per* e *tim* in mosche WTALA mantenute in regime LD 12:12 alle temperature di 10, 18 e 23°C. L'analisi è stata condotta per lo ZT in cui generalmente è stato riscontrato il picco di espressione dei due geni ovvero ZT12. I risultati ottenuti sono riportati in Fig. 4.5. L'analisi statistica (LSD) ha messo in evidenza l'esistenza di una differenza significativa tra i livelli di espressione di *tim* a 10°C rispetto a 23°C ($F=8.791$, $p=0.04135$) e tra i livelli di espressione di *per* a 10°C rispetto a 23°C ($p=0.045$). I risultati ottenuti hanno quindi confermato quanto già osservato per la linea Canton S. Infatti, l'espressione di *tim* è risultata minore a basse temperature mentre quella di *per* più elevata.

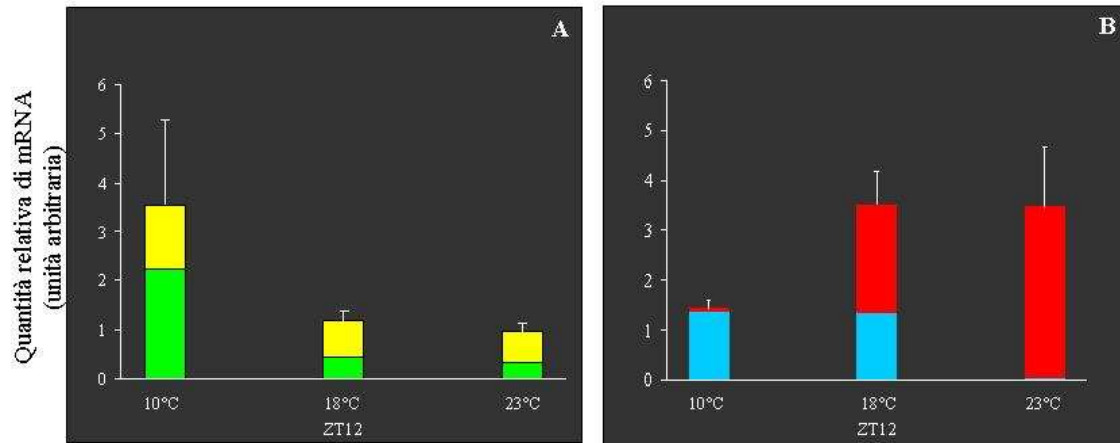
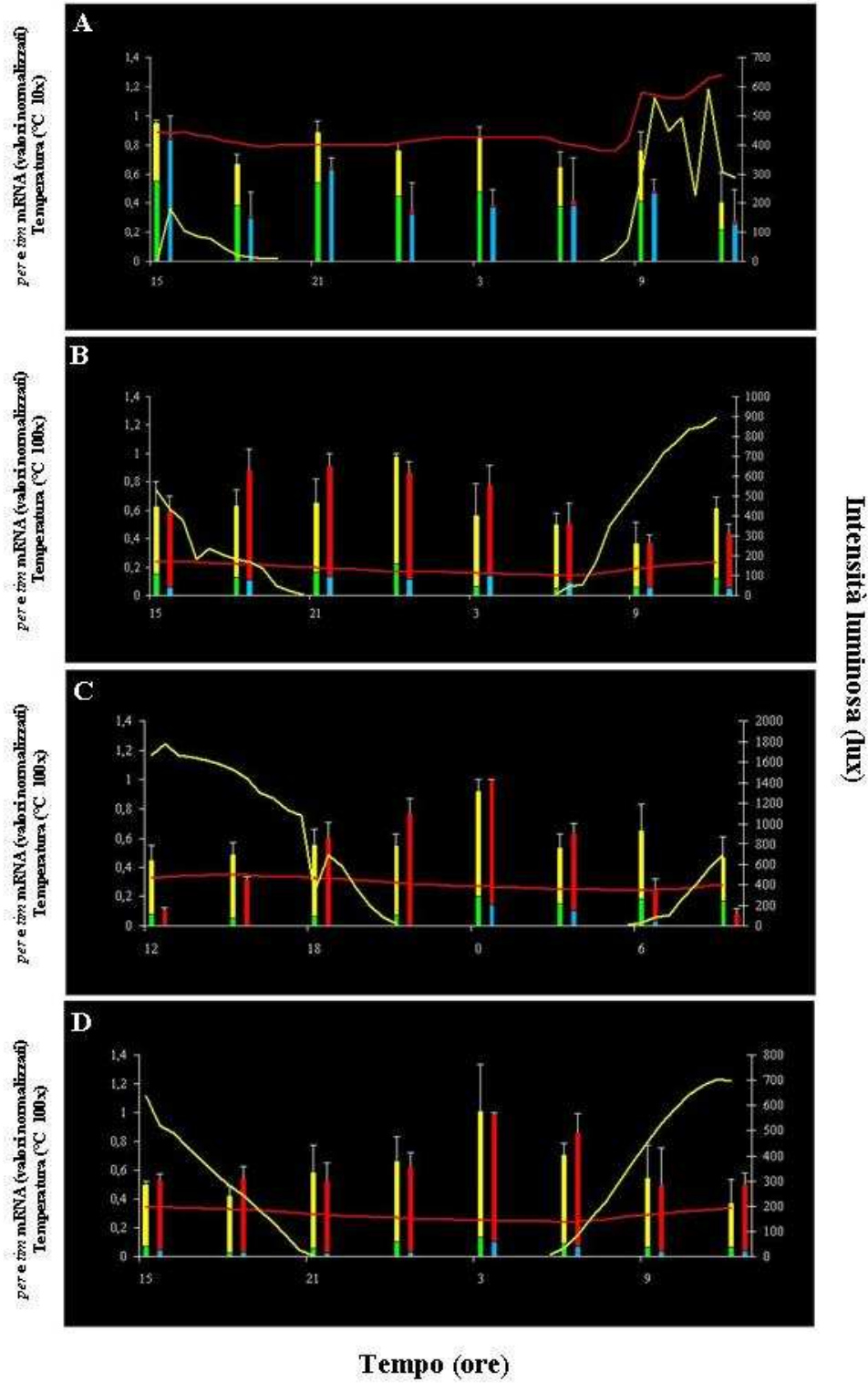


Fig. 4.5: Livelli relativi di mRNA totale per i geni *per* (A) e *tim* (B) calcolata a ZT12 per mosche mantenute in regime di LD 12:12 a tre diverse temperature (10, 18 e 23°C) (\pm SEM). In verde è rappresentato *per^{spliced}*, in giallo *per^{unspliced}*, in blu *tim^{cold}*, in rosso *tim^{normal}*. L'analisi statistica rivela che l'espressione di *per* è maggiore a 10°C ($p=0.045$) rispetto a 18 e 23°C mentre l'espressione di *tim* è minore a 10°C rispetto a 18 e 23°C ($p=0.041$).

4.3.2 Profili di espressione dell'mRNA dei geni *period* e *timeless* in condizioni naturali

Nella Fig. 4.6 A-H sono rappresentate le quantità normalizzate e mediate su tre diverse estrazioni indipendenti degli mRNA rispettivamente di *period* e *timeless*. L'analisi è stata condotta mediante RT-PCR. Gli mRNA sono stati ottenuti a partire da campioni di teste di moscerini della linea WTALA raccolti da individui mantenuti in condizioni naturali da almeno tre giorni in diverse stagioni. Negli istogrammi le diverse varianti di splicing sono rappresentate con colori diversi: in verde la variante di splicing *per^{spliced}*, in giallo *per^{unspliced}*, in blu *tim^{cold}* e in rosso *tim^{normal}*. La linea rossa rappresenta la temperatura (°C) mentre la linea gialla rappresenta l'intensità luminosa (lux).

Il confronto tra i valori ottenuti per *period* con quelli ottenuti per *timeless* non è possibile in quanto i risultati riportati sono stati ricavati a partire da quantificazioni effettuate su gel diversi e quindi non confrontabili.



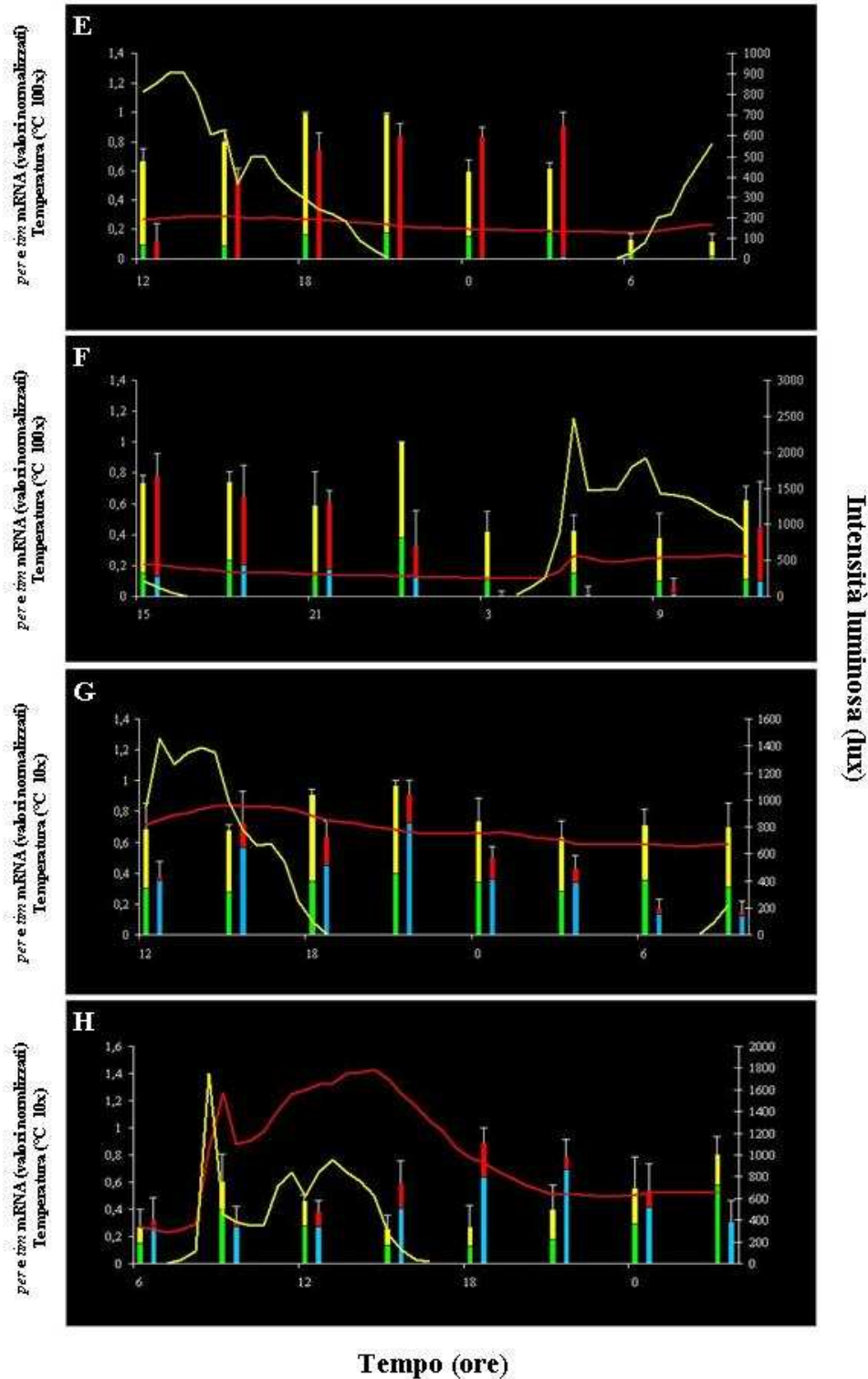


Fig. 4.6: Profili trascrizionali dell'*mRNA* di *period* e *timeless* per la linea WTALA in condizioni naturali (\pm SEM). Con la linea rossa è rappresentata la temperatura (asse principale), con la linea gialla l'intensità luminosa (asse secondario). Gli istogrammi in verde rappresentano *per^{spliced}*, in giallo *per^{unspliced}*. La proporzione di *per^{spliced}* è maggiore a basse temperature. Le varianti di splicing della trascrizione del gene *tim* sono rappresentate rispettivamente in blu per *tim^{cold}* ed in rosso per *tim^{normal}*. La proporzione di *tim^{cold}* è più elevata a basse temperature. (A) 27-28 Marzo 2008; (B) 6-7 Maggio 2008; (C) 21-22 Giugno 2007; (D) 24-25 Giugno 2008; (E) 12-13 Luglio 2007; (F) 20-21 Settembre 2007; (G) 23-24 Ottobre 2007; (H) 13-14 Novembre 2007.

Le analisi statistiche (ANOVA e test LSD) (Tab 4.3 e appendice 1) hanno messo in evidenza differenze significative ($p < 0.05$) tra le quantità totali di mRNA del gene *period* nei diversi ZT nel corso delle 24 ore solo nel mese di Luglio 2007 (Tab. 4.3). Per gli altri periodi di campionamento, ad eccezione dei mesi di Marzo e Ottobre 2008 in cui l'andamento generale è risultato sostanzialmente piatto, sono state riscontrate differenze significative nel test LSD (appendice 1) per la presenza di un picco di massima espressione tra le ore 0.00 e le 3.00 ($p < 0.05$) mentre nelle ore diurne è stato registrato un minimo di espressione.

Per quanto riguarda il gene *timeless* l'analisi statistica (ANOVA e test LSD) (Tab 4.3 e appendice 1) ha messo in evidenza differenze significative ($p < 0.05$) tra le quantità totali di mRNA nei diversi ZT dei profili trascrizionali ottenuti nei mesi più caldi (Maggio, Giugno 2007, Luglio, Settembre, Ottobre). Tale dato ha indicato che, in condizioni naturali, *tim* ha un andamento ciclico in quasi tutte le condizioni testate sia con fotoperiodi lunghi ed elevate temperature medie sia durante la primavera e l'autunno con fotoperiodi più corti e basse temperature. Per quanto concerne il campionamento effettuato nel Giugno 2008 l'analisi ANOVA ($F=1.3$, $p=0.08$) non ha messo in luce differenze significative tra gli ZT campionati, tuttavia l'analisi LSD (appendice 1) indica come alle ore 3.00 vi sia una quantità di mRNA di *tim* statisticamente diversa da quella registrata alle ore 9.00, 12.00, 15.00, 18.00 e 21.00. Non sono risultate statisticamente diverse le quantità di mRNA presenti alle ore 24.00 e 6.00. Queste analisi hanno evidenziato quindi un andamento di espressione ciclico anche per questa situazione sperimentale analizzata.

Per quanto riguarda le analisi condotte nel mese di Novembre, il test LSD ha messo in evidenza l'esistenza di differenze statisticamente significative tra i campionamenti effettuati alle ore 18.00 e 21.00 e quelli effettuati alle prime ore del giorno (h=3.00, 6.00, 9.00 e 12.00) evidenziando un andamento ciclico per l'espressione del gene *tim* anche in questo caso.

Nel mese di Marzo invece, un eventuale andamento ciclico dell'espressione del gene *tim* non è stato supportato sia dall'analisi statistica generale (ANOVA: $F=1.3$, $p=0.3$) che di dettaglio (LSD).

Mese	<i>period</i>		<i>timeless</i>	
	F	p (value)	F	p (value)
Marzo 2008	2.6	0.051	1.3	0.3
Maggio 2008	1.58	0.21	4.15	0.008*
Giugno 2007	1.88	0.13	30.11	0.0001*
Giugno 2008	1.25	0.33	1.3	0.08
Luglio 2007	36.28	0.0001*	26.48	0.0001*
Settembre 2007	2.49	0.065	3.57	0.016*
Ottobre 2008	1.17	0.37	6.08	0.001*
Novembre 2007	1.55	0.21	2.43	0.06

Tab. 4.3: In tabella sono rappresentati i valori F e p del test ANOVA che mettono in evidenza eventuali differenze significative tra le quantità totali di mRNA ottenute nei diversi ZT nei diversi profili trascrizionali dei geni *per* e *tim*. (I dati significativamente diversi sono indicati come *, $p < 0.05$).

Al fine di verificare se in condizioni naturali le quantità relative delle varianti di splicing *per^{spliced}* e *tim^{cold}* siano funzione della temperatura, sono stati considerati separatamente un paio di ZT notturni (mezzanotte e le tre di notte) e un paio di diurni (mezzogiorno e le tre del pomeriggio). In questo modo si possono valutare anche eventuali effetti sull'espressione dovuti alla lunghezza del fotoperiodo. I dati di espressione sono stati

messi in relazione con le temperature misurate al momento del campionamento, e riportati in Fig. 4.7 e 4.8.

I valori di correlazione ottenuti hanno messo in luce una relazione diretta tra la trascrizione delle forme $per^{spliced}$ e tim^{cold} e la temperatura sia per gli ZT diurni ($per^{spliced}$: $R^2=0.74$, $F=43.35$, $P<0.0001$; tim^{cold} : $R^2=0.86$; $F=101.06$, $P<0.0001$), sia per gli ZT notturni ($per^{spliced}$: $R^2=0.68$, $F=33.37$, $P<0.0001$; tim^{cold} : $R^2=0.74$; $F=44.13$, $P<0.0001$). In particolare si è osservato che le quantità relative di $per^{spliced}$ e tim^{cold} diminuiscono all'aumentare della temperatura così come già riscontrato in laboratorio. Il confronto tra i dati raccolti negli ZT notturni (ZT 0 e ZT3) e negli ZT diurni (ZT12 e ZT15) non ha evidenziato differenze statisticamente significative sia per quanto riguarda la forma $per^{spliced}$ ($p>0.5$) sia per quanto riguarda la forma tim^{cold} ($p>0.2$). Ciò indica che la luce non influenza la proporzione nell'espressione delle forme $per^{spliced}$ e tim^{cold} .

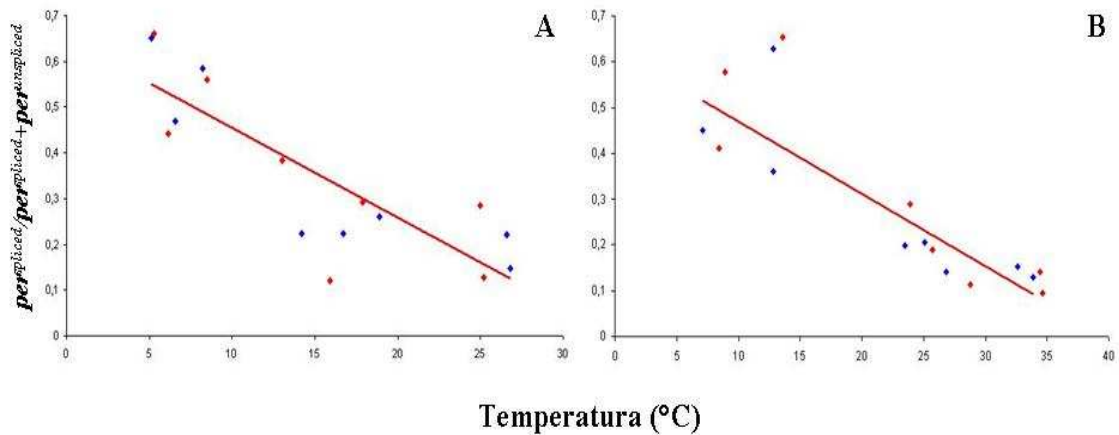


Fig. 4.7: Regressioni lineari che indicano la relazione tra la temperatura e la proporzione di $per^{spliced}$ sul totale di mRNA trascritto in condizioni naturali per ZT notturni (A) (i quadri blu rappresentano i valori di proporzione di $per^{spliced}$ a ZT0 mentre i quadri rossi rappresentano i valori a ZT3; $R^2=0.68$, $F=33.37$, $P<0.0001$) e ZT diurni (B) (i quadri blu rappresentano i valori di proporzione di $per^{spliced}$ a ZT12 mentre i quadri rossi rappresentano i valori a ZT15; $R^2=0.74$, $F=43.35$, $P<0.0001$). Il confronto tra i due gruppi è stato effettuato tramite un test di Student relativamente alle pendenze e alle intercette delle rette di regressione senza riscontrare differenze statisticamente significative. Nel confronto tra le pendenze si sono ottenuti i seguenti valori: $t=0.6557$, $p=0.517$. Nel confronto tra le intercette si sono ottenuti i seguenti valori: $t=0.3148$, $p=0.7551$.

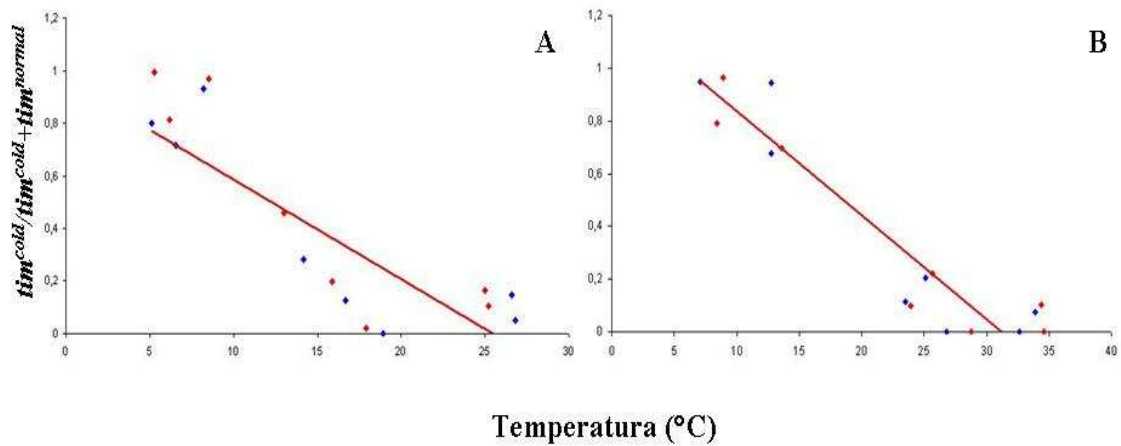


Fig. 4.8: Regressioni lineari che indicano la relazione tra la temperatura e la proporzione di tim^{cold} sul totale di mRNA trascritto in condizioni naturali per ZT notturni (A) (i quadri blu rappresentano i valori di proporzione di tim^{cold} a ZT0 mentre i quadri rossi rappresentano i valori a ZT3; $R^2=0.74$, $F=44.13$, $P<0.0001$) e ZT diurni (B) (i quadri blu rappresentano i valori di proporzione di tim^{cold} a ZT12 mentre i quadri rossi rappresentano i valori a ZT15; $R^2=0.86$, $F=101.06$, $P<0.0001$). Il confronto tra i due gruppi è stato effettuato tramite un test di Student relativamente alle pendenze e alle intercette delle rette di regressione senza riscontrare differenze statisticamente significative. Nel confronto tra le pendenze si sono ottenuti i seguenti valori: $t=0.7183$, $p=0.4781$. Nel confronto tra le intercette si sono ottenuti i seguenti valori: $t=1.2016$, $p=0.2389$.

