

A. PICCIN, S. CAPPELLOZZA, S. MOREAU, P. CISOTTO, M. PEGORARO,  
G. MAZZOTTA, C. BENNA, F. SANDRELLI, M. ZORDAN, L. CAPPELLOZZA, R. COSTA

### **Costruzione di linee transgeniche di *Bombyx mori* caratterizzate da dsRNA interference costitutiva del gene orologio<sup>(\*)</sup>**

**Riassunto** - L'orologio circadiano degli insetti è costituito da loop trascrizionali interconnessi e regolati da meccanismi di retroazione negativa dovuti all'interazione complessa di parecchi geni "orologio" e dei loro prodotti proteici. Uno di questi geni, *period* (*per*), svolge un ruolo particolarmente importante nel core dell'oscillatore circadiano del dittero *Drosophila melanogaster*. Mutazioni a questo gene possono determinare alterazioni della ritmicità circadiana e della durata dello sviluppo. Allo scopo di verificare se effetti simili si verificano anche in altri insetti, è stato allestito un costrutto adatto per la trasformazione di embrioni del lepidottero *Bombyx mori* e capace di indurre silenziamento genico post-trascrizionale specifico del gene *per* via ds RNA interference. Sono state ottenute diverse linee transgeniche indipendenti che, ad una prima caratterizzazione molecolare, risultano avere incorporato numeri variabili di inserti esogeni.

**Abstract** - *Bombyx mori transgenic lines for the induction of constitutive dsRNA interference of the clock gene period.*

The circadian clock of insects consists of interlocking transcriptional feedback loops which are positively and negatively regulated by the complex interaction of a number of "clock" genes and their protein products. One of these genes, *period* (*per*), plays a central role in the core of the circadian oscillator of the dipteran *Drosophila melanogaster*. Mutations in this gene lead to alterations in circadian rhythmicity and developmental timing. In order to establish whether similar effects can also be observed in other insects, we employed a construct suitable for the embryonic transformation of the lepidopteran *Bombyx mori*. This construct was engineered to allow specific ds RNA interference-induced post-transcriptional gene silencing of the *Bombyx per* gene. A preliminary molecular characterization of the resulting transformants shows that several independent transgenic lines harboring variable numbers of transgenes were obtained.

**Key words** - *Bombyx mori*, clock genes, transgenesis, dsRNA interference, post-transcriptional gene silencing.

---

(\*) La ricerca é stata finanziata dal M.I.P.A.F. nell'ambito del progetto finalizzato "Produzione di nuove tecnologie per il rilancio della gelsibachicoltura italiana".

## INTRODUZIONE

La ritmicità in biologia è un fenomeno piuttosto diffuso, che interessa domini temporali molto diversi tra loro. Con ogni probabilità, i “veri” ritmi circadiani rappresentano risposte adattative molto antiche degli organismi viventi alla rotazione terrestre e quindi alle variazioni ambientali che questo fenomeno genera, senza sosta, ogni 24 ore. Nel corso dell’evoluzione si sono infatti originati dei congegni biologici in grado di misurare il tempo, gli “orologi circadiani”, costituiti da geni e da proteine, che controllano negli organismi l’organizzazione temporale di numerosi processi biochimici e fisiologici, così come quella di molti fenotipi comportamentali. Il possedere un orologio endogeno efficiente consente agli organismi di anticipare le variazioni giornaliere dell’ambiente, e quindi di adattarsi per tempo ad esse.

A partire dal 1995, dopo anni di progressi importanti ma piuttosto lenti nell’identificazione delle componenti molecolari degli orologi circadiani, le ricerche in questo settore hanno subito una improvvisa accelerazione, con uno sviluppo straordinario delle conoscenze circa la natura dei meccanismi molecolari che generano ritmicità circadiana in organismi molto diversi tra loro, dai cianobatteri ai mammiferi (Dunlap, 1999; Costa, 2001).

Oggi sappiamo che degli “oscillatori circadiani”, costituiti da geni e proteine “orologio”, si sono organizzati più volte, in modo indipendente, nel corso dell’evoluzione. Infatti, i geni che originano e controllano gli “orologi circadiani” dei cianobatteri, dei funghi, degli insetti e delle piante non sembrano presentare omologie tra loro. A partire dal 1997, è apparso invece chiaro che esiste una buona somiglianza, funzionale e genetica, tra l’orologio biologico circadiano degli insetti, in particolare del moscerino *Drosophila melanogaster* Meig, e quello dei mammiferi (Clayton *et al.*, 2001). In questo caso, i geni orologio implicati sono infatti omologhi e svolgono funzioni simili, anche se, nel corso dell’evoluzione, si sono diversificate alcune delle loro relazioni regolative.

