

Alterazione dell'espressione dei geni orologio in *Drosophila melanogaster* a seguito di un intenso campo magnetico impulsato

Puricella Antonietta^{1a}, Ciccarese Andrea^{2a}, Delle Side Domenico², Monteduro Luigi², Bozzetti Maria¹, Nassisi Vincenzo², Specchia Valeria^{1*}

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

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

a. Questi autori hanno contribuito in modo uguale al lavoro

* valeria.specchia@unisalento.it

Abstract

Gli organismi hanno la capacità di percepire il campo magnetico terrestre e di alterare i processi biologici in risposta ad un campo magnetico applicato. Non sono ancora chiari i meccanismi molecolari alla base della percezione del campo magnetico. In questo lavoro abbiamo dimostrato che un campo magnetico impulsato di 400mT/1Hz induce un'alterazione comportamentale in individui adulti di *Drosophila melanogaster*. Inoltre, il livello di espressione di *tim* incrementa nelle teste dei moscerini dopo l'esposizione al campo. Tim è un target del magnetorecettore cryptochrome. Questi risultati preliminari indicano una possibile relazione tra il ritmo circadiano e cryptochrome nella percezione del campo magnetico.

Introduzione

Gli esseri viventi sono sottoposti tutti all'azione del campo magnetico terrestre, ma anche ai campi magnetici originati da vari dispositivi di uso comune compresi quelli utilizzati per i servizi domestici e per scopi industriali e diagnostici.

Diversi studi sono stati condotti per valutare la capacità degli organismi di percepire il campo magnetico terrestre e per valutare gli effetti del campo magnetico statico e del campo magnetico ELF sui processi biologici. I dati sperimentali hanno messo in evidenza che il campo magnetico è causa di stress a diversi livelli di organizzazione degli organismi [1-3].

I pathway molecolari che mediano la percezione del campo magnetico e i processi

molecolari alterati dal campo magnetico non sono stati ancora chiariti.

Negli studi condotti utilizzando come modello *Drosophila melanogaster* è stata identificata la proteina cryptochrome (Cry) come componente chiave del pathway.

I suddetti moscerini che mancano della proteina Cry non mostrano un comportamento magnetorecettivo. Questa evidenza sperimentale dimostra che Cry è necessaria nella magnetorecezione in *Drosophila* [4,5].

Cryptochrome appartiene alla classe delle flavoproteine ed è implicata nella percezione del campo geomagnetico attraverso la reazione della coppia di radicali attivati dalla radiazione luminosa. Cry attivata dalla luce blu (circa 450 nm) va in contro ad un cambiamento conformazionale che le permette di interagire con altre proteine,

siano esse appartenenti al pathways di regolazione dei ritmi circadiani che alle proteine implicate nella magnetorecezione. Un'altra proteina chiamata MagR è un magnetorecettore e forma un complesso proteico con Cry. Questo complesso agisce come un magnetosensore ed è in grado di allinearsi spontaneamente al campo magnetico [6]. Questo comportamento fa supporre che la suddetta proteina possiede un magnetone intrinseco e secondo la meccanica quantistica interviene un momento meccanico porta all'allineamento del magnetone con il campo magnetico

Materiali e metodi

Drosophila stocks

I moscerini sono stati allevati alla temperatura ottimale di 25°C su terreno di coltura standard.

Individui adulti Oregon-R (Or-R) sono stati usati come ceppo wild type.

Estrazione dell'RNA totale e qRT-PCR

L'RNA totale è stato estratto da 50 teste usando il kit microRNAqueos (AMBION), seguendo il protocollo precedentemente descritto [7].

Il campione è stato incubato con DNasi I 'RNase free' (AMBION) (1 U/mg-1 RNA) a 37°C per 30 min (100 µl).

1 µg dell'RNA totale è stato usato come stampo per la retrotrascrizione usando SuperScriptIII RNaseH-reverse transcriptase (Life technologies). qRT-PCR è stata effettuata usando SmartCycler Real-time PCR (Cepheid) e la molecola fluorescente SYBR green (Celbio). Per la quantificazione del trascritto è stato usato il metodo del $2\Delta\Delta Ct$.