4.4 Discussione

In parallelo allo studio dell'attività locomotoria di *Drosophila melanogaster* in natura, sono stati analizzati i profili trascrizionali di alcuni geni fondamentali nel meccanismo molecolare dell'orologio endogeno circadiano. È stata condotta un'analisi dell'espressione dell'mRNA dei geni *per* e *tim* sia in condizioni di laboratorio (LD12:12) a tre diverse temperature costanti sia in condizioni naturali in diverse stagioni. Studi condotti in precedenza in laboratorio (Majercak *et al.*, 1999 e 2004, Collins *et al.*, 2004, Boothroyd *et al.*, 2007) avevano dimostrato che possono essere trascritte due diverse varianti di splicing della trascrizione sia per il gene *period* che per il gene *timeless* in conseguenza di fenomeni di splicing temperatura dipendenti. È noto che il prevalere della variante di splicing *per^{spliced}* ha come conseguenza l'anticipo della fase dell'attività locomotoria serale delle mosche. Non è ancora noto invece quali meccanismi o fenomeni possano essere influenzati dalle diverse varianti di splicing di *tim*, *tim^{cold}* e *tim^{normal}*. È stata da noi condotta un'analisi del variare delle proporzioni sul totale dell'mRNA trascritto di queste varianti di splicing della trascrizione note per i geni *per* e *tim* in condizioni naturali e di laboratorio.

Le analisi condotte in laboratorio nell'ambito del lavoro sperimentale oggetto di questa tesi di dottorato hanno confermato i risultati di studi precedenti (So e Rosbash, 1997; Majercak *et al.*, 1999) mostrando a 23°C e 18°C un andamento ciclico dell'mRNA totale dei geni *per* e *tim* con una fase situata all'inizio della notte. A 10°C gli mRNA dei due geni sembrano perdere ciclicità segnalando un effetto della temperatura sull'ampiezza dell'oscillazione della trascrizione. I profili trascrizionali ottenuti a partire dai campionamenti in condizioni naturali hanno mostrato andamenti confrontabili con quelli ottenuti a partire dai campionamenti effettuati in laboratorio. L'espressione dell'mRNA totale dei due geni in condizioni naturali ha evidenziato andamenti ciclici con i massimi di espressione di *per* e *tim* generalmente in fase e che si collocano durante la notte anticipando sempre il momento di massima espressione dei loro prodotti

proteici (valutato però in modo specifico nei neuroni orologio tramite immunocitochimica (ICC)) che si attesta attorno all'alba (P. Menegazzi, comunicazione personale). Esperimenti condotti in laboratorio mimando il variare contemporaneo di luce e temperatura hanno evidenziato risultati analoghi (Currie *et al.*, 2009). Solo in Marzo per entrambi i geni e in Ottobre per *period* l'andamento ciclico dei geni è risultato ridotto e non supportato statisticamente. E' stato inoltre riscontrato che in condizioni di laboratorio l'espressione del gene *period* aumenta a basse temperature (10°C rispetto a 23°C) mentre quella del gene *timeless* diminuisce.

E' stato poi dimostrato che la proporzione delle forme *per^{spliced}* e *tim^{cold}* sul totale del trascritto in condizioni di laboratorio e in condizioni naturali aumenta al diminuire della temperatura. Ciò ha suggerito che il più veloce accumulo a basse temperature di *per^{spliced}* sia in grado di regolare l'anticipo della fase dell'E-onset a basse temperature anche in condizioni naturali così come dimostrato in condizioni di laboratorio (Majercak *et al.*, 1999). L'analisi dell'attività locomotoria serale in condizioni naturali ha infatti messo in evidenza un progressivo avanzamento dell'E-onset in relazione all'aumento della temperatura (paragrafo 3.3.6). Si è osservato però che una volta scesi al di sotto della soglia termica dei 20-22°C l'E-onset perde la relazione con la temperatura e sembra essere influenzato dal fotoperiodo, passando probabilmente ad una regolazione dettata dal diminuire dell'intensità luminosa indotta dal sopraggiungere del tramonto. Ciò ha indicato che in condizioni naturali il meccanismo molecolare che detta la fase dell'E-onset, determinato dallo splicing temperatura dipendente di *per*, sia mascherato da altri tipi di meccanismi regolativi a temperature inferiori a 22°C, visto che, al contrario, la proporzione di *per^{spliced}* è risultata aumentare in modo lineare anche sotto la temperatura di 22°C. Inoltre, il fatto che in condizioni naturali la relazione tra E-onset e temperatura si sia rivelata valida sia per mosche wild-type che per la linea mutante *per⁰¹* (paragrafo 3.3.6), linea che non esprime la proteina PER e non è quindi in grado di mettere in atto il meccanismo regolativo che coinvolge lo splicing temperatura dipendente di *per*, ha suggerito che in condizioni naturali altri processi biologici possano regolare la fase dell'E-onset in assenza di un orologio molecolare funzionante.

Studi precedenti hanno mostrato che in natura esistono per *timeless* due alleli distinti, *ls-tim* e *s-tim*, che differiscono per un polimorfismo di lunghezza nella regione codificante in 5' del gene *timeless*. Il primo allele genera due distinte forme di TIM, una short e una long, mentre il secondo solo la forma short. E' stato dimostrato come l'allele *ls-tim* si stia diffondendo ad elevate latitudini per la sua capacità di favorire l'entrata in diapausa a parità di fotoperiodo rispetto a *s-tim*, cosa che costituirebbe un vantaggio adattativo per mosche che devono sopravvivere nei climi nordici (Sandrelli *et al.*, 2007). Tale coinvolgimento di *tim* nella regolazione della diapausa e l'elevata proporzione di *tim^{cold}* a basse temperature hanno suggerito un possibile coinvolgimento della proteina TIM^{COLD} nei processi che regolano l'insorgenza della diapausa. Studi futuri dovranno indagare la capacità di entrare in diapausa per mosche transgeniche in grado di esprimere in modo specifico ciascuna delle quattro possibili forme di TIMELESS: "long" e "short" TIM^{NORMAL} e "long" e "short" TIM^{COLD}.

Capitolo 5

Discussione

Oggetto di studio di questa tesi di dottorato è stato in larga parte il comportamento circadiano di *D. melanogaster* mediante un'analisi dell'attività locomotoria in condizioni naturali in diverse stagioni dell'anno. L'influenza dei principali parametri ambientali, luce e temperatura, sul comportamento delle mosche è stata definita attraverso un'analisi dell'attività mattutina e serale. A questo scopo sono state analizzate linee wild-type e i principali "mutanti orologio" già caratterizzati in condizioni di laboratorio. Inoltre si è indagato a livello molecolare sull'espressione a livello trascrizionale dei geni *period* e *timeless* in condizioni naturali e di laboratorio quantificando l'mRNA totale espresso e la proporzione sul totale delle due diverse varianti di splicing note sia per il gene *per* (*per^{spliced}* e *per^{unspliced}*) che per il gene *tim* (*tim^{normal}* e *tim^{cold}*).

5.1 Caratteristiche del comportamento della linea wild-type WTALA in condizioni naturali

Il comportamento delle mosche della linea wild-type WTALA in condizioni naturali ha mostrato notevoli similarità con quanto già riscontrato in condizioni di laboratorio. Nelle registrazioni effettuate durante il periodo estivo a Padova le mosche hanno mostrato chiaramente un'attività mattutina e un picco di attività serale con un anticipo sia dell'alba che del tramonto. L'attività locomotoria delle stesse mosche della linea WTALA registrata durante il periodo primaverile e quello autunnale ha mostrato di risentire delle basse temperature con conseguente perdita o ritardo del picco mattutino. In giorni particolarmente caldi si è riscontrata la presenza di un terzo picco di attività concentrata nel pomeriggio in corrispondenza delle ore più calde del giorno. Con temperature medie diurne maggiori di 29°C si è osservato che tutte le mosche assumono un'attività trimodale. In condizioni di laboratorio il calo diurno di attività che separa l'attività mattutina da quella serale è stato definito "siesta" ed interpretato come un comportamento innato, modulato dalla temperatura, messo in atto dalle mosche per evitare le ore più calde della giornata (Majercak *et al.*, 1999). La presenza di un'intensa attività pomeridiana riscontrata in condizioni naturali con elevate temperature diurne è quindi un fenomeno del tutto inaspettato che è stato interpretato come una "reazione" al forte calore presente nei pomeriggi estivi.

Alcuni esperimenti condotti in condizioni di laboratorio hanno evidenziato risultati comportamentali in mosche wild-type che non sono stati confermati in condizioni naturali. In laboratorio è stato dimostrato che la presenza di mosche di diverso sesso all'interno dello stesso tubo di registrazione rende l'attività locomotoria prevalentemente notturna, cosa che non accade se nello stesso tubo di registrazione vi sono coppie dello stesso sesso (Fujii *et al.*, 2007). Gli esperimenti da noi condotti in condizioni naturali non hanno mostrato, al contrario, differenze significative tra la proporzione media di attività notturna registrata per coppie di diverso o dello stesso sesso. Esperimenti condotti in condizioni di laboratorio hanno inoltre dimostrato che in presenza di basse intensità luminose di notte (nel tentativo di mimare la presenza di luce lunare) la fase dei picchi dell'attività mattutina e serale si sposta all'interno del periodo notturno, mentre a livello molecolare la fase del ciclo delle proteine PER e TIM ritarda specificamente nel quinto neurone laterale piccolo (sLN_v) (Bachleitner *et al.*, 2007). Gli esperimenti da noi condotti in condizioni naturali non hanno mostrato differenze di fase

tra l'attività locomotoria registrata per mosche esposte a periodi di luna piena e quella registrata per mosche esposte a periodi di luna nuova. Anche a livello molecolare non si sono riscontrate variazioni di fase nel ciclo molecolare di PER e TIM a livello del quinto sLN_v nelle due condizioni testate (luna piena e luna nuova) in condizioni naturali (P. Menegazzi, comunicazione personale).

5.2 Influenza della luce e della temperatura sull'attività locomotoria mattutina e serale di linee wild-type e mutanti

L'attività mattutina delle linee wild-type e delle linee mutanti è risultata fortemente regolata dai parametri ambientali esterni. È stata trovata una correlazione tra la temperatura media notturna e la fase (misurata come "morning-onset" - alba nautica) dell'attività locomotoria mattutina (paragrafo 3.3.2). Inoltre, la fase dell'attività mattutina è risultata diversa per mosche mantenute in condizioni "naturali coperte" (buio "artificiale") rispetto a quella calcolata per mosche dello stesso genotipo ma mantenute in condizioni "naturali scoperte" (paragrafo 3.3.4). Ciò ha suggerito che la temperatura e la luce concorrono a determinare il M-onset in condizioni naturali

È stata riscontrata una diversa sensibilità alla temperatura per quanto riguarda il M-onset tra le due linee wild-type WTALA e HU. La linea naturale HU, proveniente da latitudini elevate, ha mostrato una fase del "morning peak" ritardata rispetto quella calcolata a pari temperatura per la linea WTALA, costituita da linee provenienti da latitudini più basse. Questo diverso comportamento sarebbe da imputare al diverso background genetico che caratterizza le due linee e sarebbe responsabile di una diversa sensibilità alla luce e alla temperatura da parte della linea HU rispetto alla linea WTALA. D'altra parte nella letteratura scientifica è già riportato che in *Drosophila* un modo per adattarsi ai fotoperiodi tipici di latitudini elevate è quello di ridurre la sensibilità alla luce (Pittendrigh *et al.*, 1989; Tauber *et al.*, 2007).

La linea *tim⁰¹* ha rivelato una scarsa dipendenza dalla temperatura della fase dell'attività locomotoria mattutina. Questo comportamento può essere spiegato ricordando che studi recenti hanno messo in evidenza che TIM, coinvolto nella regolazione luce dipendente dell'orologio endogeno tramite CRY (Ceriani *et al.*, 1999), è stato coinvolto anche in processi dipendenti dalla temperatura: i suoi livelli trascrizionali sono maggiori ad elevate temperature (Majercak *et al.*, 1999) mentre TIM è degradata in seguito a shock termici (Sidote *et al.*, 1998). È stato trovato che lo splicing dell'ultimo introne di *tim* è temperatura dipendente (Boothroyd *et al.*, 2007).

L'attività serale si è dimostrata maggiormente controllata dall'orologio endogeno rispetto all'attività mattutina in condizioni naturali. I dati hanno mostrato anche in questo caso una dipendenza della fase (misurata come "evening-onset" - T-peak) dell'E-onset dalla temperatura per la maggior parte delle linee analizzate (wild-type e mutanti). Tuttavia, le linee *per^S* e *per^L* che hanno evidenziato rispettivamente un accorciamento e un allungamento del periodo circadiano in esperimenti condotti in laboratorio (Hardin *et al.*, 1990), hanno mostrato un comportamento statisticamente diverso rispetto alle linee wild-type anche in natura. Ciò ha suggerito che la proteina PER giochi un ruolo nella regolazione dell'attività serale in condizioni naturali.

Studi condotti in laboratorio in precedenza hanno messo in evidenza come l'attività mattutina e serale siano controllate da due gruppi indipendenti di neuroni orologio (paragrafo 1.10). Le M-cells controllano l'anticipo del picco mattutino in regimi LD12:12 e regolano la ritmicità in condizioni di buio costante mentre le E-cells controllano l'attività serale in regimi LD12:12 e mantengono la ritmicità con fotoperiodi

lunghe (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004; Murad *et al.*, 2007; Picot *et al.*, 2007; Stoleru *et al.*, 2007). In condizioni naturali non si è riscontrata, al contrario, una specifica relazione tra l'alterazione dell'orologio sulle M-cells e un corrispondente fenotipo sull'attività locomotoria mattutina. Infatti, mosche *yw; pdfGal4/UAS-cyc1103; +/-*, in grado di deregolare in modo specifico il "morning clock", hanno mostrato un comportamento statisticamente diverso dalle linee wild-type sia nell'attività locomotoria mattutina che in quella serale (rispettivamente maggiore sensibilità alla temperatura media notturna del M-onset e assenza di una relazione tra la fase dell'E-onset e la temperatura media diurna). Ciò ha suggerito che probabilmente in condizioni naturali il variare continuo di luce e temperatura influisce sull'attività locomotoria generando comportamenti che sono legati a meccanismi ancora ignoti in grado di mascherare quelli riscontrabili tramite analisi condotte in condizioni di laboratorio. D'altra parte lo studio degli effetti della temperatura sull'orologio endogeno circadiano è iniziato solo nell'ultimo decennio e ha svelato per il momento solo alcuni dei meccanismi con cui la temperatura influenza la ritmicità circadiana (Matsumoto *et al.*, 1998; Glaser e Stanewsky, 2005; Miyasako *et al.*, 2007; Yoshii *et al.*, 2009).

5.3 Comportamento in condizioni naturali dei "mutanti orologio"

Il risultato più sorprendente che si può trarre dall'analisi dell'attività locomotoria registrata in condizioni naturali è che gran parte delle linee "mutanti orologio" si comportano in modo "ritmico", spesso con pattern di attività simili a quelli riscontrati nelle linee wild-type. In condizioni di laboratorio le linee mutanti si dimostrano aritmiche in "free running" (Dunlap, 1999), o al più in condizioni di alternanza luce/buio mantengono una ritmicità dettata dalla variazione rettangolare delle transizioni luminose perdendo però la capacità di anticiparle (Grima *et al.*, 2004). In condizioni naturali i passaggi luce/buio sono gradualmente e non influenzano la ritmicità delle mosche. I dati raccolti in questa tesi mostrano che le linee wild-type e la maggior parte di quelle mutanti presentano una elevata ritmicità in condizioni naturali e spesso la stessa fase dell'attività locomotoria mattutina e serale (paragrafo 2.3.2). Ciò ha suggerito che vi sia una indipendenza del comportamento delle mosche in condizioni naturali rispetto allo stato molecolare dell'orologio endogeno.

Diverse spiegazioni possono rendere conto di questi comportamenti delle linee mutanti. E' possibile che un meccanismo fisiologico indipendente dall'orologio agisca contribuendo a regolare l'attività. Questo spiegherebbe perché spesso le linee wild-type e quelle mutanti hanno un comportamento simile in condizioni naturali e il gran numero di relazioni trovate tra il variare dei parametri ambientali e i pattern locomotori. Alcuni dati però, hanno mostrato che l'orologio endogeno può influenzare l'attività locomotoria in natura, in misura maggiore per quanto riguarda l'attività serale rispetto a quella mattutina (capitolo 3). Ma allora perché il "morning peak" sarebbe più controllato rispetto all'"evening peak" da un meccanismo fisiologico indipendente dall'oscillatore circadiano? Una risposta plausibile può arrivare considerando il modo diverso con cui variano le intensità di luce e di temperatura la mattina rispetto alla sera. Al tramonto la luce inizia in genere a diminuire lentamente seguita circa due ore dopo dal decrescere della temperatura. Al contrario al mattino, la luce e la temperatura si impennano rapidamente dopo l'alba. Il più rapido variare dei parametri ambientali all'alba scatenerrebbe una risposta fisiologica in grado di sovrapporsi e mascherare più

efficacemente l'orologio endogeno nella regolazione dell'attività mattutina rispetto a quanto accade alla sera dove i cambiamenti ambientali più lenti influirebbero in misura minore sui meccanismi "clock controlled".

Un'altra possibilità è che in condizioni naturali, più complesse rispetto a quelle del laboratorio, anche l'orologio molecolare sia regolato in maniera più complessa coinvolgendo molecole e neuroni non ancora noti. D'altra parte, anche i numerosissimi dati raccolti in laboratorio non hanno ancora trovato tutti una precisa collocazione nel puzzle del meccanismo molecolare che regola la ritmicità circadiana. Ad esempio, ai neuroni laterali posteriori (LPN) non è stata ancora attribuita una funzione specifica, anche se sembrano coinvolti nell'entrainment mediato dalla temperatura, e per alcune molecole, come il neuropeptide F e l'ITP (Ion Transport Peptide) è stato solo ipotizzato un ruolo nell'output controllato dall'orologio, senza identificare alcuna funzione specifica (Klasfeld *et al.*, 2004; Shafer *et al.*, 2006; Picot *et al.*, 2007; Johard *et al.*, 2009).

I risultati nel loro complesso hanno mostrato come il variare continuo della luce e della temperatura sia in grado di generare comportamenti circadiani molto specifici. Finora una delle teorie più accreditate sulla struttura dell'orologio circadiano considera la presenza di due oscillatori che regolano l'attività mattutina e serale indipendentemente (Pittendrigh e Bruce, 1959; Helfrich-Forster *et al.*, 2007). In laboratorio a temperatura costante e con diversi cicli luce/buio i neuroni che rappresentano questi due oscillatori sono stati identificati e studiati ma in condizioni naturali il complesso di dati raccolti suggerisce una regolazione più complessa dell'orologio endogeno, con la temperatura che sembrerebbe giocare un ruolo fondamentale.

5.4 L'espressione dei geni *period* e *timeless* in condizioni naturali

Lo studio della trascrizione dei geni *period* e *timeless* e delle loro varianti di splicing ha messo in evidenza una certa omogeneità tra profili trascrizionali ottenuti dai campionamenti in condizioni di laboratorio e quelli ottenuti dai campionamenti in condizioni naturali. Gli mRNA di *per* e *tim* hanno mostrato un andamento ciclico dei loro livelli di espressione in condizioni di laboratorio alle temperature testate (10, 18 e 23°C) con una fase all'inizio della notte. Anche i profili trascrizionali ottenuti dai campionamenti in condizioni naturali hanno evidenziato un andamento ciclico dell'espressione di *per* e *tim* in quasi tutte le condizioni testate con un massimo trascrizionale che è stato registrato durante la notte, circa sei ore prima del massimo di espressione del loro prodotto proteico, valutato però specificamente nei neuroni orologio tramite immunocitochimica (ICC). Solo all'inizio della primavera (Marzo) o in autunno avanzato (Ottobre), solo per *period*, è stato riscontrato un andamento piatto dell'espressione dei geni *per* e *tim*. È stato riscontrato inoltre che in condizioni di laboratorio l'espressione del gene *period* aumenta a basse temperature (10°C rispetto a 23°C) mentre quella del gene *timeless* diminuisce.

È stato inoltre dimostrato che la proporzione delle forme *per^{spliced}* e *tim^{cold}* sul totale del trascritto in condizioni di laboratorio e in condizioni naturali aumenta al diminuire della temperatura. Ciò ha suggerito che il più veloce accumulo a basse temperature di *per^{spliced}* sia in grado di regolare l'anticipo della fase dell'E-onset anche in condizioni naturali così come dimostrato in condizioni di laboratorio (Majercak *et al.*, 1999). L'analisi dell'attività locomotoria serale in condizioni naturali ha infatti messo in

evidenza un progressivo avanzamento dell'E-onset in relazione all'aumento della temperatura (paragrafo 3.3.6). Si è osservato però che una volta scesi al di sotto della soglia termica dei 20-22°C l'E-onset perde la relazione con la temperatura e sembra essere influenzato dal fotoperiodo, passando probabilmente ad una regolazione dettata dal diminuire dell'intensità luminosa nell'ambiente indotta dal sopraggiungere del tramonto (Fig. 3.9). Ciò ha suggerito che in condizioni naturali il meccanismo molecolare che detta la fase dell'E-onset, determinato dallo splicing temperatura dipendente di *per*, sia mascherato da altri tipi di meccanismi regolativi a temperature inferiori a 22°C, visto che, al contrario, la proporzione di *per^{spliced}* è risultata aumentare in modo lineare anche a temperature più basse.

Il prevalere della variante *tim^{cold}* a basse temperature suggerisce invece un suo possibile ruolo nei processi che regolano l'insorgenza della diapausa.

L'analisi dei sistemi circadiani in laboratorio ha portato a numerose scoperte nell'ambito della genetica del comportamento. I risultati di questa tesi di dottorato indicano che molti aspetti della regolazione della ritmicità circadiana rimangono inesplorati nelle analisi condotte in laboratorio e che se questo tipo di approccio, teso a semplificare i parametri di studio, era inizialmente necessario, oggi comincia ad essere solo un punto di partenza per analisi più complesse.

Capitolo 6

L'orologio endogeno circadiano di *Drosophila melanogaster* in regimi artificiali perturbati

6.1 Introduzione

6.1.1 I ritmi sonno/veglia

L'attività locomotoria è uno dei principali fenotipi ritmici regolati dall'orologio circadiano endogeno in *Drosophila melanogaster* (Rosato e Kyriacou, 2006). Essa è allo stesso tempo anche un indice dell'alternarsi delle fasi sonno/veglia dell'organismo. Il sonno è un fenotipo ritmico ubiquitario negli animali. Due sistemi regolativi agiscono in parallelo per determinare il fenomeno del sonno: il sistema endogeno circadiano è responsabile della periodicità del sonno mentre il sistema omeostatico regola il bisogno di dormire ovvero la quantità di sonno necessaria all'organismo in relazione all'affaticamento avvenuto nel periodo di veglia. A livello molecolare non è noto come interagiscono i due livelli regolativi (Cirelli e Tononi, 2008).

