

DIPARTIMENTO DI GENETICA E ANATOMIA PATOLOGICA
SEZIONE DI GENETICA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BARI

DOTTORATO DI RICERCA
IN GENETICA
ED EVOLUZIONE MOLECOLARE

CARATTERIZZAZIONE GENETICA E MOLECOLARE DI
MUTAZIONI AUTOSOMICHE CHE INTERFERISCONO CON
L'ESPRESSIONE DELLE SEQUENZE *Stellate* IN
Drosophila melanogaster

COORDINATORE:
Prof. Mariano Rocchi

DOTTORANDA

Dott.ssa TRITTO PATRIZIA

TUTORE:
Prof. Gioacchino Palumbo

XII CICLO
1996-2000

INDICE

INTRODUZIONE	4
IL SISTEMA <i>SEGREGATION DISTORTION</i> .	6
SISTEMA <i>abo-ABO</i>	8
IL SISTEMA <i>crystal-Stellate</i> .	9
MATERIALI e METODI	
Stocks di <i>Drosophila melanogaster</i> .	11
Terreni di coltura per cellule batteriche	11
Estrazione di DNA Genomico	12
Southern blot ed ibridazione	12
Marcatura per oligoprimering	13
Estrazione di RNA totale	14
Analisi di Northern blot	15
Estrazione di proteine da tessuti di <i>D.mel.</i>	15
SDS-PAGE	15
Western-blot	15
Preparazione e fissaggio di cervelli e ghiandole salivari di <i>Drosophila melanogaster</i>	17
Immunofluorescenza ed ibridazione <i>in situ</i> dei cromosomi mitotici e politenici.	18
β -Galactosidasi detection di gonadi in <i>D. mel.</i>	19
Preparazione dei tessuti (testicoli ed ovari) da ibridare con sonde ad RNA.	19
Preparazione di ribosonde.	20
Preparazione dei testicoli e immunocolorazione con anticorpo.	20
Protocollo alternativo per la preparazione di ovari ed immunocolorazione con anticorpo specifico.	22
Recupero della flanking per STS.	23
RISULTATI	
PREMESSA GENERALE	24
CAPITOLO I	
1. Caratteristiche comuni.	25
Caratterizzazione citologica della proteina <i>Stellate</i> , per immunocolorazione <i>in situ</i> con l'anticorpo anti- <i>Stellate</i> .	25
1.2 Analisi dell'espressione delle sequenze <i>Stellate</i> nei mutanti autosomici.	26
CAPITOLO II	
Caratterizzazione genetica e molecolare del mutante autosomico <i>sting (sti)</i> .	27

2.1 Colorazione con la β galattosidasi di tessuti del mutante <i>sting</i> .	27
2.2 Clonaggio del gene <i>sting</i> .	28
2.3 Analisi di espressione di <i>sting</i> .	28
2.4 Analisi di complementazione.	29
2.5 Omologia Piwi-Sting e multiallineamento	29

CAPITOLO III

Caratterizzazione genetica e molecolare del mutante autosomico <i>scratch</i> (<i>scrt</i>).	30
--	----

3.1 Colorazione con la β galattosidasi di tessuti del mutante <i>scratch</i> .	30
3.2 Clonaggio e caratterizzazione di <i>scratch</i> .	30
3.3 Analisi dei revertanti.	31
3.4 Analisi del trascritto di <i>hsp83</i> .	32
3.5 Risposta allo shock termico del mutante <i>scrt</i> .	32
3.6 Localizzazione del trascritto di <i>hsp83</i> nella linea germinale di individui omozigoti <i>scrt</i> .	33
3.7 Analisi citologica delle diverse fasi della spermatogenesi del mutante <i>scratch</i> .	34

CAPITOLO IV

Caratterizzazione genetica e molecolare della mutazione autosomica <i>sirio</i> .	35
---	----

4.1 Colorazione con la β galattosidasi di tessuti del mutante <i>sirio</i> .	35
4.2 Clonaggio ed organizzazione genomica del gene <i>sirio</i> .	36
4.3 Analisi dell'espressione del trascritto di <i>sirio</i> .	37
4.4 Analisi della proteina <i>Sirio</i> .	38

DISCUSSIONE	38
-------------	----

BIBLIOGRAFIA	45
--------------	----

INTRODUZIONE

La maggior parte dei genomi eucariotici é caratterizzata dalla presenza di due tipi di cromatina: eucromatina ed eterocromatina. Il dominio eucromatico contiene la maggior parte dei geni strutturali, molti dei quali consistono di sequenze di DNA in singola copia. Inoltre mostra alcune peculiari caratteristiche: tra queste essa é condensata in metafase e decondensata in interfase, presumibilmente perché coinvolta nel processo di trascrizione (Wallrath 1998).

In contrasto, l'eterocromatina, localizzata principalmente nelle regioni pericentromeriche, comprende regioni cromosomiche, o a volte interi cromosomi che, da un punto di vista citologico, rimangono in uno stato condensato durante la maggior parte del ciclo cellulare (Heitz 1928). I domini eterocromatici sono in genere poveri di geni e per la maggior parte consistono di sequenze di DNA altamente e mediamente ripetute.

L'eterocromatina rappresenta una frazione significativa in molti genomi eucariotici (circa il 15% nell'uomo ed il 30%-35% in *Drosophila melanogaster*). E' ormai acquisito il concetto che essa sia coinvolta in numerosi processi biologici.

Tra i tanti, due autori, Perea e Henning (1990) in "Heterochromatin, junk or collector item?", si sono interrogati sul significato biologico della eterocromatina, concludendo su come essa possa essere essenziale nel genoma degli eucarioti, sebbene le sue caratteristiche funzionali e strutturali restino a tutt'oggi un mistero (Henning 1999).

Nel 1966 Brown distingue due tipi di eterocromatina: **facoltativa e costitutiva.**

L'eterocromatina facoltativa corrisponde a regioni cromosomiche che hanno la facoltà di assumere, in differenti tipi cellulari o in determinati stadi dello sviluppo, un elevato grado di condensazione.

L'eterocromatina facoltativa é funzionalmente molto simile alla eterocromatina costitutiva e rappresenta un interessante sistema per regolare diverse funzioni geniche. Esempi ben noti di eterocromatina facoltativa comprendono il meccanismo di inattivazione di uno dei due cromosomi X di mammifero per garantire la compensazione del dosaggio dei geni legati al sesso (Lyon 1972).

L'eterocromatizzazione di specifiche regioni o di interi genomi aploidi, con lo scopo di renderli funzionalmente inattivi (Brow and Nur 1964), si osserva anche in alcuni insetti coccidi o in *Sciara* in cui i cromosomi risultano, in qualche modo, "imprinted" prima della

fusione dei gameti, ed è quindi possibile distinguere la loro origine materna o paterna (Crouse 1960, Monk 1988).

L'eterocromatina costitutiva, invece, è un componente strutturale, permanente dei cromosomi di tutte le cellule. Tra le sue caratteristiche più peculiari, oltre al suo stato di condensazione, essa mostra ritardo nella replicazione, scarsa attività trascrizionale, numero ridotto di geni ed è costituito di grossi blocchi di sequenze di DNA altamente e mediamente ripetute (John 1988).

L'eterocromatina costitutiva è inoltre caratterizzata da una intrinseca plasticità. Sono infatti noti esempi di organismi in cui è richiesto nella linea germinale un maggior contenuto di eterocromatina rispetto alla linea somatica e questo si realizza con meccanismi di sotto-regolazione o eliminazione del DNA eterocromatico nella linea somatica (Pimpinelli and Goday 1989; Spradling et al. 1992).

Un ulteriore ruolo della eterocromatina, da un punto di vista funzionale e strutturale, è stato evidenziato da vari autori. Sono state identificate copie degli elementi trasponibili Het-A, jockey, TART (Levis et al. 1993). In particolare Het-A (Biessmann et al. 1992) è richiesto in *D. melanogaster* per il mantenimento delle estremità telomeriche, per le interazioni telomero-telomero e telomero-involucro nucleare. Infatti l'elemento Het-A (appartenente, come gli elementi TART, alla famiglia LINEs-long interspersed elements) si trova solo nelle regioni telomeriche ed ha la capacità di interagire con le estremità dei cromosomi rotti mediante una regione poliadenilata (Mason and Biessmann 1995). Questo rappresenta un recente esempio di funzione biologica delle regioni eterocromatiche. Inoltre in *D. melanogaster* a tutt'oggi sono stati identificati più di 30 geni localizzati nella eterocromatina, tra cui: *light* (*lt*), *rolled* (*rl*) e *concertina* (*cta*) che hanno una struttura particolare e cioè presentano piccoli esoni ed introni molto grandi nei quali sono localizzate sequenze di DNA satellite ed anche trasposoni (Schupach et al. 1989, Delvin et al. 1990, Dimitri 1991, Reuter et al. 1992).

Un'altra proprietà molto studiata della eterocromatina è la sua abilità a silenziare geni eucromatici. Questo accade quando dei geni sono, a seguito di trasposizioni o riarrangiamenti cromosomici, giustapposti in cis con regioni eterocromatiche.

Questo fenomeno, riportato per la prima volta da Muller nel 1930, prende il nome di Variegazione per effetto di posizione (PEV) (Weiler and Wakimoto 1995; Wakimoto 1998).

A seguito della inversione cromosomica, causata dai raggi X, che neo-localizzava il gene *white* nell'eterocromatina centromerica, si osservava il tipico fenotipo a mosaico del colore dell'occhio. L'analisi dei cromosomi politenici mise in evidenza la correlazione tra PEV ed una estensione della "conformazione eterocromatica" in un compartimento eucromatico. Naturalmente il fenotipo reverte nel caso di una nuova inversione che rilocalizza il gene nella corretta posizione.

E' possibile osservare l'effetto opposto su geni eterocromatici come *light*, *rolled*, *concertina* il cui silenziamento é dovuto alla neo-localizzazione in regioni eucromatiche (Shultz 1936; Hessler 1958).

Diversi sono i fattori che influenzano la PEV: ambientali, come la temperatura o il pH; genetici, come la presenza di un eccesso di eterocromatina, quale un cromosoma Y addizionale (Dimitri 1989), o la presenza di loci modificatori.

Questi dati sembrano sostenere l'ipotesi che segmenti eterocromatici, addizionati ad un genoma, possano competere per una determinata quantità di proteine associate alla eterocromatina, diminuendone la concentrazione in prossimità dei loci variegati (Zucherhandl, 1974).

Lo studio della PEV é attualmente rivolto verso l'analisi, genica e molecolare, dei loci modificatori. In particolare, mutazioni dominanti che sopprimono la PEV, riguardano geni *Su(var)s* che codificano fattori in grado di mantenere lo stato inattivo della cromatina, e mutazioni in geni *E(var)s* che codificano per prodotti necessari per il mantenimento dello stato attivo del cromosoma come fosforilasi, chinasi e proteine cromosomiche (Grigliatti 1991; Locket al. 1988; Wakimoto 1990; Elgin 1997; Reuter et al. 1990, 1992).

La *Drosophila melanogaster* é, tra gli organismi modello, il più adatto allo studio della eterocromatina. Da un lato, il suo genoma, circa 20 volte inferiore a quello umano, é sicuramente più plastico per manipolazioni genetiche. Dall'altro, la disponibilità di riordinamenti cromosomici con quantità variabili di eterocromatina, la possibilità di ottenere deficienze e riarrangiamenti che interessano specifici segmenti di eterocromatina e la costruzione di una mappa citologica dettagliata, ottenuta con colorazioni differenziali dei cromosomi mitotici e politenici (Gatti and Pimpinelli 1992), ha aiutato a capire se l'eterocromatina ha solo un ruolo "selfish", senza benefici addizionali per l'organismo ospite o se ha un ruolo biologico.

Tra le funzioni in essa identificate, ve ne sono alcune definite "criptiche", in quanto possono essere rilevate solo in presenza di mutazioni in altri loci eucromatici. In particolare, in *Drosophila melanogaster* sono stati individuati 3 sistemi genetici che coinvolgono specifiche interazioni tra elementi genici eucromatici ed eterocromatici: SD (*Segregation Distortion*), *abo*-ABO ed *crystal-Stellate* (per una review Palumbo et al. 1994).

IL SISTEMA SEGREGATION DISTORTION.