Saggio di geotassi negativa

La 'geotassi negativa' è un comportamento innato mediante il quale i moscerini risalgono le pareti del contenitore dopo averli fatti cadere sul fondo.

Le immagini delle posizioni dei moscerini dopo 9 s sono state ricavate con una

fotocamera digitale.

Apparato sperimentale

Per la generazione del campo magnetico impulsato è stato utilizzato l'apparato sperimentale (Fig.1) progettato e realizzato presso il Laboratorio di Elettronica Applicata e Strumentazione (LEAS). Tale apparato è in grado di fornire un campo magnetico impulsato di alta intensità, con un valore di picco di 400 mT, sinusoidale smorzato dalla durata di circa 30 ns. Allo scopo si utilizza un condensatore di alta tensione (capacità 0.15 µF e tensione massima 50 kV) e una spark-gap per alimentare un solenoide.

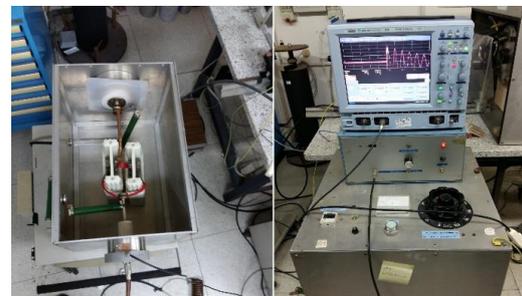


Fig.1 Apparato strumentale utilizzato.

Il solenoide è composto da un profilato circolare di rame di 0,8 cm di diametro. Il suo raggio a è di 3 cm e l'altezza l di 12 cm per un totale di 11 spire (N). Una bobina di Rogowski è stata costruita per diagnosticare la corrente di scarica [8, 9]. La Fig. 2 mostra il circuito elettrico dell'impulsatore.

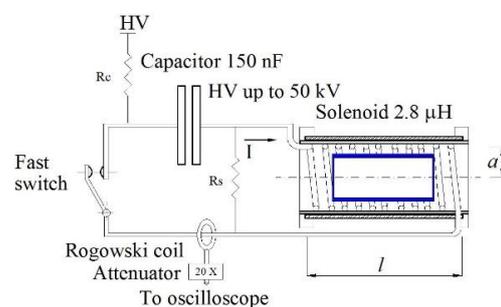


Fig.2: Schema elettrico dell'apparato utilizzato per la generazione del campo magnetico impulsato.

Gli impulsi di corrente che alimentano il solenoide permettono la formazione di un campo magnetico secondo la seguente formula:

$$B = \mu k \frac{NI}{l} \quad (1)$$

con k coefficiente di correzione di forma.

Pur se non è evidente nel circuito, è presente una resistenza R dovuta ai contatti, alla resistenza interna del condensatore, alla spark gap e alla resistività dei conduttori. Nel nostro caso risulta essere di 0.5Ω . Il solenoide ha un'induttanza di circa $3.0 \mu\text{H}$ e risulta che $1/LC > R^2/4L^2$ ed il circuito non può non oscillare alla frequenza di 230 kHz . Il valore è controllato dalla relazione $f = \sqrt{1/LC - R^2/4L^2}$.

La corrente, e quindi il campo magnetico ha la seguente forma:

$$I(t) = \frac{V}{2\pi fL} e^{-\frac{R}{2L}t} \sin(2\pi f t) \quad (2)$$

Una tipica forma d'onda della corrente è in Fig. 3. Con la tensione di alimentazione del condensatore di $V = 24 \text{ kV}$, il valore di picco del campo magnetico è risultato di 420 mT al centro del solenoide, e di 400 mT il valore medio nel volume centrale di altezza 3.5 cm .

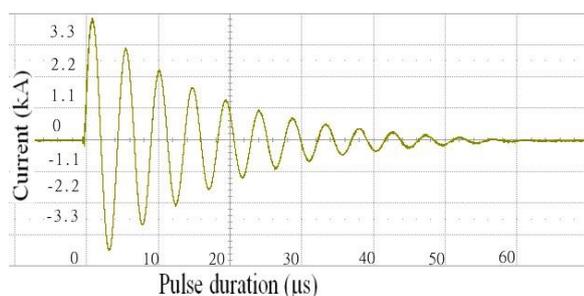


Fig. 3: Tipica forma d'onda del campo magnetico.