Le caratteristiche fondamentali che devono essere verificate per definire il sonno in un essere vivente sono le seguenti: uno stato di immobilità, la diminuzione del livello di attenzione, la presenza di una soglia di risveglio, la necessità di recuperare le ore di sonno eventualmente perse, la possibilità di manipolare farmacologicamente lo stato di dormienza, la presenza di una serie di manifestazioni elettrofisiologiche durante le ore di sonno che possono essere misurate attraverso l'elettroencefalogramma (EEG) (Siegel, 2008).

Nei mammiferi nel corso di otto ore di sonno si alternano circa 4-5 episodi ciclici della durata di circa 100 minuti ciascuno caratterizzati dall'alternarsi di una fase di sonno REM (rapid eye movement) e quattro fasi di sonno non REM, caratterizzate a loro volta da specifiche frequenze registrabili via EEG. Alla fase 1 del sonno non REM seguono gli stadi 2 e 3, detti SWS (slow wave sleep), caratterizzati da almeno il 20% di onde delta (tra gli 0.74 e i 4.5 Hz). Lo stadio 4 della fase non REM rappresenta il periodo del sonno più profondo (Siegel, 2008, Munch *et al.*, 2007).

Numerosi sistemi neurali che sfruttano diversi neurotrasmettitori (glutammato, acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina, istamina, adenosina, orexina, GABA) sono stati coinvolti nella regolazione del sonno (Foltényi *et al.*, 2007b).

Numerose sono le malattie che colpiscono la capacità di dormire a livello di qualità, quantità e ritmo: l'insonnia, la narcolessia, un'eccessiva sonnolenza durante il giorno che si avverte nonostante la persona abbia dormito sufficientemente la notte, i disturbi che deregolano la corretta fase del sonno (Advanced o Delayed sleep disorders) (Neikrug e Ancoli-Israel, 2009). Nella FASPS (Familiar Advanced Sleep Phase Syndrome) è stato dimostrato un legame diretto tra la regolazione post traduzionale della proteina dell'orologio circadiano di mammifero PER e la malattia (Jones *et al.*, 1999; Toh *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2005). I pazienti affetti da FASPS mostrano un anticipo della fase del sonno e dell'andamento ciclico della melatonina di 4-5 ore. A livello molecolare una sostituzione aminoacidica in hPER2 (dove h sta per *Homo*

sapiens) e una nella chinasi hCKI δ che agisce su hPER2 sono risultate importanti per l'insorgenza della patologia (Vanselow *et al.*, 2006).

Nei paesi industrializzati, specialmente in quelli emergenti, dal 15 al 30% dei lavoratori è regolarmente sottoposto a regimi di lavoro con turnazioni che provocano l'effetto di una desincronizzazione cronica dell'orologio endogeno e ritmi innaturali dei cicli sonno/veglia (Shields, 2002). Da ricerche recenti è emerso che il lavoro con turnazioni ed il jet lag cronico, cui vanno incontro ad esempio piloti ed hostess, hanno ripercussioni sulle capacità cognitive e mnemoniche ed aumentano la possibilità di aggravamento di patologie già esistenti oltre a promuovere in individui sani disturbi del sonno, malattie a carico dell'apparato circolatorio e digerente, come ulcere peptiche, e perfino il cancro (Cho, 2001; Knutsson, 2003; Rafnsson *et al.*, 2001). Alcuni di questi problemi si aggravano con l'accumularsi degli anni di lavoro, sia in conseguenza della condizione lavorativa stessa sia in ragione dell'invecchiamento dei soggetti (Knutsson, 2003; Davidson *et al.*, 2006).

Oltre a questi problemi concernenti la salute ed il benessere dei lavoratori il lavoro con turnazioni può aumentare il rischio di incidenti ed è fonte di pericolo per la sicurezza pubblica, specialmente di notte e nel settore del trasporto (Philip, 2005; Folkard *et al.*, 2005). È dimostrato che dall'8 al 32% dei lavoratori con turni notturni o con orari variabili presentano serie difficoltà ad adattarsi a questi regimi (Schwartz e Roth, 2006) e la maggior parte di essi presenta un particolare disordine del sonno che il "Sistema di classificazione internazionale dei disordini del sonno" (American Academy of Sleep medicine, 2005) descrive come associato al lavoro secondo turni atipici (SWSD: *shift work sleep disorder*). Esso è caratterizzato da eccessiva sonnolenza dovuta alla rottura del ciclo sonno/veglia.

I fattori che determinano l'intolleranza al lavoro con turnazioni sono molteplici ed includono anche fattori di predisposizione individuale (Barton, 1994) per cui, per comprendere questo complesso problema e trovare delle possibili soluzioni, si è reso necessario l'utilizzo di un approccio a più livelli. Attualmente le contromisure proposte e sviluppate per far fronte alle gravi conseguenze mediche e sociali associate al lavoro con turnazioni consistono nell'esposizione dei lavoratori a luce intensa in periodi ben definiti nel corso delle 24 ore (Crowley *et al.*, 2003), nella pianificazione strategica di brevi periodi di sonno della durata di 20-40 minuti ("naps") (Takayama *et al.*, 2004) e nell'utilizzo di agenti farmacologici, come ad esempio psicostimolanti, ipnotici, melatonina o caffeina, al fine di promuovere lo stato di vigilanza durante il lavoro o, al contrario, di favorire il sonno durante i giorni di riposo.

Diventa perciò sempre più urgente valutare quali siano gli effetti che la deregolazione cronica del ritmo sonno/veglia comporta sulla salute.

6.1.2 *Drosophila* come modello per lo studio del sonno

Drosophila melanogaster può essere considerata un ottimo organismo modello per lo studio del sonno (Hendricks *et al.*, 2000a; Shaw *et al.*, 2000).

Il sonno in base alla definizione elettrofisiologica classica era riconosciuto esistere solo nei mammiferi e negli uccelli (Campbell e Tobler, 1984; Siegel, 1995; Tobler, 1995). Solo in tali organismi si può individuare un alternarsi di distinti pattern di potenziali elettrici misurati in maniera oggettiva e quantificabile nella corteccia (EEG). Questa definizione porterebbe ad escludere sistematicamente la possibilità di studiare il sonno in organismi modello meno complessi dal momento che i cambiamenti relativi dell'EEG riscontrabili in mammiferi ed uccelli sono impossibili da registrare in

invertebrati dotati di un rigido esoscheletro e in semplici vertebrati privi di corteccia. Tuttavia, l'impiego di organismi modello non vertebrati consente di applicare con maggiore facilità tecniche di biologia molecolare e di condurre più agevolmente esperimenti comportamentali. Inoltre, il loro studio si è rivelato utile per la spiegazione anche di altri fenomeni neurali complessi, come i ritmi circadiani e la memoria. Per questi motivi e in considerazione del fatto che il sonno riveste un ruolo fisiologico fondamentale, si è cercato di definirlo anche nelle drosofile (Hendricks *et al.*, 2000a). Per questo organismo non solo, infatti, sono disponibili un'estesa letteratura scientifica ed aggiornati database di genetica ma è anche già stata identificata la base genetica di molti comportamenti complessi, come i ritmi circadiani, (Williams e Sehgal, 2001b), il corteggiamento (Hall, 1994), l'apprendimento e la memoria (Tully, 1994). Di contro bisogna considerare che le piccole dimensioni e l'esoscheletro rigido rappresentano delle limitazioni tecniche all'investigazione del cervello dell'animale intatto e che il sistema nervoso centrale (SNC) dell'insetto manca di strutture anatomiche analoghe a quelle dei mammiferi. Ad oggi, numerosi lavori indicano che il riposo in *Drosophila* può essere considerato come uno stato "sleep-like", dal momento che riflette le caratteristiche principali del sonno dei mammiferi (Hendricks *et al.*, 2000a; Shaw *et al.*, 2000).

Esperimenti di registrazione di attività locomotoria e di osservazione di singoli esemplari (Shaw *et al.*, 2000) hanno dimostrato che esiste in *Drosophila* uno stato di completa immobilità con soli movimenti pulsanti addominali. Questi periodi di immobilità si verificano generalmente nel mezzo della notte e possono durare anche fino a 160 minuti. Nelle mosche in riposo è stata osservata inoltre una ridotta reattività sensoriale, anche dopo solo 5 minuti dall'inizio dello stato di immobilità, sia alle interazioni sociali che agli stimoli meccanici, contrariamente a quanto accade alle drosofile in uno stato attivo che rispondono prontamente ad uno stimolo meccanico, visivo o uditivo di bassa e media intensità (Shaw *et al.*, 2000; Nitz *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2004). Questi risultati hanno permesso di definire il sonno in *Drosophila* come un periodo di immobilità della durata di almeno 5 minuti (Huber *et al.*, 2004).

Un'altra caratteristica che rende il riposo di *Drosophila* comparabile al sonno dei mammiferi è la sua regolazione, oltre che circadiana, anche omeostatica (Huber *et al.*, 2004). Nei mammiferi, il sonno è regolato da un *pacemaker* circadiano che controlla la sua ricorrenza e da un *drive* omeostatico, che aumenta durante la veglia e viene dissipato durante il sonno (Borbély e Achermann, 1999). Analogamente in *Drosophila* una regolazione omeostatica del riposo viene suggerita dal fatto che è stato riscontrato un aumento compensatorio del riposo, in individui mantenuti svegli, proporzionale alla privazione di riposo imposta. E' stato anche dimostrato che, come avviene per i topi (Rechtschaffen *et al.*, 1989), la perdita cronica totale del sonno può risultare letale anche per *Drosophila* e che per proteggere l'organismo dagli effetti letali della perdita del sonno viene indotta la sintesi di alcune chaperonine (Shaw *et al.*, 2002).

Un altro carattere condiviso tra il sonno di *Drosophila* e quello dei mammiferi è la sua distribuzione nell'arco della vita: il tempo dedicato al riposo sembra più importante e necessario nelle giovani mosche mentre risulta ridotto in quelle più "anziane". Esso, inoltre, è modulato dagli stessi stimolanti ed ipnotici che hanno effetto sui mammiferi (Shaw *et al.*, 2000).

Infine, come nel cervello dei mammiferi, anche in *Drosophila* il sonno e la veglia sono associati a diversi pattern di espressione genica: i geni trascritti durante il periodo di veglia codificano per fattori di trascrizione e proteine implicati nella risposta agli stress, alla risposta immunitaria e al metabolismo dei carboidrati, mentre quelli relativi al

periodo di sonno includono numerosi geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi. L'espressione di questi differenti trascritti è modulata nel corso delle 24 ore confermando un'interazione a livello molecolare tra il meccanismo circadiano e quello omeostatico nella regolazione del sonno (Cirelli *et al.*, 2005a).

Gli studi sul sonno in *Drosophila* hanno permesso di individuare una serie di geni coinvolti nella regolazione di tale fenomeno e le zone del sistema nervoso centrale dell'insetto maggiormente coinvolte nella regolazione dello stato di dormienza. L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) sembra essere alla base di uno dei pathway regolativi del sonno. Manipolando molecole come ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase), SPITZ, RHOMBOID o STAR, in grado di attivare il recettore EGFR, coinvolto anche in processi di sviluppo, è possibile aumentare o diminuire la quantità di sonno in *Drosophila* (Shilo, 2005; Foltenyi *et al.*, 2007a). Anche le proteine PKA (Protein Kinase A) e CREB (cAMP Response Element Binding Protein) regolano il sonno (Joiner *et al.*, 2006), nonché geni che originano canali del potassio a dipendenza di voltaggio (*shaker*, Cirelli *et al.*, 2005b) e il sistema dopaminergico (*fumin*, Kume *et al.*, 2005; Andretic *et al.*, 2005). Esperimenti di microarray hanno evidenziato inoltre che la privazione del sonno genera un aumento della trascrizione di alcuni geni del sistema immunitario (Shaw *et al.*, 2002). La regione dell'SNC dove più si concentrano le vie neurali di attivazione e anche di inibizione del sonno sembra essere quella dei corpi fungiformi (mushroom bodies) (Pitman *et al.*, 2006).

6.1.3 Studio degli effetti del “lavoro” in regimi di shift-work cronico in *Drosophila melanogaster*

Visti i recenti progressi nello studio del sonno in *Drosophila* e data l'importanza del cercare di comprendere gli effetti del “lavoro in turnazione” sulla salute degli individui, si è cercato di definire un protocollo per analizzare dal punto di vista genetico e molecolare gli effetti del “lavoro in turnazione” utilizzando *Drosophila melanogaster* come organismo modello. Il primo problema affrontato è stato la realizzazione di un sistema paragonabile ad una “attività lavorativa”, in grado tra l'altro di impedire in certi orari il sonno nelle mosche. Si è scelto di “far lavorare” le mosche con continuità mentre al contempo ne veniva registrata l'attività locomotoria. L'”attività lavorativa” impedisce alle mosche di stare ferme e richiede un'”attività fisica” continua che è facilmente “leggibile” nei dati come un elevato incremento di attività locomotoria. Sono stati applicati diversi tipi di turnazione del “lavoro” secondo quanto riportato nel paragrafo successivo (materiali e metodi) per un periodo di tempo che fosse abbastanza lungo in rapporto alla vita delle mosche e che è stato individuato in un mese. Durante i periodi in cui le mosche sono costrette ad una “attività fisica” si è voluto mimare non solo il fatto che non possano riposare ma anche il diverso tipo di intensità luminosa cui è sottoposto un soggetto durante il lavoro in spazi chiusi. Le analisi degli effetti sono state condotte a livello del tasso di sopravvivenza e nella risposta comportamentale ottico-motoria mentre analisi di microscopia elettronica sullo stato cellulare dei cervelli sono state condotte in parallelo in collaborazione con la Dr.ssa Lucia Manni (Dipartimento di Biologia, Università di Padova).

6.2 Materiali e metodi

Per ogni esperimento sono stati utilizzati tre gruppi di moscerini: i “Worker” (W, esemplari obbligati a “lavorare con turnazioni” e soggetti a cicli di luce variabili), i “Light Shifted Control” (LSC, esemplari che “non lavorano” ma che sono soggetti agli stessi cicli di luce dei worker) e i controlli (C12:12, esemplari che “non lavorano” e sono soggetti ad un regime LD 12:12 costante). L’attività locomotoria è stata registrata con le stesse modalità descritte nei capitoli precedenti (paragrafo 2.2.3).

6.2.1 *Shift-work machine*

La *shift-work machine* è un’apparecchiatura che abbiamo costruito per mimare una situazione di lavoro nelle mosche (Fig. 6.1). Essa consiste in un piano orizzontale oscillante di 80 cm di lunghezza e 45 cm di larghezza, su cui possono essere inserite fino a quattro schede di registrazione dell’attività locomotoria. Il “lavoro” applicato alle mosche consiste nel disturbare il loro equilibrio costringendole a recuperarlo costantemente senza poter riposare. Per ottenere questo la piattaforma orizzontale compie un movimento orizzontale interrotto bruscamente ad intervalli regolari (6-8 volte al minuto). La macchina è azionata da un motore collegato al computer centrale che viene programmato dall’operatore scegliendo i regimi di luce e “lavoro” desiderati. Gli individui sono posti dentro tubini di vetro alloggiati nei monitor posti sulla piattaforma mobile. Sopra la “*shift-work machine*” sono posizionate cinque luci bianche fredde. Le intensità luminose applicate sono state di 230 lux durante le ore di “lavoro” e di 900 lux durante le ore “diurne” in cui non viene imposto il “lavoro”. Durante le ore notturne di “non lavoro” le luci erano spente.

L’apparecchiatura è posizionata in una camera termostata ad una temperatura di 23°C. La durata totale di ciascun esperimento è di sei “settimane lavorative”. Ciascuna “settimana lavorativa” è costituita da quattro giorni lavorativi e un quinto giorno definito di week-end durante il quale i moscerini non “lavorano” e hanno un regime di luce pari a LD 12:12. Nei giorni di week-end le drosofile vengono trasferite in tubini con medium nutritivo fresco.



Fig. 6.1: Shift-work machine. I monitor, posizionati sull’oscillatore utilizzato per mimare “attività lavorativa” nelle mosche, permettono di registrare l’attività locomotoria di singole mosche. Il “lavoro” consiste nel recupero continuo di una situazione di equilibrio disturbato costantemente dallo stimolo meccanico trasmesso alle mosche.

6.2.2 Regimi di “lavoro”

Lo shift-work cronico viene indotto attraverso esperimenti della durata di sei “settimane lavorative” nelle quali i regimi imposti durante le prime tre settimane vengono ripetuti una seconda volta. Lo shift-work è stato indotto facendo slittare le ore di “lavoro” in senso orario (clockwise) o antiorario (counter-clockwise). Nel regime “counter-clockwise” (CCW) (Fig. 6.2) il “lavoro” è programmato nella prima (e quarta) “settimana lavorativa” di notte (da ZT 16 a ZT 0), nella seconda (e quinta) “settimana lavorativa” di sera (da ZT 8 a ZT 16) e nella terza (e sesta) “settimana lavorativa” di giorno (da ZT 0 a ZT 8)

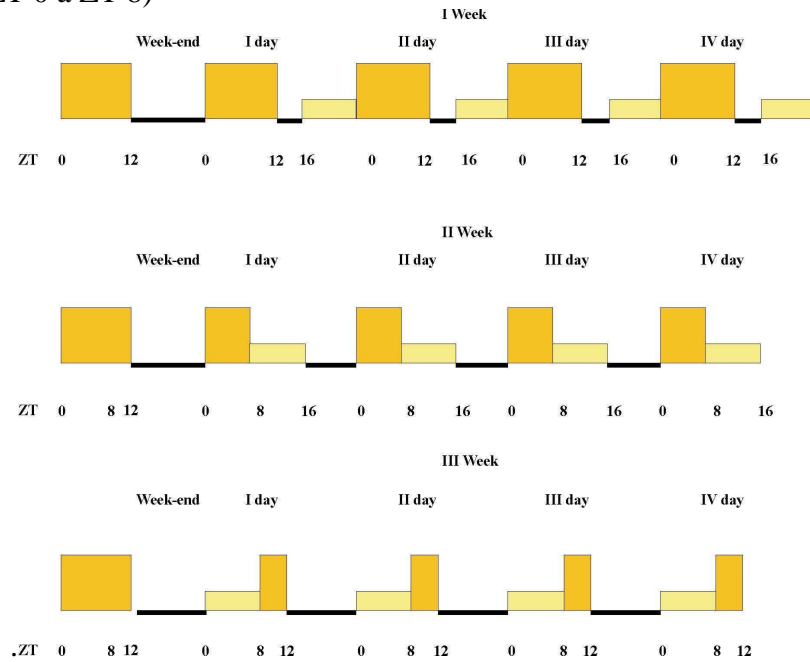


Fig. 6.2: Rappresentazione schematica del regime “counter-clockwise”. Le barre nere rappresentano le ore di buio, i rettangoli gialli rappresentano le ore in cui le mosche sono obbligate a “lavorare” con intensità luminosa di 230 lux, mentre i rettangoli arancioni rappresentano le ore in cui l’intensità luminosa è di 900 lux e le mosche non sono costrette a “lavorare”.

Nel regime “clockwise” (CW) (Fig. 6.3) il “lavoro” è programmato nella prima (e quarta) “settimana lavorativa” di notte (da ZT 16 a ZT 0), nella seconda (e quinta) “settimana lavorativa” di giorno (da ZT 0 a ZT 8) e nella terza (e sesta) “settimana lavorativa” di sera (da ZT 8 a ZT 16).

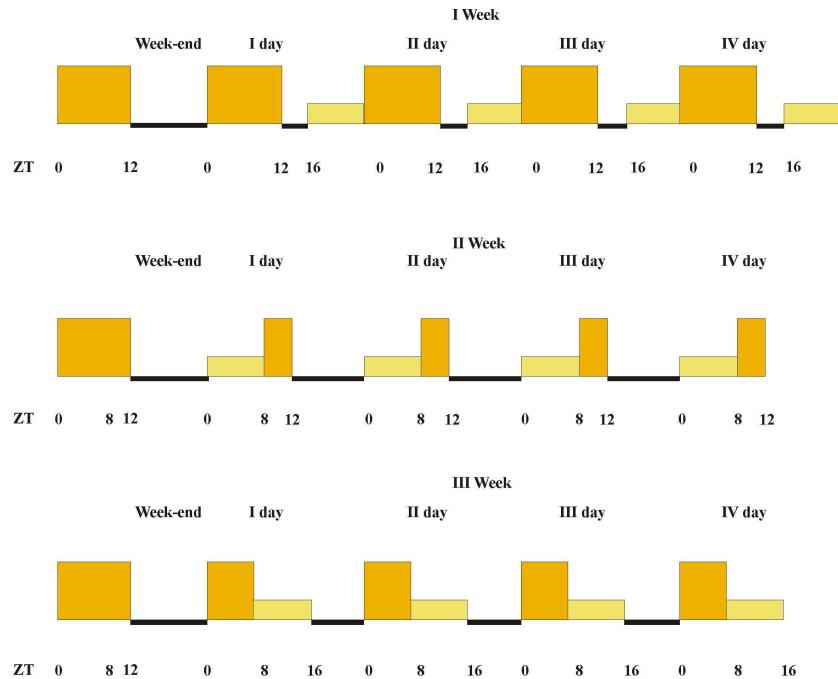


Fig. 6.3: Rappresentazione schematica del regime “clockwise”. Le barre nere rappresentano le ore di buio, i rettangoli gialli rappresentano le ore lavorative con intensità luminosa di 230 lux, mentre i rettangoli arancioni rappresentano le ore del giorno non lavorative in cui l’intensità luminosa è di 900 lux.

Come controllo è stato applicato anche un regime di “lavoro” con assenza di turnazione delle ore lavorative (Fig. 6.4). Il “lavoro” impartito agli individui è programmato dalla prima alla sesta “settimana lavorativa” sempre di giorno (da ZT 0 a ZT 8).

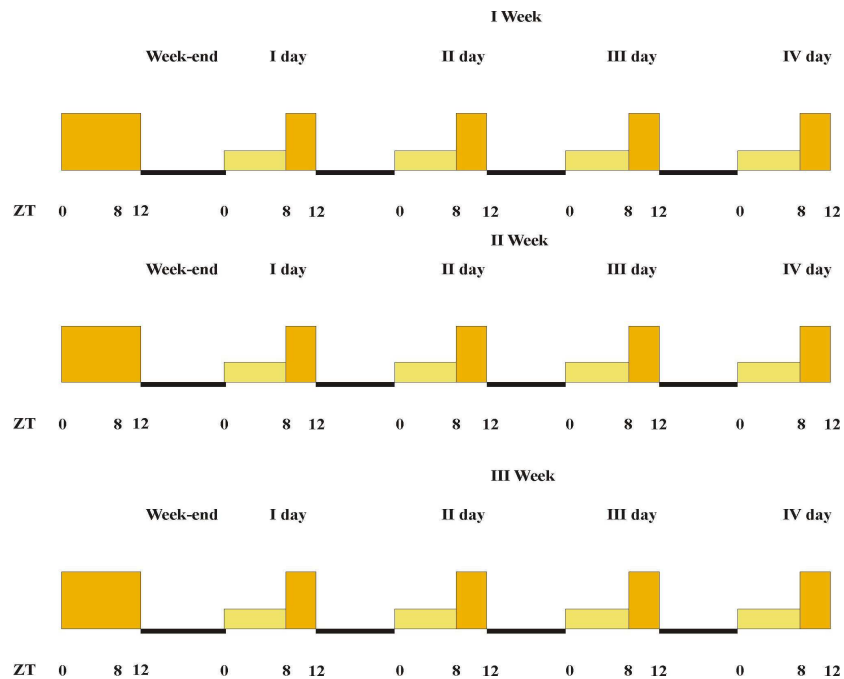


Fig. 6.4: Rappresentazione schematica del regime di “lavoro” con assenza di turnazione. Le barre nere rappresentano le ore di buio, i rettangoli gialli rappresentano le ore in cui i worker sono obbligati a “lavorare” con intensità luminosa di 230 lux, mentre i rettangoli arancioni rappresentano le ore in cui l’intensità luminosa è di 900 lux e le mosche non sono costrette a “lavorare”.