Esempi di *meiotic drive*, in cui un particolare allele o cromosoma in eterozigosi é trasmesso in maniera preferenziale, sono stati descritti in popolazioni naturali di funghi, piante, insetti e mammiferi (Lyttle 1991). Questo fenomeno, che sovverte le leggi mendeliane, può trovare un vantaggio selettivo nel suo compimento. I

meccanismi molecolari che sono alla base del *meiotic drive* sono in parte ancora sconosciuti.

Uno dei sistemi di *meiotic drive* meglio caratterizzati è il sistema *Segregation Distorter* (*SD*) in *Drosophila melanogaster*, esempio classico di *meiotic drive* specifico della meiosi maschile. Maschi eterozigoti per un cromosoma II *SD* e un omologo *SD*⁺ trasmettono alla progenie, nel 98% dei casi, un eccesso di cromosomi *SD*, a causa di una disfunzione degli spermatozoi portanti l'omologo *SD*⁺ (Temin et al. 1991). L'analisi genetica ha dimostrato che *Segregation Distorter* dipende dalla interazione di tre elementi, due dei quali, *Sd* (*Segregation Distorter*) ed *E(Sd)* (*Enhancer di Sd*), essenziali per indurre alterata segregazione in spermatozoi che portano l'allele sensibile o supersensibile di un terzo locus denominato *Responder* (rispettivamente *Rsp*^S e *Rsp*^{SS}); un cromosoma che porta l'allele insensibile (*Rsp*^I) ne risulta resistente (Ganetzky 1977; Sharp et al. 1985).

Il locus *E(Sd)* non solo aumenta l'azione di *Sd*, ma in maniera indipendente è in grado di causare segregazione distorta. La letalità degli spermatozoi è correlata ad una anormale condensazione della cromatina (Tokuyasu et al. 1977).

Deficienze di *Sd* eliminano la capacità distortante, mentre deficienze di *Rsp* rendono i cromosomi *SD*⁺ insensibili alla distorsione. Il locus *Sd* mappa nella regione politenica eucromatica 37D2-6 del II cromosoma, mentre *E(Sd)*s e *Rsp* si localizzano nella eterocromatina dello stesso cromosoma (Pimpinelli e Dimitri 1989), rispettivamente in 2L e 2R (Dimitri 1991).

Il locus *Rsp* è costituito da una sequenza di DNA ripetuto di circa 120 pb ricco in AT ed il numero di copie è correlato direttamente alla sensibilità dell'allele (Pimpinelli e Dimitri 1989; Wu et al. 1988). Adiacente a *Rsp* sono sempre presenti elementi ripetuti in tandem dell'elemento trasponibile Bari-1 (Caizzi et al. 1993).

E' stata avanzata l'ipotesi (Ganetzky 1977; Pimpinelli e Dimitri 1989; Lyttle 1989) che il repeat di 120 pb abbia la proprietà di legare il DNA, per cui la proteina *Sd* legherebbe con alta affinità il DNA di *Rsp* e di conseguenza la causa della disfunzione sarebbe attribuibile all'asimmetrica distribuzione della stessa in maschi *Sd Rsp*^{ins}/*Sd*⁺ *Rsp*^S.

L'analisi molecolare ha indicato che locus *Sd* è associato con una duplicazione in tandem di un frammento *EcoRI* di 11.5Kb; tale frammento risulta di 6.5 kb in wild type (Powers and Ganetzky 1991). L'attività distortante è legata a questo frammento 11.5 kb in quanto, inserito per trasformazione, causa "distorsione" nella linea germinale maschile (McLean and Merrill 1994); in definitiva, l'attività *Sd* è contenuta in questa sequenza.

Entrambi i frammenti di 6.5 kb (*Sd*⁺) ed 11.5 kb (*Sd*) sono stati sequenziati ed i relativi cDNAs sono stati caratterizzati. In *Sd*⁺ sono

state individuate 2 unità di trascrizione; la prima, dHS2ST, codifica per l'omologo di *Drosophila* del gene di mammifero "heparan-sulfate 2-sulfotranferase (Kobayashi et al. 1997); la seconda, dRanGAP, è stata identificata come l'omologo di *Drosophila* del gene di mammifero RanGAP1 e funziona come scambiatore di guanina attivando il gene *Ras* che, a sua volta, interviene nella regolazione della attività nucleasica della proteina *Ran*.

L'organizzazione di *Sd* è simile a quella di *Sd*⁺. Mentre il trascritto dHS2ST codifica per una proteina wild type, l'analisi dei trascritti di *SD* indica che il trascritto distale dRanGAP si estende di circa 300-400 pb verso la parte prossimale della duplicazione, e questo provoca l'inserimento in "frame" di un nuovo codone di stop con il risultato di una proteina dRanGAP trunca al COOH-terminale. Questa proteina trunca, prodotto funzionale di *Sd*, è stabilmente espressa nei testicoli ed è la causa della distorsione (Saito et al. 1997, Mahajan 1998).

Poiché *Ran* svolge un ruolo centrale nel trasporto nucleare sia come regolatore che coordinatore, *Sd* potrebbe determinare un trasporto impari negli spermatozoi con l'allele *Rsp*^S rispetto a quelli contenenti *Rsp*ⁱ giustificando il drive meiotico (Dasso and Pu 1998).

IL SISTEMA ABO-*abo*.

Larry Sandler (1970) isolò in una popolazione naturale una mutazione recessiva ad effetto materno, *abo1* (*abnormal oocyte*), localizzata nella regione politenica eucromatica 31-32C del II L. Uova deposte da femmine omozigoti per *abo* hanno poche probabilità di raggiungere lo stadio adulto e la probabilità di sopravvivenza di individui *abo/abo* dipende dalla quantità di eterocromatina. Elementi eterocromatici ABO sono stati mappati in tutti i cromosomi, ad esclusione del IV, e la loro azione mostra modalità additive (Pimpinelli et al. 1985).

Analisi genetiche e molecolari indicano che le sequenze ABO sono ripetute. Apparentemente ABO è un elemento indispensabile perché probabilmente presente in molteplici copie; in ogni caso è stato osservato che la simultanea delezione di almeno 4 regioni ABO causa letalità embrionale (Fanti comun. per).

Sono stati formulati modelli per spiegare l'interazione *abo-ABO*. Alcuni prevedono che entrambi i loci codificano per omologhi prodotti genici; alternativamente, *abo*⁺ potrebbe regolare positivamente ABO e che l'assenza del suo prodotto può essere compensato da un eccesso della proteina ABO nella eterocromatina (Tomkiel 1990).

Il locus eucromatico *abo* è stato clonato (Tomkiel et al. 1995) e la caratterizzazione molecolare di differenti mutanti di questo gene ha dimostrato che il suo prodotto è in grado di interagire con i geni per gli istoni. Questi risultati suggeriscono un effettivo

ruolo del sistema *abo-ABO* nella regolazione della cromatina (Berloco comun. per).

IL SISTEMA *crystal-Stellate*.

La prima evidenza che nel nucleo e nel citoplasma degli spermatozociti di maschi X/O di *Drosophila melanogaster* sono presenti aggregati cristallini risale alle osservazioni di Meyer e coll., 1961 (Fig. 1). In seguito è stato scoperto che il tipo di aggregati, a forma di ago o di stella, dipende dal locus X-linked *Stellate* (*Ste*); infatti gli aghi si osservano in presenza dell'allele *Ste*⁺, le stelle in presenza dell'allele *Ste* (Hardy et al. 1984).

I cristalli nella linea germinale di maschi X/O non rappresentano l'unico fenotipo in quanto tali maschi presentano anomalie meiotiche, quali difetti di condensazione e segregazione dei cromosomi meiotici (Lyfschytz and Hareven 1977). Tale fenotipo è osservabile quando il cromosoma Y porta la delezione della regione eterocromatica *h11*, dove è stato mappato il locus *crystal* (*cry*) (Pimpinelli et al. 1986; Palumbo et al. 1994) o *Suppressor of Stellate* *Su(Ste)* (Livak 1990). Inoltre maschi con genotipo *XSte+/Ycry-* sono semifertili, mentre quelli con genotipo *XSte/Ycry-* sono completamente sterili.

Il locus *cry* è costituito da sequenze mediamente ripetute (80-240 copie in popolazioni naturali (Lyckegoord and Clark 1989) di 800 pb dopo digestione con l'enzima di restrizione *CfoI*.

Anche il locus *Stellate* è risultato essere costituito da sequenze ripetute, dopo il suo clonaggio e la sua caratterizzazione (Lovett 1983).

Il locus *Stellate* è risultato omologo a *cry*, e contiene tre classi di repeat: di 950 pb, 1100pb, 1150pb, dopo digestione con l'enzima di restrizione *CfoI*. I due diversi alleli *Ste* e *Ste*⁺ dipendono dal numero di copie dei repeats di *Stellate*, infatti un grado di ripetizione che va da 15 a 52 copie riguarda l'allele *Ste*⁺ e da 250 a 400 copie riguarda l'allele *Ste* (Livak 1984; Palumbo et al. 1994).

Il locus *Stellate* è stato mappato per ibridazione *in situ* nella regione politenica eucromatica 12E-1 dei cromosomi politenici (Palumbo et al. 1994), e nella regione eterocromatica *h27* dei cromosomi mitotici come mostrato in figura 2 su neuroblasi larvali di individui *Oregon-R* ibridati con la sonda *Stellate* (Palumbo et al. 1994).

La sequenza *Stellate* contiene due introni ed è trascritta solo nei testicoli di maschi X/O o *X/Ycry-*, producendo un abbondante trascritto di 750 nt, che è completamente assente il maschi *wild type* (Livak 1990). L'analisi della sequenza di alcuni cDNAs di *Stellate* ha identificato una "open reading frame" (ORF) in grado di codificare per una proteina di 19.500 dalton che mostra una omologia del 40% con la subunità regolativa β della caseina chinasi II (CK2) di

Drosophila e bovino (Livak 1990). CK2 é coinvolto in molteplici funzioni nell'ambito del metabolismo cellulare, tra queste é responsabile della fosforilazione della DNA topoisomerasi II che, a sua volta, interviene nel corretto grado di condensazione dei cromosomi in quanto fosforila gli istoni (Uemura et al. 1978; Yasuhisa et al. 1991).

Esperimenti di immunocolorazione *in situ* su testicoli di maschi X/Ycry- utilizzando l'anticorpo policlonale anti-*Stellate*, prodotto in topo, hanno mostrato che i cristalli presenti nella linea germinale di questi individui sono costituiti, esclusivamente o quasi, dalla proteina *Stellate* (Bozzetti et al. 1995). Saggi biochimici *in vitro* hanno dimostrato che la proteina *Stellate* compete con la normale subunità β per il legame con la subunità catalitica α . Questo puó determinare un'alterazione dell'attività della CK2 e di conseguenza della topoisomerasi II. Essendo quest'ultima, come detto in precedenza, necessaria per la corretta condensazione e segregazione dei cromosomi meiotici, la sua alterata attività potrebbe essere responsabile dell'insorgenza dei difetti meiotici osservati nel fenotipo *Stellate*.

Il pattern di espressione di *Stellate* é stato osservato in maschi con diversi genotipi (Schmidt et al. 1999). Oltre al trascritto specifico di 750-850 nt della linea germinale maschile, già osservato da Livak (Livak 1990), sono stati evidenziati altri due trascritti, uno polyA⁺ di 1200 basi ed uno polyA⁻ di circa 8000 basi, entrambi espressi ad alti livelli anche in maschi *wild type* ed in femmine, essi sono inoltre sempre presenti nella linea somatica.

Per cercare di comprendere il meccanismo molecolare che sottende alla interazione dei loci coinvolti nel sistema *crystal-Stellate*, abbiamo selezionato una serie di mutanti che, sulla base di parametri definiti in seguito, intervengono nell'espressione delle sequenze *Stellate*.

Il mio lavoro di tesi di dottorato si é concentrato in particolare nella caratterizzazione genetico molecolare di tre mutazioni autosomiche che deregolano l'espressione di *Stellate*.

MATERIALI e METODI

Condizioni di cultura e ceppi di *Drosophila*

Tutti i ceppi sono cresciuti con polenta di composizione standard, ad una temperatura di 25°C (Lindsley and Zimm 1992). Per i nostri esperimenti, sono stati utilizzati i cromosomi seguenti:

$B^s cry^1 Yy^+$: cromosoma Y ottenuto da P. Ripoll. Risulta delecto della regione h11-13 (Palumbo et al 1994). Nel corso di questa tesi sar  riportata come $Ycry^-$.

