

Stress da radiazione RF a 900 MHz ed attivazione di elementi trasponibili in tessuti germinali di *Drosophila melanogaster*

V. Specchia¹, A. Friscini¹, D. Dell'Isola¹, D. Delle Side², L. Velardi², V. Nassisi², S. Pimpinelli³ and M.P. Bozzetti¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Laboratorio di Genetica - Università del Salento, Via Provinciale Lecce-Monteroni, C.P. 193, 73100 Lecce, Italy

²Dipartimento di Matematica e Fisica, Laboratorio di Elettronica Applicata e Strumentazione, LEAS Università del Salento, Via provinciale Lecce-Arnesano, C.P. 193, 73100 Lecce, Italy

³Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "Charles Darwin"-Sapienza Università di Roma, Piazzale Aldo Moro, 00185 Roma, Italy
e-mail: maria.bozzetti@unisalento.it

Abstract

Nel mondo naturale gli individui, le popolazioni e le specie si devono confrontare con variazioni delle condizioni ambientali. Gli organismi e le loro cellule mettono in atto un adattamento fisiologico attraverso risposte che sono immediate e reversibili. Condizioni di stress però, possono causare modificazioni a livello genomico che possono alterare processi biologici fondamentali conducendo a trasformazioni cellulari. È noto da tempo che fattori ambientali provocano condizioni di stress che possono indurre in vari organismi l'attivazione di elementi genetici mobili o elementi trasponibili (TEs) il cui movimento è tra le cause di instabilità genomica. In questo lavoro, individui di *Drosophila melanogaster* sono stati sottoposti a stress da radiazione RF a 900 MHz ed esaminati per l'attivazione di TEs nei tessuti germinali di entrambi i sessi. Tale stress ha causato un significativo incremento dell'attivazione di tali elementi, confermando che diversi stress ambientali possono avere come conseguenza l'instabilità dei genomi e la comparsa di mutazioni *de novo* dovute all'inserzione di elementi trasponibili in geni codificanti.

Introduzione

Le condizioni di "instabilità" genomica derivano dalla presenza di mutazioni e riarrangiamenti cromosomici; l'instabilità genomica è generalmente associata con patologie umane, ma è anche cruciale per l'evoluzione.

Le cause dell'instabilità genomica sono molteplici e comprendono errori durante la replicazione del DNA, difetti di controllo del ciclo cellulare, mutazioni di geni preposti a prevenire l'integrità genomica quali i geni soppressori di tumore e gli oncogeni [1]. Tra le cause di danni al DNA e di

instabilità genomica vi sono sequenze di DNA ripetute e potenzialmente invasive, note come elementi trasponibili (TEs) [2-4]. I TEs che comprendono due principali classi (i retrotrasposoni e i trasposoni a DNA) sono componenti ubiquitari dei genomi eucariotici. La loro presenza può influenzare l'espressione di geni localizzati nelle regioni adiacenti [5] oltre che provocare rotture cromosomiche [6]. Gli organismi hanno evoluto meccanismi preposti al silenziamento dei TEs. Studi condotti nell'ultimo decennio, in particolare in *Drosophila*, hanno iniziato a chiarire i meccanismi molecolari alla

base del silenziamento dei trasposoni e di altre sequenze ripetute. Elementi chiave di questa regolazione sono piccole molecole di RNA e proteine di una famiglia conservata detta Argonauta [7]. Nelle gonadi opera uno specifico pathway di regolazione dei TE noto come piRNA pathway. In esso intervengono le proteine della sottofamiglia Piwi della famiglia Argonauta e i piwi-interacting RNA o piRNA, entrambi questi componenti sono presenti esclusivamente o prevalentemente nelle gonadi di entrambi i sessi. Un ruolo chiave è svolto da Aubergine, una di queste "Piwi-proteins" [8, 9]; altri componenti importanti sono la proteina heat shock HSP90 [10] e il cochaperone di HSP90, Shutdown [11].

E' stato osservato da tempo che gli stress ambientali inducono l'attività degli elementi trasponibili in vari organismi e questo rappresenta un legame fondamentale tra i fattori ambientali e le variazioni dei genomi [4, 12]. È già noto l'effetto dello stress di temperatura (heat shock) che determina movimento di elementi trasponibili [13]. Abbiamo voluto verificare se un diverso tipo di stress, come le onde elettromagnetiche (EM) nel range della radiofrequenza (RF), potesse determinare effetti simili sugli elementi trasponibili e, in generale, sulle sequenze ripetute.