6.2.3 Analisi della sopravvivenza

I dati ottenuti nello studio dell'attività locomotoria di ogni singolo individuo sono stati impiegati anche per la determinazione del tasso di mortalità dei diversi gruppi di moscerini studiati, registrando la mortalità ogni 12 ore.

Per ogni categoria (W, LSC, C12:12) è stato calcolato il numero di esemplari morti per un periodo di tempo di 732 ore corrispondenti a sei "settimane lavorative".

Tali valori sono stati utilizzati per la realizzazione delle tabelle di sopravvivenza dalle quali sono state ricavate le relative curve secondo il metodo di Kaplan-Meier (Norman e Streiner, 1998).

Gli esemplari che alla fine dell'esperimento (sesta settimana) risultavano ancora vivi sono stati considerati come "ritirati" e definiti dal programma come "censurati".

Al fine di verificare se il regime di shift-work induce una maggiore mortalità sugli individui che lo hanno subito rispetto ai controlli, sono state confrontate le curve di sopravvivenza dei due campioni utilizzando il test di Mantel-Cox (Log-Rank test). Le analisi sono state effettuate con il programma Statistica 7.0 (StatSoft).

6.2.4 Test ottico-motorio

E' stato dimostrato che esemplari di *Drosophila* adulti mettono in atto risposte comportamentali alla luce, agli odori, alla temperatura, all'umidità, alla gravità, al flusso d'aria e alla presenza di esemplari dell'altro sesso (Connolly e Tully, 1998). E' stato altresì dimostrato che tali comportamenti possono essere alterati in esemplari sottoposti a stress. Per questo motivo sono state studiate, attraverso un test ottico-motorio, possibili alterazioni fenotipiche nelle mosche impegnate nei regimi di shift-work precedentemente descritti.

Il test ottico-motorio permette di misurare l'abilità di coordinare il movimento in risposta a stimoli visivi. Gli esperimenti sono stati condotti secondo il metodo descritto da Burnet e Beck (1968).

Lo strumento utilizzato a tale scopo consiste in un cilindro rotante di plexiglass (diametro 8 cm; altezza 9 cm) avente delle strisce verticali alternate bianche e nere. La velocità di rotazione è pari a 30 rpm (giri per minuto). Gli individui sottoposti a tale test, sono tutti maschi e appartengono alle tre diverse categorie (W, LSC, C12:12) di moscerini che sono stati sottoposti ai regimi di shift-work. Gli individui di ogni categoria (W, LSC, C12:12) sono stati testati al termine della terza e sesta "settimana lavorativa". I moscerini sono stati introdotti, uno per volta, in un tubo di vetro a forma di T con le due braccia orizzontali trasparenti e quella verticale dipinta di nero (Fig. 6.5). Il tubo a T, dopo alcuni minuti in cui le mosche si sono adattate al nuovo ambiente, è stato posto al centro del cilindro e una luce fredda proveniente da una lampada a fibre ottiche (Highlight 3100, OLYMPUS EUROPE) è stata orientata perpendicolarmente al centro del cilindro e posizionata ad un'altezza di 30 cm dal fondo del cilindro stesso. L'apparecchio viene azionato dall'operatore e il cilindro inizia a ruotare. La risposta viene considerata "corretta" quando il moscerino, uscito dal braccio nero del tubo a T, si muove nel senso corrispondente alla rotazione delle strisce. Ciascun individuo è stato testato 10 volte di seguito, cambiando in maniera casuale la direzione di movimento del cilindro, ad ogni prova, al fine di evitare il verificarsi di fenomeni di abitudine. Tutti gli esperimenti sono stati condotti ad una temperatura di $24 \pm 1^\circ \text{C}$. Le analisi statistiche sono state effettuate con il programma Statistica 7.0 (StatSoft).

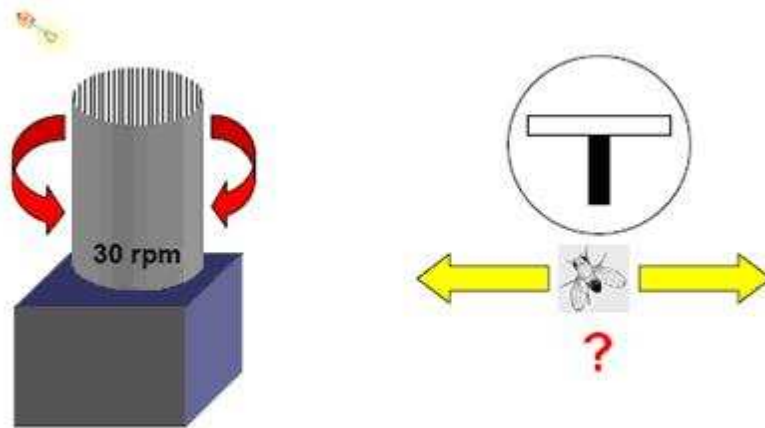


Fig. 6.5: Test ottico-motorio. Lo strumento consiste in un cilindro rotante di plexiglass avente delle strisce verticali alternate bianche e nere. La velocità di rotazione è di 30 rpm; la luce è posizionata in modo perpendicolare al centro del cilindro. Ciascun moscerino è posto nel braccio centrale, dipinto di nero, di un tubo di vetro a forma di T mentre le due braccia orizzontali del tubo sono trasparenti. La risposta viene considerata “corretta” quando il moscerino, uscito dal braccio nero del tubo a T, si muove nel senso corrispondente alla rotazione delle strisce (modificato da Burnet & Beck, 1968).

6.3 Risultati

6.3.1 Analisi dell'attività locomotoria

I protocolli di shift-work sono stati applicati, secondo gli schemi descritti nei materiali e metodi (paragrafo 6.2), su esemplari maschi della linea WTALA. Lo scopo di tali esperimenti è stato quello di indagare sui possibili effetti prodotti dalla deregolazione cronica dell'orologio circadiano indotta dal “lavoro in turnazione”. In Fig. 6.6 è riportata l'attività locomotoria di mosche worker (W) e light shifted control (LSC) durante le prime 3 “settimane lavorative” mantenute in un regime di shift-work “counter-clockwise”. Le rappresentazioni grafiche del comportamento nelle altre situazioni studiate non sono qui riportate in quanto non presentano particolari differenze rispetto a quelle presentate in Fig. 6.6. E' stato rilevato, come atteso, che durante le ore di “lavoro” i worker si muovono con maggiore intensità rispetto ai light shifted control. Questo dato è stato interpretato come indice di un effetto di stimolo dell'”attività lavorativa” sull'attività locomotoria delle mosche. Le registrazioni dell'attività locomotoria, hanno mostrato che una aumentata attività viene mantenuta dai worker anche in assenza di “lavoro”, durante le ore diurne, mentre viene invece persa durante le ore notturne. In condizioni di LD12:12 le mosche WTALA hanno mostrato profili di attività attesi e quindi “normali” per una linea wild-type a temperatura costante, con due picchi di attività, mattutino e serale, separati da una “siesta” diurna.

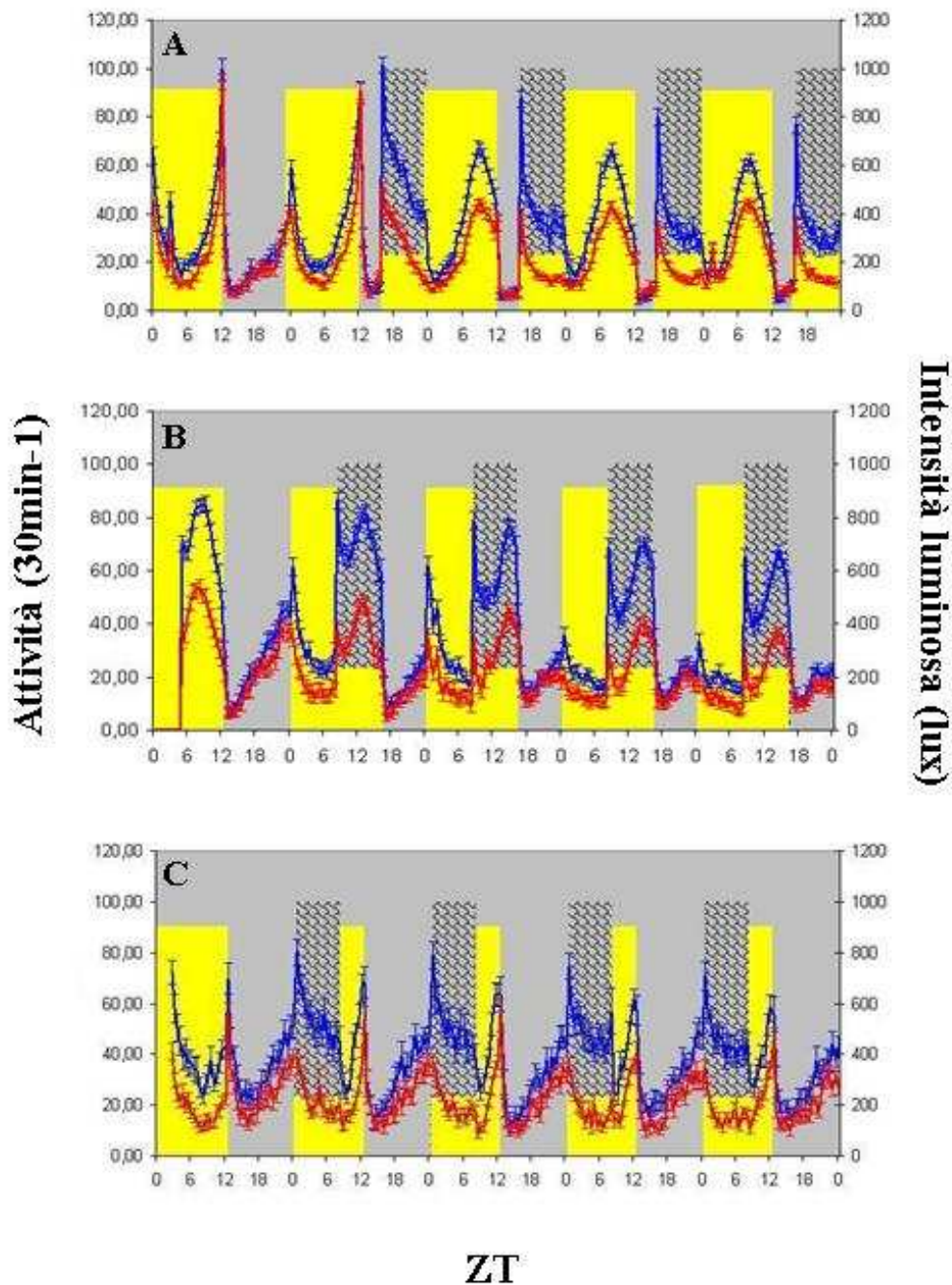


Fig. 6.6: L'attività locomotoria media (\pm SEM), calcolata su intervalli di tempo di 30 minuti, è raffigurata in funzione del tempo. Sull'asse secondario è riportata l'intensità luminosa espressa in lux (istogrammi in giallo). La griglia nera rappresenta i periodi in cui è attiva la "shift-working machine". L'attività locomotoria dei "lavoratori" (W) è rappresentata in blu, mentre quella dei "light shifted control" (LSC) in rosso. (A) Prima "settimana lavorativa": un giorno in regime di luce LD 12:12 e quattro giorni consecutivi con "attività lavorativa" da ZT 16 a ZT 0; N_w 110, N_{lsc} 110. (B) Seconda "settimana lavorativa": un giorno in regime di luce LD 12:12 e quattro giorni consecutivi con "attività lavorativa" da ZT 8 a ZT 16; N_w 97, N_{lsc} 89. (C) Terza "settimana lavorativa": un giorno in regime di luce LD 12:12 e quattro giorni consecutivi con "attività lavorativa" da ZT 0 a ZT 8; N_w 88, N_{lsc} 78.

6.3.2 Analisi della sopravvivenza

Il grafico in Fig. 6.7 riporta le curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier (Norman e Streiner, 1998), per esemplari sottoposti a un regime di shift-work “counter-clockwise” (è riportato uno di due esperimenti, i risultati dell’altro sono in appendice 2). Dal grafico si è osservato che alla fine dell’esperimento la proporzione cumulativa di sopravvivenza è di circa 0,4 per controlli (C12:12) mentre per W e LSC si attesta su valori prossimi a 0,1. Nel secondo esperimento, riportato in appendice 2, si è osservata una mortalità più rapida per i W rispetto a LSC e C12:12.

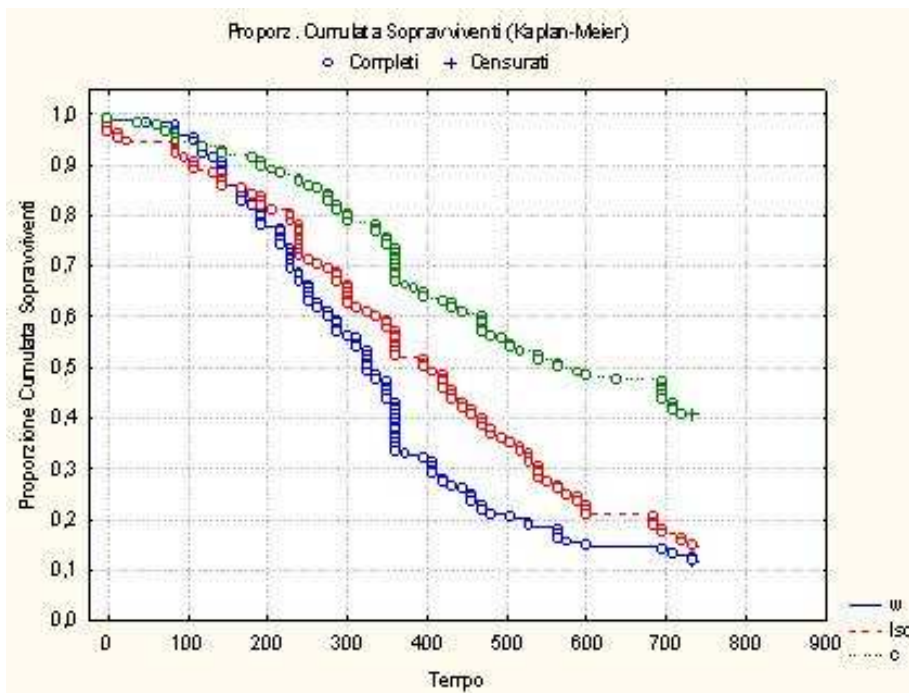


Fig. 6.7: Curve di sopravvivenza (metodo Kaplan-Meier) di individui sottoposti a un regime di shift-work “counter-clockwise”. w: individui soggetti a shift-work (blu), lsc: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker (rosso), c: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante (verde). La numerosità iniziale per i tre gruppi testati è di 128 individui. Il tempo è espresso in ore.

La Tab. 6.1 riporta i risultati ottenuti dai confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank (Norman e Streiner, 1998). Dal confronto così effettuato è risultato che i controlli (C12:12) mostrano una curva di mortalità statisticamente diversa rispetto agli individui W e agli LSC. Tra questi ultimi due gruppi non è risultata invece alcuna differenza significativa $p < 0,05$.

	W	LSC	C12:12
W	---	0.055	$p > 0.0001^*$
LSC		---	$p > 0.0001^*$
C12:12			---

Tab. 6.1: Confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank. W: esemplari soggetti a shift-work, LSC: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker, C12:12: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante.

Il grafico in Fig. 6.8 riporta le curve di sopravvivenza per esemplari sottoposti a un regime di shift-work “clockwise”. Dal grafico si è osservato che alla fine di questo regime di shift-work la proporzione cumulativa di sopravvissuti si attesta per tutti i gruppi su valori prossimi a 0,1.

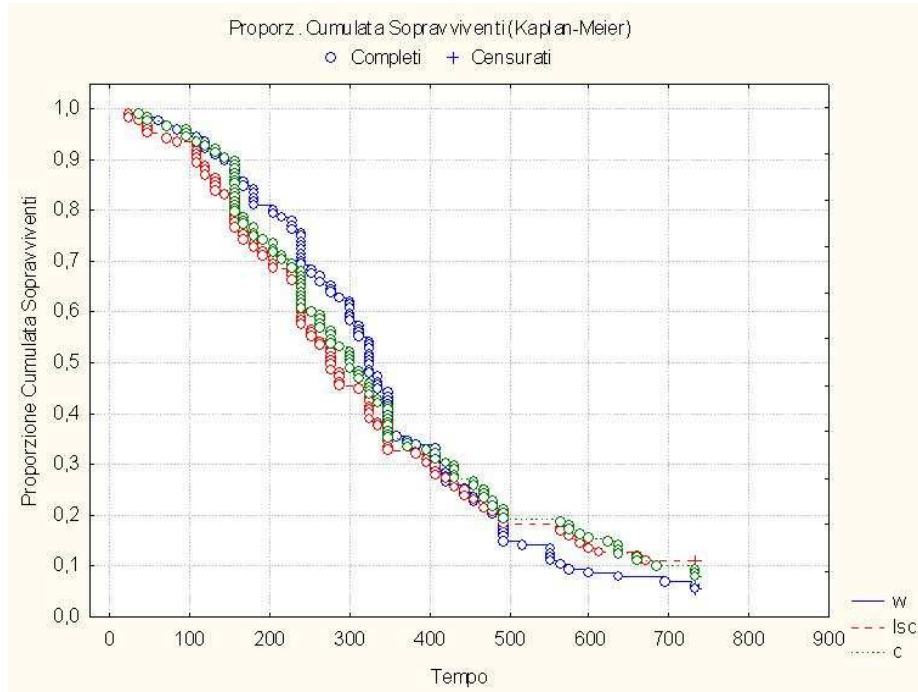


Fig. 6.8: Curve di sopravvivenza (metodo Kaplan-Meier) di individui sottoposti a un regime di shift-work “clockwise”. w: individui soggetti a shift-work (blu), lsc: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker (rosso), c: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante (verde). La numerosità iniziale per i tre gruppi testati è di 128 individui. Il tempo è espresso in ore.

La Tab. 6.2 riporta i risultati ottenuti dai confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank. Dal confronto eseguito non sono risultate differenze statisticamente significative tra i gruppi considerati.

	W	LSC	C12:12
W	---	0.824	0.778
LSC		---	0.681
C12:12			---

Tab. 6.2: Confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank. W: esemplari soggetti a shift-work, LSC: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker, C12:12: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante.

Analoghe analisi sono state condotte confrontando mosche sottoposte a regimi di “lavoro” costante con controlli LD12:12. Il “lavoro” è stato confinato nelle prime otto ore del giorno. Non si sono riscontrate differenze significative tra le curve di mortalità ($p < 0,05$) (appendice 2).

6.3.3 Test ottico-motorio

Il test ottico-motorio è stato effettuato preliminarmente su individui di controllo della linea WTALA a 3-5 giorni dallo sfarfallamento (C0: controlli 0) mantenuti in regimi di luce LD 12:12 ad una temperatura di 23°C. I risultati sono riportati nella Tab. 6.3.

Genotipo	N	Numero medio di risposte corrette	St. Err.
WTALA	36	7,97	0,19

Tab. 6.3: Risultato del test preliminare effettuato su individui di controllo di 3-5 giorni d'età mantenuti in regimi di luce LD 12:12 alla temperatura di 23°C. In tabella sono riportati il numero medio di risposte corrette su 10 prove per individuo e relativo errore standard. N: numero di individui testati.

L'analisi statistica condotta con il test ANOVA (LSD) ha messo in luce che in regime di "counter-clockwise" esistono differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra W e LSC alla terza "settimana lavorativa" nei confronti dei controlli C0, e tra LSC alla sesta settimana e controlli C0 (Fig. 6.9 e Tab. 6.4).

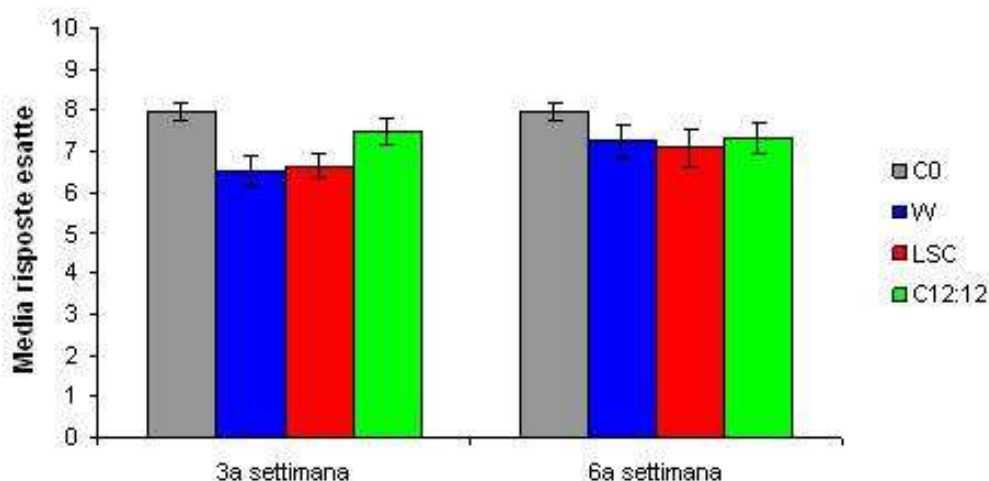


Fig. 6.9: Numero medio di risposte corrette (\pm SEM) del test ottico-motorio per ciascuna categoria testata dopo la terza e sesta "settimana lavorativa" in regime "counter-clockwise", C0= controlli (N=67), individui di 3-5 giorni d'età mantenuti in regimi di luce LD 12:12, W= shift-worker (N 3a settimana=88; N 6a settimana=54), individui soggetti shift-work, LSC= light shifted control (N 3a settimana=90; N 6a settimana=56), individui soggetti solo a shift luminoso, C12:12= controlli mantenuti in regime LD 12:12 (N 3a settimana=95; N 6a settimana=57).