$ywSte^+ f, g^3 Ste, W5Ste$: cromosomi X recanti circa 30 e 300 copie del repeat *Stellate*, rispettivamente.

$ms(2L)sting, ms(2L)sirio, ms(3L)scratch$: mutazioni indotte dalla inserzione di un singolo elemento PZ. Le prime due mutazioni sono bilanciate su CyO ; la terza su $TM3$. Natura e caratteristiche fenotipiche sono descritte in seguito. $ms(2L)sirio$   stato in precedenza descritto come $ms(2)1006$ (Gonczy et al. 1992).

Terreni di coltura per cellule batteriche

Luria Broth ⁺ (LB ⁺)	Luria Broth ⁻ (LB ⁻)
1% Triptone	1% Triptone
0.5%Estr.di lievito	0.5%Estr.di liev.
0.5% NaCl	0.5% NaCl
0.2 MgSO ₄	

Per ottenere il valore di pH 7.2, si aggiungono poche gocce di NaOH (10 M) e si porta a volume con H₂O. Per il

terreno solido, si addiziona Bactoagar (Difco) all'1.5%; le piastre sono mantenute a 37 °C *overnight* e poi conservate a 4°C.

Per ottenere una colonia satura di batteri si preleva una colonia da una piastra e la si inocula in opportune quantità di LB, lasciandola crescere a 37°C *overnight* in agitazione. Quando è necessario al terreno di coltura viene aggiunto l'antibiotico opportuno.

Estrazione di DNA Genomico

Circa 200-300 mg di mosche sono omogeneizzate in potter in 10 ml di soluzione 1 (0.3 M saccarosio, 50 mM TRIS-HCl, 40 mM EDTA). Quindi l'omogeneizzato è centrifugato a 4000 rpm per 10' ed il pellet così ottenuto viene sospeso in 1 ml di soluzione 2 (0.1M TRIS-HCl, 0.1 N NaCl, 50 mM EDTA) . Alla soluzione sono aggiunti 25 µl di proteinasi K (10 mg/ml) e 50 µl SDS e si incuba per 1h a 60°C. Quindi sono aggiunti 270 µl/ml di NaCl 6M, si centrifuga per 15' a 2500 rpm e si raccoglie il sovrantante. A questo punto si aggiungono 2.5 volumi di EtOH 95% per favorire la precipitazione del DNA genomico. Il DNA, quindi, è trasferito in EtOH 70% e successivamente disciolto in TEA buffer. Dopo questa operazione si aggiunge RNasi ad una concentrazione finale di 20 µl/ml e si incuba per 30' a 37°C. Il DNA viene sottoposto ad una estrazione fenolica e la soluzione ottenuta viene precipitata aggiungendo 1/10 di volume NaAc 3M e 3 volumi di EtOH al 95% per 30' a - 80 °C.

Southern blot ed ibridazione

Dopo la corsa elettroforesi in TAE buffer 1x, il gel è fotografato, denaturato e trasferito in vaschetta con una soluzione 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl per 30' in agitazione continua a temperatura ambiente.

Trascorso questo tempo dopo un lavaggio in acqua distillata il gel è posto in una soluzione neutralizzante 0.5 M TRIS HCl pH 7.2, 1.5 M NaCl per 30' in agitazione a temperatura ambiente. Si prepara intanto il filtro di nylon del tipo Hbond N (AMERSHEN) della grandezza del gel. Il filtro

di nylon e la carta WHATMANN 3MM sono immersi in 2x SSC e poi posti a contatto con il gel. Quindi sul filtro e sulla carta 3MM si procede con trasferimento *overnight* per capillarità.

In seguito si effettua un baking in stufa per circa 40' ad 80°C sotto vuoto. Prima di effettuare l'ibridazione il filtro è pre-ibridato per 2 h a 42°C in una soluzione che presenta la stessa composizione di quella di ibridazione.

MISCELA DI IBRIDAZIONE:

- formamide 50%
- SSC 5x
- Denhardt's 5x
- SDS 0.5x
- EDTA pH 8 10mM
- Salmon sperm DNA 100 g/ml

DENHARDT'S SOLUTION 50x :

- 1% BSA
- 1% polyvinil pirrolidone
- 1% Ficoll

20x SSC:

- 3M NaCl
- 0.3 M Na citrato

Dopo la pre-ibridazione si aggiunge al filtro la soluzione di ibridazione con la sonda marcata nelle condizioni di stringenza desiderate. Per i lavaggi del filtro ad una stringenza media si effettua un lavaggio a 65°C per 15' nel 2x SSC, 0.1% SDS e 2 lavaggi ciascuno di 15' nel 1x SSC, 0.1% SDS. Se la radioattività aspecifica non è del tutto eliminata si effettua un ulteriore cambio di 15' in una soluzione 0.2x SSC, 0.1% SDS. I filtri di nylon vengono quindi esposti direttamente.

Marcatura per oligoprimering

Questa metodica è in grado di produrre una marcatura ad elevata attività specifica e si basa sulla ibridazione, con una miscela di tutti i possibili esanucleotidi che fungono da primers, al DNA precedentemente denaturato che deve essere marcato. Il filamento complementare è sintetizzato a partire dal 3'-OH di un qualsiasi esanucleotide usando la DNA polimerasi. Il nucleotide ³²P-dATP marcato viene incorporato durante la sintesi.

Il Kit di marcatura è fornito dalla Boehringer.

Si denatura il DNA mediante bollitura per 10 min. in un volume massimo di 9 µl, si raffredda e di seguito si aggiungono:

- 3 µl di miscela di dCTP, dGTP, dTTP in rapporto 1:1:1
- 2 µl della reazione di miscela;
- 1 µl dell'enzima Klenow;
- 5 µl di ³²P-ATP;

per un volume complessivo di 20 µl.

Si incuba a 37°C per un intervallo compreso tra 30' e 3h. Successivamente si blocca la reazione con 2 µl di Na₂EDTA 0.2 M e si aggiungono 80 µl di una soluzione di TRIS 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH8, SDS 0.1%. Il tutto viene passato su una colonna di Sephadex G50 bilanciata con una soluzione contenente TRIS 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1% e si centrifuga a 2000 giri per 2'. Si aggiungono sulla colonna altri 100 µl della stessa soluzione e si ricentrifuga nelle stesse condizioni di prima per allontanare la radioattività aspecifica. I 200 µl di sonda marcata, prima di essere usati per l'ibridazione, sono denaturati mediante bollitura per 5'.

Estrazione di RNA totale

50 coppie di testicoli di maschi di *D.melanogaster* sono dissezionate in soluzione Ringer modificato (Ashburner 1989). Dopo aver aggiunto 0.9 ml di soluzione lisante (NaCl 0.1M, 0.1M Trisbase, 0.03M Na₂EDTA, e 1% Sarkosyl), i testicoli sono omogenati ed estratti con fenolo: cloroformio: isoamylalcohol (50:49:1).

L'RNA è precipitato a -20°C aggiungendo 2.5 vol di EtOH 95%. I campioni sono quindi sciolti in 20 µl di mix (per 1 ml: 470 µl formamide deionizzata, 157 µl 10xMOPS, e 275 µl di acqua sterile) e denaturati a 65°C per 15 minuti. Infine a ciascun campione sono aggiunti 2 µl di loading buffer per RNA (Sambrook et al.1989). L'elettroforesi è effettuata in un gel denaturante di formaldeide e MOPS a 1% di agarosio (Sambrook et al.1989).

Soluzione Ringer modificato:

183 mM KCl, 47 mM NaCl, 10 mM TRI-HCl pH 6.8

Analisi di Northern blot

Dopo l'elettroforesi, il gel è fotografato e lavato con acqua sterile per 10' e quindi posto in 20XSSC per circa 30'. Il trasferimento è effettuato con membrana di nylon Hybond-N overnight ed il baking per 45' ad 80°C sotto vuoto.

Estrazione di proteine da tessuti di *Drosophila melanogaster*

Ovari e testicoli sono prelevati da circa 50 individui adulti (maschi e femmine) provenienti da ceppi diversi di *Drosophila melanogaster* e trattati nelle stesse condizioni. Inizialmente sono posti in soluzione Ringer, in presenza di un inibitore delle proteasi cellulari (PMFS). Dopo aver allontanato la soluzione Ringer, i tessuti sono risospesi in 10 µl di una soluzione lisante e quindi accuratamente omogeneizzati; infine sono denaturati per bollitura per 5' e centrifugati a 14000 rpm per 10'. Al sovrantante, trasferito in una nuova eppendorf, si aggiunge un uguale volume della soluzione denaturante 2x per proteine, ed infine si bollisce per 10'. I campioni raffreddati possono essere immediatamente caricati su gel di poliacrilammide o conservati a - 20°C per alcune settimane.

Soluzione Ringer modificato:

183 mM KCl, 47 mM NaCl, 10 mM TRI-HCl pH 6.8

Soluzione Lisante:

6% SDS, 1 mM EDTA, 0.2 mM,
PMFS: fenilmetilsulfonilfluoride

SDS-PAGE e WESTERN-BLOT

L'elettroforesi su gel di poliacrilamide allo 0.8% è condotta seguendo il metodo riportato da Laemmli (Laemmli, 1970). Durante le corse elettroforetiche sono stati inclusi i seguenti marcatori di peso molecolare (Bio-Rad): fosforilasi B (112KD), albumina bovina (84KD), ovoalbumina (53.2KD), anidrasi carbonica (34.9KD), soybean trypsin inhibitor (28.7 KD) e lisozima (18.5KD); direttamente sciolti nella soluzione denaturante 1X e bolliti per 10'.

Il trasferimento delle proteine sul filtro di nitrocellulosa (Hybond-C) è stato seguendo il metodo di Towbin (Towbin et al.1979).

Ibridazione con anticorpo primario

La membrana, lavata con un buffer salino TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5), è immersa in una soluzione saturante (3% gelatina-TBS 1x) e lasciata per circa 1h in agitazione a temperatura ambiente; quindi viene lavata in TTBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5) per 10' in agitazione a temperatura ambiente. La soluzione di lavaggio viene decantata, si aggiunge la soluzione buffer per l'anticorpo primario (1% gelatina-TTBS) e quindi l'anticorpo in una diluizione che può variare soprattutto a seconda che sia omologo o eterologo. La diluizione da noi usata è di 1:500. La reazione di ibridazione viene condotta a temperatura ambiente in agitazione *overnight*.

Ibridazione con anticorpo secondario

Rimossa la soluzione in cui è presente l'anticorpo primario, la membrana viene lavata in TTBS per 5' a temperatura ambiente. Tale lavaggio viene ripetuto una seconda volta. Decantata la soluzione di lavaggio, viene aggiunta la soluzione buffer per l'anticorpo secondario (TTBS-1% gelatina) in cui viene aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina (AP) in opportuna diluizione (2 µl di anticorpo in 6 µl di buffer). Si incuba per circa 1h in agitazione a temperatura ambiente. Decantata la soluzione dell'anticorpo secondario, si effettuano 2 lavaggi della membrana di 5' ciascuno con TTBS e uno finale sempre di 5' con TBS per rimuovere l'eccesso di Tween-20.

Per lo sviluppo del colore si prepara una soluzione costituita da 100 µl di AP color reagente A {NBT in soluzione acquosa di dimetilformamide (DMF) contenente cloruro di magnesio} 100 µl di AP color reagente B {contenente BCIP in DMF} e 10 ml di AP color buffer e vi si immerge la membrana. L'avvenuta reazione antigene-anticorpo è segnalata dallo sviluppo di una banda di colore porpora che appare in un tempo dipendente dalla concentrazione della proteina antigenica, e che comunque non supera i 30'. A reazione avvenuta si lava la membrana 2 volte in H₂O distillata e la si lascia asciugare all'aria prima di conservarla al buio.

Preparazione e fissaggio di cervelli e ghiandole salivari di *Drosophila melanogaster*.

I cromosomi mitotici e politenici di *Drosophila melanogaster* sono ottenuti dissezionando mosche al terzo stadio larvale, in soluzione fisiologica (0.7%NaCl) e separando, rispettivamente, cervelli e ghiandole salivari.