A dispetto della loro apparente origine ed evoluzione indipendenti, ciò che sorprende è che gli oscillatori circadiani di batteri, funghi, piante, insetti e mammiferi, sembrano accomunati da modalità di funzionamento sostanzialmente simili basate su meccanismi di retroazione negativa.

Il ruolo svolto come “organismo modello” da *D. melanogaster* nel campo della cronobiologia è stato, ed è tuttora, centrale per lo studio e la dissezione genetica e molecolare dell’orologio biologico e *Drosophila* è, senza dubbio, l’organismo per il quale possediamo oggi il maggior numero di conoscenze circa il funzionamento dell’oscillatore endogeno.

L’orologio circadiano endogeno controlla negli insetti importanti fenotipi ritmici come la schiusa delle uova, lo sfarfallamento dell’adulto e l’attività locomotoria dell’adulto. La ritmicità circadiana che caratterizza molteplici aspetti comportamentali e fisiologici degli organismi animali e vegetali è generata da un sistema di cicli a retroazione positiva e negativa. Tra gli insetti, in particolare in *D. melanogaster*, il core dell’oscillatore circadiano può essere schematicamente descritto a livello molecolare mediante due loop trascrizionali interconnessi e regolati da meccanismi di retroazione negativa

basati principalmente sulle proteine PERIOD (PER) e TIMELESS (TIM). Queste proteine, generalmente sotto forma di eterodimero, regolano negativamente la trascrizione dei loro stessi geni *per* e *tim*. Altre due proteine CLOCK (CLK) e CYCLE (CYC), sono componenti importanti dei due loop e svolgono un ruolo di attivatori della trascrizione di *per* e *tim*. L'interazione di queste proteine con altri partner (in particolare con chinasi quali DBT, e SHAGGY) origina un'oscillazione endogena stabile. Complesso è anche il pathway di trasduzione del segnale luminoso al core dell'orologio circadiano (importante per la sincronizzazione della ritmicità circadiana endogena con l'alternarsi del giorno e della notte). Un ruolo fondamentale in questo processo è svolto dalla proteina TIM e da un fotorecettore noto come CRYPTOCHROME (CRY). Una descrizione dettagliata ed aggiornata del modello corrente circa l'organizzazione molecolare dell'orologio circadiano in *Drosophila* è in Zordan *et al.* (2002).

La regolazione del gene *per* rappresenta perciò un aspetto molto critico per il funzionamento dell'orologio circadiano negli insetti. Mutanti nulli per il gene *period* in *Drosophila* mostrano tempi di sviluppo uovo-adulto significativamente più corti rispetto agli individui wild type in condizioni di esposizione a regimi di luce continua (LL), nei quali il funzionamento dell'orologio circadiano risulta sostanzialmente abolito (Kyriacou *et al.*, 1990).

Al fine di verificare se fenomeni simili sono riscontrabili anche in altri insetti, ed in particolare in lepidotteri di interesse economico come *Bombyx mori* L., si è allestito un costrutto per la trasformazione e la conseguente produzione di linee permanenti di *B. mori* caratterizzate in modo costitutivo dal silenziamento genico post-trascrizionale del gene orologio *period* omologo di *per* di *D. melanogaster*.

## MATERIALI E METODI

### *Preparazione di un costrutto per l'induzione di RNAi transgenica del gene "orologio" period (per) di B. mori*

Si è reso necessario, inizialmente, costruire un vettore adatto all'incorporazione di materiale genetico ectopico nel genoma di *B. mori*. Il vettore scelto per la trasformazione è piggyBac (Lobo *et al.*, 1999; Peloquin *et al.*, 2000; Tamura *et al.*, 2000). Per la preparazione di linee di *B. mori* transgeniche è stato quindi modificato il vettore piggyBac[3xP3-EGFP] (pBac[3xP3-EGFP]) per renderlo adatto alla trasformazione ed all'espressione di geni di interesse in questo organismo.

Il plasmide impiegato contiene il marcatore EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (Cormack *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) sotto il controllo di un promotore artificiale caratterizzato dalla presenza di tre repeat in tandem dei siti di legame per il fattore di trascrizione Pax-6 (3 x P3) (Sheng *et al.*, 1997; Berghammer *et al.*, 1999; Horn *et al.*, 2000). In esso sono stati inseriti un frammento del promotore del gene per l'Actina (*Act*) di *B. mori* ed un sito di terminazione e poli-adenilazione del virus SV40, separati tra loro da alcuni siti di restrizione. Tali modificazioni permettono il clonaggio e la trascrizione costitutiva dei frammenti oggetto di studio.