		W	LSC	C12:12	W	LSC	C12:12
		3 ^a settimana			6 ^a settimana		
W	3 ^a settimana						
LSC		0,805					
C12:12		0,053	0,087				
W	6 ^a settimana	0,150	0,226	0,613			
LSC		0,253	0,363	0,041	0,761		
C12:12		0,102	0,158	0,761	0,839	0,613	
C0		0,001*	0,002*	0,280	0,099	0,047*	0,155

Tab. 6.4: Valori di significatività (p) dell'analisi statistica (LSD) effettuata sui dati ottenuti dal test ottico-motorio effettuato su mosche sottoposte a un regime di shift work "counter-clockwise". (W: esemplari soggetti a shift-work, LSC: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker, C12:12: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante). * =valori statisticamente significativi (p<0,05).

L'analisi statistica eseguita sui dati ottenuti dagli individui mantenuti in regime di shift-work "clockwise" (Fig. 6.10) è riportata nella Tab. 6.5. Sono state riscontrate differenze statisticamente significative (p<0,05) tra W e LSC alla terza "settimana lavorativa" con i rispettivi controlli C12:12 della terza "settimana lavorativa", con i controlli C12:12 della sesta settimana e con i controlli C0. Inoltre è risultata significativa la differenza tra controlli C12:12 alla terza settimana e W alla sesta settimana, e tra W alla sesta settimana confrontati con gli LSC e controlli C12:12 alla sesta settimana e controlli C0.

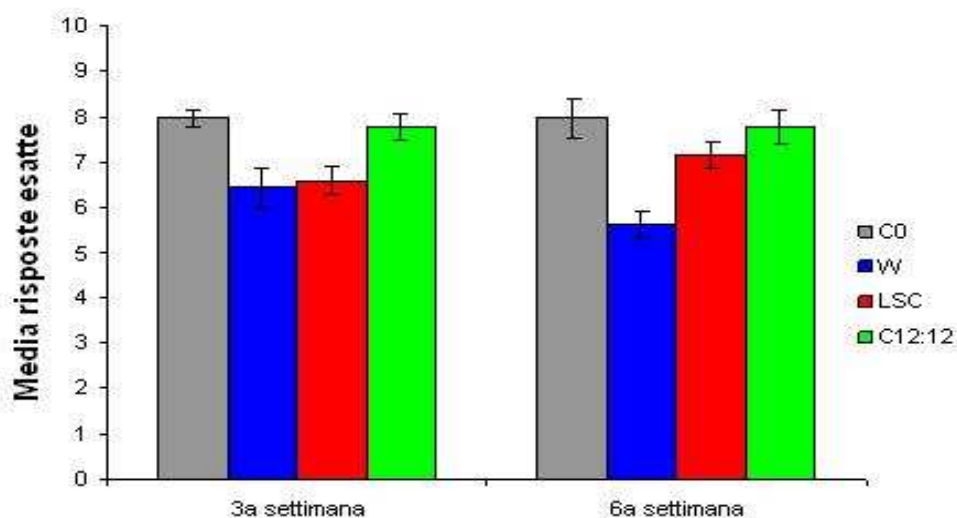


Fig. 6.10: Numero medio di risposte corrette (± SEM) del test ottico-motorio per ciascuna categoria testata dopo la terza e sesta "settimana lavorativa" in regime "clockwise", C0= controlli 0 (N=67), individui di 3-5 giorni d'età mantenuti in regimi di luce LD 12:12, W= shift-worker (N 3a settimana=38; N 6a settimana=31), individui soggetti a shift-work, LSC= light shifted control (N 3a settimana=40; N 6a settimana=25), individui soggetti solo a shift luminoso, C12:12= controlli mantenuti in regime LD 12:12 (N 3a settimana=97; N 6a settimana=56).

		W	LSC	C12:12	W	LSC	C12:12
		3 ^a settimana			6 ^a settimana		
W	3 ^a settimana						
LSC		0,714					
C12:12		0,002*	0,006*				
W	6 ^a settimana	0,108	0,051	0,000*			
LSC		0,140	0,236	0,211	0,006*		
C12:12		0,004*	0,010*	0,986	0,000*	0,230	
C0		0,000*	0,000*	0,607	0,000*	0,067	0,651

Tab. 6.5: Valori di significatività (p) dell'analisi statistica (LSD) effettuata sui risultati del test ottico-motorio effettuato su mosche sottoposte a un regime di shift work "clockwise". (W: esemplari soggetti a shift-work, LSC: esemplari soggetti a cicli di luce variabili, C12:12: esemplari soggetti ad un regime di luce LD 12:12). * =valori statisticamente significativi (p<0,05).

Per quanto riguarda i dati ottenuti a partire da individui sottoposti a regime di "lavoro" in assenza di turnazione, l'analisi statistica (Fig. 6.11 e Tab. 6.6) ha messo in evidenza differenze significative tra W alla sesta settimana rapportati ai W e controlli C12:12 alla terza "settimana lavorativa". Lo stesso risultato è stato ottenuto tra LC (Light Control, individui soggetti agli stessi cicli di luce dei worker, come gli LSC, ma che non subiscono in questo regime di "lavoro" shift luminoso) alla sesta settimana e controlli C12:12 alla terza settimana. Si è osservata inoltre una differenza statisticamente significativa tra W alla sesta settimana e controlli C0.

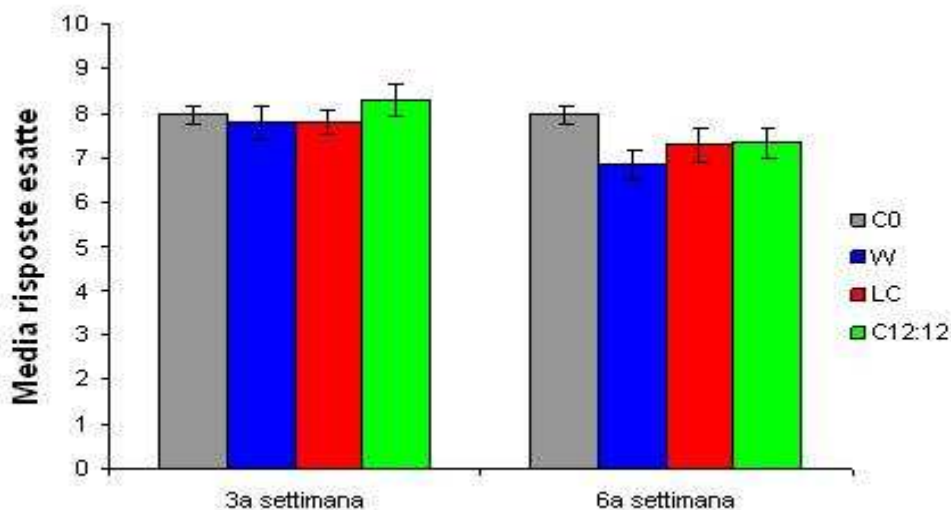


Fig. 6.11: Numero medio di risposte corrette (\pm SEM) del test ottico-motorio per ciascuna categoria testata dopo la terza e sesta "settimana lavorativa" in regime di assenza di "turnazione del lavoro", C0= controlli 0 (N=67), W= worker (N 3a settimana=20; N 6a settimana=20), individui soggetti a "lavoro" costante durante le prime otto ore del giorno, LC= (N 3a settimana=20; N 6a settimana=20), individui soggetti agli stessi cicli di luce dei worker, C12:12= controlli mantenuti in regime LD 12:12 (N 3a settimana=20; N 6a settimana=12).

		W	LC	C12:12	W	LC	C12:12
		3 ^a settimana			6 ^a settimana		
W	3 ^a settimana						
LC		1,000					
C12:12		0,270	0,270				
W	6 ^a settimana	0,037*	0,037*	0,002*			
LC		0,270	0,270	0,028*	0,320		
C12:12		0,372	0,372	0,066	0,355	0,949	
C0		0,666	0,666	0,411	0,005*	0,093	0,181

Tab. 6.6: Valori di significatività (p) dell'analisi statistica (LSD) effettuata sui risultati del test ottico-motorio effettuato su mosche sottoposte a un regime di assenza di "turnazione del lavoro". (W: esemplari soggetti a "lavoro" costante durante le prime otto ore del giorno, LC: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker, C12:12: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12). * =valori statisticamente significativi (p<0,05).

6.4 Discussione

Il paradigma sperimentale di shift-work, messo a punto nel nostro laboratorio, nasce dall'idea di utilizzare *Drosophila melanogaster* per indagare gli effetti di regimi di lavoro e/o luminosi artificiali perturbati che rievochino le condizioni lavorative proprie dei lavoratori turnisti. Da studi recenti emerge infatti che i lavoratori sottoposti a regimi di lavoro con turnazione che comportano una deregolazione cronica della ritmicità circadiana, manifestano disturbi del sonno (Ohayon *et al.*, 2002). E' stato inoltre dimostrato che gli operatori di volo sottoposti a jet lag cronico possono presentare, dopo alcuni anni di lavoro, atrofia del lobo temporale destro e deficit nell'apprendimento e nella memoria spaziale (Cho, 2001).

Poiché è stato dimostrato che è possibile definire uno stato di riposo in *Drosophila* e che *Drosophila* è un buon modello per lo studio degli effetti da privazione di sonno (Huber *et al.*, 2004), si è deciso di utilizzare *Drosophila melanogaster* per studiare gli effetti della desincronizzazione generata da regimi di shift-work. A tal fine sono stati applicati regimi di shift-work a mosche della linea naturale wild-type WTALA con turnazioni a cadenza settimanale. Sono state definite "settimane lavorative" di cinque giorni con un giorno come week end e quattro giorni lavorativi. Il "lavoro" è stato applicato in ore diverse ogni settimana. Lo schema totale di shift-work applicato è consistito nella ripetizione di due cicli uguali di tre "settimane lavorative".

I risultati ottenuti dall'analisi dell'attività locomotoria hanno mostrato che le mosche soggette a shift-work hanno esibito una iperattività locomotoria durante le ore lavorative.

Individui sottoposti a un regime di shift-work "counter-clockwise" (W e LSC) hanno mostrato una mortalità più accentuata rispetto ai controlli C12:12. In regime di shift-work "clockwise" invece non si sono riscontrate differenze significative nella vitalità dei gruppi studiati (W, LSC e C12:12); tali valori sono confrontabili con i dati ottenuti con esperimenti in assenza di shift-work. Anche nella specie umana a regimi di shift-work antiorari sono stati associati disturbi fisici e psicologici più pronunciati rispetto a quanto non sia stato trovato in relazione a regimi di shift-work orari (Van Amelsvoort *et al.*, 2004).

Il test ottico-motorio in mosche sottoposte a regimi di shift-work (sia “counterclockwise” che “clockwise”) ha messo in evidenza alcune differenze tra W, LSC e C12:12, soprattutto dopo la terza “settimana lavorativa”. Questi dati, confrontati con quelli ottenuti dallo stesso test eseguito su individui mantenuti in assenza di shift-work, hanno fatto ipotizzare effetti negativi dello shift-work sulle capacità ottico-motorie dei moscerini. Questi effetti sono risultati più evidenti alla terza settimana mentre sembrano attenuarsi in corrispondenza dalla sesta settimana. Tale risultato sembra per ora di difficile interpretazione, tuttavia potrebbe essere dovuto, almeno in parte, ad un effetto di “selezione” sulla popolazione di partenza.

Le maggiori differenze significative si sono trovate tra i C12:12 e gli altri due gruppi W e LSC. Sia a livello di mortalità che nel test ottico-motorio le differenze significative trovate separano nettamente i C12:12 da W e LSC. Ciò suggerisce che un fattore principale che agisce sui parametri studiati sia lo shift luminoso cronico. Un ulteriore dato che ci porta in questa direzione è stato ricavato attraverso analisi di microscopia elettronica. Sono stati osservati i neuroni di alcune aree del cervello al fine di mettere in luce eventuali danni a livello cellulare causati dal regime di shift-work. I danni al cervello sono stati valutati, confrontando cervelli di W, LSC e LD12:12, sia in modo qualitativo che quantitativo in raddomeri e in cellule della lamina e della medulla. Questo tipo di indagine, condotto su esemplari sottoposti a shift-work “counterclockwise”, ha messo in evidenza differenze tra C12:12 e gli altri due gruppi W e LSC che si dimostrano ancora una volta relativamente omogenei per quanto riguarda gli effetti causati dallo shift-work. L’incidenza dei danni valutati alla terza settimana lavorativa sembra diminuire alla sesta settimana confermando ancora una volta l’effetto possibile di selezione nella popolazione sopravvissuta (risultati ottenuti nell’ambito di una collaborazione con la Dr.ssa Lucia Manni, Dipartimento di Biologia Università di Padova).

Appendice 1

Sono riportati i valori di significatività (p) dell'analisi statistica (LSD) effettuata tra le quantità totali di mRNA per i diversi ZT dei profili trascrizionali ottenuti dai campionamenti condotti in condizioni naturali e di laboratorio per i geni *period* e *timeless* (Capitolo 4). I valori statisticamente significativi sono indicati in rosso ($p < 0.05$).

Condizioni di laboratorio (LD12:12)

a) Test LSD per *period* (23°C)

ZT	ZT0	ZT3	ZT6	ZT9	ZT12	ZT15	ZT18	ZT21
ZT0		0,748577	0,012025	9,25E-05	2,69E-07	1,61E-06	7,61E-06	3,23E-05
ZT3	0,748577		0,023405	0,000178	4,51E-07	2,83E-06	1,39E-05	6,11E-05
ZT6	0,012025	0,023405		0,032502	3,82E-05	0,000344	0,002173	0,01096
ZT9	9,25E-05	0,000178	0,032502		0,004707	0,044105	0,210095	0,599685
ZT12	2,69E-07	4,51E-07	3,82E-05	0,004707		0,289469	0,065795	0,014376
ZT15	1,61E-06	2,83E-06	0,000344	0,044105	0,289469		0,392261	0,118521
ZT18	7,61E-06	1,39E-05	0,002173	0,210095	0,065795	0,392261		0,452352
ZT21	3,23E-05	6,11E-05	0,01096	0,599685	0,014376	0,118521	0,452352	

b) Test LSD per *period* (18°C)

ZT	ZT0	ZT3	ZT6	ZT9	ZT12	ZT15	ZT18	ZT21
ZT0		0,190654904	0,073974252	0,066574574	0,041643	0,936313	0,363165796	0,146167
ZT3	0,190655		0,593090951	0,555602789	0,408895	0,216944	0,035064202	0,01057
ZT6	0,073974	0,593090951		0,95545131	0,765924	0,085838	0,01163168	0,003369
ZT9	0,066575	0,555602789	0,95545131		0,808748	0,07738	0,010341068	0,002988
ZT12	0,041643	0,408895105	0,765923679	0,808747768		0,048713	0,006185908	0,001777
ZT15	0,936313	0,216943681	0,085838065	0,077380292	0,048713		0,324188471	0,127244
ZT18	0,363166	0,035064202	0,01163168	0,010341068	0,006186	0,324188		0,56249
ZT21	0,146167	0,010570456	0,003368618	0,002988234	0,001777	0,127244	0,562489986	

c) Test LSD per *period* (10°C)

ZT	ZT0	ZT3	ZT6	ZT9	ZT12	ZT15	ZT18	ZT21
ZT0		0,434163	0,97545904	0,07986613	0,196277425	0,119037	0,129132	0,465465
ZT3	0,434163		0,41683409	0,01668673	0,047124024	0,026208	0,028784	0,140696
ZT6	0,975459	0,416834		0,08455656	0,206307307	0,125674	0,136243	0,484014
ZT9	0,079866	0,016687	0,08455656		0,609030843	0,826273	0,790548	0,278232
ZT12	0,196277	0,047124	0,20630731	0,60903084		0,769102	0,804547	0,556416
ZT15	0,119037	0,026208	0,12567376	0,82627285	0,769101739		0,963116	0,381807
ZT18	0,129132	0,028784	0,13624296	0,79054803	0,804546773	0,963116		0,406588
ZT21	0,465465	0,140696	0,4840143	0,27823234	0,556415677	0,381807	0,406588	

d) Test LSD per *timeless* (23°C)

ZT	ZT0	ZT3	ZT6	ZT9	ZT12	ZT15	ZT18	ZT21
ZT0		0,966262	0,646507	0,00923	0,004398	0,050488	0,351244	0,686667
ZT3	0,966262		0,616804	0,008475	0,004037	0,046592	0,332956	0,659325
ZT6	0,646507	0,616804		0,023182	0,011157	0,116941	0,594248	0,994254
ZT9	0,00923	0,008475	0,023182		0,714752	0,394928	0,104804	0,038294
ZT12	0,004398	0,004037	0,011157	0,714752		0,231557	0,057642	0,020159
ZT15	0,050488	0,046592	0,116941	0,394928	0,231557		0,358542	0,155363
ZT18	0,351244	0,332956	0,594248	0,104804	0,057642	0,358542		0,621882
ZT21	0,686667	0,659325	0,994254	0,038294	0,020159	0,155363	0,621882	

e) Test LSD per *timeless* (18°C)

ZT	ZT0	ZT3	ZT6	ZT9	ZT12	ZT15	ZT18	ZT21
ZT0		0,025965422	9,35838E-05	6,90688E-06	1,1E-06	1,42E-05	1,03966E-05	0,002395
ZT3	0,025965		0,015354685	0,000875759	0,000101	0,001996	0,001400455	0,268323
ZT6	9,36E-05	0,015354685		0,19111599	0,027893	0,344558	0,27028808	0,136845
ZT9	6,91E-06	0,000875759	0,19111599		0,307961	0,700889	0,826236248	0,009782
ZT12	1,1E-06	0,000100536	0,027893141	0,307961166		0,167995	0,220095828	0,001066
ZT15	1,42E-05	0,001996107	0,344557524	0,700888693	0,167995		0,868740678	0,021828
ZT18	1,04E-05	0,001400455	0,27028808	0,826236248	0,220096	0,868741		0,015509
ZT21	0,002395	0,268323481	0,136844546	0,009782463	0,001066	0,021828	0,015509087	

f) Test LSD per *timeless* (10°C)

ZT	ZT0	ZT3	ZT6	ZT9	ZT12	ZT15	ZT18	ZT21
ZT0		0,506256	0,98197627	0,04531893	0,026134333	0,087229	0,213373	0,187108
ZT3	0,506256		0,49222133	0,01155803	0,006451369	0,02359	0,06567	0,056246
ZT6	0,981976	0,492221		0,04736859	0,027361052	0,090927	0,2212	0,194159
ZT9	0,045319	0,011558	0,04736859		0,783271909	0,731505	0,394493	0,439493
ZT12	0,026134	0,006451	0,02736105	0,78327191		0,538285	0,265139	0,299396
ZT15	0,087229	0,02359	0,09092709	0,73150545	0,538285196		0,606193	0,663261
ZT18	0,213373	0,06567	0,22120038	0,39449346	0,265138596	0,606193		0,935468
ZT21	0,187108	0,056246	0,19415906	0,43949348	0,299395591	0,663261	0,935468	

Condizioni naturali

27-28 Marzo 2008

a) *period*

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,082803	0,69476	0,230417	0,516643	0,064547	0,234303	0,002102
18	0,082803		0,166137	0,55454	0,25246	0,894539	0,547551	0,088777
21	0,69476	0,166137		0,409362	0,795425	0,132401	0,415237	0,004886
0	0,230417	0,55454	0,409362		0,56763	0,471002	0,991508	0,028025
3	0,516643	0,25246	0,795425	0,56763		0,204781	0,574753	0,008491
6	0,064547	0,894539	0,132401	0,471002	0,204781		0,464641	0,112883
9	0,234303	0,547551	0,415237	0,991508	0,574753	0,464641		0,027427
12	0,002102	0,088777	0,004886	0,028025	0,008491	0,112883	0,027427	

b) *timeless*

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,038646	0,403891	0,053595	0,069834	0,0852	0,14332	0,029427
18	0,038646		0,181899	0,867572	0,760513	0,681344	0,485577	0,891768
21	0,403891	0,181899		0,237876	0,293765	0,342923	0,505166	0,144598
0	0,053595	0,867572	0,237876		0,889923	0,806697	0,593638	0,762285
3	0,069834	0,760513	0,293765	0,889923		0,915216	0,691684	0,659937
6	0,0852	0,681344	0,342923	0,806697	0,915216		0,771283	0,585588
9	0,14332	0,485577	0,505166	0,593638	0,691684	0,771283		0,406709
12	0,029427	0,891768	0,144598	0,762285	0,659937	0,585588	0,406709	

6-7 Maggio 2008

a) *period*

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,964441	0,87758	0,089284	0,748197	0,54005	0,203838	0,95719
18	0,964441		0,912812	0,096868	0,714851	0,511525	0,189571	0,921734
21	0,87758	0,912812		0,117928	0,635547	0,445253	0,157937	0,835514
0	0,089284	0,096868	0,117928		0,048519	0,026963	0,006409	0,080851
3	0,748197	0,714851	0,635547	0,048519		0,768387	0,33303	0,789038
6	0,54005	0,511525	0,445253	0,026963	0,768387		0,49478	0,575523
9	0,203838	0,189571	0,157937	0,006409	0,33303	0,49478		0,222139
12	0,95719	0,921734	0,835514	0,080851	0,789038	0,575523	0,222139	

b) *timeless*

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,072734	0,045729	0,081441	0,240277	0,571636	0,172068	0,329959
18	0,072734		0,809306	0,951746	0,493156	0,023746	0,004062	0,009897
21	0,045729	0,809306		0,762939	0,357868	0,014415	0,00242	0,005927
0	0,081441	0,951746	0,762939		0,531303	0,026861	0,004624	0,011243
3	0,240277	0,493156	0,357868	0,531303		0,091213	0,017497	0,040862
6	0,571636	0,023746	0,014415	0,026861	0,091213		0,406738	0,674876
9	0,172068	0,004062	0,00242	0,004624	0,017497	0,406738		0,676627
12	0,329959	0,009897	0,005927	0,011243	0,040862	0,674876	0,676627	

21-22 Giugno 2007

a) period

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,679993	0,709575	0,014772	0,771166	0,296074	0,893728	0,792252
18	0,679993		0,967821	0,034435	0,902641	0,518595	0,586011	0,501343
21	0,709575	0,967821		0,031759	0,934644	0,49334	0,61369	0,52683
0	0,014772	0,034435	0,031759		0,026911	0,118074	0,011165	0,008484
3	0,771166	0,902641	0,934644	0,026911		0,444289	0,671822	0,580801
6	0,296074	0,518595	0,49334	0,118074	0,444289		0,241653	0,19643
9	0,893728	0,586011	0,61369	0,011165	0,671822	0,241653		0,896551
12	0,792252	0,501343	0,52683	0,008484	0,580801	0,19643	0,896551	

b) timeless

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,003883	7,04E-05	5,98E-07	0,00183	0,401372	0,014496	0,026105
18	0,003883		0,070468	0,000307	0,726318	0,000632	1,5E-05	2,59E-05
21	7,04E-05	0,070468		0,017687	0,133253	1,34E-05	5,1E-07	8,2E-07
0	5,98E-07	0,000307	0,017687		0,000643	1,54E-07	1,07E-08	1,58E-08
3	0,00183	0,726318	0,133253	0,000643		0,000302	7,74E-06	1,32E-05
6	0,401372	0,000632	1,34E-05	1,54E-07	0,000302		0,078582	0,131579
9	0,014496	1,5E-05	5,1E-07	1,07E-08	7,74E-06	0,078582		0,775663
12	0,026105	2,59E-05	8,2E-07	1,58E-08	1,32E-05	0,131579	0,775663	