I cervelli, appena dissezionati, sono posti per 10 min in una goccia di soluzione ipotonica, (0.5 M sodio citrato tribasico biidrato) e successivamente fissati per 1' in una goccia di 5:3:2 metanolo/acido acetico/H₂O. Subito dopo lo schiacciamento, i preparati sono stati immersi in azoto liquido, e successivamente trasferiti in ETOH assoluto per circa 20-30'. Le ghiandole salivari, subito dopo la dissezione, sono state trasferite in una goccia di 45% acido acetico, posta su di un vetrino porta oggetto, e incubate per 15'-20' a temperatura ambiente.

Dopo aver posto il coprioggetto ed esercitata una leggera pressione per permettere la distensione dei cromosomi politenici, i preparati sono immersi in azoto liquido, e successivamente trasferiti in EtOH assoluto per circa 30'.

Immunofluorescenza ed ibridazione *in situ* dei cromosomi mitotici e politenici.

I cromosomi mitotici e politenici sono trattati per l'immunofluorescenza come precedentemente descritto.

Preparazione delle sonde: i frammenti di DNA da utilizzare come sonde sono stati marcati per nick-translation con digoxigenina o con biotina; da 1 a 2µg di DNA è stato incubato per 2h a 15°C in nick translation buffer, 0.01%β-mercaptoetanololo, 0.05mM dNTP 11-dUTP-digoxigenina(oppure 11-dUTP-biotina), DNase e DNA polimerasi(10 U).

Il frammento marcato è precipitato utilizzando 3µg di salmon sperm, 1/10 vol. di Na-Ac 3M e 3 volumi di etanolo e successivamente risospeso nella miscela di ibridazione (50% formammide deionizzata, 10% Dextran Sulphate, 2X SSC), in un volume complessivo di 10µl per vetrino.

Ibridazione: i preparati sono disidratati in etanolo 70%, 90% e assoluto, denaturati in 70% formammide-2X SSC a 70°C per 2', nuovamente disidratati nella stessa serie di etanolo ed infine sono incubati *overnight* a 37°C, in camera umida, con la sonda precedentemente denaturata a 80°C per 8'.

Lavaggi: il giorno seguente i vetrini sono lavati in 50% formammide-2X SSC a 42°C ed incubati per 1h con l'anticorpo anti-digoxigenina coniugata a rodamina (o con avidina coniugata a FITC) in 4XSSC, 1%BSA, 0.1% Tween-20. Dopo i lavaggi in 4%SSC contenente 0.1% Tween-20, i preparati sono infine stati colorati con 0.13ug/ml di DAPI in 2XSSC ed i segnali di ibridazione rilevati dalla CCD camera.

Osservazione: tutte le osservazioni citologiche eseguite in questa tesi, sono state realizzate al microscopio ottico di Fluorescenza su cui é stata montata una CCD (charge-coupled-device) camera. Le immagini sono state elaborate e sovrapposte con il programma Adobe Photoshop.

β -Galactosidasi detection di gonadi in *D. melanogaster*.

Le gonadi di femmine di almeno 3 giorni e di maschi nati da un giorno, sono state dissezionate in soluzione Ringer e fissati per 15' in 1% glutaraldeide, 50 mM sodio cacodilato.

I tessuti sono stati lavati per 3 volte con lo staining buffer (7.2 mM NaHPO₄, 2.8 mM NaH₂PO₄, 1mM MgCl₂, 0.5 M NaCl) e lasciati a temperatura ambiente per 30'. Si é proceduto con una incubazione da 12 a 16 a 37°C nella staining solution (basata sul protocollo di A.Fire's e modificata da O.Gaul) contenente per 1 ml: 695µl MgCl₂ 1M, 200µl NaPi(0.5 M pH 7.2), 100µl Redox-buffer 100 mM K(3)Fe(CN)₆, K(4) Fe(CN)₆, 4µl 1%SDS a cui viene aggiunto 1/30 di volume di 8% Xgal (5bromo-4chloro-3indolyl- β alactocyrano).

Dopo incubazione con la staining solution, i tessuti sono lavati con PBS 1X/1mM EDTA, deidratati in soluzioni di EtOH a concentrazione crescente e lasciati con 80% glicerolo/PBS per alcune ore prima di essere montati in una goccia di glicerolo o di antifading. Nella preparazione degli ovari, prima del montaggio finale dei vetrini, i diversi ovaroli devono essere delicatamente separati ed allineati prima di porre il coprioggetto.

Preparazione dei testicoli ed ovari da ibridare con sonde ad RNA.

Questa procedura permette di osservare la colorazione specifica di ribosonde su tessuti che mantengono integro il loro aspetto tridimensionale.

Gli ovari ed i testicoli di *Drosophila* sono dissezionati in PBST (PBS-0.1%Tween-20) e posti in ghiaccio in eppendorf. Si procede fissando per 20' con 200 µl 4%paraformaldeide /PBST, 20 µl DMSO, 600 µl heptano a temperatura ambiente in agitazione. La fase di heptano viene rimossa e si aggiungono 500 µl di 4% paraformaldeide/PBST per 5', quindi la fase superiore é rimossa ed i preparati sono lavati con ME (90% metanolo, 10% 50mM EGTA, pH 8) e reidratati per 5' in 500µl ME / 500µl PF.

Sono di seguito effettuati 3 lavaggi in PBST ed altri 2 ciascuno di 5' sempre in PBST a temperatura ambiente prima di procedere all'incubazione con proteinasi K (50µl/ml) per 5'. Si procede a bloccare la reazione con 2mg/ml di glicina per 2' e si rifissa per 20' con 4%PF/PBST. Si effettuano 5 lavaggi in PBST e si incuba in 1:1 soluzione di ibridazione/PBST e per altri 10' con la sola soluzione di ibridazione a temperatura ambiente. I tessuti così preparati dopo una pre-ibridazione di 1h a 55°C possono essere ibridati con la sonda ad RNA precedentemente marcata.

Preparazione di ribosonde

L'utilizzo di sonde ad RNA marcate con fluorocromi ed utilizzate *in situ* su tessuti "whole-mount" di *Drosophila* offre diversi vantaggi rispetto al convenzionale metodo di "detection" basato sulla fosfatasi alcalina. Per esempio con una sonda fluorescente si producono immagini non diffusibili e ad alta risoluzione. Inoltre è possibile produrre sonde marcate con diversi fluorocromi, ed osservare contemporaneamente eventuali patterns di espressione sovrapposti. E' possibile ottenere sonde ad RNA di senso ed antisense, utilizzando, come nel nostro caso per *hsp83*, per la produzione della sonda di antisense la Sp6 RNA polimerasi e digestione con XbaI, e per la sonda di senso (che per i nostri esperimenti ha costituito il controllo negativo) la T7 Rna polimerasi (entrambe Boehringer Mannheim).

Dopo aver effettuato una digestione (DNA stampo clonato tra due promotori T7, SP6) con l'opportuna endonucleasi di restrizione per la linearizzazione, il DNA estratto è purificato (fenolo cloroformio 1:1) e precipitato in condizioni standard. In seguito è risospeso in acqua priva di RNasi fino ad una concentrazione finale di 1µg/µl ed é quindi

pronto per la reazione di trascrizione in vitro allestita come segue:

1-2µl di Dna linearizzato, 1.5-2.5µl di H₂O, 5X buffer specifico per la Rna polimerasi utilizzata, 2µl di ATP(10mM), 2µl di GTP(10mM), 2µl di CTP(10mM), 1.2µl di UTP(10mM), 0.8µl Digoxigenin 12-UTP(10mM), (Fluorescein Rna labeling mix e Dig Rna labeling mix, Boehringer Mannheim); 2µl DTT 100mM; 0.5µl Placental RNase inhibitor 40U/µl; 2µl di RNA polimerasi 20U/µl per un Volume finale di 30µl.

La reazione viene lasciata ad incubare per 2h a 37°C; circa 4µl del prodotto della reazione sono controllati su gel di agarosio allo 0.8%. Poi si aggiungono 2µl di EDTA 0.5M e si precipitata con 2.5µl LiCl 4M e 75µl di ETOH assoluto. Il pellet ottenuto viene lavato con ETOH al 70% e può essere risospeso in 100µl del buffer di ibridazione (HYB) costituito da: formamide (50%finale), SSC(5Xfinale), Yeast RNA(500µg/ml), Eparina (50µg/ml finale), DNA carrier Salmon Sperm (100µg/ml finale), TritonX-100 0.3%, H₂O RNase free per portare a volume. La ribosonda è denaturata ad 80°C per 3', raffreddata in ghiaccio ed aggiunta ai preparati preibridati nella HYB per 1-2 h a 56°C per 12-16 h.

Dopo l'ibridazione si effettuano 3 lavaggi di 30'ciascuno a 58°C usando 400µl di 3:1 HYB/PBT (PBT=1XPBS + 0.1% Twenn-20); 1:1 HYB/PBT; 1:3 HYB/PBT; l'ultimo lavaggio è fatto in solo PBT.

I tessuti sono poi lavati con PBTB (PBT+ 0.5% latte in polvere il cui utilizzo è indicato per ridurre significativamente il "background"). L'ibridazione con la sonda ad RNA è poi rivelata incubando i tessuti con anticorpo anti-digoxigenina prodotto in pecora (diluizione 1:1000 di una soluzione 0.2 mg/ml Boehringer Mannheim) in PBTB per 2h a 25°C o 12-16 h a 4°C al buio. I tessuti sono lavati per 4 volte con PBTB con cambi ogni 20' e quindi l'anticorpo primario è rivelato incubando i tessuti con anticorpo anti-sheep coniugato con il fluorocromo Cy3 (diluizione 1:2000 di 1 mg/ml; Jackson Immuno Research laboratories) in PBTB per 2h a 25°C o a 4°C *overnight*. Dopo aver lavato i tessuti molte volte in PBTB, essi sono montati in glicerolo al 70% contenente DAPI(Sigma Chemical) ed osservati al microscopio, in fluorescenza, collegato con una CCD camera e le immagini sono, infine, elaborate con il programma Adobe Photoshop.

Preparazione dei testicoli e immunocolorazione con anticorpo.

Questa metodica ci permette di localizzare *in situ*, a livello degli spermatociti, la presenza e la distribuzione della proteina Stellate o Hsp90 riconosciuta dall'anticorpo contro le stesse.

Per la preparazione degli spermatociti si procede alla dissezione, in una goccia di TESTIS BUFFER (TIT), di maschi

adulti, giovani. Una coppia di testicoli è trasferita su di un coprioggetto non siliconato contenente 3 o 4 µl di TIT, quindi, si lascia aderire al coprioggetto un portaoggetto. Si controlla al microscopio a contrasto di fase che il tessuto sia disteso. I vetrini così preparati sono congelati velocemente in azoto liquido e fissati in metanolo (a -20 °C) per 5', quindi si pongono in acetone (a -20 °C) per 1'.

Si procede ad una fase di lavaggio per 10' in una soluzione 0.5% di acido acetico, 1% di Triton X-100 in PBS (1x), quindi si passano i vetrini in PBS (1x) per 3 tre volte per 5'.

I vetrini così trattati sono incubati con l'anticorpo primario ottenuto in topo, diluito 1 a 80 per anticorpo anti-Ste ed 1 a 10 per anticorpo anti-Hsp90 in una soluzione di PBS e 1% BSA, per 1h a temperatura ambiente in PBS 1x quindi si incuba con anticorpo secondario, anti immunoglobulina di topo, per 1h a temperatura ambiente al buio in camera umida e si lava in PBS 1x.

I vetrini sono colorati con una soluzione di DAPI, per 3', che colora in maniera specifica il DNA, quindi si lava 1 volta in PBS e si procede a montare i vetrini con Antifade. I vetrini così preparati possono ora essere osservati al microscopio a fluorescenza. Le immagini possono essere acquisite tramite CCD camera .

TIT (Testis Buffer):

KCl	183 mM
NaCl	47 mM
Tris Hcl	10 mM

DAPI:

60 ml 2 x SSC
80 ml DAPI soluzione madre

PBS 10 x (per 1l):

80 gr NaCl
2 gr Kcl
11.5 Na₂HPO₄ 2 H₂O
2 gr KH₂PO₄
sciogliere in H₂O distillata ed autoclavare

ANTIFADE (per 10 ml):

0.233 gr DABCO
800 µl H₂O
200 µl 1M Tris-Hcl
9 ml glicerolo
10 µl di ioduro di propidio 0.2 mg/ml.