Per effettuare queste modifiche si è reso necessario amplificare mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) i due frammenti menzionati, e successivamente unirli mediante una strategia basata sulla reazione di PCR (fig. 1). Un frammento del promotore di *Act* (*Act-prom*) di 241bp è stato amplificato usando gli oligonucleotidi *act5* (5'-AAAAGGCGCGCCACAGGAAACAGCTATGACC-3') e *act3* (5'-TACTAGTCTGATGCACTGTTCGAGCACACC-3'), entrambi contenenti siti di restrizione (*Asc*I e *Spe*I rispettivamente, sottolineati nel testo) utilizzati nelle successive fasi di clonaggio. Per l'amplificazione del terminatore di SV40 (un frammento di 282 bp - *SV40-Term*) si è usata la coppia di oligonucleotidi *SV40-5* (5'-CATCAGACTAGTAAGCGGCCGCGACTCT-3') e *SV40-3* (5'-AAAAAGATCTCGCGTATCGATAAGCTTTAAG-3') contenenti, rispettivamente, i siti di restrizione *Spe*I e *Bgl*III. L'oligonucleotide *act3* contiene una zona complementare ad una regione dell'oligonucleotide *SV40-5*. I frammenti *Act-prom* ed *SV40-Term* ottenuti tramite PCR possono in questo modo appaiarsi a livello di tale zona di complementarietà ed eventualmente estendersi (in presenza di una polimerasi) per formare una singola molecola in cui *Act-prom* e *SV40-Term* risultano fusi assieme. Tale zona di complementarietà contiene un sito per l'enzima *Spe*I, che viene successivamente utilizzato per l'inserimento del transgene.

I due frammenti sono quindi stati mescolati in quantità equimolare, e nuovamente amplificati usando la coppia di oligonucleotidi *act5* e *SV40-3* per ottenere *Act-Sv40* (517 bp).

Infine *Act-SV40* è stato clonato in pBac[3xP3-EGFP] tramite i siti di restrizione *Asc*I e *Bgl*III, per ottenere pBac[3xP3-EGFP]-exp.

#### *Costruzione di un frammento del gene per di Bombyx mori adatto alla trascrizione di un RNA a doppio filamento*

Un frammento di 825 bp del gene *per* di *B. mori* (Regier et al., 1998, GenBank Accession Number AF063429) è stato amplificato da RNA mediante RT-PCR, usando

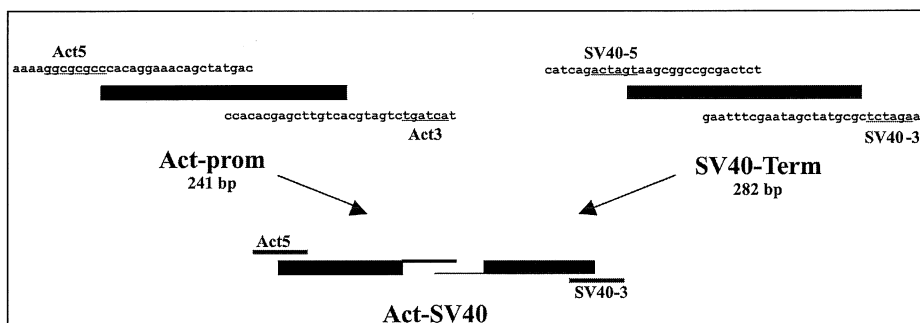


Fig. 1 - Schema della strategia adottata per la preparazione, mediante PCR, di un frammento di DNA contenente il promotore del gene per l'actina di *Bombyx mori* ed il terminatore di SV40 fusi assieme.

i due oligonucleotidi *perBm5a* (5'-CGGTACGCAAGAAAAAGCTC-3') e *perBm3c* (5'-CTGTGGTCCGGATCCTGTATTTC-3'), e clonato in pCR2-Topo (Invitrogen). Tale frammento è stato poi subclonato in pBC KS+ (Stratagene) usando i siti di restrizione *SpeI* e *ApaI* presenti nel polylinker del vettore pCR2-Topo rispettivamente a monte ed a valle del frammento stesso. E' stato inoltre amplificato un frammento di 379 bp del gene *LacZ* (codificante la  $\beta$ -Galattosidasi di *Escherichia coli*) da usarsi come spaziatore (Piccin *et al.*, 2001) tra due frammenti *per* di 825 bp che sono stati quindi clonati invertiti tra loro (IR), mediante gli oligo *Lac1m* (5'-GCATTATCCG-GACCATCC-3') e *Lac2* (5'-TCTCTCCAGGTAGCGAAAGC-3'), ognuno dei quali contiene un sito *AvaII* (sottolineato). Tale frammento di *LacZ* è stato clonato in pCR2-Topo. pBC-*per* è stato quindi linearizzato tagliando con le endonucleasi *AvaII* (sito contenuto all'estremità 3' del frammento *per*) e *KpnI* (contenuto nel polylinker di pBC). Contemporaneamente pCR2-*per* è stato digerito con *AvaII* e *KpnI* ed il frammento di *per* così liberato è stato separato dal vettore mediante corsa elettroforetica e successiva elettroeluzione. Una ligazione a tre componenti è stata poi eseguita per unire i frammenti pBC-*per* (*KpnI*-*AvaII*), *lacZ* (*AvaII*-*AvaII*) e *per* (*AvaII*-*KpnI*), per ottenere pBC-*per*-IR. In fig. 2 è riportato uno schema grafico che illustra le operazioni eseguite