Recentemente l'uso delle RF ha dimostrato una risposta sugli organismi viventi modificando la velocità di mutazione [14, 15] e causando una mancata regolazione delle sequenze ripetute *Stellate* in *Drosophila* [16]. Le sequenze ripetute *Stellate* sono peculiari del genoma di *Drosophila* e il loro mancato silenziamento determina, nei tessuti germinali maschili, la produzione di una proteina specifica, la proteina *Stellate*, che forma aggregati cristallini negli spermatozoi [17]. Le sequenze *Stellate* sono regolate, al pari degli elementi trasponibili, dal piRNA pathway [8]. La ricerca di cristalli di *Stellate* negli spermatozoi è quindi uno strumento utile per identificare condizioni (genetiche o ambientali) che alterano il pathway di silenziamento degli elementi trasponibili e che possono quindi determinare instabilità genomica.

Apparato sperimentale

E' stata utilizzata la radiazione elettromagnetica nel range delle radiofrequenze, essendo allo stato

attuale quella più diffusa per l'uso della telefonia mobile. Allo scopo è stata costruita una linea di trasmissione per permettere di controllare il campo interagente con i nostri campioni. Il generatore RF è un RHODE & SCHWARZ SM300. La sua frequenza massima è di 3 GHz e la potenza di uscita 20 mW. L'impedenza caratteristica, e quindi la resistenza d'uscita, è di 50 Ω. Al fine di limitare gli effetti di disadattamento e controllare il campo, la linea è stata realizzata con due conduttori piani di lunghezza $l=15\text{ cm}$ e larghezza $a=10\text{ cm}$, separati da 4 supporti in PVC di spessore $h=2\text{ cm}$, Fig. 1.

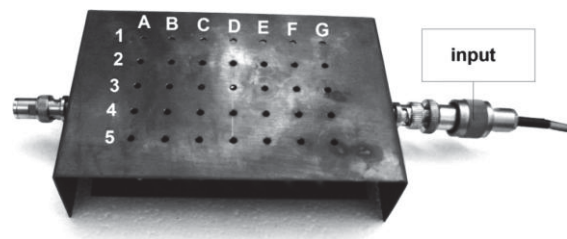


Fig. 1. Foto della linea di trasmissione.

Teoricamente la lunghezza della linea non influenza l'impedenza caratteristica essendo espressa dalla seguente formula:

$$R_0 = \sqrt{\frac{L}{C}} = \sqrt{\frac{\mu_0}{\epsilon_0} \frac{h}{l}} \quad (1)$$

dove si è escluso l'irraggiamento esterno e indicato con ϵ_0 e μ_0 rispettivamente la permittività elettrica e la permeabilità magnetica. Chiudendo la linea su un carico di 50 Ω il campo al suo interno è risultato misto, cioè composto da un'onda progressiva ed un'onda stazionaria, come si può vedere dalla Fig. 1[13], a causa dell'irraggiamento esterno.

Per meglio comprendere il funzionamento riportiamo in Fig. 2 uno schema del set up sperimentale.

In Fig. 3 è riportata la mappatura del campo misurando in ogni foro della linea di trasmissione con una sonda elettrica.

La mappatura riporta un campo intenso di 170 V/m sul lato *out* della linea ed un campo di 100 V/m sul lato *input*.

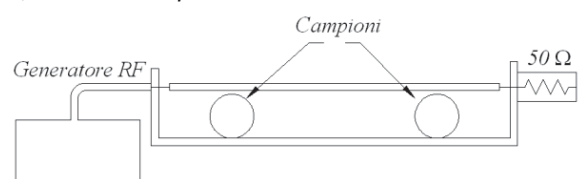


Fig. 2. Schema del set up sperimentale.