Protocollo alternativo per la preparazione di ovari ed immunocolorazione con anticorpo specifico.

Gli ovari sono dissezionati in EBR (Ringer's solution) freddo e trasferiti in tubi eppendorf contenenti 1x e EBR in ghiaccio.

Eliminato l'EBR, si aggiungono agli ovari 100 µl di buffer devitalizzante e 600 µl di heptano allo scopo di fissarli ed impermeabilizzarli. Si agita vigorosamente per saturare il buffer con l'heptano e quindi si mette sull'agitatore a temperatura ambiente. Quindi si rimuove la soluzione di cui sopra facendo tre lavaggi con PBS da 10' ciascuno. Gli ovari sono pretrattati incubandoli per 10' in PBT e si aggiunge il supernatante all'anticorpo primario diluito 1:20 in PBT; quindi si incuba a 4°C *overnight*. L'anticorpo in eccesso viene eliminato facendo tre lavaggi successivi in PBT e quindi 4 lavaggi, ciascuno di 15', sempre in PBT. Al campione si aggiunge l'anticorpo secondario (1:20 in PBT) coniugato con un fluorocromo (anti-mouse-FITC) e si incuba 2h a temperatura ambiente. Si elimina il sovrinatante e si lava il campione per 15' in PBT ripetendo 4 volte tale lavaggio. Seguono 2 lavaggi in PBS. Si elimina il PBS e si aggiunge una soluzione contenente DAPI (1 µg/µl in PBS) per 5'. Segue un lavaggio in PBS che quindi viene rimosso per poi aggiungere una soluzione 50% glicerolo/PBS e lasciare per 20' per equilibrare gli ovari. Gli ovari sono poi montati su un vetrino con una goccia di glicerolo-PBS (cercando di separare gli ovaricoli tra di loro), al di sopra del quale si pone il coprioggetto. Il vetrino così preparato è osservato con il microscopio a fluorescenza.

1xEBR (Ringer's Solution)

NaCl	130 mM
KCl	4.7 mM
CaCl ₂	1.9 mM
Hepes, pH 6.9	10 mM

Buffer devitalizzante

1 vol Buffer B
1 vol formaldeide 36%
4 vol H₂O

Buffer B

KH ₂ PO ₄ (pH 6.8)	100 mM
KCl	450 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	20 mM

PBT

1XPBS

0.3% Triton X-100

0.5% BSA (frazione V da Sigma)

Recupero della flanking per "Sequence Tag Sites"(STS).

Avendo a disposizione un ceppo di *Drosophila melanogaster* mutagenizzato con un elemento P, questa procedura permette di recuperare le sequenze fiancheggianti il sito di inserzione, il loro sequenziamento e quindi di conoscere la regione genomica in cui l'elemento P si è inserito.

Il DNA viene estratto da moscerini adulti (come descritto in precedenza). Circa 2 γ di DNA sono digeriti con gli enzimi Sau3A, MspI, HinfI, separatamente. Questi enzimi sono presenti rispettivamente all'estremità 5' e 3' di elementi PlacW e PZ(ry+), ed inoltre, ad una certa distanza dal sito di inserzione, nel DNA fiancheggiante. Le digestioni sono incubate a 65°C per 20'.

Viene effettuata una ligazione di circa 1 γ di ciascun digesto in un volume complessivo di 400 μ l, e si incuba a 4°C overnight. La ligasi viene poi precipitata con etanolo assoluto e risospesa in un volume di acqua di 75 μ l.

Circa 10 μ l della ligasi viene sottoposta ad una reazione di amplificazione, utilizzando coppie di primers specifiche delle estremità 5' e 3' di ciascun elemento P utilizzato (ad esempio per l'estremità 5' si può usare la coppia Plac4/Plow, mentre per l'estremità 3' la coppia Pry2/Pry1). Per entrambe le coppie la reazione di amplificazione viene condotta con una temperatura di annealing di 57°C. La Taq polimerasi utilizzata in questo tipo di amplificazioni è l'Expand long template PCR system, che permette di effettuare l'amplificazione in condizioni in cui non si conosce a priori la grandezza dei segmenti amplificati, grandezza che può essere anche di qualche Kb.

La sequenza dei primers utilizzati è:

Plac4 (27) 5'- ACT gTg CgT TAg gTC CTg TTC ATT gTT -3'

Plow (18) 5'- gAA gCC gAT AgCTgCCCT g -3'

Pry1 (26) 5'- CCT TAg CAT gTC CgT ggg gTT TgA TA -3'

Pry2 (28) 5'- CTT gCC gAC ggg ACC ACC TTA TgT TAT T -3'

Circa 10 µl di ciascun amplificato sono controllati su gel di agarosio all'1%.

I frammenti amplificati sono sottoposti a sequenziamento automatico, utilizzando le coppie di primers utilizzate nell'amplificazione.

RISULTATI

PREMESSA GENERALE

Da quanto esposto nell'introduzione, risulta evidente la complessità dei meccanismi molecolari che sottostanno all'interazione tra regioni cromosomiche. Al fine di indagare sui meccanismi che regolano l'espressione delle sequenze *Stellate*, abbiamo caratterizzato alcuni mutanti autosomici che, in quanto maschio sterili e con cristalli negli spermatozoi, mostrano di interferire con l'espressione di *Stellate*.

In particolare sono stati oggetto della nostra ricerca, e di questa tesi di dottorato, tre mutazioni autosomiche: *ms(2L)sting*, *ms(2L)sirio* e *ms(3L)scratch*.

CAPITOLO I

1. Caratteristiche comuni.

Il sistema *crystal-Stellate* provoca, come già descritto, alterazioni nella linea germinale maschile. Per selezionare geni che potrebbero interferire con questo sistema, abbiamo

cominciato a guardare alle caratteristiche fenotipiche presentate da mutazioni maschio sterili, già identificate in altri laboratori. Alcune di queste sono risultate per noi particolarmente interessanti, in quanto nei testicoli di questi maschi era riportata la presenza di aggregati cristallini.

Abbiamo quindi cominciato la caratterizzazione di tre mutanti: *ms(2L)sting*, *ms(2L)sirio* e *ms(3L)scratch*. Nello specifico, *sting* (*sti*) é stato isolato da Schafer (risultati non pubblicati); *scratch* (*scrt*) da Castrillon (Castrillon et al.1993); *sirio* da Gonczy (Gonczy et al.1992).

Per verificare che i cristalli sono il prodotto dell'attivazione delle sequenze *Stellate*, abbiamo utilizzato i seguenti parametri:

1. Analisi a contrasto di fase e per immunocolorazione della forma dei cristalli in presenza di cromosomi X con differenti alleli *Ste*; per ciò abbiamo effettuato incroci specifici (Fig. 5) per inserire cromosomi X con numero di copie note di *Stellate*. Per ciascun mutante abbiamo quindi costruito ceppi recanti cromosomi X sia ad alto numero di copie, *SteW5* (250 copie) e *g3Ste* (300 copie) che a basso numero, *ywSte⁺f* (29 copie).

2. Analisi dell'espressione delle sequenze *Stellate* in questi mutanti autosomici.

1.1 Caratterizzazione citologica della proteina *Stellate*, per immunocolorazione *in situ* con l'anticorpo anti-*Stellate*.

I testicoli estratti da maschi di un giorno omozigoti *sting*, *scratch* ed *sirio* sono stati fissati ed immunocolorati con l'anticorpo anti-*Stellate* (utilizzato in diluizione 1:80 in PBS/BSA O.N.).

Per quanto riguarda *sting*, l'osservazione al microscopio a fluorescenza ha messo in evidenza che maschi *XSte⁺* mostrano una colorazione specifica dei cristalli e che questi sono a forma di ago (Fig. 6b); invece, maschi *XSte* hanno cristalli a forma di stella (Fig. 6c). Quindi, la forma e la composizione dei cristalli in *sting* é del tutto paragonabile al fenotipo osservato nei maschi *ywSte⁺f/Ycry⁻* e *W5Ste/Ycry⁻* (Fig. 4).

Per *scratch*, testicoli di maschi omozigoti, immunocolorati con l'anticorpo anti-*Stellate*, presentano cristalli ad ago sia in presenza dell'allele *Ste⁺* (Fig. 7b) che di *Ste* (Fig. 7c); quale controllo, individui *g3Ste/0* portano cristalli a stella (Fig. 7a). Quindi, *scratch* mostra un comportamento differente, sia rispetto a maschi *sting* che a *X/Ycry⁻*.

Nel mutante *sirio* la immunocolorazione con l'anticorpo anti-Stellate ha messo in evidenza, nei testicoli di maschi Ste^+ , la presenza di granuli interspersi nel citoplasma (Fig. 8b); in maschi omozigoti Ste l'anticorpo riconosce delle strutture ad ago (fig.8c) a livello degli spermatozoi. In questo, *sirio* mostra un fenotipo differente rispetto agli altri due mutanti descritti in precedenza.

Da questa prima analisi, è evidente che in tutti e tre i mutanti vi è la produzione della proteina Stellate, anche se, presumibilmente, in quantità differenti.

1.2 Analisi dell'espressione delle sequenze Stellate nei mutanti autosomici.

In maschi X/Y le sequenze *Stellate* mostrano un pattern di espressione quale mostrato in figura 3. E' presente un trascritto polyA- ad elevato peso molecolare di circa 8000 nt ed uno polyA+ di 1400 nt (Fig. 3 linee 1-3); in maschi con genotipo X/O e $X/Ycry^-$ è presente, in aggiunta, un trascritto eterogeneo di 750-850 nt. Tale trascritto mostra una differenza nella intensità del segnale di ibridazione: infatti individui Ste hanno un segnale più intenso (Fig.3 linea 4) rispetto a quelli genotipicamente Ste^+ (Fig. 3 linea 2).

Per analizzare il pattern di espressione di *Stellate* nei mutanti autosomici considerati, abbiamo effettuato analisi di Northern su RNA totale estratto da testicoli di maschi omozigoti recanti sia l'allele Ste^+ che Ste .

I patterns di espressione ottenuti sono stati comparati con quelli di maschi con genotipo X/Y e $X/Ycry^-$.

Analisi di espressione per *sting*.

Nel mutante autosomico *sting* il pattern di espressione di *Stellate* è comparabile a quello di individui con genotipo $X/Ycry^-$.

Come mostrato in figura 9, il trascritto di 750-850 nt, presente esclusivamente in maschi $X/Ycry^-$ (Fig.9 linea 1), è evidente anche in individui omozigoti *sting* e la sua quantità è direttamente proporzionale al numero di copie del repeat *Stellate* (Fig.9 linee 3-7). Esso è, invece, completamente assente negli eterozigoti (Fig.9 linee 5-6) e nel controllo X/Y (Fig.9 linea 2).

I trascritti di 8000 nt e di 1400 nt sono presenti in maschi X/Y (Fig. 9 linea 2) ed in maschi eterozigoti *sting* (Fig. 9

linee 5-6) ed inoltre negli ovari e, a livello somatico, anche nei cervelli e ghiandole salivari (dato non mostrato).

Analisi di espressione per *scratch*.

Come osservato per *sting*, anche nei maschi omozigoti *scratch* (Fig. 10 linee 4-5-6) è presente il trascritto di 750-850 nt, come nei maschi *X/Ycry-* (Fig. 10 linee 1-2-3), che è invece assente nel *wild type* (Fig. 10 linea 7).

I trascritti di 1400 nt e di 8000 nt sono presenti in tutti i campioni.

Da notare che l'intensità del trascritto di 750-850 nt negli omozigoti *scratch Ste* (Fig.10 linee 5-6) e *Ste+* (Fig. 10 linea 4) è nettamente inferiore rispetto all'intensità dello stesso trascritto in maschi *X/Ycry- Ste* (Fig.10 linee 2-3) e *Ste+* (Fig.10 linea 1), rispettivamente.

Questo dato è in accordo con quanto osservato a livello citologico, dove maschi omozigoti *scratch* sia *Ste* che *Ste+* presentano cristalli ad ago.

Analisi di espressione per *sirio*.