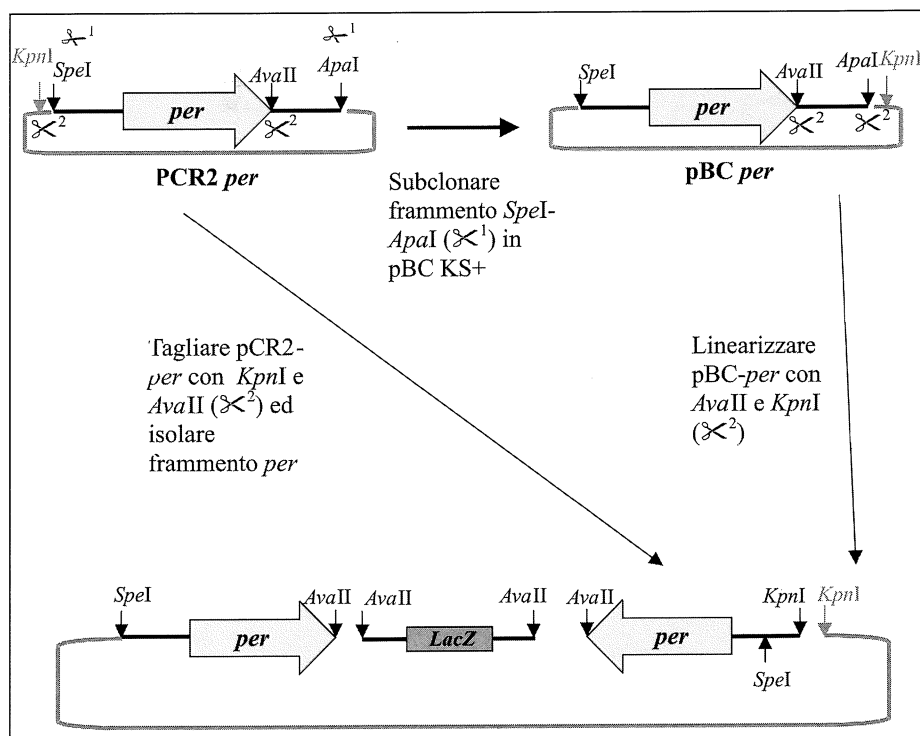


Fig. 2 - Schema del clonaggio eseguito per la preparazione del costrutto contenente le due repeat invertite del gene *per* di *Bombyx mori* separate da un frammento del gene *lacZ* di *E. coli*.

per la preparazione del costrutto contenente le due "repeat" invertite del gene *per* di *B. mori* separate da un frammento del gene *lacZ* di *E. coli*.

#### *Trasferimento del costrutto nel vettore di trasformazione*

Il costrutto pBC-*per*-IR per la trascrizione dell'RNA capace di formare una struttura a doppio filamento (hairpin-RNA) è stato poi trasferito nel vettore pBac[3xP3-EGFP] digerendo sia quest'ultimo che pBC-*per*-IR con *SpeI*. Il frammento codificante le IR è stato isolato mediante separazione elettroforetica e successiva estrazione da gel di agarosio, ed è poi stato subclonato in pBac[3xP3-EGFP]-exp. In fig.