24-25 Giugno 2008

a) period

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,77391	0,7301	0,51519	0,059838	0,411986	0,848452	0,628833
18	0,773908		0,5292	0,352459	0,034045	0,273271	0,633286	0,843502
21	0,730127	0,52919		0,757221	0,113489	0,629861	0,877333	0,411178
0	0,51519	0,35246	0,7572		0,192718	0,861842	0,643775	0,263717
3	0,059838	0,03405	0,1135	0,192718		0,254074	0,085754	0,02282
6	0,411986	0,27327	0,6299	0,861842	0,254074		0,526066	0,200494
9	0,848452	0,63329	0,8773	0,643775	0,085754	0,526066		0,501897
12	0,628833	0,8435	0,4112	0,263717	0,02282	0,200494	0,501897	

b) timeless

Ore	15	18	21	0	3	6	9	12
15		0,93001	0,9665	0,596678	0,018705	0,075809	0,841376	0,855475
18	0,930009		0,8967	0,658248	0,02241	0,089225	0,773558	0,787341
21	0,966501	0,89672		0,568287	0,017147	0,070056	0,874299	0,888508
0	0,596678	0,65825	0,5683		0,054318	0,193111	0,468047	0,478899
3	0,018705	0,02241	0,0171	0,054318		0,483175	0,012325	0,0128
6	0,075809	0,08922	0,0701	0,193111	0,483175		0,051745	0,053584
9	0,841376	0,77356	0,8743	0,468047	0,012325	0,051745		0,985618
12	0,855475	0,78734	0,8885	0,478899	0,0128	0,053584	0,985618	

12-13 Luglio 2007

a) *period*

Ore	12	15	18	21	0	3	6	9
12		0,106595	0,00076	0,001033	0,409532	0,540882	4,67E-06	3,67E-06
15	0,106595		0,026933	0,035977	0,021109	0,032911	2,67E-07	2,16E-07
18	0,00076	0,026933		0,885643	0,000133	0,000209	8,23E-09	6,91E-09
21	0,001033	0,035977	0,885643		0,000179	0,000281	9,96E-09	8,35E-09
0	0,409532	0,021109	0,000133	0,000179		0,82707	2,23E-05	1,73E-05
3	0,540882	0,032911	0,000209	0,000281	0,82707		1,46E-05	1,14E-05
6	4,67E-06	2,67E-07	8,23E-09	9,96E-09	2,23E-05	1,46E-05		0,894711
9	3,67E-06	2,16E-07	6,91E-09	8,35E-09	1,73E-05	1,14E-05	0,894711	

b) *timeless*

Ore	12	15	18	21	0	3	6	9
12		0,000735	3,14E-05	6,12E-06	6,74E-06	1,93E-06	0,292385	0,292385
15	0,000735		0,137813	0,026862	0,029872	0,007017	7,93E-05	7,93E-05
18	3,14E-05	0,137813		0,394601	0,423405	0,145928	4,17E-06	4,17E-06
21	6,12E-06	0,026862	0,394601		0,958158	0,522649	9,27E-07	9,27E-07
0	6,74E-06	0,029872	0,423405	0,958158		0,489798	1,01E-06	1,01E-06
3	1,93E-06	0,007017	0,145928	0,522649	0,489798		3,21E-07	3,21E-07
6	0,292385	7,93E-05	4,17E-06	9,27E-07	1,01E-06	3,21E-07		1
9	0,292385	7,93E-05	4,17E-06	9,27E-07	1,01E-06	3,21E-07	1	

20-21 Settembre 2007

a) *period*

Ore	18	21	0	3	6	9	12	15
18		0,969139	0,395743	0,195724	0,08425	0,08988	0,054322	0,529728
21	0,969139		0,375364	0,206948	0,078464	0,083749	0,050442	0,505227
0	0,395743	0,375364		0,049554	0,34512	0,36272	0,243827	0,820461
3	0,195724	0,206948	0,049554		0,008826	0,009425	0,00571	0,072792
6	0,08425	0,078464	0,34512	0,008826		0,971736	0,814825	0,246584
9	0,08988	0,083749	0,36272	0,009425	0,971736		0,787528	0,260358
12	0,054322	0,050442	0,243827	0,00571	0,814825	0,787528		0,169265
15	0,529728	0,505227	0,820461	0,072792	0,246584	0,260358	0,169265	

b) *timeless*

Ore	18	21	0	3	6	9	12	15
18		0,564363	0,453062	0,061623	0,003756	0,004309	0,006493	0,161643
21	0,564363		0,85904	0,174441	0,012863	0,014708	0,021882	0,392492
0	0,453062	0,85904		0,232577	0,01862	0,021249	0,031399	0,494976
3	0,061623	0,174441	0,232577		0,187195	0,207768	0,280159	0,595014
6	0,003756	0,012863	0,01862	0,187195		0,948885	0,798081	0,072823
9	0,004309	0,014708	0,021249	0,207768	0,948885		0,847839	0,082086
12	0,006493	0,021882	0,031399	0,280159	0,798081	0,847839		0,116343
15	0,161643	0,392492	0,494976	0,595014	0,072823	0,082086	0,116343	

23-24 Ottobre 2007

a) period

Ore	12	15	18	21	0	3	6	9
12		0,939682	0,170869	0,095192	0,776235	0,730962	0,898707	0,946757
15	0,939682		0,150357	0,082827	0,7192	0,788306	0,839237	0,886752
18	0,170869	0,150357		0,738602	0,269139	0,093437	0,21051	0,190829
21	0,095192	0,082827	0,738602		0,157153	0,049672	0,119661	0,10742
0	0,776235	0,7192	0,269139	0,157153		0,531867	0,875081	0,827703
3	0,730962	0,788306	0,093437	0,049672	0,531867		0,638245	0,681678
6	0,898707	0,839237	0,21051	0,119661	0,875081	0,638245		0,951726
9	0,946757	0,886752	0,190829	0,10742	0,827703	0,681678	0,951726	

b) timeless

Ore	12	15	18	21	0	3	6	9
12		0,03676	0,111082	0,002821	0,442104	0,738264	0,184527	0,151309
15	0,03676		0,562127	0,231139	0,155576	0,070405	0,00209	0,001621
18	0,111082	0,562127		0,084892	0,382305	0,196891	0,007275	0,005654
21	0,002821	0,231139	0,084892		0,014675	0,005777	0,000157	0,000123
0	0,442104	0,155576	0,382305	0,014675		0,660036	0,044973	0,035582
3	0,738264	0,070405	0,196891	0,005777	0,660036		0,103455	0,083327
6	0,184527	0,00209	0,007275	0,000157	0,044973	0,103455		0,905836
9	0,151309	0,001621	0,005654	0,000123	0,035582	0,083327	0,905836	

13-14 Novembre 2007

a) period

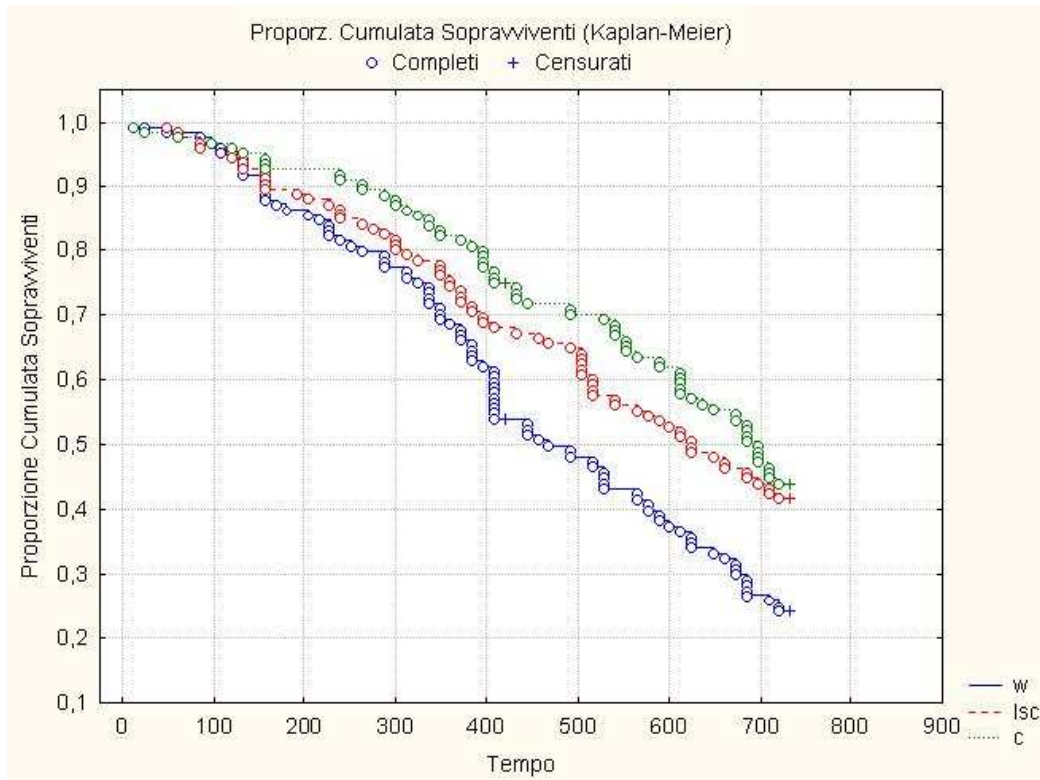
Ore	6	9	12	15	18	21	0	3
6		0,1458	0,390728	0,944345	0,996228	0,562084	0,219198	0,028058
9	0,1458		0,526954	0,129182	0,146988	0,362733	0,805657	0,388631
12	0,390728	0,526954		0,354708	0,393253	0,775432	0,696889	0,144816
15	0,944345	0,129182	0,354708		0,940583	0,516785	0,195889	0,024345
18	0,996228	0,146988	0,393253	0,940583		0,565227	0,220852	0,028328
21	0,562084	0,362733	0,775432	0,516785	0,565227		0,502066	0,087024
0	0,219198	0,805657	0,696889	0,195889	0,220852	0,502066		0,272542
3	0,028058	0,388631	0,144816	0,024345	0,028328	0,087024	0,272542	

b) timeless

Ore	6	9	12	15	18	21	0	3
6		0,967939	0,76022	0,208405	0,013586	0,037993	0,314984	0,935933
9	0,967939		0,729958	0,195273	0,012489	0,035069	0,296929	0,967937
12	0,76022	0,729958		0,332001	0,025541	0,06876	0,477776	0,700147
15	0,208405	0,195273	0,332001		0,163162	0,355823	0,787974	0,182814
18	0,013586	0,012489	0,025541	0,163162		0,616372	0,101907	0,011478
21	0,037993	0,035069	0,06876	0,355823	0,616372		0,238545	0,032357
0	0,314984	0,296929	0,477776	0,787974	0,101907	0,238545		0,279644
3	0,935933	0,967937	0,700147	0,182814	0,011478	0,032357	0,279644	

Appendice 2

Curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier (Norman e Streiner, 1998), per esemplari sottoposti a un regime di shift work “counter-clockwise”:



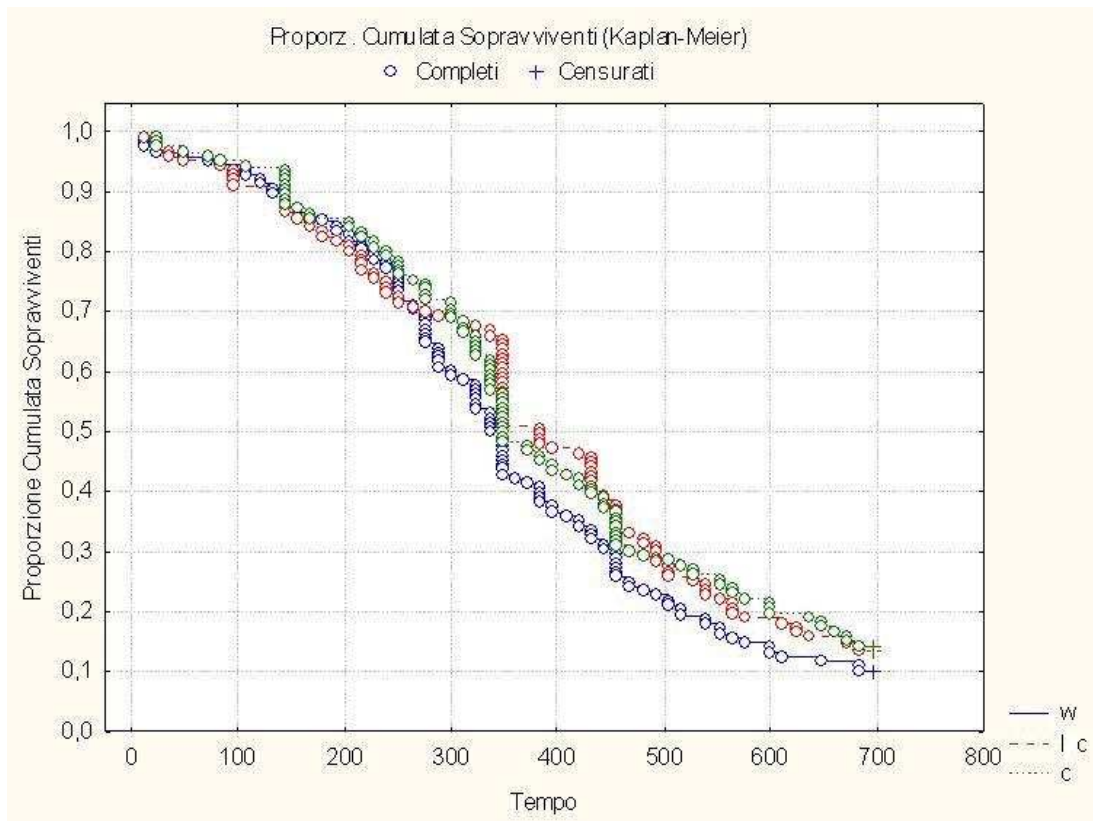
Curve di sopravvivenza (metodo Kaplan-Meier) di individui sottoposti a un regime di shift work “counter-clockwise”. w: esemplari soggetti a shift work (blu), lsc: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker (rosso), c: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante (verde). La numerosità iniziale per i tre gruppi testati è di 128 individui. Il tempo è espresso in ore.

Confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank (Norman e Streiner, 1998):

	W	LSC	C12:12
W	---	0.056	p>0.0017*
LSC		---	0.400
C12:12			---

Confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank. W: esemplari soggetti a shift work, LSC: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker, C12:12: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante.

Curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier (Norman e Streiner, 1998), per esemplari sottoposti a un regime di “lavoro” costante:



Curve di sopravvivenza (metodo Kaplan-Meier) di individui sottoposti a un regime di “lavoro” costante. w: esemplari soggetti a un regime di “lavoro” costante durante le prime otto ore del giorno (blu), lc: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker (rosso), c: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante (verde). La numerosità iniziale per i tre gruppi testati è di 128 individui. Il tempo è espresso in ore.

Confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank (Norman e Streiner, 1998):

	W	LC	C12:12
W	---	0.173	0.198
LC		---	0.945
C12:12			---

Confronti tra i gruppi secondo il metodo di Log-Rank. W: esemplari soggetti a un regime di “lavoro” costante durante le prime otto ore del giorno. LC: esemplari soggetti agli stessi cicli di luce dei worker. C12:12: esemplari soggetti ad un regime LD 12:12 costante.

Appendice 3

Analisi statistiche:

Tutti i test statistici di significatività assumono inizialmente la cosiddetta ipotesi zero, anche chiamata ipotesi nulla. Quando si effettua il confronto fra due o più gruppi di dati (campioni), l'ipotesi zero prevede sempre che non esista alcuna differenza tra i gruppi riguardo al parametro considerato. Quindi se l'ipotesi nulla è valida, le eventuali differenze osservate nei campioni (il parametro considerato) vanno attribuite al solo caso. Una decisione di respingere l'ipotesi nulla (presa sulla base del test statistico) è probabilmente giusta, ma potrebbe anche essere errata. La probabilità di commettere questo errore si chiama livello di significatività del test. Il livello di significatività di un test può essere scelto a piacere dallo sperimentatore. Questa probabilità, chiamata anche valore p , di solito viene fissata ai valori di 0.05 (5%) o di 0.01 (1%). Questa probabilità rappresenta una stima quantitativa della probabilità che le differenze osservate siano dovute al caso.

In questa tesi di dottorato sono stati utilizzati i seguenti test statistici:

ANOVA e TEST LSD: L'analisi della varianza è un test statistico parametrico che permette di confrontare due o più gruppi di dati confrontando la variabilità interna (within) a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi (between). L'intento è quello di verificare l'ipotesi nulla che tutte le medie dei diversi gruppi di dati considerati siano uguali tra di loro contro l'ipotesi alternativa che almeno una coppia di medie presenti una differenza statisticamente significativa. Nel presente elaborato di tesi l'ipotesi nulla, secondo la quale tutte le medie sono uguali, è stata rifiutata quando il p -value era inferiore a 0.05. Quando il p -value è inferiore a 0.05 non significa che le medie sono tutte significativamente diverse l'una dall'altra ma, piuttosto, che c'è almeno una coppia di medie la cui differenza è statisticamente significativa. E' quindi necessario individuare quali sono le medie diverse tra loro, procedendo quindi a verificare l'uguaglianza tra tutte le possibili coppie di medie attraverso opportuni test. In tali test, detti test post-hoc, per ogni coppia di medie l'ipotesi nulla è che la differenza tra queste sia pari a zero, mentre l'alternativa è che le due medie differiscano significativamente tra loro. Tale modo di procedere (procedura LSD, Least Significant Difference) tiene sotto controllo l'errore relativo ad ognuno dei singoli confronti. Anche per queste analisi il livello di significatività utilizzato nel presente elaborato di tesi è pari a $p=0.05$.

Test t di Student: E' una statistica parametrica che serve a confrontare tra di loro due campioni. L'ipotesi nulla è che non vi sia differenza tra le medie dei due campioni considerati. Il livello di significatività utilizzato nel presente elaborato di tesi è pari $p=0.05$.

ANCOVA (Analisi della Covarianza): E' un test statistico parametrico fattoriale combinazione di un modello di regressione e di un modello di tipo ANOVA. Esso è costituito da una parte regressiva ed una di analisi della varianza. L'ANCOVA si usa qualora si voglia neutralizzare l'effetto continuo sulla variabile dipendente di una variabile di disturbo chiamata covariata.

Test di Kaplan-Meier: E' un'analisi statistica inferenziale non parametrica che consente di costruire curve di sopravvivenza (ovvero il grafico della relazione esistente tra la probabilità di sopravvivere e il tempo di osservazione). Tale test permette di analizzare l'incidenza di un determinato evento in un certo arco temporale. La probabilità di sopravvivere ogni giorno è condizionata al fatto di essere sopravvissuti i giorni precedenti. In questo test la probabilità di sopravvivenza viene calcolata ogni giorno considerando la morte progressiva degli individui nel

tempo. Le curve di sopravvivenza sono state confrontate tra di loro con il Log Rank test per verificare statisticamente eventuali differenze.

Bibliografia

American Academy of Sleep Medicine (2005) International classification of sleep disorders. Diagnostic and coding manual. 2nd ed. Westchester (IL).

Andretic R., van Swinderen B., Greenspan R.J. (2005) Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Current Biology*, **15**, 1165-75.

Aschoff J., Wever R. (1962) Spontanperiodik des menschen bei ausschluss aller zeitgeber. *Naturwissenschaften*, **49**, 337.

Aschoff J., Klotter K., Wever R. (1965) Circadian vocabulary, pag XI-XIV, in: "Circadian clocks", J. Aschoff, ed. North Holland Publishing Company, Amsterdam.

Akten B., Jauch E., Genova G.K., Kim E.Y., Edery I., Raabe T., Jackson F.R. (2003) A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci.*, **6**, 251-257.

Allada R., White N.E., So W.V., Hall J.C., Rosbash M. (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian clock disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell*, **93**, 791-804.

Atkinson N.S., Brenner R., Chang W., Wilbur J., Larimer J.L., Yu J. (2000) Molecular separation of two behavioral phenotypes by a mutation affecting the promoters of a Ca-activated K channel. *J. Neurosci.*, **20**, 2988-93.

Bachleitner W., Kempinger L., Wülbeck C., Rieger D., Helfrich-Förster C. (2007) Moonlight shifts the endogenous clock of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 3538-43.

Bargiello T.A., Young M.W. (1984) Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2142-2146.

Barton, J. (1994) Choosing to work at night: a moderating influence on individual tolerance to shift work. *Journal of Applied Psychology*, **79**, 449-454.

Baylies M.K., Bargiello T.A., Jackson F.R., Young M.W. (1987) Changes in abundance or structure of the *per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature*, **326**, 390-2.

Beaver L.M., Gvakharia B.O., Vollintine T.S., Hege D.M., Stanewsky R., Giebultowicz J.M. (2002) Loss of circadian clock function decreases reproductive fitness in males of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2134-9.

Belvin M.P., Zhou H., Yin J.C. (1999) The *Drosophila* *dCREB2* gene affects the circadian clock. *Neuron*, **22**, 777-87.

Beling I. (1929) Uber das zeigtedachtnis der bienen. *Z. Vgl. Physiol.*, **9**, 259.

Benito J., Zheng H., Hardin P.E. (2007) PDP1epsilon functions downstream of the circadian oscillator to mediate behavioral rhythms. *J. Neurosci.*, **27**, 2539-47.

Benna C., Bonaccorsi S., Wulbeck C., Helfrich-Forster C., Gatti M., Kyriacou C.P., Costa R., Sandrelli F. (2010) *Drosophila timeless2* is required for chromosome stability and circadian photoreception. *Current Biology*, **20**, 1-7

Blau J., Young M.W. (1999) Cycling *vrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*, **99**, 661-71.

Blau J. (2001) The *Drosophila* circadian clock: what we know and what we don't know. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **12**, 287-93.

Borberly A.A., Achermann P. (1999) Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J. Biol. Rhythms*, **14**, 557-568.

Boothroyd C.E., Wijnen H., Naef F., Saez L., Young M.W. (2007) Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. *PLoS Genet.*, **3**, e54.

Bolwig N. (1946) Senses and sense organs of the anterior end of the house fly larvae. *Vidensk Medd Dansk naturh Forenh Kbh*, **109**, 81-217.

Bridges C.B., Brehme K.F. (1944) The mutants of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington. Publication No.552.

Burnet B., Beck J. (1968) Phenogenetic studies on visual acuity in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Phys.*, **57**, 855-860.

Busza A., Murad A., Emery P. (2007) Interactions between circadian neurons control temperature synchronization of *Drosophila* behavior. *J. Neurosci.*, **27**, 10722-10733.