L'espressione delle sequenze *Stellate* nel mutante autosomico *sirio* è in linea con quanto osservato per i precedenti mutanti ma i livelli di trascrizione di *Stellate* per il trascritto di 750-850 nt sono più bassi. In particolare, questi risultano poco evidenti in maschi omozigoti *sirio;XSte+* (Fig. 11 linea 4) e comunque più bassi in combinazione con *XSte* (Fig 11 linea 6) rispetto ai normali livelli di espressione di questo trascritto si *Stellate* in maschi *X/O* (o *X/Ycry-*).

CAPITOLO II

Caratterizzazione genetica e molecolare del mutante autosomico *sting* (*sti*).

2.1 Colorazione con β galattosidasi di tessuti del mutante *sting*.

Gli elementi P modificati sono normalmente utilizzati nella mutagenesi in *Drosophila* perché, come in questo caso, il *P(lacW)* (Bier et al.1989) contiene, tra gli altri, il gene batterico betagalattosidasi (*lacZ*), in modo che l'espressione

di *lacZ* possa eventualmente identificare enhancers tessuto o stadio specifici di *Drosophila* (Fig. 12a). L'espressione specifica del gene reporter può essere visualizzata mediante colorazione per l'attività β galattosidasica.

Nel mutante *sting* l'attività della β galattosidasi è stata rilevata a livello delle gonadi. In particolare nei maschi omozigoti (Fig.12 c) a livello delle primissime fasi della spermatogenesi, spermatogoni e spermatociti precoci. Nelle femmine omozigoti si osserva una colorazione transiente durante lo stadio 6 dell'oogenesi; inoltre allo stadio 9 (Fig. 12e) si colorano in maniera specifica le nurce cells.

2.2 Clonaggio del gene *sting*.

Il mutante autosomico *sting* è stato identificato durante uno screening per fenotipo maschio-sterilità (Shafer, non pubblicati) in circa 2225 linee *P(lacW)* trasformanti (Bier et al.1989).

In *sting* l'inserzione dell'elemento *P(lacW)* è stata mappata, per ibridazione *in situ*, nella regione politetnica 32D del cromosoma II (Schmidt 1996).

Per essere certi che l'inserzione del *P(lacW)* fosse l'unica causa dei fenotipi mutati, è stata indotta la reversione utilizzando l'elemento $\Delta 2-3$ (Robertson et al. 1988). L'analisi dei revertanti *white* ha permesso di osservare un recupero della fertilità e, pertanto, il fenotipo *sting* è correlato alla sola presenza dell'elemento *P(lacW)* nella regione 32D. Il recupero delle sequenze fiancheggianti è stato ottenuto mediante *plasmid rescue*. Il clone recuperato è stato poi utilizzato per uno screening in una libreria genomica in *lambda* ed ha portato all'isolamento di 2 cloni fagici, che si sovrappongono, contenenti in totale circa 35 kb di sequenza genomica.

E' stato isolato un cDNA parziale di circa 1345 nt che, insieme al frammento genomico, è stato sequenziato ed ha permesso di localizzare il sito di inserzione dell'elemento *P(lacW)* a 58 pb a monte del sito di inizio della trascrizione. E' stato isolato, infine, un cDNA con una ORF per una proteina putativa di 866 aminoacidi e con peso molecolare di 99 KD.

2.3 Analisi di espressione di *sting*.

Analisi di Northern rivelano la presenza di un mRNA poliA+ di circa 3000 nt le cui dimensioni sono in linea con il clone di cDNA di 2790 bp identificato. Negli individui *wild type* questo trascritto si accumula prevalentemente nelle gonadi di femmine e maschi, inoltre nelle prime è molto più rappresentato. Nel mutante in omozigosi, sia in maschi che in femmine, l'espressione di *sting* è deregolata; infatti il

trascritto di 3000 nt viene prodotto anche all'esterno delle gonadi e solo nei testicoli dei maschi é presente un trascritto addizionale di 4500 nt (Fig.13). Mentre la natura di questo trascritto addizionale é ancora da chiarire, la deregolazione dell'espressione negli omozigoti potrebbe essere causata dall'inserimento dell'elemento *P(lacW)* al 5' del gene, a monte del sito di inizio della trascrizione.

2.4 Analisi di complementazione.

Nella regione 32D era stato in precedenza localizzato il gene *aubergine (aub)*. La sua struttura, dedotta dall'analisi molecolare, é mostrata in figura 14. Il gene é complessivamente lungo 3671 bp ed é organizzato in 8 esoni e 7 introni.

Il test di complementazione eseguito tra *sting* ed *aub* indica che le due mutazioni rappresentano due alleli dello stesso gene. Per questo *sting* è stato rinominato *aub^{sting}*.

Aubergine é una mutazione ad effetto materno importante per la determinazione della polarità dell'uovo, pertanto é un gene che interviene molto precocemente nello sviluppo (Wilson et al.1996). Il gene *aub^{sting}* codifica per una proteina di 866 aminoacidi, con peso molecolare di 99 Kd; questa proteina, per successive analisi in banca dati, é risultata omologa ad una proteina di *Drosophila* chiamata *Piwi*, che interviene nell'automantenimento delle cellule staminali (Cox et al.1998; 2000).

2.5 Omologia Piwi-Sting e multiallineamento

Come mostrato in figura 15 l'omologia della proteina *Sting* con *Piwi* é del 43% per tutta la sua lunghezza e del 64%, con similarità dell'87% nella regione carbossi-terminale.

E' stato inoltre eseguito per la regione carbossiterminale dal 760 a 866 aminoacido un multiallineamento tra *Sting*, *Piwi*, *Hiwi* (omologo di *Piwi* nell'uomo), *Miwi* (topo), e la proteina prodotta dal gene D2030 di *C. elegans* dove sono state evidenziate le regione aminoacidiche più conservate (Fig. 16) tra le proteine da noi analizzate.

CAPITOLO III

Caratterizzazione genetica e molecolare del mutante autosomico *scratch* (*scrt*).

3.1 Colorazione con β galattosidasi di tessuti del mutante *scratch*.

Come per il mutante *sting*, anche per *scratch* (*scrt*), il costrutto utilizzato per la mutagenesi, *P(PZ)*, (Mlodzik et al.1992) permette di visualizzare l'espressione del gene *lacZ* attraverso la colorazione che evidenzia l'attività della β galattosidasi (Fig.17a).

In maschi omozigoti *scrt* si evidenzia una colorazione diffusa, anche se poco intensa, in tutto il testicolo (Fig.17 c), assente nel controllo (Fig.17 b). Nelle femmine omozigoti *scrt* é ben evidente una colorazione ben definita a livello del germario di ciascun ovario (Fig.17e), completamente assente negli ovari di femmine controllo (Fig.17 d).

3.2 Clonaggio e caratterizzazione di *scratch*.

Anche *scratch* é stato selezionato durante uno screening di mutanti autosomici P-indotti, per fenotipo maschio sterilità.

L'elemento P, mappato *in situ* nella regione politenica 63B del III cromosoma, causa il fenotipo di maschio sterilità e induce a livello degli spermatociti e spermatidi la formazione di aggregati cristallini (Castrillon et al.1993).

L'elemento *P(PZ)* (Mlodzik et al. 1992) utilizzato per la mutagenesi, come altri elementi P modificati permette, per *plasmid rescue*, il clonaggio delle sequenze genomiche fiancheggianti il sito di inserzione dell'elemento P. E' stato recuperato un clone contenete 300 pb fiancheggianti il sito di inserzione. Questo é stato poi utilizzato come sonda per uno screening di una libreria genomica di Canton S nel vettore EMBL4; questo ha portato all'isolamento di un fago positivo contenente una sequenza genomica di 11Kb. Una coibridazione *in situ* tra l'elemento *P(PZ)*, marcato con biotina e rivelato con avidina-rodamina, ed il clone fagico marcato con digoxigenina e rivelato con anti-digoxigenina-FITC, ci hanno permesso di

localizzare perfettamente la sequenza clonata nella regione 63B. Il plasmide di 300 pb è stato sequenziato e l'analisi di sequenza in banca dati ha dimostrato che *scrt* è un allele del gene per la proteina heat-shock HSP 83; questo dato è stato confermato anche dalla mappa di restrizione del fago isolato (non mostrato).

Mutanti del gene *hsp83*, indotti con EMS, erano stati in precedenza isolati e erano tutti letali in omozigosi (Cutforth and Rubin 1994; Van der Straten et al. 1997). Test di complementazione tra *scratch* e 5 differenti mutazioni di *hsp83*, caratterizzate da Cutforth e Rubin, indicano che *scratch* non complementa con nessuna di esse. Questo dato conferma ulteriormente che *scratch* è un allele di *hsp83* e, più interessante, rappresenta l'unica mutazione vitale in omozigosi.

L'analisi di sequenza, da noi effettuata, ci ha permesso di caratterizzare la regione genomica in cui è avvenuta l'inserzione di P. In figura 18 è indicato il sito XbaI (utilizzato per il recupero del plasmide) in posizione -66 e sono indicati 195 nt che precedono le 31 pb dell'inserimento dell'elemento P utilizzato. In conclusione, l'inserimento dell'elemento P è avvenuto nell'unico introne del gene *hsp83* (Hackett and Lis 1993) a circa 200 pb a valle di una "box" (HSE) importante per il riconoscimento al DNA delle proteine heat-shock (Xiao and Lis 1989).

3.3 Analisi dei revertanti.

Il mutante *scratch* è stato ottenuto per trasformazione con l'elemento P(PZ) di 14466 pb (Fig.17a), che porta le seguenti caratteristiche: il marcatore selezionabile *rosy+* (*ry+*), una ORI (origine di replicazione batterica), la resistenza all'antibiotico kanamicina, e specifici siti di restrizione per il *plasmid rescue*. Inoltre questo elemento può essere utilizzato come *enhancer trap* per lo studio, stadio-tessuto specifico, grazie alla presenza del gene per la β galattosidasi. Per verificare che i fenotipi osservati nel mutante sono causati dalla inserzione di P, è stata indotta una rimobilizzazione dell'elemento.

Un revertante *rosy* (rev 22) mostra completa reversione del fenotipo sterilità. Sono state ottenute diverse escissioni imprecise delle quali alcune mantengono il fenotipo maschio sterilità (rev 7, rev 17, rev 11) ed altre portano letalità (rev 52, rev 24). Le linee ottenute sono state poi caratterizzate per PCR e per analisi citologica mirata alla osservazione dei cristalli.

Sul DNA genomico estratto da individui omozigoti (nel caso dei letali da mosche eterozigoti) per ciascuna linea è stata effettuata una prima amplificazione, al fine di saggiare la presenza di P, utilizzando per il 3' la coppia Pry2/*hsp83*-

5'lower; per il 5' la coppia Plower/ hsp83-5'upper (le sequenze dei primers scelti e le modalità di amplificazione sono indicate in Materiali e Metodi). Abbiamo osservato che solo nel caso di rev 22 non c'è alcuna banda di amplificazione ad indicare l'avvenuta escissione precisa dell'elemento P. Nei restanti revertanti abbiamo ottenuto una banda di amplificazione di circa 1125 nt per la prima coppia di primers e di circa 171 nt per la seconda coppia. Su questi è stata effettuata una successiva amplificazione (utilizzando la Taq Expandtm long template per lunghi stampi) con gli oligo Plac4 al 5' e Pry1 al 3', che amplificano esclusivamente l'elemento P(PZ). I risultati ottenuti mostrano che in rev 7 sono delete circa 7 kb dell'elemento P, in rev 17 circa 11 kb e in rev 11 circa 13.6 kb. Nelle linee letali (rev 52 e rev 24) sono deleti circa 4 kb dell'elemento P.

In accordo con i dati molecolari, l'analisi citologica, condotta per immunocolorazione con l'anticorpo anti-Stellate in maschi omozigoti revertanti, ha messo in evidenza l'assenza di cristalli in spermatociti e spermatidi di rev 22; la presenza di cristalli simili a quelli presenti in maschi omozigoti *scratch* nelle linee con fenotipo sterilità (rev 7, rev 17, rev 11). Nelle linee letali (rev 52 e rev 24) non è stato possibile affiancare il dato citologico a quello molecolare per l'assenza di maschi omozigoti.