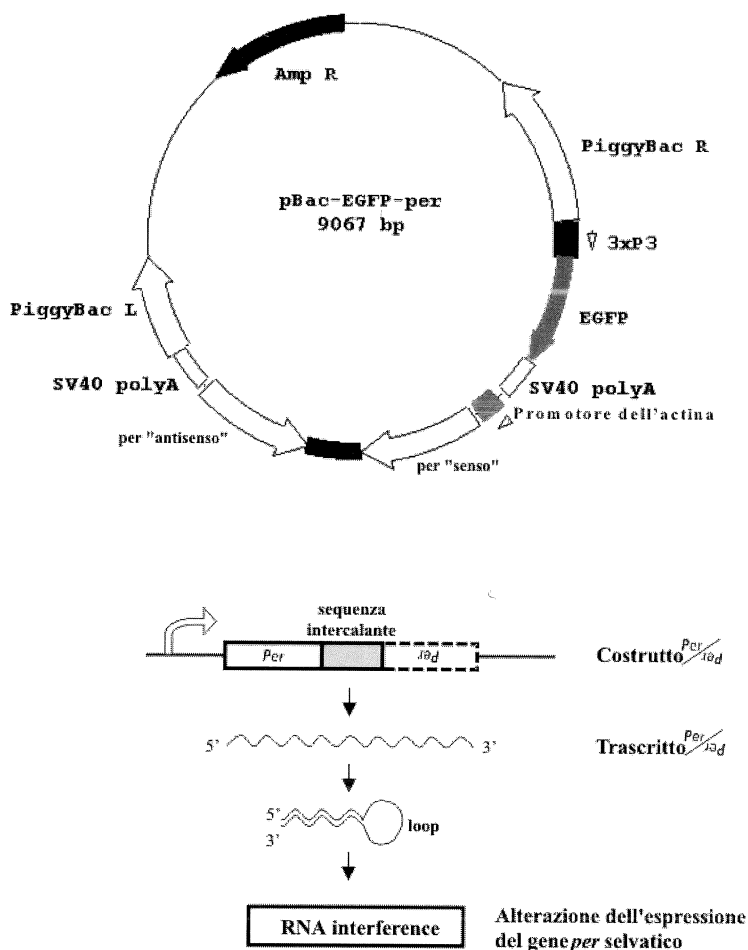


Fig. 3 - Schema del costrutto e del vettore di trasformazione utilizzato.

3 viene riportato uno schema del costruito allestito e del vettore di trasformazione utilizzato.

## RISULTATI

### *Microiniezione di embrioni di B. mori*

Con il costruito descritto in precedenza sono stati iniettati 4354 embrioni del ceppo "Nistari" di *B. mori* (un ceppo polivoltino di origine indiana, disponibile presso l'Istituto Sperimentale di Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura, Padova). Da questi si sono sviluppate circa 800 larve dalle quali sono stati ottenuti 463 adulti (G0). Questi sono stati utilizzati per allestire altrettanti incroci, in accordo con lo schema riportato in fig. 4, al fine di analizzarne la progenie (G1) ed identificare eventuali organismi transgenici. Da ogni incrocio sono stati ottenuti circa 300 embrioni (G1) per un totale quindi di circa 90.000 embrioni.

Questi embrioni sono stati esaminati al microscopio a fluorescenza per identificare eventuali transgenici esprimenti il gene reporter per la EGFP. Nella progenie di uno <sup>(1)</sup> di questi incroci sono stati identificati circa 30 embrioni transgenici (fig. 5, in alto) che esprimevano la proteina EGFP a livello delle strutture deputate alla formazione dell'occhio e del sistema nervoso. Questi embrioni sono stati quindi riuniti a quelli non transgenici ed allevati in massa fino allo stadio pupale. A questo punto sono state riesaminate al microscopio a fluorescenza tutte le pupe per identificare quelle transgeniche (fig. 5, in basso) da cui iniziare gli incroci successivi, allestiti al fine di ottenere, dopo un certo numero di generazioni, linee transgeniche permanenti ed omozigoti per il/i transgene/i, in accordo con lo schema riportato in fig. 4.

### *Caratterizzazione molecolare delle linee transgeniche ottenute dalle pupe esprimenti GFP*

Una prima caratterizzazione molecolare delle linee fondate a partire dalle pupe transgeniche per il costruito che induce silenziamento genico post-trascrizionale del gene *per* di *B. mori* è stata condotta su individui ottenuti in G2 (fig. 4). In fig. 6 è riportata un'immagine fotografica di un Southern Blot ottenuto per digestione con *XhoI* del DNA genomico estratto da 14 linee transgeniche. Il pattern di ibridazione, ottenuto con una sonda di 1500 bp per il gene che codifica la proteina EGFP che funge da reporter nella trasformazione, indica chiaramente che sono state ottenute linee con diverso numero di inserti. Queste linee verranno ora stabilizzate, reiterando la procedura di incrocio schematizzata in fig. 4, al fine di ottenere linee indipendenti ed omozi-

---

<sup>(1)</sup> L'efficienza dell'incorporazione stabile del costruito nelle linee germinali è stata, quindi, pari allo 0,03% (1/4354). Tuttavia tale indice assume scarso significato per vari motivi: 1) la mortalità del 48% registrata durante lo sviluppo larva-adulto ed indipendente dall'operazione di microiniezione potrebbe avere casualmente eliminato individui trasformati nelle linee germinali; 2) costrutti di lunghezza diversa danno generalmente luogo ad efficienze diverse; 3) la letteratura scientifica sull'argomento è estremamente limitata (Tamura *et al.*, 2000), perciò manca, comunque, un dato di paragone.