Distribuzione del campo elettrico nella cella TEM

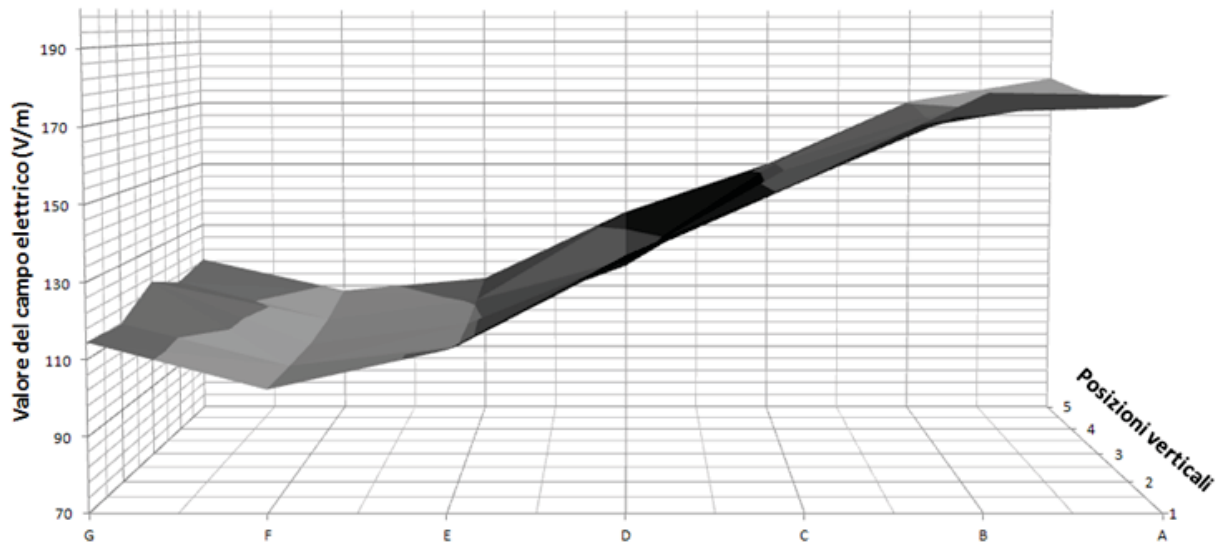


Fig. 3. Mappa indicante la distribuzione del campo elettrico all'interno della linea a 900 MHz.

Materiali e Metodi

Materiali: Individui provenienti da un ceppo selvatico *OregonR*, 50 femmine e 100 maschi, tutti giovani di due-tre giorni) sono stati introdotti in barattoli contenenti il mezzo di coltura in cui normalmente si sviluppano, costituito da: farina di mais, agar, zucchero e lievito.

Metodi, Condizioni di stress: Due barattoli contenenti le mosche sono stati sottoposti all'azione costante della RF a 900 MHz ad una intensità di 170 e 100 V/m per 5 giorni consecutivi nella linea di trasmissione alla temperatura di 20 °C e umidità costante. Altri due barattoli sono stati tenuti alle stesse condizioni di temperatura ed umidità senza l'azione della RF, per essere usati come controllo.

Estrazione di RNA totale da gonadi di *Drosophila* e sintesi della prima strand di cDNA: I testicoli e gli ovari sono stati dissezionati in soluzione Ringer (NaCl 47 mM, KCl 183 mM, Tris-HCl 10 mM pH 6,8). Per l'estrazione sono stati utilizzati 30 mg di tessuto (che corrispondono a circa 70 coppie di testicoli e circa 40 coppie di ovari) di individui sia stressati che di controllo.

Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il Kit RNAqueous-4PCR della ditta Ambion. Dopo trattamento dell'RNA con DNaseI, la sintesi della prima strand di cDNA è stata effettuata utilizzando il Kit SuperScript first-strand synthesis system (Invitrogen).

Real Time PCR: La Real Time PCR è una *Polinucleotide Chain Reaction* (PCR) in cui l'amplificazione e il rilevamento dell'amplificato avvengono nello stesso momento, stabilisce quindi la quantità relativa di uno specifico RNA trascritto, è anche chiamata "RT-PCR quantitativa o *qRT-PCR*". Lo strumento utilizzato per effettuare gli esperimenti di Real Time PCR è stato lo Smart Cycler della Cepheid. La Master Mix utilizzata è Fluo Cycle, SYBR Green (2X) della Celbio costituita da Tris-HCl (pH 8.3) 20 mM, mix dNTPs 20 mM, 0.02% Tween-20, KCl 100 mM, MgCl 8 mM, SYBR Green.

La reazione è stata allestita nel modo seguente in un volume totale di 25 µl: Master Mix 1X, Primer Forward 10 pmoli, Primer Reverse 100 pmoli, cDNA 1 µl. Il protocollo eseguito ha previsto 10' a 95°C e 45 cicli di cui ciascuno prevede: 30'' a 95°C, 30'' alla temperatura di annealing ottimale per la coppia di primers utilizzata, 30'' a 72°C. Per

l'analisi dei dati è stato utilizzato il metodo del $2\Delta\Delta Ct$ [18]. Per ciascun trasposone analizzato è stata utilizzata una coppia di oligonucleotidi scelta con caratteristiche specifiche per l'esecuzione di protocolli di Real Time PCR.