Risultati

Comportamento di individui wild type dopo esposizione al campo magnetico impulsato

Per analizzare gli effetti del campo magnetico impulsato, abbiamo applicato impulsi alla frequenza di $1 \text{ Hz}/400 \text{ mT}$ ai moscerini. Abbiamo usato 100 individui adulti (4 giorni

di vita) wild type, OR-R e suddiviso i moscerini in dieci gruppi da dieci individui ciascuno. Cinque gruppi sono stati esposti al campo per 2 ore in presenza di luce blu. Essa è fornita da un set di 4 diodi blu il cui spettro di emissione è centrato a 480 nm , Fig. 4.

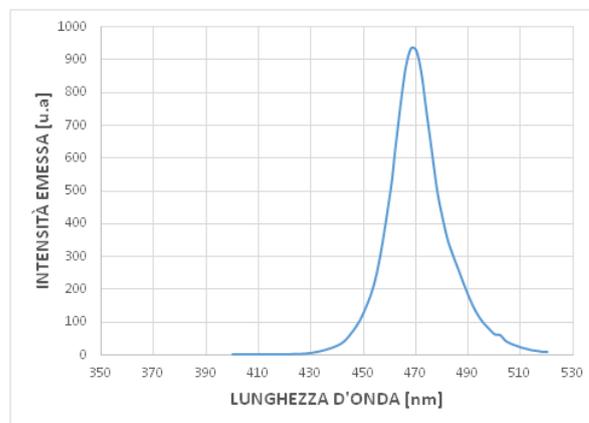


Fig. 4: Spettro di emissione del set di diodi UV.

Cinque gruppi sono stati illuminati con luce blu senza esporli al campo magnetico e sono stati usati come controllo. Alla fine dell'esposizione è stato effettuato il saggio di geotassi negativa, ripetendolo tre volte per ogni gruppo. In particolare i moscerini sono stati fatti cadere sul fondo del tubo contenitore alto 9 cm ed è stata calcolata la loro distribuzione in tre settori di 3 cm ciascuno dopo 9 secondi di tempo (Tabella 1 e Tabella 2).

WILD TYPE CONTROLLO			
gruppo	0-3 cm	3-6 cm	6-9 cm
TEST 1.1	4	2	4
TEST 1.2	4	3	3
TEST 1.3	2	1	7
TEST 2.1	1	2	7
TETS 2.2	3	2	5
TEST 2.3	2	4	4
TEST 3.1	3	3	4
TEST 3.2	6	2	2
TEST 3.3	7	0	3
TEST 4.1	9	1	0
TEST 4.2	7	2	1

TEST 4.3	5	4	1
TEST 5.1	1	2	7
TEST 5.2	2	4	4
TEST 5.3	2	4	4
MEDIA	3,4	2,4	3,4
Deviazione standard	2,4	1,2	2,2

Tabella 1. Distribuzione dei moscerini controllo nei tre settori del tubo

wild type TEST			
GRUPPO	0-3 cm	3-6 cm	6-9 cm
TEST 1.1	8	2	0
TEST 1.2	8	2	0
TEST 1.3	6	4	0
TEST 2.1	4	4	2
TEST 2.2	4	4	2
TEST 2.3	7	1	2
TEST 3.1	6	0	4
TEST 3.2	6	2	2
TEST 3.3	6	2	2
TEST 4.1	7	1	2
TEST 4.2	7	3	0
TEST 4.3	8	1	1
TEST 5.1	5	2	3
TEST 5.2	4	4	2
TEST 5.3	6	2	2
MEDIA	6,1	2,3	1,6
Deviazione standard	1,4	1,3	1,2

Tabella 2. Distribuzione dei moscerini test nei tre settori del tubo

I risultati sono stati riportati nel grafico (Figura 6). La distribuzione media dei moscerini dopo l'esposizione al campo magnetico impulsato è maggiore nei primi tre centimetri, la situazione opposta si verifica nel settore 6-9 cm. Questo risultato indica che il campo magnetico impulsato induce un'alterazione della geotassi negativa di *Drosophila*.