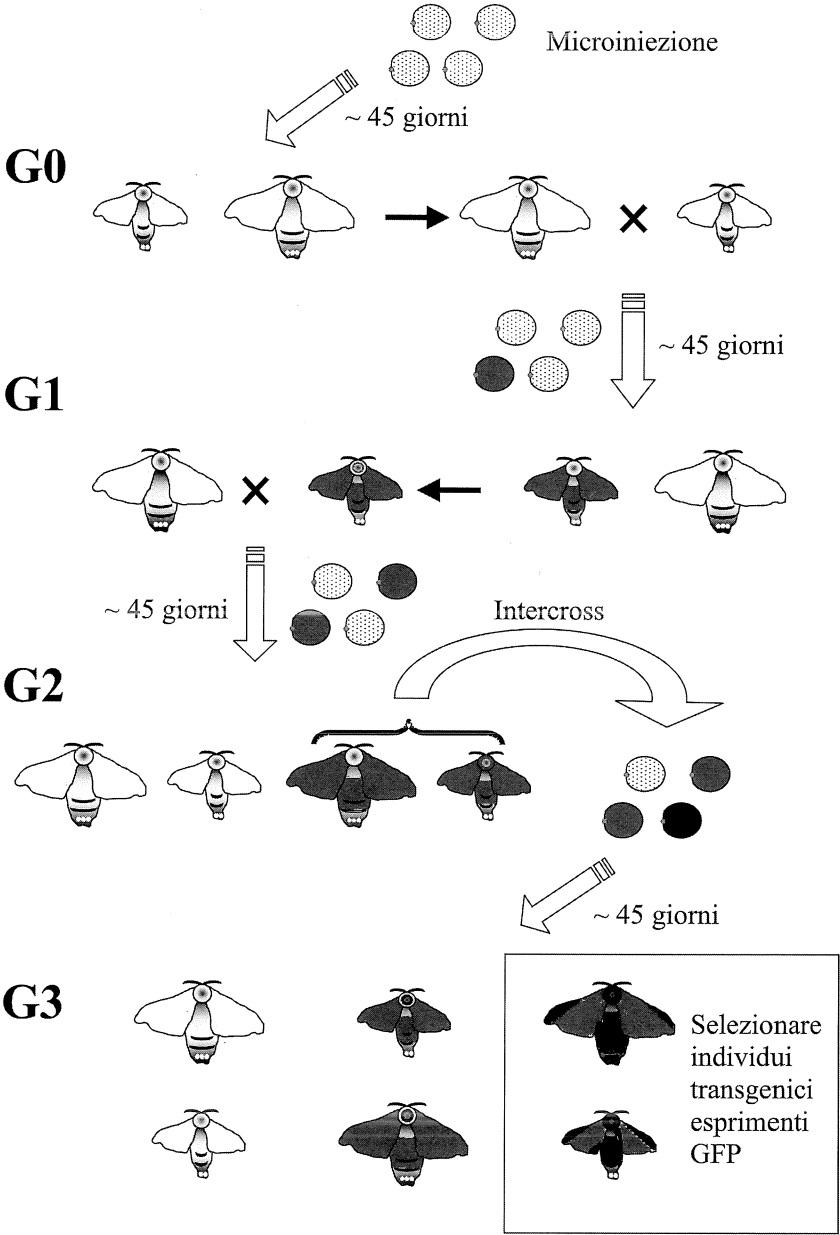


Fig. 4 - Schema degli incroci adottati per l'isolamento delle linee transgeniche a partire dagli individui trasformati ottenuti dopo microiniezione degli embrioni di *Bombyx mori*.