Risultati

Trascorsi 5 giorni dall'applicazione della frequenza costante a 900 MHz, i moscerini sono stati sottoposti a dissezione per ottenere i testicoli e gli ovari da cui è stato estratto l'RNA totale. Successivamente è stato sintetizzato il cDNA e i campioni sono stati utilizzati per reazioni di qRT-PCR. Sono stati utilizzati per tali reazioni primers specifici per alcuni elementi trasponibili e primers specifici per un gene ad espressione costitutiva, *rp49*, che rappresenta il controllo interno di quantità di RNA. In particolare sono stati esaminati tre retrotrasposoni normalmente silenziati nelle cellule germinali: *R1*, *roo* e *springer*. Sono state effettuate tre reazioni di amplificazione per ciascun cDNA preparato e sono stati calcolati i valori medi di C_T (primo ciclo di amplificazione a cui si rileva una fluorescenza non dovuta al fondo) e le deviazioni standard. Successivamente è stato calcolato il numero di volte di incremento (fold change) del trascritto di ciascun elemento trasponibile esaminato secondo i metodi riportati in [9,18]. I valori ottenuti per i trasposoni che hanno mostrato attivazione sono riportati nelle Tab. 1 e 2 e sono stati utilizzati per la costruzione dei grafici riportati rispettivamente in Fig. 4 e 5.

Trasposone	Fold change in ovari stressati vs. controllo	Coefficiente di variazione
<i>R1</i>	2,0	0,01
<i>roo</i>	2,2	0,03
<i>springer</i>	2,1	0,10

Tabella 1: Valori di numero di volte di incremento del trascritto di elementi trasponibili in ovari di individui sottoposti a stress rispetto ad individui di controllo.

Trasposone	Fold change in testicoli stressati vs controllo	Coefficiente di variazione
<i>l</i>	3,30	0,03
<i>roo</i>	2,53	0,05
<i>springer</i>	2,63	0,01

Tabella 2: Valori di numero di volte di incremento del trascritto di elementi trasponibili in ovari di individui sottoposti a stress rispetto ad individui di controllo.

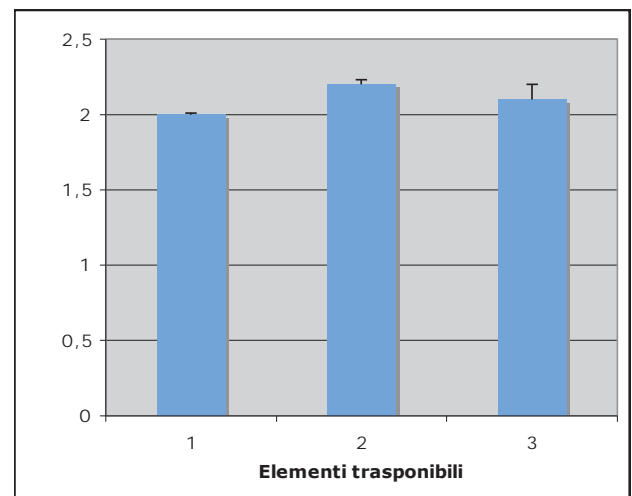


Fig. 4: Grafico relativo al numero di volte di incremento del trascritto di elementi trasponibili in ovari di individui sottoposti a stress rispetto ad individui di controllo. 1= *R1*; 2= *roo*; 3=*springer*.

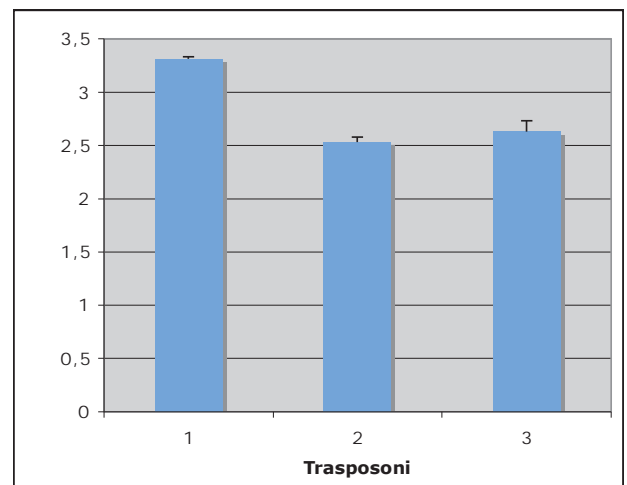


Figura 5: Grafico relativo al numero di volte di incremento del trascritto di elementi trasponibili in testicoli di individui sottoposti a stress rispetto ad individui di controllo. 1= *l*; 2= *roo*; 3=*springer*.