Bhutani Supriya (2009) Natural entrainment of the *Drosophila melanogaster* circadian clock. Università di Leicester (U.K).

Campbell S., Tobler I. (1984) Animal sleep: a review of sleep duration across phylogeny. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, **8**, 269-300.

Castiglione-Morelli M.A., Guantieri V., Villani V., Kyriacou C.P., Costa R., Tamburro A.M. (1995) Conformational study of the thr-gly repeat in the *Drosophila* clock protein, PERIOD. *Proc. Biol. Sci.*, **260**, 155-163.

Ceriani M.F., Darlington T.K., Staknis D., Mas P., Petti A.A., Weitz C.J., Kay S.A. (1999) Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, **285**, 553-6.

Ceriani M.F., Hogenesch J.B., Yanovsky M., Panda S., Straume M., Kay S.A. (2002) Genome-wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *J. Neurosci.*, **22**, 9305-19.

Chen W.F., Majercak J., Edery I. (2006) Clock-gated photic stimulation of *timeless* expression at cold temperatures and seasonal adaptation in *Drosophila*. *J. Biol. Rhythms*, **21**, 256-71.

- Chen W.F., Low K.H., Lim C., Edery I. (2007) Thermosensitive splicing of a clock gene and seasonal adaptation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**, 599-606.
- Cheng Y., Gvakharia B., Hardin P.E. (1998) Two alternatively spliced transcripts from the *Drosophila period* gene rescue rhythms having different molecular and behavioral characteristics. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6505-14.
- Cho K. (2001) Chronic “jet-lag” produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nature Neuroscience*, **4**, 567,568.
- Cirelli C., LaVaute T.M., Tononi G. (2005a) Sleep and wakefulness modulate gene expression in *Drosophila*. *Journal of Neurochemistry*, **94**, 1411-1419.
- Cirelli C., Bushey D, Hill S, Huber R, Kreber R, Ganetzky B, Tononi G. (2005b) Reduced sleep in *Drosophila Shaker* mutants. *Nature*, **434**, 1087-92.
- Cirelli C., Tononi G. (2008) Is sleep essential? *PLoS Biol.*, **6**, e216.
- Citri Y, Colot H.V., Jacquier A.C., Yu Q., Hall J.C., Baltimore D., Rosbash M. (1987) A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene, *Nature*, **326**, 42-7.
- Collins B.H., Rosato E., Kyriacou C.P. (2004) Seasonal behaviour in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1945-50.
- Collins B.H., Dissel S., Gaten E., Rosato E., Kyriacou C.P. (2005) Disruption of Cryptochrome partially restores circadian rhythmicity to the arrhythmic *period* mutant of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 19021-6.
- Connolly J.B., Tully T. (1998) *Drosophila*, a practical approach. In Roberts, D.B. (ed.). Oxford University Press, Oxford, U.K., cap.9.
- Costa R., Peixoto A.A., Barbujani G., Kyriacou C.P. (1992) A latitudinal cline in a *Drosophila* clock gene. *Proc Biol Sci.*, **250**, 43-9.
- Costa R., Kyriacou C.P. (1998) Functional and evolutionary implications of natural variation in clock genes. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **8**, 659-664.
- Crowley S.J., Lee C., Tseng C.Y., Fogg L.F., Eastman C.I. (2003) Combinations of bright light, scheduled dark, sunglasses, and melatonin to facilitate circadian entrainment to night shift work. *J. Biol. Rhythms*, **12**, 5-15.
- Currie J., Goda T., Wijnen H. (2009) Selective entrainment of the *Drosophila* circadian clock to daily gradients in environmental temperature. *BMC Biol.*, **11**, 7:49.
- Curtin K.D., Huang Z.J., Rosbash M. (1995) Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila period* protein contributes to the circadian clock. *Neuron*, **14**, 365-72.

- Cummings F.W. (1975) A biochemical model of the circadian clock. *J. Theor. Biol.*, **55**, 455-470.
- Cyran S.A., Buchsbaum A.M., Reddy K.L., Lin M.C., Glossop N.R., Hardin P.E., Young M.W., Storti R.V., Blau J. (2003) *Vrille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, **112**, 329-41.
- Darlington T. K., Wager-Smith K., Ceriani M.F., Staknis D., Gekakis N., Steeves T.D., Weitz C.J., Takahashi J.S., Kay S.A. (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science*, **280**, 1599-603.
- David J.R., Capy P. (1988) Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends Genet.*, **4**, 106-11.
- Davidson A.J., Sellix M.T., Daniel J., Yamazaki S., Menaker M., Block G.D. (2006) Chronic jet-lag increases mortality in aged mice. *Current Biology*, **16**, R914-R916.
- Dissel S., Fedic R., Garner K.J., Costa R., Kyriacou C.P., Rosato E. (2004) A constitutively active cryptochrome in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.*, **7**, 834-40.
- Dockendorff T.C., Su H.S., McBride S.M., Yang Z., Choi C.H., Siwicki K.K., Sehgal A., Jongens T.A. (2002) *Drosophila* lacking *dfmr1* activity show defects in circadian output and fail to maintain courtship interest. *Neuron*, **34**, 973-84.
- Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P. (2006) Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, **125**, 497-508.
- Dolezelova E., Dolezel D., Hall J.C. (2007) Rhythm defects caused by newly engineered null mutations in *Drosophila's cryptochrome* gene. *Genetics*, **177**, 329-345.
- Dong G., Golden S.S. (2008) How a cyanobacterium tells time. *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 541-6.
- Duffy J.B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *Genesis*, **34**, 1-15.
- Dunlap J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, **96**, 271-90.
- Emery P., So W.V., Kaneko M., Hall J.C., Rosbash M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, **95**, 669-679.
- Emery P., Stanewsky R., Helfrich-Forster C., Emery-Le M., Hall J.C., Rosbash M. (2000) *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*, **26**, 493-504.
- Esquirol Y., Bongard V., Mabile L., Jonnier B., Soulat J.M., Perret B. (2009) Shift work and metabolic syndrome: respective impacts of job strain, physical activity, and dietary rhythms. *Chronobiol. Int.*, **26**, 544-59

- Fang Y., Sathyanarayanan S., Sehgal A. (2007) Post-translational regulation of the *Drosophila* circadian clock requires protein phosphatase 1 (PP1). *Genes Dev.*, **21**, 1506-1518.
- Folkard S., Lombardi D.A., Tucker P.T. (2005) Shift work: safety, sleepiness and sleep. *Industrial Health.*, **43**, 20-23.
- Foltenyi K., Greenspan R.J., Newport J.W. (2007a) Activation of EGFR and ERK by rhomboid signaling regulates the consolidation and maintenance of sleep in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.*, **10**, 1160-7.
- Foltenyi K., Andretic R., Newport J.W., Greenspan R.J. (2007b) Neurohormonal and neuromodulatory control of sleep in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**, 565-71.
- Frisch B., Hardin P.E., Hamblen-Coyle M.J., Rosbash M., Hall J.C. (1994) A promoterless *period* gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical *per* expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron*, **12**, 555-70.
- Fujii S., Krishnan P., Hardin P., Amrein H. (2007) Nocturnal male sex drive in *Drosophila*. *Current Biology*, **17**, 244-51.
- Gekakis N., Saez L., Delahaye-Brown A.M., Myers M.P., Sehgal A., Young M.W., Weitz C.J. (1995) Isolation of timeless by PER protein interaction: Defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science*, **270**, 811-5.
- Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., King D.P., Takahashi J.S., Weitz C.J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, **280**, 1564-9.
- Glaser F.T., Stanewsky R. (2005) Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Current Biology*, **15**, 1352-63.
- Glaser F.T., Sehadova H., Gentile C., Simoni A., Giesecke A., Albert J.T., Stanewsky R. (2009) Temperature entrainment of *Drosophila*'s circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron*, **64**, 251-66.
- Glossop N.R., Lyons L.C., Hardin P.E. (1999) Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science*, **286**, 766-8.
- Grima B., Lamouroux A., Chelot E., Papin C., Limbourg-Bouchon B., Rouyer F. (2002) The F-box protein SLIMB controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature*, **420**, 178-182.
- Grima B., Chelot E., Xia R., Rouyer F. (2004) Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, **431**, 869-73.
- Hall J.C. (1994) The mating of a fly. *Science*, **264**, 1702-1714.
- Hanai S., Hamasaka Y., Ishida N. (2008) Circadian entrainment to red light in *Drosophila*: Requirement of rhodopsin 1 and rhodopsin 6. *Neuroreport.*, **19**, 1441-1444.

- Hardie R.C. (2001) Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. J. Exp. Biol., **204**, 3403-9.
- Hardin P.E., Hall J.C., Rosbash M. (1990) Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature, **343**, 536-40.
- Hardin P.E., Hall J.C., Rosbash M. (1992) Circadian oscillations in *period* gene mRNA levels are transcriptionally regulated. Proc Natl Acad Sci U S A, **89**, 11711-11715.
- Hardin P.E. (1994) Analysis of *period* mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. Mol. Cell. Biol., **14**, 7211-7218.
- Hatzfeld M. (1999) The armadillo family of structural proteins. Int. Rev. Cytol., **186**, 179-224.
- Helfrich-Förster C., Täuber M., Park J.H., Mühlig-Versen M., Schneuwly S., Hofbauer A. (2000) Ectopic expression of the neuropeptide pigment-dispersing factor alters behavioral rhythms in *Drosophila melanogaster*. J. Neurosci., **20**, 3339-53.
- Helfrich-Forster C. (2001) The locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* is controlled by a dual oscillator system. J. Insect Phys., **47**, 877-887.
- Helfrich-Forster C. (2005) Techniques that revealed the network of the circadian clock of *Drosophila*. Methods Enzymol., **393**, 439-51.
- Helfrich-Forster C., Yoshii T., Wulbeck C., Grieshaber E., Rieger D., Bachleitner W., Cusamano P., Rouyer F. (2007) The lateral and dorsal neurons of *Drosophila melanogaster*: New insights about their morphology and function. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., **72**, 517-525.
- Hendricks J.C., Finn S.M., Panckeri K.A., Chavkin J., Williams J.A., Sehgal A., Pack A. (2000a) Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. Neuron, **25**, 129-138.
- Hendricks J.C., Sehgal A., Pack A.I. (2000b) The need for a simple animal model to understand sleep. Progress in Neurobiology, **61**, 339-351.
- Hofbauer A., Campos Ortega J.A. (1990) Proliferation pattern and early differentiation of the optic lobes in *Drosophila melanogaster*. Roux's Arch. Dev. Biol., **198**, 264-274.
- Honma S., Kawamoto T., Takagi Y., Fujimoto K., Sato F., Noshiro M., Kato Y., Honma K. (2002) *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock. Nature, **419**, 841-4.
- Howlader G, Sharma VK. (2006) Circadian regulation of egg-laying behavior in fruit flies *Drosophila melanogaster*. J. Insect Physiol., **52**, 779-85.
- Huber R., Hill S.L., Holladay C., Biesiadecki M., Tononi G., Cirelli C. (2004) Sleep homeostasis in *Drosophila melanogaster*. Sleep, **27**, 628-639.

- Hsu C.D., Adams S.M., O'Tousa J.E. (2002) *Rpr-* and *hid*-driven cell death in *Drosophila* photoreceptors. *Vision Res.*, **42**, 507-16.
- Hyun S., Lee Y., Hong S.T., Bang S., Paik D., Kang J., Shin J., Lee J., Jeon K., Hwang S., Bae E., Kim J. (2005) *Drosophila* GPCR *han* is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron*, **48**, 267-278.
- Inoue S., Shimoda M., Nishinokubi I., Siomi M.C., Okamura M., Nakamura A., Kobayashi S., Ishida N., Siomi H. (2002) A role for the *Drosophila* fragile X-related gene in circadian output. *Current Biology*, **12**, 1331-5.
- Ishiura M., Kutsuna S., Aoki S., Iwasaki H., Andersson C.R., Tanabe A., Golden S.S., Johnson C.H., Kondo T. (1998) Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science*, **281**, 1519-23.
- Ivleva N.B., Bramlett M.R., Lindahl P.A., Golden S.S. (2005) *LdpA*: a component of the circadian clock senses redox state of the cell. *EMBO J.*, **24**, 1202-10.
- Ivleva N.B., Gao T., LiWang A.C., Golden S.S. (2006) Quinine sensing by the circadian input kinase of the cyanobacterial circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **103**, 17468-73.
- Iwasaki H., Kondo T. (2004) Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. *J. Biol. Rhythms*, **19**, 436-44.
- Jackson F.R., Bargiello T.A., Yun S.H., Young M.W. (1986) Product of *per* locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature*, **320**, 185-8.
- Joiner W.J., Crocker A., White B.H., Sehgal A. (2006) Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature*, **441**, 757-60.
- Johard H.A., Yoishii T., Dircksen H., Cusumano P., Rouyer F., Helfrich-Förster C., Nässel D.R. (2009) Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *J. Comp. Neurol.*, **516**, 59-73.
- Jones C.R., Campbell S.S., Zane S.E., Cooper F., DeSano A., Murphy P.J., Jones B., Czajkowski L., Ptáček L.J. (1999) Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat. Med.*, **5**, 1062-5.
- Kadener S., Stoleru D., McDonald M., Nawathean P., Rosbash M. (2008a) *Clockwork Orange* is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev.*, **21**, 1675-86.
- Kadener S., Menet J.S., Schoer R., Rosbash M. (2008b) Circadian transcription contributes to core period determination in *Drosophila*. *PLoS Biol.*, **6**, 119.
- Kaneko M., Helfrich-Förster C., Hall J.C. (1997) Spatial and temporal expression of the *period* and *timeless* genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J. Neurosci.*, **17**, 6745-60.

Katayama M., Kondo T., Xiong J., Golden S.S. (2003) *ldpA* encodes an iron-sulfur protein involved in light-dependent modulation of the circadian period in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Bacteriol.*, **185**, 1415-22.

Kaushik R., Nawathean P., Busza A., Murad A., Emery P., Rosbash M. (2007) PER-TIM interactions with the photoreceptor cryptochrome mediate circadian temperature responses in *Drosophila*. *PLoS Biol.*, **5**, e146.

Kawamoto T., Noshiro M., Sato F., Maemura K., Takeda N., Nagai R., Iwata T., Fujimoto K., Furukawa M., Miyazaki K., Honma S., Honma K., Kato Y. (2004) A novel autofeedback loop of *Dec1* transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 117-24.

Kempinger L., Dittmann R., Rieger D., Helfrich-Forster C. (2009) The nocturnal activity of fruit flies exposed to artificial moonlight is partly caused by direct light effects on the activity level that bypass the endogenous clock. *Chronobiol. Int.*, **26**, 151-66.

King D.P., Zhao Y., Sangoram A.M., Wilsbacher L.D., Tanaka M., Antoch M.P., Steeves T.D., Vitaterna M.H., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., Turek F.W., Takahashi J.S. (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, **89**, 641-53.

Klarsfeld A., Malpel S., Michard-Vanhée C., Picot M., Chélot E., Rouyer F. (2004) Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J. Neurosci.*, **24**, 1468-77.

Kloss B., Price J.L., Saez L., Blau J., Rothenfluh A., Wesley C.S., Young M.W. (1998) The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. *Cell*, **94**, 97-107.

Ko H. W., Jiang J., Edery I. (2002) Role for *slimb* in the degradation of *Drosophila* period protein phosphorylated by doubletime. *Nature*, **420**, 673-678.

Koh K., Zheng X., Sehgal A. (2006) JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science*, **312**, 1809-1812.

Konopka R.J., Benzer S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 2112-6.

Konopka R.J., Pittendrigh C., Orr D. (1989) Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. *J. Neurogenet.*, **6**, 1-10.

Kramer G. (1952) Experiments on bird orientation. *Naturwissenschaften*, **94**, 265.

Krishnan B., Dryer S.E., Hardin P.E. (1999) Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **400**, 375-8.

Krishnan B., Levine J.D., Lynch M.K., Dowse H.B., Funes P., Hall J.C., Hardin P.E., Dryer S.E. (2001) A new role for *cryptochrome* in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature*, **411**, 313-7.

- Knutsson A. (2003) Health disorders of shift workers. *Occupational Medicine*, **53**, 103-108.
- Kume K., Kume S., Park S.K., Hirsh J., Jackson F.R. (2005) Dopamine is a regulator of arousal in the fruit fly. *J. Neurosci.*, **25**, 7377-84.
- Kyriacou C.P., Hall J.C. (1980) Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 6729-33.
- Kyriacou C.P., Rosato E. (2000) Squaring up the E-box. *J. Biol. Rhythms*, **15**, 483-90.
- Lagouge M., Argmann C., Gerhart-Hines Z., Meziane H., Lerin C., Daussin F., Messadeq N., Milne J., Lambert P., Elliott P., Geny B., Laakso M., Puigserver P., Auwerx J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, **127**, 1109-22.
- Landskron J., Chen K.F., Wolf E., Stanewsky R. (2009) A role for the PERIOD:PERIOD Homodimer in the *Drosophila* circadian clock. *PLOS Biology*, **7**, 820-835.
- Lear B.C., Merrill C.E., Lin J.M., Schroeder A., Zhang L., Allada R. (2005) A G protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron*, **48**, 221-227.
- Lee C., Etchegaray J.P., Cagampang F.R., Loudon A.S., Reppert S.M. (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, **107**, 855-67.
- Levine J.D., Casey C.I., Kalderon D.D., Jackson F.R. (1994) Altered circadian pacemaker functions and cyclic AMP rhythms in the *Drosophila* learning mutant *dunce*. *Neuron*, **13**, 967-74.
- Levine J.D. (2004) Sharing time on the fly. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **16**, 210-216.
- Lin F.J., Song W., Meyer-Bernstein E., Naidoo N., Sehgal A. (2001) Photic signaling by cryptochrome in the *Drosophila* circadian system. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 7287-94.
- Lin J.M., Kilman V.L., Keegan K., Paddock B., Emery-Le M., Rosbash M., Allada R. (2002) A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, **420**, 816-820.
- Lin J.M., Schroeder A., Allada R. (2005) In vivo circadian function of casein kinase 2 phosphorylation sites in *Drosophila* PERIOD. *J. Neurosci.*, **25**, 11175-11183.
- Liu Y., Tsinoremas N.F., Johnson C.H., Lebedeva N.V., Golden S.S., Ishiura M., Kondo T. (1995) Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.*, **9**, 1469-78.

- Liu Y., Garceau N.Y., Loros J.J., Dunlap J.C. (1997). Thermally regulated translation control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the *Neurospora* circadian clock. *Cell*, **89**, 477-486.
- Low K. H., Lim C., Ko H. W., Edery I. (2008) Natural variation in the splice site strength of a clock gene and species-specific thermal adaptation. *Neuron*, **60**, 1054-67.
- Majercak J., Kalderon D., Edery I. (1997) *Drosophila melanogaster* deficient in protein kinase A manifests behavior-specific arrhythmia but normal clock function. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5915-22.
- Majercak J., Sidote D., Hardin P.E., Edery I. (1999) How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. *Neuron*, **24**, 219-30.
- Majercak J., Chen W.F., Edery I. (2004) Splicing of the *period* gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3359-72.
- Martinek S., Inonog S., Manoukian A.S., Young M.W. (2001) A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, **105**, 769-79.
- Matsumoto A., Matsumoto N., Harui Y., Sakamoto M., Tomioka K. (1998) Light and temperature cooperate to regulate the circadian locomotor rhythm of wild type and *period* mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*, **44**, 587-596.
- McNeil G.P., Zhang X., Genova G., Jackson F.R. (1998) A molecular rhythm mediating circadian clock output in *Drosophila*. *Neuron*, **20**, 297-303.
- Mertens I., Vandingenen A., Johnson E.C., Shafer O.T., Li W., Trigg J.S., De Loof A., Schoofs L., Taghert P.H. (2005) PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron*, **48**, 213-219.
- Meyer P., Saez L., Young M.W. (2006) PER-TIM interactions in living *Drosophila* cells: an interval timer for the circadian clock. *Science*, **311**, 226-9.
- Mitsui A., Kumazawa S., Takahashi A., Ikemoto H., Arai T. (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature*, **323**, 720-722.
- Miyasako Y., Umezaki Y., Tomioka K. (2007) Separate sets of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *J. Biol. Rhythms*, **22**, 115-126.
- Mori T., Johnson C.H. (2000) Circadian control of cell division in unicellular organisms. *Prog. Cell. Cycle Res.*, **4**, 185-192.
- Münch M.Y., Cain S.W., Duffy J.F. (2007) Biological Rhythms Workshop IC: sleep and rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **72**, 35-46.
- Murad A., Emery-Le M., Emery P. (2007) A subset of dorsal neurons modulates circadian behavior and light responses in *Drosophila*. *Neuron*, **53**, 689-701.

- Myers M.P., Wager-Smith K., Wesley C.S., Young M.W., Sehgal A. (1995) Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science*, **270**, 805-8.
- Naidoo N., Song W., Hunter-Ensor M., Sehgal A. (1999) A role for the proteasome in the light response of the TIMELESS clock protein. *Science*, **285**, 1737-41.
- Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., Sassone-Corsi P. (2008) The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, **134**, 329-40.
- Nakahata Y., Sahar S., Astarita G., Kaluzova M., Sassone-Corsi P. (2009) Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, **324**, 654-7.
- Neikrug A.B., Ancoli-Israel S. (2009) Sleep Disorders in the Older Adult: A Mini-Review. *Gerontology*, Sep 9.
- Newby L.M., Jackson F.R. (1993) A new biological rhythm mutant of *Drosophila melanogaster* that identifies a gene with an essential embryonic function. *Genetics*, **135**, 1077-90.
- Newby L.M., Jackson F.R. (1996) Regulation of a specific circadian clock output pathway by *lark*, a putative RNA-binding protein with repressor activity. *J. Neurobiol.*, **31**, 117-28.
- Njus D., Sulzman F.M., Hastings J.W. (1974) Membrane model for the circadian clock. *Nature*, **248**, 116-120.
- Nitz D.A., Van Swinderen B., Tononi G., Greenspan R.J. (2002) Electrophysiological correlates of rest and activity in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology*, **12**, 1934-1940.
- Norman G.R., Streiner D.L. (1998) *Biostatistics: the bare essential*. B.C. Decker, Inc., Hamilton, Ontario, Canada.
- Ohayon M.M., Lemoine P., Arnaud-Briant V., Dreyfus M. (2002) Prevalence and consequences of sleep disorders in a shift worker population. *Journal of Psychosomatic Research.*, **53**, 577-583.
- Pak W.L., Leung H.T. (2003) Genetic approaches to visual transduction in *Drosophila melanogaster*. *Receptors Channels*, **9**, 149-167.
- Park J.H., Hall J.C. (1998) Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms*, **13**, 219-28.
- Park J.H., Helfrich-Forster C., Lee G., Liu L., Rosbash M., Hall J.C. (2000) Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3608-13.