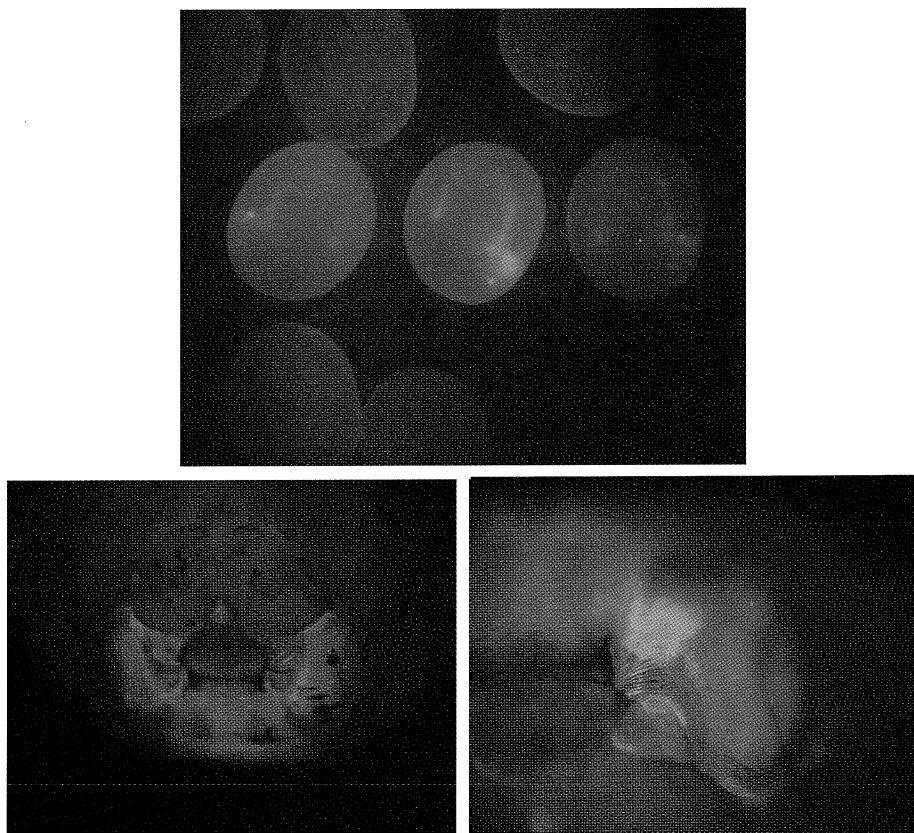


Fig. 5 - In alto, embrioni di *Bombyx mori* transgenici identificati grazie all'espressione di EGFP a livello degli abbozzi oculari e del sistema nervoso. In basso, *Bombyx mori* allo stadio pupale. Testa con occhi che esprimono EGFP e particolare ingrandito di un occhio di una pupa transgenica con espressione di EGFP.

goti, caratterizzate ciascuna dalla presenza di un numero definito e stabile di inserti che inducono dsRNA interference del gene *per* endogeno.

### CONCLUSIONI

Le linee transgeniche di *B. mori* così ottenute verranno quindi analizzate per identificare e descrivere eventuali effetti del silenziamento genico post-trascrizionale del gene *per* sull'orologio circadiano, su alcuni fenotipi ritmici controllati dall'oscillatore endogeno e, soprattutto, sui tempi di sviluppo uovo-adulto in diversi regimi di alle-

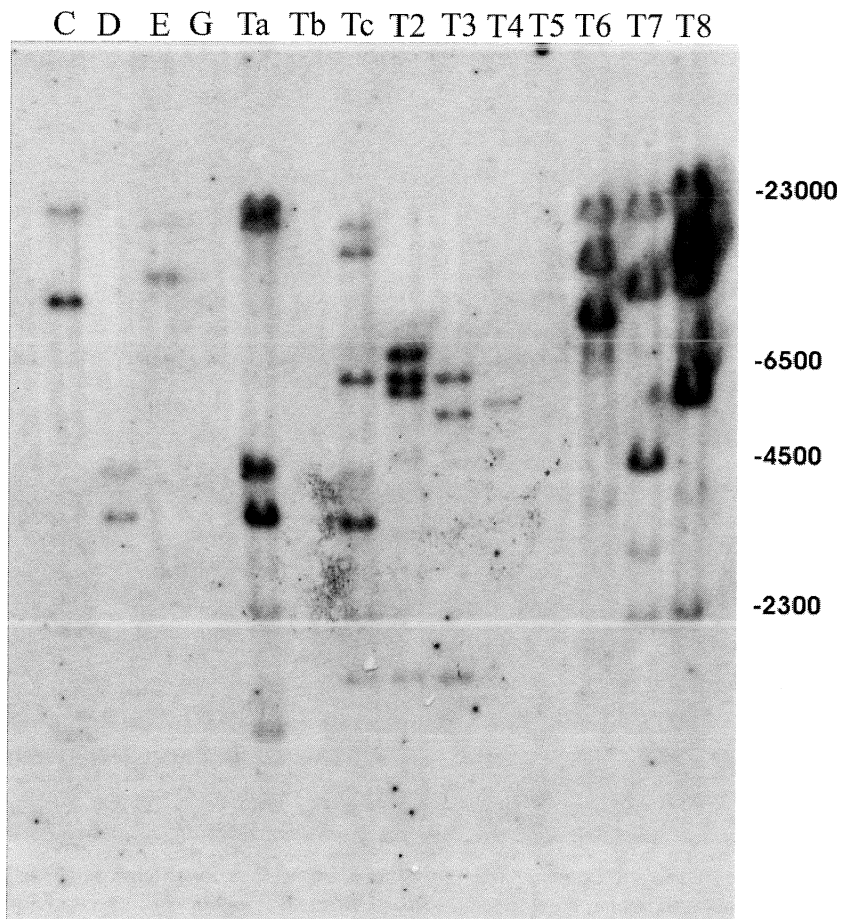


Fig. 6 - Southern Blot ottenuto per digestione con l'enzima di restrizione *XhoI* del DNA genomico estratto da 14 linee transgeniche di *Bombyx mori*. E' visibile il pattern di ibridazione, ottenuto con una sonda di 1500 bp per il gene che codifica la proteina EGFP, che funge da reporter nella trasformazione. Per ciascuna linea transgenica, individuata dalla sigla posta in corrispondenza di ciascuna corsia, sono presenti un numero variabile di inserti. Sono riportati i riferimenti ai pesi molecolari delle relative bande di DNA.

vamento per quanto concerne le condizioni di illuminazione ambientale. In particolare, l'attività di caratterizzazione delle linee, via PCR quantitativa, è rivolta attualmente alla stima dell'efficienza con la quale viene indotto il knock-out funzionale e alla descrizione accurata degli eventuali effetti della interferenza specifica del gene orologio *per* sulla dinamica della transizione dallo stadio embrionale allo stadio larvale.