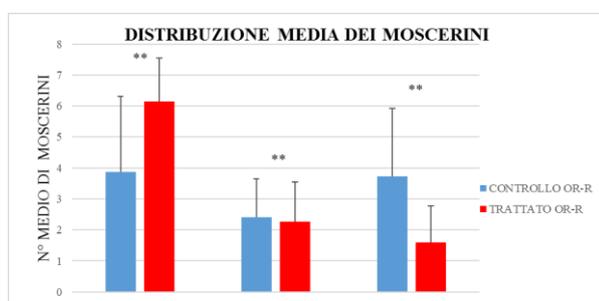


Figura 5. Rappresentazione grafica della distribuzione media di moscerini (controllo e test) nei tre settori del tubo. $p=0,001$ (Test T)

Espressione dei geni target di Cryptochrome

Per studiare i pathway molecolari coinvolti nella risposta al campo magnetico, abbiamo iniziato analizzando i livelli di espressione di un gene chiamato *timeless* (*tim*). La proteina Tim ha una stretta relazione con il magnetorecettore Cryptochrome, in particolare nei meccanismi del ritmo circadiano. Abbiamo analizzato mediante qRT-PCR i livelli del trascritto *tim* nelle teste dei moscerini esposti al campo magnetico. Abbiamo osservato un incremento di 3,81 del trascritto *tim* dopo l'esposizione al campo magnetico (Tabella 3).

	<i>tim</i>
OR-R test VS OR-R ctrl1	2.66
OR-R test VS OR-R ctrl2	4.96
Media	3.81
Deviazione Standard	1.62

Tabella 3. Valori di fold change per il trascritto *tim* nelle teste dei moscerini dopo l'esposizione al campo magnetico

Discussione e Conclusioni

Molti studi stanno identificando le molecole, evolutivamente conservate, coinvolte nella percezione del campo magnetico. MagR e cryptochrome sembra rappresentino le proteine principali nella capacità di percepire il campo magnetico e nella capacità di orientamento. Rimangono poco chiari i

meccanismi di trasduzione di questi segnali e i pathway alterati dal campo magnetico statico e impulsato.

In questo lavoro abbiamo valutato gli effetti del campo magnetico impulsato sul comportamento dei moscerini. Abbiamo anche cercato di determinare se la proteina Cry gioca un ruolo nella percezione del campo insieme alle sue proteine target coinvolte nel ciclo circadiano. In particolare abbiamo verificato un incremento dell'espressione di *tim* dopo il trattamento con il campo magnetico. L'attivazione di Cry induce la degradazione di Tim e attiva la sua trascrizione.

Successivi esperimenti utilizzando ceppi mutanti nei geni *cry*, *magR* e *tim* potranno chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nella magnetorecezione e nello stress indotto dai campi magnetici.

References

- [1] Ueno S and Shigemitsu T in Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields. Eds. CRC Press, USA, 3rd edition, 2007.
- [2] Ghodbane S, Lahbib A, Sakly M and Abdelmelek H BioMed Research International Volume 2013 (2013), Article ID 602987
- [3] Delle Side D, Specchia V, D'Attis S, Giuffreda , Quarta G, Calcagnile L, Bozzetti MP, Nassisi V Journal of Instrumentation (2016) vol. 11, p. C05007
- [4] Gegear RJ, Casselman A, Waddell S and Reppert S. Nature (2008) 454, 1014-1018.
- [5] Gegear R J, Foley LE, Casselman A and Reppert, S. M. Nature (2010) 463, 804-807.
- [6] Siying Qin, Hang Yin, Celi Yang, Yunfeng Dou, Zhongmin Liu, Peng Zhang, He Yu, Yulong Huang, Jing Feng, Junfeng Hao, Jia Hao, Lizong Deng, Xiyun Yan, Xiaoli Dong, Zhongxian Zhao, Taijiao Jiang, Hong-Wei Wang, Shu-Jin Luo and Can Xie Nature Materials (2015) 15:217-226.
- [7] Specchia V, Piacentini L, Tritto P, Fanti L, D'Alessandro R, et al. Nature (2010) 463: 662-665
- [8] Nassisi V., Luches A. Rev Sci Instrum., (1979) 50(7): 900-902
- [8] Nassisi V. e Delle Side D., Rev. Sci. Instrum. 88, 024701 (2017) [doi.org/10.1063/1.4974742]