Conclusioni

Lo studio ha dimostrato che le RF a 900MHz, a cui i moscerini sono stati sottoposti, sono in grado di alterare la regolazione del silenziamento delle sequenze ripetute corrispondenti ad elementi trasponibili. Infatti, è stato riscontrato un incremento significativo della quantità di trascritto di vari retrotrasposoni nelle gonadi maschili e femminili di individui sottoposti a RF a 900 MHz rispetto al controllo. L'aumento del trascritto di vari elementi trasponibili è sintomo di un loro possibile movimento e quindi misura la capacità di alterare la funzionalità genica che potrebbe causare mutazioni. Questa indagine potrà essere estesa valutando la frequenza di alterazioni morfologiche nella progenie di individui sottoposti all'azione delle RF 900 MHz che potrebbe derivare dall'insorgenza di mutazioni *de novo* causate dal movimento degli elementi trasponibili.

Acknowledgments

Il lavoro qui presentato è stato parzialmente supportato attraverso il PON 254/Ric. (Cod. PONA3_00334).

References

- [1] A. Aguilera and B. Gómez-González Nat Rev Genet. **9** (3): 204-217 (2008).
- [2] B. McClintock Science **226**: 792–801 (1984).
- [3] S. Pimpinelli, M. Berloco, L. Fanti, P. Dimitri, S. Bonaccorsi, E. Marchetti, R. Caizzi, C. Caggese and M. Gatti PNAS **92**: 3804-3808 (1995)
- [4] E.S. Lander Nature **470**, 167-197 (2011).
- [5] J. Häslér , T. Samuelsson and K. Strub Cell Mol Life Sci. **64**(14): 1793-1800 (2007)
- [6] S.L. Gasior, T.P. Wakeman, B. Xu and P.L. Deininger J Mol Biol. **357**(5):1383-1393 (2006)
- [7] Ghildiyal, M. and Zamore, P.D. Nature Reviews Genetics **10**: 94-108 (2009)
- [8] V.V. Vagin, A. Sigova, C. Li , H. Seitz, V. Gvozdev and P.D. Zamore Science. **313**(5785): 320-324 (2006).
- [9] V. Specchia, C. Benna, G.M. Mazzotta A. Piccin, M.A. Zordan , R. Costa and M. P. Bozzetti Genetics. **178**(3):1271-1282 (2008).
- [10] V. Specchia, L Piacentini, P. Tritto, L. Fanti, R. Dalessandro, G. Palumbo, Pimpinelli S. and M.P. Bozzetti Nature **463**: 662-665 (2010)
- [11] D. Olivieri , K.A. Senti, S. Subramanian , R. Sachidanandam J. Brennecke Mol Cell. **28**;**47**(6):954-69 (2012)
- [12] P. Capy, G. Gasperi, C. Biemont, and C. Bazin Heredity **85**, 101–106 (2000)
- [13] C. Vieira, P. Aubry, D. Lepetit and C. Biemont Proc. Biol. Sci. **265**: 1161–1165 (1998).
- [14] F. Belloni, D. Doria, A. Lorusso, V. Nassisi, L. Velardi, P. Alifano, C. Monaco, A. Talà, M. Tredici and A. Rainò, J. Phys. D: Appl. Phys. **39**, 2856-2861(2006)
- [15] F. Belloni, et al. J. Phys. D: Appl. Phys. **39**, 2856-2861(2006)
- [16] V Specchia, L Giordano, MP Bozzetti, V Nassisi, D Delle Side 2nd Workshop-Plasmi, Sorgenti, Biofisica ed Applicazioni 2010 (1), 112-115
- [17] M.P. Bozzetti, S. Massari, P. Finelli, F. Meggio, L.A. Pinna, B. Boldyreff. O.G. Issinger, G. Palumbo, C. Ciriaco, S. Bonaccorsi and S. Pimpinelli PNAS **92**: 6067-6071 (1995)
- [18] K.J. Livak and T.D. Schmittingen Methods **25**: 402 (2001).