3.4 Analisi del trascritto di *hsp83*

In figura 19 è mostrato il Northern di *hsp83* su testicoli di maschi controllo (Fig.19 linea 1), X/Ycry-;scrt+/scrt+ (Fig. 19 linea 2), eterozigoti *scrt* (Fig. 19 linea 3) e omozigoti *scrt* (Fig. 19 linea 4). In tutti i campioni è presente il trascritto di 2557 nt di *hsp83* e questo sembra essere sia quantitativamente che qualitativamente paragonabile in tutti i genotipi rappresentati, ad eccezione dei maschi omozigoti *scrt* (linea 4) in cui sembra esserci una riduzione nella quantità.

3.5 Risposta allo shock termico

Avendo dimostrato che *scratch* è un allele di *hsp83* e che l'elemento P(PZ) si è inserito a circa 200 pb dalla regione (HSE) (Xiao and Lis 1989) importante per le proteine haet-shock, abbiamo voluto analizzare sia la quantità del

trascritto di *hsp83* che la quantità di proteina Hsp83 prodotta nei tessuti germinali di *scrt* dopo shock termico.

Le condizioni sperimentali che hanno dato risultati più efficaci sono consistite nel sottoporre gli individui da analizzare per 1h a 37°C, al fine di indurre lo shock termico. A questo, per la sola analisi di Western, abbiamo aggiunto un recupero da 15' a 30', a 25°C.

L'analisi di Northern del trascritto di *hsp83* nei tessuti germinali mostra come i maschi omozigoti *scrt* non rispondono allo shock termico (Fig.20 linea 4) essendo le quantità del trascritto paragonabile sia prima (Fig. 20 linea 3) che dopo (Fig. 20 linea 4) lo shock termico. L'aumento della trascrizione di *hsp83* é invece documentato nel controllo, analizzato sia in assenza (Fig. 20 linea 1) che in presenza di shock termico (Fig. 20 linea 2).

L'anticorpo monoclonale anti-Hsp90 (di uomo e bovino, StessGen) riconosce in *Drosophila* una banda proteica di 83 KD corrispondente alla proteina Hsp83 di *Drosophila*. Nei testicoli di maschi controllo X/Y e X/Ycry-, dopo lo shock termico ed il recupero, si osserva un aumento della quantità della proteina Hsp83 (Fig.21 linee 2 e 6) paragonate alla situazione tal quale (Fig.21 linea 1 e 5); invece, per gli individui omozigoti *scrt* non ci sono differenze tra prima (Fig.21 linea 3) e dopo (Fig.21 linea 4) lo shock termico.

Pertanto, il risultato del Western é in accordo con quanto risulta dal Northern.

3.6 Localizzazione del trascritto di *hsp83* nella linea germinale di individui omozigoti *scratch*

Per meglio caratterizzare i diversi fenotipi causati dall'inserzione dell'elemento *P(PZ)* in *scratch*, abbiamo analizzato la localizzazione *in situ* del trascritto di *hsp83* nei testicoli ed ovari di individui omozigoti. A questo proposito abbiamo costruito una ribosonda di senso e di antisenso, contenente circa 800 nt, clonata in PGEM 7, della sequenza codificante di *hsp83*, così come descritto in Materiali e Metodi.

Nei maschi controllo, in accordo con la distribuzione della proteina Hsp83 (Liu Yue et al.1999), l'RNA di *hsp83* si localizza nel citoplasma delle diverse popolazioni cellulari durante la spermatogenesi (Fig.22a).

Al contrario, nei testicoli di maschi omozigoti la localizzazione del trascritto sembra nucleare e soprattutto non é presente in maniera uniforme, ma si localizza più abbondantemente nella porzione più apicale del testicolo, occupata dagli spermatogoni (Fig.22b).

Precedenti analisi per la localizzazione del trascritto di *hsp83* negli ovari *wild type* (Ding et al. 1993), riportano che questo trascritto é presente ad alti livelli nelle cellule della linea germinale durante tutto lo sviluppo tranne che in due periodi dell'oogenesi. In particolare, l'oogenesi di *Drosophila* può essere suddivisa in stadi distinti che sono ordinati in maniera spaziale e temporale nei singoli ovariooli che compongono ciascun ovario (King 1970). L'espressione dell'RNA di *hsp83* é assente nella regione 1 del germario ed é inizialmente rilevabile nella regione 2-3 del germario in tutte le 16 cellule della "germ line cyst". L'RNA di *hsp83* continua poi ad essere presente dallo stadio 1 allo stadio 5, assente dallo stadio 6 allo stadio 8, e riprende ad alti livelli dallo stadio 9 in poi (Ding et al. 1993).

Nelle femmine omozigoti *scrt* la situazione sembra essere differente (Fig. 23) poiché la nostra analisi *in situ*, con la ribosonda di antisenso per *hsp83*, conferma l'assenza del trascritto nella regione 1 del germario, mentre, a differenza del controllo, esso risulta presente anche dallo stadio 6-8 dell'oogenesi.

3.7 Analisi citologica delle diverse fasi della spermatogenesi del mutante *scratch*

Per comprendere le cause della sterilità dei maschi omozigoti *scrt*, abbiamo analizzato la spermatogenesi dal punto di vista citologico.

Il processo di differenziamento degli spermatozoi, a partire da cellule goniali indifferenziate, é uno dei più complessi processi di sviluppo. Questo si compone di 2 tipi di divisione cellulare: divisioni mitotiche per la moltiplicazione delle cellule goniali e divisione meiotiche che portano alla formazione degli spermatozoi aploidi. Inoltre sia le cellule premeiotiche che postmeiotiche, subiscono ulteriori modificazioni che terminano con la formazione delle code degli spermatozoi. Tutti questi processi definiscono la spermatogenesi.

Noi abbiamo osservato il processo della spermatogenesi in *scrt*, seguendo in particolare sia l'organizzazione della tubulina, utilizzando un anticorpo monoclonale anti- α tubulina (Amersham; Bloese et al. 1982), che la condensazione della cromatina, utilizzando la colorazione con DAPI. L'analisi citologica é stata effettuata secondo quanto descritto da Cenci et al. (1994).

Nella Figura 25 sono mostrate le diverse fasi della spermatogenesi in maschi omozigoti *scratch*. L'analisi della prometafase tardiva della I divisione meiotica (stadio M1), evidenziata a contrasto di fase (Fig.25 a MI) dalla presenza di granuli elettrondensi nel nucleo e negli spermatozoi I e che corrispondono alla disintegrazione delle loops dell'Y

(Bonaccorsi et al.1988), mostra che in alcuni casi la cromatina non é perfettamente organizzata nelle 3 "clumps" (Fig.25 c MI), ma sono evidenti ponti cromatinici (freccia). Inoltre la immunocolorazione con l'anticorpo anti- α tubulina (Fig.25 b MI) evidenzia come le fibre del fuso, che si dispongono ai poli del nucleo, presentino i due asters poco distanziati tra loro.

Durante la telofase I (stadio M5), la cromatina sembra compatta ai poli (Fig. 25 c M5), mentre la tubulina non sembra ben organizzata, in quanto mostra delle zone in cui le fibre sfuggono alla geometria complessiva (Fig.25 b M5).

In diverse prometafasi tardive di spermatociti II (stadio M8) di *scrt* si osserva, come di norma, la scomparsa nella membrana nucleare, ma la condensazione della cromatina non è completa (Fig.25c M8), cromatina che probabilmente sarà persa. Si osservano, inoltre, fusi che in alcuni casi sembrano anomali.

Infine, in telofase II tardiva (stadio M11), si osservano grosse anomalie nella organizzazione della cromatina (Fig.25 c M11) che presenta "spots" sopranumerali.

I difetti citologici da noi evidenziati non sono, probabilmente, così gravi da causare un arresto completo del differenziamento degli spermatozoi e quindi tali da giustificare il fenotipo maschio sterilità, ma sicuramente contribuiscono, con altri fattori non ancora definiti ed in fase di caratterizzazione, a rendere alterata la spermatogenesi in *scratch*.

CAPITOLO IV

Caratterizzazione genetica e molecolare del mutante autosomico *sirio*.

4.1 Colorazione con β galattosidasi di tessuti del mutante *sirio*.

Come descritto per i precedenti mutanti autosomici, il costrutto *P(lacW)* (Bier et al.1989) permette di identificare inserzioni dell'elemento in prossimità di enhancers tessuto o stadio specifici; avvenuta l'inserzione, l'attività della β galattosidasi può essere rivelata per la presenza nel costrutto del gene *LacZ* sotto il controllo di un promotore debole.

Il mutante maschio sterile *ms(1006)* (Gonczy et al.1992), e da noi rinominato *sirio*, mostrava una colorazione β galattosidasi specifica non descritta, in letteratura, in maniera esauriente. Abbiamo, quindi voluto caratterizzare esattamente la colorazione, dovuta alla attività β galattosidasica, nei testicoli di individui *sirio* (come descritto in Materiali e Metodi).

I risultati ottenuti mostrano come nell'omozigote sia presente una netta colorazione (Fig. 26 d) in una posizione piuttosto centrale del testicolo, a differenza di quanto riportato (Gonczy et al. 1992). Tale colorazione é appena evidente in individui eterozigoti *sirio* (Fig.26 c), e completamente assente in maschi controllo (Fig. 26 b).

4.2 Clonaggio ed organizzazione genomica del gene *sirio*.

La mutazione *sirio* é stata isolata (Gonczy et al. 1992) in uno screening per maschio sterili causate dall'inserzione di un unico elemento *P(lacW)*. Da questo screening sono state selezionate 11 linee enhancer trap di trasformanti che manifestavano nei testicoli la colorazione specifica dovuta alla β galattosidasi.

Abbiamo localizzato il punto di inserzione dell'elemento *P(lacW)* nella regione 35B2-35C1 del II cromosoma politenico utilizzando delezioni della regione.

Maschi omozigoti *sirio* sono sterili, mentre le femmine omozigoti sono pienamente fertili.

Dal momento che la mutazione *sirio* é stata indotta dall'inserzione dell'elemento P, é stato possibile adottare la strategia di clonaggio delle flanking mediante "STS"(Sequence Tag Sites). Il DNA genomico estratto di individui omozigoti é stato digerito con gli enzimi di restrizione *Sau3A*, *CfoI*, *MspI*, ed i frammenti ottenuti sono stati poi ligati nelle condizioni descritte in Materiali e Metodi.

Il ligato é stato amplificato utilizzando coppie di primers che vanno rispettivamente, verso l'esterno e verso l'interno dell'elemento P: la coppia per il 5' del sito di inserzione é costituita dai primers *P(lower)/Plac4*, la coppia per il 3' dai primers *Pterm./Pzyl*. Le condizioni di amplificazione ci hanno permesso di recuperare tre amplificati sia per il 5' che per il 3', con diverso peso molecolare, in base all'enzima di restrizione utilizzato. Per il recupero delle flanking al 5' abbiamo preso in considerazione l'amplificato di circa 1700 pb ottenuto dalla digestione con l'enzima *MspI*, e per quella al 3' l'amplificato di circa 600 pb ottenuto sempre con lo stesso enzima.

I due amplificati sono stati clonati nel vettore plasmidico PBS e poi sequenziati. Dall'analisi in banca dati si è stabilito che si tratta di un gene non noto denominato CG12635, localizzato nella regione 35C1-C3 del 2L di *Drosophila*. Il cDNA corrispondente è di 1296 pb. Dai dati di sequenza dell'amplificato di 1700 pb abbiamo localizzato il punto di inserzione nella regione non codificante al 5' del gene, a circa 24 pb dal punto di inizio della trascrizione (Fig.28); il gene complessivamente di 3912 pb risulta privo di introni.

I risultati relativi al frammento di 600 pb al 3' di P ci hanno permesso sia di individuare la ripetizione canonica di 7 pb determinata dall'inserimento di P che di leggere circa 345 pb del gene.

Sulla base della sequenza del cDNA del presunto gene sirio sono stati scelti 2 oligonucleotidi: UA 1006 e LA 1006 (sequenze in Materiali e Metodi) cui sono stati aggiunti rispettivamente i siti di restrizione SacI e XbaI. L'amplificazione condotta su un ceppo controllo, (utilizzando le condizioni standard richieste dalla Taq Platinum; Gibco), ci ha permesso di recuperare un amplificato di circa 800 pb, che è stato successivamente clonato in PBS.

Questo frammento è stato utilizzato per eseguire una ibridazione *in situ* su cromosomi politenici del ceppo Oregon-R. La sonda, marcata per nick-translation con 11dUTPdigoxigenina e rivelata con anti digoxigenina coniugata a FITC, è stata mappata nella regione 35C1 del II cromosoma politenico (Fig. 27), dove in precedenza era stato localizzato l'elemento P(*lacW*).