In organismi wild type questa transizione sembra dipendere non solo dall'età dell'embrione ma anche da un effetto di "canalizzazione" verso una finestra temporale determinata dall'orologio circadiano. Risultati preliminari suggeriscono la possibilità che il silenziamento genico di *per* in *B. mori* alteri la definizione di tale finestra temporale.

## BIBLIOGRAFIA

- BERGHAMMER A.J., KLINGLER M., WIMMER E.A., 1999 - A universal marker for transgenic insects. - *Nature* 402: 370-371
- CLAYTON J.D., KYRIACOU C.P., REPERT S.M., 2001 - Keeping time with the human genome. - *Nature* 409(6822):829-31
- CORMACK B.P., VALDIVIA R.H., FALKOW S., 1996 - FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). - *Gene* 173(1 Spec No):33-8
- COSTA R. (guest editor), 2001 - Circadian Clocks. - *Sem. Cell Dev. Biol.* 12 (4):267-341
- DUNLAP J.C., 1999 - Molecular bases for circadian clocks. - *Cell* 96(2):271-90
- HORN C., JAUNICH B., WIMMER E.A., 2000 - Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. - *Dev. Genes Evol.* 210: 623-629
- HORN C., SCHMID B., POGODA F., WIMMER E., 2002 - Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. - *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32(10):1221
- LOBO N., LI X., FRASER M.J. JR, 1999 - Transposition of the piggyBac element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni*. - *Mol. Gen. Genet.* 261(4-5):803-10
- PELOQUIN J.J., THIBAUT S.T., STATEN R., MILLER T.A., 2000 - Germ-line transformation of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) mediated by the piggyBac transposable element. *Insect Mol. Biol.* 9(3):323-33
- PICCIN A., SALAMEH A., BENNA C., SANDRELLI F., MAZZOTTA G., ZORDAN M., ROSATO E., KYRIACOU C.P., COSTA R., 2001 - Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. - *Nucleic Acids Res.* 29(12): e55.
- REGIER J.C., FANG Q.Q., MITTER C., PEIGLER R.S., FRIEDLANDER T.P., ALMA SOLIS M., 1998 - Evolution and phylogenetic utility of the *period* gene in Lepidoptera. - *Mol. Biol. Evol.* 15(9):1172-82
- KYRIACOU CP, OLDROYD M, WOOD J, SHARP M, HILL M., 1990 - Clock mutations alter developmental timing in *Drosophila*. - *Heredity* 64:395-401
- SHENG G., THOUVENOT E., SCHMUCKER D., WILSON D.S., DESPLAN C., 1996 - Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6/eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors - *Genes Dev.* 11: 1122-1131
- TAMURA T., THIBERT C., ROYER C., KANDA T., ABRAHAM E., KAMBA M., KÔMOTO N., THOMAS J., MAUCHAMP B., CHAVANCY G., SHIRK P., FRASER M., PRUDHOMME J., COUBLE P., 2000 - Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. - *Nat. Biotechnol.* 18(1):81-4
- YANG T.T., CHENG L., KAIN S.R., 1996 - Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. - *Nucleic Acids Res.* 24: 4592-4593

ZORDAN M., SANDRELLI F., COSTA R., 2002 - A concise overview of circadian timing in *Drosophila*. - *Frontiers in Biosciences* (in press).

ALBERTO PICCIN, STÉPHANE MOREAU, PAOLA CISOTTO, MIRKO PEGORARO, GABRIELLA MAZZOTTA, CLARA BENNA, FEDERICA SANDRELLI, MAURO ZORDAN, RODOLFO COSTA - Dipartimento di Biologia, Università di Padova, Via U. Bassi 58/B, 35131 Padova. E-mail: [rodolfo.costa@unipd.it](mailto:rodolfo.costa@unipd.it)

SILVIA CAPPELLOZZA, LUCIANO CAPPELLOZZA - Istituto Sperimentale Zoologia Agraria, Sezione Specializzata per la Bachicoltura, Via dei Colli 28, 35143, Padova. E-mail: [info@sezione-bachicoltura.it](mailto:info@sezione-bachicoltura.it)

Accettato il 30 ottobre 2002