- Peixoto A.A., Hall J.C. (1998) Analysis of temperature-sensitive mutants reveals new genes involved in the courtship song of *Drosophila*. *Genetics*, **148**, 827-38.
- Peng Y., Stoleru D., Levine J.D., Hall J.C., Rosbash M. (2003) *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS Biol.*, **1**, E13.
- Philip P. (2005) Sleepiness of occupational drivers. *Industrial Health*, **43**, 30-33.
- Picot M., Cusumano P., Klarsfeld A., Ueda R., Rouyer F. (2007) Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS Biol.*, **5**, e315.
- Pittendrigh C.S. (1967) Circadian systems. I. the driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **58**, 1762-7.
- Pittendrigh C.S., Bruce V.G. (1959) Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. 475-505.
- Pittendrigh C.S., Daan S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers oscillations in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons. *J. Comp. Physiol. A.*, **106**, 333.
- Pittendrigh C.S., Takamura T. (1989) Latitudinal clines in the properties of a circadian pacemaker. *J. Biol. Rhythms*, **4**, 217-35.
- Pitman J.L., McGill J.J., Keegan K.P., Allada R. (2006) A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature*, **441**, 753-6.
- Plautz J.D., Kaneko M., Hall J.C., Kay S.A. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, **278**, 1632-5.
- Price J.L., Blau J., Rothenfluh A., Abodeely M., Kloss B., Young M.W. (1998) *Double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, **94**, 83-95.
- Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, **110**, 251-60.
- Puttonen S., Härmä M., Hublin C. (2010) Shift work and cardiovascular disease - pathways from circadian stress to morbidity. *Scand J Work Environ Health*. In press.
- Rafnsson V., Tulinius H., Jonasson J.G., Hrafnekelsson, J. (2001). Risk of breast cancer in female flight attendants: a population-based study (Iceland). *Cancer causes control*, **12**, 95-101.
- Ramsey K.M., Yoshino J., Brace C.S., Abrassart D., Kobayashi Y., Marcheva B., Hong H.K., Chong J.L., Buhr E.D., Lee C., Takahashi J.S., Imai S., Bass J. (2009) Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*, **324**, 651-4.

- Rao K.R., Riehm J.P. (1993) Pigment-dispersing hormones. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **680**, 78-88.
- Rechtschaffen A., Bergmann B.M., Everson C.A., Kushida C.A., Gilliland M.A. (1989) Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep*, **12**, 68-87.
- Reddy P., Zehring W.A., Wheeler D.A., Pirrotta V., Hadfield C., Hall J.C., Rosbash M. (1984) Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell*, **38**, 701-10.
- Renn S.C., Park J.H., Rosbash M., Hall J.C., Taghert P.H. (1999) A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, **99**, 791-802.
- Reppert S.M., Weaver D.R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.*, **63**, 647-76.
- Reppert S.M., Weaver D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935-41.
- Rieger D., Stanewsky R., Helfrich-Forster C. (2003) Cryptochrome, compound eyes, hofbauer-buchner eyelets, and ocelli play different roles in the entrainment and masking pathway of the locomotor activity rhythm in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms*, **18**, 377-91.
- Rieger D., Wülbeck C., Rouyer F., Helfrich-Förster C. (2009) *Period* gene expression in four neurons is sufficient for rhythmic activity of *Drosophila melanogaster* under dim light conditions. *J. Biol. Rhythms*, **24**, 271-82.
- Richter C.P. (1922) A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psychol. Monogr.*, **1**, 1.
- Roennenberg T., Merrow M. (2002) External time-Internal time. *J. Biol. Rhythms*, **17**, 107-109.
- Roennenberg T., Merrow M. (2003) The network of time: understanding the molecular circadian system. *Current Biology*, **13**, 198-207.
- Rosato E., Peixoto A.A., Costa R., Kyriacou C.P. (1997) Linkage disequilibrium, mutational analysis and natural selection in the repetitive region of the clock gene, *period*, in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, **69**, 89-99.
- Rosato E., Mazzotta G., Piccin A., Zordan M., Costa R., Kyriacou C.P. (2001) Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. *Current Biology*, **11**, 909-17.
- Rosato E., Kyriacou C.P. (2006) Analysis of locomotor activity rhythms in *Drosophila*. *Nat. Protoc.*, **1**, 559-568.

- Rothenfluh A., Young M.W., Saez L. (2000) A TIMELESS-independent function for PERIOD proteins in the *Drosophila* clock. *Neuron*, **26**, 505-14.
- Rouyer F., Rachidi M., Pikielny C., Rosbash M. (1997) A new gene encoding a putative transcription factor regulated by the *Drosophila* circadian clock. *EMBO J.*, **16**, 3944-54.
- Rubin G.M., Spradling A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, **218**, 348-53.
- Rutila J.E., So W.V., Rosbash M., Hall J.C. (1998) CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell*, **93**, 805-14.
- Qiu J., Hardin P.E. (1996) Developmental state and the circadian clock interact to influence the timing of eclosion in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms*, **11**, 75-86.
- Sakai T., Ishida N. (2001) Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9221-5.
- Sandrelli F., Tauber E., Pegoraro M., Mazzotta G., Cisotto P., Landskron J., Stanewsky R., Piccin A., Rosato E., Zordan M., Costa R., Kyriacou C.P. (2007) A molecular basis for natural selection at the *timeless* locus in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **316**, 1898-1900.
- Santolini E., Puri C., Salcini A.E., Gagliani M.C., Pelicci P.G., Tacchetti C., Di Fiore P.P. (2000) Numb is an endocytic protein. *J. Cell. Biol.*, **151**, 1345-52.
- Sarov-Blat L., So W.V., Liu L., Rosbash M. (2000) The *Drosophila takeout* gene is a novel molecular link between circadian rhythms and feeding behavior. *Cell*, **101**, 647-656.
- Sathyanarayanan S., Zheng X., Kumar S., Chen C.H., Chen D., Hay B., Sehgal A. (2008) Identification of novel genes involved in light-dependent CRY degradation through a genome-wide RNAi screen. *Genes Dev.*, **22**, 1522-1533.
- Sato T.K., Panda S., Miraglia L.J., Reyes T.M., Rudic R.D., McNamara P., Naik K.A., FitzGerald G.A., Kay S.A., Hogenesch J.B. (2004) A functional genomics strategy reveals *Rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, **43**, 527-37.
- Saunders D.S., Henrich V.C., Gilbert L.I. (1989) Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 3748-52.
- Sawyer L.A., Hennessy J.M., Peixoto A.A., Rosato E., Parkinson H., Costa R., Kyriacou C.P. (1997) Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Science*, **278**, 2117-20.
- Sawyer L.A., Sandrelli F., Pasetto C., Peixoto A.A., Rosato E., Costa R., Kyriacou C. P. (2006) The *period* gene Thr-Gly polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* populations: implications for selection. *Genetics*, **174**, 465-80.

- Sayeed O., Benzer S. (1996) Behavioral genetics of thermosensation and hygrosensation in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, **93**, 6079-84.
- Schmitz O., Katayama M., Williams S.B., Kondo T., Golden S.S. (2000) *CikA*, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. Science, **289**, 765-8.
- Schneider I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. J. Embryol. Exp. Morphol., **27**, 353-65.
- Schwartz J.R., Roth T. (2006) Shift work sleep disorder: burden of illness and approaches to management. Drugs, **66**, 2357-2370.
- Scully A.L., Zelhof A.C., Kay S.A. (2002) A P element with a novel fusion of reporters identifies *regular*, a C2H2 zinc-finger gene downstream of the circadian clock. Mol. Cell. Neurosci., **19**, 501-14.
- Sehgal A., Price J.L., Man B., Young M.W. (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and *per* RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. Science, **263**, 1603-6.
- Shafer O.T., Helfrich-Forster C., Renn S.C., Taghert P.H. (2006) Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. J. Comp. Neurol., **498**, 180-93.
- Shaw P.J., Cirelli C., Greenspan R.J., Tononi G. (2000) Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. Science, **287**, 1834-1837.
- Shaw P.J., Tononi G., Greenspan R.J., Robinson D.F. (2002) Stress response genes protect against lethal effects of sleep deprivation in *Drosophila*. Nature, **417**, 287-292.
- Sheeba V., Chandrashekar M.K., Joshi A., Sharma V.K. (2001) Persistence of oviposition rhythm in individuals of *Drosophila melanogaster* reared in an aperiodic environment for several hundred generations. J. Exp. Zool., **15**, 541-9.
- Shields M. (2002) Shift work and health. Health report, **13**, 11-33.
- Shirasu N., Shimohigashi Y., Tominaga Y., Shimohigashi M. (2003) Molecular cogs of the insect circadian clock. Zoolog. Sci., **20**, 947-55.
- Shilo B.Z. (2005) Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. Development, **132**, 4017-27.
- Siegel J.M. (1995) Phylogeny and the function of sleep. Behavioural Brain Research, **69**, 29-34.
- Siegel J.M. (2008) Do all animals sleep? Trends Neurosci., **31**, 208-13.
- Sidote D., Majercak J., Parikh V., Edery I. (1998) Differential effects of light and heat on the *Drosophila* circadian clock proteins PER and TIM. Mol. Cell. Biol., **18**, 2004-2013.

Simposon S., Gaibraith J.J. (1906) Observations on the normal temperature of the monkey and its diurnal variation, and on the effect of changes in the daily routine of this variation. *Trans. R. Soc. Edinb.*, **45**, 115.

Smith R.M., Williams S.B. (2006) Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium *Synechococcus elongates*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8564-8569.

So W.V., Sarov-Blat L., Kotarski C.K., McDonald M.J., Allada R., Rosbash M. (2000) *takeout*, a novel *Drosophila* gene under circadian clock transcriptional regulation. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6935-44.

So W.V., Rosbash M. (1997) Post-transcriptional regulation contributes to *Drosophila* clock gene mRNA cycling. *EMBO J.*, **16**, 7146-55.

Sofola O., Sundram V., Ng F., Kleyner Y., Morales J., Botas J., Jackson F.R., Nelson D.L. (2008) The *Drosophila* FMRP and LARK RNA-binding proteins function together to regulate eye development and circadian behavior. *J. Neurosci.*, **28**, 10200-5.

Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager-Smith K., Kay S.A., Rosbash M., Hall J.C. (1998) The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, **95**, 681-92.

Stanewsky R., Lynch K.S., Brandes C., Hall J.C. (2002) Mapping of elements involved in regulating normal temporal *period* and *timeless* RNA expression patterns in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Rhythms*, **17**, 293-306.

Stanewsky R. (2003) Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *Wiley Inter. Sci.*, **10164**, 111-147.

Stempfl T., Vogel M., Szabo G., Wülbeck C., Liu J., Hall J.C., Stanewsky R. (2002) Identification of circadian-clock-regulated enhancers and genes of *Drosophila melanogaster* by transposon mobilization and luciferase reporting of cyclical gene expression. *Genetics*, **160**, 571-93.

Stoleru D., Peng Y., Agosto J., Rosbash M. (2004) Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, **431**, 862-868.

Stoleru D., Nawathean P., Fernandez M.P., Menet J.S., Ceriani M.F., Rosbash M. (2007) The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell*, **129**, 207-219.

Suh J., Jackson F.R. (2007) *Drosophila ebony* activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron*, **55**, 435-447.

Sweeney B.M., Hastings J.W. (1957) Characteristics of the diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **49**, 115.

Sweeney B.M. (1974) A physiological model for circadian rhythms from the *Acetabularia* rhythm paradoxes. *Int. J. Chronobiol.*, **2**, 25-33.

- Takahata S., Sogawa K., Kobayashi A., Ema M., Mimura J., Ozaki N., Fujii-Kuriyama Y. (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 789-94.
- Takai N., Nakajima M., Oyama T., Kito R., Sugita C., Sugita M., Kondo T., Iwasaki H. (2006) A KaiC-associating SasA-RpaA two-component regulatory system as a major circadian timing mediator in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12109-14.
- Takayama H., Matsumoto S., Murata K., Ebara T., Kubo T., Tachi N., Itani T. (2004) Effects of the length and timing of nighttime naps on task performance and physiological function. *Revista de saude publica*, **38**, 32-37.
- Tanoue S., Krishnan P., Krishnan B., Dryer S.E., Hardin P.E. (2004) Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Current Biology*, **14**, 638-649.
- Tauber E., Zordan M., Sandrelli F., Pegoraro M., Osterwalder N., Breda C., Daga A., Selmin A., Monger K., Benna C., Rosato E., Kyriacou C.P., Costa R. (2007) Natural selection favors a newly derived *timeless* allele in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **316**, 1895-1898.
- The I., Hannigan G.E., Cowley G.S., Reginald S., Zhong Y., Gusella J.F., Hariharan I.K., Bernards A. (1997) Rescue of a *Drosophila* NF1 mutant phenotype by protein kinase A. *Science*, **276**, 791-4.
- Thompson C.L., Sancar A. (2002) Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*, **21**, 9043-56.
- Tobler I. (1995) Is sleep fundamentally different between mammalian species? *Behavioural Brain Research*, **69**, 35-41.
- Todo T. (1999) Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat. Res.*, **434**, 89-97.
- Toh K.L., Jones C.R., He Y., Eide E.J., Hinz W.A., Virshup D.M., Ptáček L.J., Fu Y.H. (2001) An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, **291**, 1040-3.
- Tully T. (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell*, **79**, 35-47.
- Van Amelsvoort L., Jansen N.W.H., Swaen G. MH., van den Brandt K.I. (2004) Direction of shift rotation among three-shift workers in relation to psychological health and work-family conflict. *Scan. Journal Work Environ Health*, **30**, 149-156.
- Vanselow K., Vanselow J.T., Westermarck P.O., Reischl S., Maier B., Korte T., Herrmann A., Herzog H., Schlotter A., Kramer A. (2006) Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev*, **20**, 2660-72.

- Vosshall L.B., Price J.L., Sehgal A., Saez L., Young M.W. (1994) Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, *timeless*. *Science*, **263**, 1606-9.
- Wheeler D.A., Hamblen-Coyle M.J., Dushay M.S., Hall J.C. (1993) Behavior in light-dark cycles of *Drosophila* mutants that are arrhythmic, blind, or both. *J. Biol. Rhythms*, **8**, 67-94.
- Weber F. (2008) Remodeling the clock: coactivators and signal transduction in the circadian clockworks. *Naturwissenschaften review*.
- Williams J.A, Su H.S., Bernards A., Field J., Sehgal A. (2001a) A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science*, **293**, 2251-6.
- Williams J.A., Sehgal A. (2001b). Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. *Annual Review of Physiology*, **63**, 729-755.
- Winfree A.T. (1967) Biological rhythms and the behaviour of populations of coupled oscillators. *Theor. Biol.*, **16**, 15-42.
- Xu Y., Mori T., Johnson C.H. (2000) Circadian clock-protein expression in cyanobacteria: rhythms and phase setting. *EMBO J.*, **19**, 3349-3357.
- Xu Y., Mori T., Johnson C.H. (2003) Cyanobacterial circadian clockwork: roles of KaiA, KaiB and the kaiBC promoter in regulating KaiC. *EMBO J.*, **22**, 2117-26.
- Xu Y., Padiath Q.S., Shapiro R.E., Jones C.R., Wu S.C., Saigoh N., Saigoh K., Ptáček L.J., Fu Y.H. (2005) Functional consequences of a *CKIdelta* mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, **434**, 640-4.
- Yang Z., Sehgal A. (2001) Role of molecular oscillations in generating behavioral rhythms in *Drosophila*. *Neuron*, **29**, 453-67.
- Yasuyama K., Meinertzhagen I.A. (1999) Extraretinal photoreceptors at the compound eye's posterior margin in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.*, **412**, 193-202.
- Yoshii T., Sakamoto M., Tomioka K. (2002) A temperature-dependent timing mechanism is involved in the circadian system that drives locomotor rhythms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoolog. Sci.*, **19**, 841-50.
- Yoshii T., Heshiki Y., Ibuki-Ishibashi T., Matsumoto A., Tanimura T., Tomioka K. (2005) Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 1176-84.
- Yoshii T., Fujii K., Tomioka K. (2007) Induction of *Drosophila* behavioral and molecular circadian rhythms by temperature steps in constant light. *J. Biol. Rhythms*, **22**, 103-14.

Yoshii T., Wülbeck C., Sehadova H., Veleri S., Bichler D., Stanewsky R., Helfrich-Förster C. (2009) The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila's* clock. *J. Neurosci.*, **29**, 2597-610.

Young MW. (1998) The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 135-52.

Yu Q., Jacquier A.C., Citri Y., Hamblen M., Hall J.C., Rosbash M. (1987) Molecular mapping of point mutations in the *period* gene that stop or speed up biological clocks in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 784-788.

Zachar Z., Bingham P.M. (1982) Regulation of *white* locus expression: The structure of mutant alleles at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Cell*, **30**, 529-541.

Zars T. (2001) Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 790-5.

Zeng H., Hardin P.E., Rosbash M. (1994) Constitutive overexpression of the *Drosophila* PERIOD protein inhibits *period* mRNA cycling. *EMBO J.*, **13**, 3590-8.

Zerr D. M., Hall J.C., Rosbash M., Siwicki K.K. (1990) Circadian fluctuations of PERIOD protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *J. Neurosci.*, **10**, 2749-62.

Zheng X., Koh K., Sowcik M., Smith C.J., Chen D., Wu M.N., Sehgal A. (2009) An isoform-specific mutant reveals a role of PDP1 epsilon in the circadian oscillator. *J. Neurosci.*, **29**, 10920-7.

Zwahlen C., Li S.C., Kay L.E., Pawson T., Forman-Kay J.D. (2000) Multiple modes of peptide recognition by the PTB domain of the cell fate determinant *Numb*. *EMBO J.*, **19**, 1505-15.

INDICE

Capitolo 1	1
Introduzione	3
1.1 Gli orologi endogeni circadiani	3
1.2 Tempo “Zeitgeber” e Tempo “Circadiano”	6
1.3 Fenotipi ritmici in <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.4 L’orologio molecolare in <i>Drosophila melanogaster</i>	8
1.5 I geni <i>period</i> e <i>timeless</i> in <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.5.1 <i>period</i>	12
1.5.2 <i>timeless</i>	14
1.6 Le vie di input (luce)	16
1.7 Le vie di input (temperatura)	18
1.8 Le vie di output	20
1.9 Orologi molecolari in altri organismi	24
1.9.1 I mammiferi	24
1.9.2 <i>Synechococcus elongatus</i>	25
1.10 Organizzazione anatomica dei neuroni orologio nel cervello di <i>Drosophila melanogaster</i>	27
1.11 Orologi periferici in <i>Drosophila melanogaster</i>	29
1.12 Varianti alleliche di geni orologio	30
Il progetto di ricerca	32
Capitolo 2	
Attività locomotoria in condizioni naturali	35
2.1 Introduzione	37
2.2 Materiali e metodi	38
2.2.1 Linee di <i>Drosophila melanogaster</i>	38
2.2.2 Mantenimento delle linee di <i>Drosophila</i>	40
2.2.3 Registrazione dell’attività locomotoria	40
2.2.4 Registrazione dei parametri ambientali	41
2.2.5 Analisi dei dati	41
2.2.6 Analisi statistiche	42
2.3 Risultati	43
2.3.1 In condizioni naturali l’attività locomotoria presenta “morning” ed “evening peak” a temperature medio-alte mentre é unimodale a basse temperature	43
2.3.2 Attività locomotoria di mosche wild-type e mutanti in condizioni naturali	43
2.3.3 Il picco pomeridiano (“Afternoon peak”)	45
2.3.4 Effetto della luce lunare sull’attività locomotoria notturna della linea WTALA in condizioni di laboratorio e in condizioni naturali	47

2.3.5 Effetto della socialità sull'attività locomotoria notturna in condizioni naturali e di laboratorio	49
2.4 Discussione	53
Capitolo 3	55
Analisi dell'attività locomotoria mattutina e serale in condizioni naturali	57
3.1 Introduzione	57
3.2 Materiali e metodi	58
3.2.1 Morning onset, peak e offset	58
3.2.2 Parametri Ambientali	60
3.2.3 Evening onset, peak e offset	60
3.2.4 Analisi statistiche	61
3.3 Risultati	61
3.3.1 Profilo stagionale del "morning onset" nell'attività locomotoria mattutina della linea WTALA	61
3.3.2 L'inizio dell'attività locomotoria mattutina (M-onset) è fortemente sensibile alla temperatura nelle linee wild-type e mutanti	62
3.3.3 Confronto tra le curve di regressione lineare ottenute per le linee wild-type e mutanti	66
3.3.4 Attività locomotoria mattutina in condizioni di buio "artificiale"	68
3.3.5 Profilo stagionale dell'onset dell'"evening peak" in condizioni naturali nella linea WTALA	72
3.3.6 L'attività locomotoria serale è correlata alla temperatura media diurna sia nelle linee wild-type che nei mutanti	73
3.3.7 Inizio dell'attività serale: confronto tra le curve di regressione delle linee wild-type e mutanti	77
3.4 Discussione	78
Capitolo 4	83
Analisi trascrizionale dei geni <i>period</i> e <i>timeless</i> in condizioni naturali	85
4.1 Introduzione	85
4.2 Materiali e metodi	87
4.2.1 Campionamenti in laboratorio	87
4.2.2 Campionamenti in condizioni naturali	87
4.2.3 RT-PCR	88
4.2.4 Analisi statistiche	91
4.3 Risultati	91
4.3.1 Profili di espressione dell'mRNA dei geni <i>period</i> e <i>timeless</i> in condizioni di laboratorio (LD12:12) a 23, 18 e 10°C	91
4.3.2 Profili di espressione dell'mRNA dei geni <i>period</i> e <i>timeless</i> in condizioni naturali	94
4.4 Discussione	99
Capitolo 5	101
Discussione	103
5.1 Caratteristiche del comportamento della linea wild-type WTALA in condizioni naturali	103
5.2 Influenza della luce e della temperatura sull'attività locomotoria mattutina e serale di linee wild-type e mutanti	104

5.3 Comportamento in condizioni naturali dei “mutanti orologio”	105
5.4 L’espressione dei geni <i>period</i> e <i>timeless</i> in condizioni naturali	106
Capitolo 6	109
L’orologio endogeno circadiano di <i>Drosophila melanogaster</i> in regimi artificiali perturbati	111
6.1 Introduzione	111
6.1.1 I ritmi sonno/veglia	111
6.1.2 <i>Drosophila</i> come modello per lo studio del sonno	112
6.1.3 Studio degli effetti del “lavoro” in regimi di shift-work cronico in <i>Drosophila melanogaster</i>	114
6.2 Materiali e metodi	115
6.2.1 Shift-work machine	115
6.2.2 Regimi di “lavoro”	116
6.2.3 Analisi della sopravvivenza	118
6.2.4 Test ottico-motorio	118
6.3 Risultati	119
6.3.1 Analisi dell’attività locomotoria	119
6.3.2 Analisi della sopravvivenza	121
6.3.3 Test ottico-motorio	123
6.4 Discussione	126
Appendice 1	129
Appendice 2	135
Appendice 3	137
Bibliografia	139

Ringraziamenti

Rodolfo, Federica, Gabriella, Clara, Stefano V., Pamela, Damiano,
Bambos, Supriya, Mirko, Alessia, Moyra, Francesca, Luca, Paola,
Paola, Elena C.