4.3 Analisi dell'espressione del trascritto di sirio.

L'analisi di Northern, utilizzando come sonda il frammento di cDNA di 800 pb, su RNA polyA+ estratto da Embrioni 0-6h (Fig.29-1), 6-16h (Fig.29-2), pupe (Fig.29-3), maschi (Fig.29-4) e femmine (Fig.29-5) Oregon-R ha mostrato la presenza di un trascritto di circa 1200 nt (in accordo con le dimensioni del cDNA del gene fornito dalla banca dati), presente in tutti gli stadi analizzati.

In particolare, questo trascritto nelle femmine si esprime a livelli più alti rispetto ai maschi (linee 4 e 5), dato controllato confrontando le quantità utilizzate in base alla intensità della sonda rp49 (Fig.29 in basso).

4.4 Analisi della proteina Sirio.

Sulla base della sequenza del gene *sirio* presente in banca dati, è stato possibile predire una proteina teorica, a funzione non nota, di 431 aminoacidi (Fig. 30); questa mostra nella parte carbossiterminale un sito NLS BP (per il segnale di localizzazione nucleare bipartita) compreso tra l'amminoacido 210 e 340 (Fig.30, box azzurra) e tra l'amminoacido 371 e 423 (Fig.30 box rossa), mostra la presenza di un dominio abbastanza conservato, con funzione non nota.

Discussione

Nel presente studio è stata svolta una caratterizzazione genetica e molecolare di tre mutanti autosomici, rispettivamente ***sting (sti)***, ***scratch (scrt)***, ***sirio*** che abbiamo dimostrato interagire con le sequenze *Stellate* di *Drosophila melanogaster*. I criteri da noi adottati per affermare con certezza che questi tre mutanti interferiscono con il sistema *crystal-Stellate* sono stati: l'immunocolorazione dei cristalli con l'anticorpo anti-*Stellate* e l'analisi dell'espressione dell'RNA di *Stellate* specifico dei cristalli.

Le tre mutazioni sono state ottenute durante screening, per fenotipo maschio-sterilità, di mutanti ottenuti dall'inserimento di elementi P del tipo *P(lacW)* per *sting* e *sirio* (Shafer, non pubblicati; Gonczy et al. 1992) e *P(PZ)* per *scratch* (Castrillon et al. 1993). L'inserimento di questi elementi determina una serie di anomalie meiotiche, parzialmente sovrapponibili a quelle presenti in maschi *X/Ycry-*. Queste sono la conseguenza della attivazione delle sequenze *Stellate*, che ha come effetto la produzione di una proteina (Fig.4) che, autoaggregandosi, può dare cristalli ad ago o a stella (Hardy et al.1984; Palumbo et al. 1994; Bozzetti et al.1995). Inoltre, l'analisi dell'espressione di *Stellate* nei testicoli di maschi omozigoti *sting*, *scratch* e *sirio* evidenzia la presenza di un trascritto maturo di 750-850 nt di *Stellate* (Fig.9;10;11); questo trascritto è assente nei maschi eterozigoti, così come nel soma e nelle femmine omozigoti. Da ciò è evidente che l'attivazione di *Stellate*, così come nei maschi *X/Ycry-*, è ristretta alla linea germinale maschile. Comunque, è da notare che, se la quantità di proteina prodotta in maschi *X/Ycry-* è in relazione al tipo di allele (*Ste* o *Ste+*) presente sull'*X*, nei mutanti autosomici, ad eccezione di *sting*, tale relazione non è mantenuta. A questo punto della nostra indagine, possiamo affermare che i mutanti autosomici *sting*, *scratch* e *sirio*, interferiscono con le sequenze *Stellate* attivando la trascrizione delle stesse e quindi la produzione della proteina *Stellate*. Sembra comunque chiaro che l'effetto di *sting* sia completamente sovrapponibile

al *cry-*, tranne che per il trascritto di 8000 nucleotidi ancora presente negli omozigoti *sting* (Fig.9), assente invece negli individui *X/Ycry-*. Per quanto riguarda *scratch* e *sirio* l'effetto sull'attivazione di *Stellate* sembra essere ridotto, come dimostrato sia dai Northern (Fig.10, 11) che dalla forma dei cristalli (Fig.7, 8). Infatti maschi *scrt* con alleli *XSte* (*W5* e *g3*) mostrano cristalli ago, del tutto paragonabili a quelli osservati in maschi *ywSte^f/Y;scrt*. La situazione è ancora più differente per *sirio*, in cui in presenza dell'allele *Ste+* si osservano aggregati cristallini interspersi nel nucleo e nel citoplasma di spermatociti (Fig. 8b), ed in presenza dell'allele *Ste* i cristalli osservati sono ad ago (Fig.8c).

ms(2L)sting

Analisi di complementazione tra *sting* e *aubergine*, un gene precedentemente localizzato nella stessa regione di *sting* (32 D), ha dimostrato che *sting* e *aubergine* sono alleli dello stesso gene, e pertanto è stato rinominato *aub^{sting}*. *Aubergine* è una mutazione femmina sterile; femmine *aubergine* producono embrioni con difetti addominali, dovuti alla errata localizzazione dell'RNA di *oskar*, fondamentale per lo sviluppo posteriore dell'uovo (Schupbach et al. 1991; Wilson et al. 1996).

La struttura del gene *aub^{sting}* è stata caratterizzata (figura 14), ed evidenzia che l'inserzione dell'elemento *P(lacW)* è avvenuta al 5' del gene, a monte del sito di inizio della trascrizione. Questo provoca una probabile deregolazione della espressione del trascritto di *sting* di circa 3000 nt, che è prodotto anche all'esterno delle gonadi; inoltre, solo nei maschi omozigoti *sting* è presente un trascritto addizionale di 4500 nt (Fig. 13).

aub^{sting} è espresso nelle gonadi di entrambi i sessi (Fig. 13) ed in embrioni 0-6h (non mostrato), ed è fornito dalla madre. Questo dato è in parte confermato dall'analisi della colorazione con β -galattosidasi dovuta all'elemento *P(lacW)* (figura 12 a). L'espressione della attività β -galattosidasica nei testicoli è limitata alla regione corrispondente agli stadi precoci (Fig.12 c). Negli ovari, la colorazione è presente allo stadio 6 in maniera transiente, allo stadio 9 nelle nurce cells (Fig.12 e) e quando queste degenerano, a partire dallo stadio 10 della oogenesi, l'attività β -galattosidasica si osserva a livello dell'oocita e poi dell'uovo (dato non mostrato).

La proteina STING, di 866 aminoacidi, ha rivelato alcune interessanti omologie per analisi in banca dati. STING risulta omologa alla proteina PIWI di *Drosophila*; l'omologia che è del 43% lungo tutta la proteina, diventa più alta, 64%, negli ultimi 104 aminoacidi della parte carbossiterminale (Fig.15).

Questa stessa regione é stata ritrovata in altre proteine di organismi anche lontani da un punto di vista evolutivo. E' stato infatti possibile eseguire un multiallineamento tra la proteina STING di *Drosophila* ed altre 22 proteine che mostrano conservazione in questa regione. Quelle più interessanti si sono rivelate la proteina D2030 di *C.elegans*, la proteina umana HIWI, la proteina di topo MIWI, la proteina di *Arabidopsis thaliana* ARGONAUTA. L'omologia PIWI-STING é estremamente interessante, visto il ruolo dimostrato per PIWI. Questa proteina è infatti necessaria all'automantenimento delle cellule staminali germinali (GCS); una mutazione in questo gene causa principalmente il fallimento della divisione asimmetrica delle cellule staminali, che normalmente producono una cistoblasti ed una nuova cellula staminale. L'azione di *piwi*, che agisce con meccanismo abbastanza conservato essendo la sua richiesta somatica e non germinale, si attuerebbe a livello delle cellule somatiche, apicali del germarium, probabilmente fornendo un segnale alle cellule staminali che le indirizzi verso una divisione di tipo asimmetrico in grado di garantire il mantenimento della linea staminale (Cox et al. 1998, 2000).

Da tutte queste informazioni possiamo, per analogia, guardare ad *aub* come ad un gene che potrebbe agire nelle primissime fasi dello sviluppo, e che potrebbe essere implicato in decisioni molto precoci, importanti nel definire le polarità dell'uovo.

La caratterizzazione di un mutante che attiva la trascrizione delle sequenze *Stellate*, *aub^{sting}*, ci ha quindi permesso, in questo caso, di identificare un allele di *aubergine*, la cui azione si esplica nella spermatogenesi.

Una affascinante ipotesi sul meccanismo di azione del gene *sting* è stata recentemente proposta (Tabara et al. 1999), sulla base della omologia di sequenza tra *sting* e uno dei due mutanti selezionati in *C.elegans* che non rispondono al silencing dovuto all' "RNA interference" (RNAi). In generale, in molti organismi, si attua un meccanismo di inibizione gene specifico, attraverso l'azione di un RNA a doppio filamento (dsRNA), con un meccanismo ancora da chiarire *in vivo*.

L'organismo modello usato inizialmente per lo studio di questo fenomeno é stato il nematode *C.elegans* (Fire et al. 1998), anche se fenomeni simili all'RNAi sono riportati in piante, *trypanosomes*, *Drosophila* e *planaria* (Kennrdell et al. 1998; Ngo et al. 1998; Sanchez-Alvorado et al. 1999). La possibilità che questo meccanismo sia conservato in specie diverse, propone una conservazione del ruolo della interferenza mediata da RNA, con un potenziale ruolo biologico nella regolazione dell'espressione genica.

In *C.elegans* diverse osservazioni hanno suggerito che l'RNAi, potrebbe funzionare a livello della regolazione post-trascrizionale (Fire et al. 1998; Tabara et al. 1998), potendo

agire ad esempio sulla degradazione di un mRNA in via di sintesi; questo tipo di informazione sembra trovare riscontro anche nelle piante e in *trypanosomes* (Ngo et al. 1998; Waterhouse et al. 1998).

L'RNAi sembra coinvolto nel meccanismo del "silencing genico", attraverso la distruzione di specifici RNA anche nei vertebrati, come zebrafish, e in embrioni di topo, a dimostrazione che questo meccanismo é in grado di funzionare anche nei mammiferi, ma solo durante le primissime fasi dello sviluppo (Wianny et al. 2000).

In *C.elegans* sono stati identificati due mutanti non letali che sfuggono alla interferenza mediata da RNA, *rde1* e *rde4* (Tabara et al. 1999), che sembrano aver completamente perso la capacità di rispondere all' RNAi. In particolare *rde1* codifica per un membro di una famiglia genica che include piante, *C.elegans*, *Drosophila*, ed omologhi nei vertebrati ed agiscono a livello della linea germinale e nello sviluppo (Bohmert et al. 1998; Cox et al. 1998; Moussian et al. 1998; Lynn et al. 1999). Abbiamo costruito un multiallineamento (Fig.31) tra la proteina STING di *Drosophila*, RDE1 di *C.elegans*, la proteina D2030 di *C.elegans* (con cui per primo *sting* aveva mostrato omologia); la proteina ARGONAUTA di *Arabidopsis thaliana* e la proteina eIF2C di coniglio (Zou et al.1998) implicata nell'inizio della traduzione. Il risultato del multiallineamento (figura 31) mostra un elevato grado di omologia, soprattutto nella porzione carbossiterminale. La conservazione di sequenza potrebbe, quindi, indicare conservazione anche nella funzione.

Vista l'omologia *STING-RDE1*, possiamo ipotizzare una funzione di *sting* nel controllo del silenziamento genico del locus ripetuto, "X-linked" *Stellate* (Tabara et al. 1999). Ad ulteriore sostegno di questa ipotesi é stato recentemente proposto (Gvozdev et al. 2000) un meccanismo di azione e regolazione del sistema *crystal-Stellate*, in cui il silencing delle sequenze *Ste* si realizza con un meccanismo mediato da RNAi.

Questa ipotesi amplierebbe quella fatta in precedenza (Schmidt et al. 1999; Palumbo et al. 1994) in cui si proponeva una repressione delle sequenze X-linked *Stellate* ad opera del locus Y-linked *crystal*, attraverso un meccanismo di sottrazione di componenti utili per l'attivazione della trascrizione del locus X-linked *Stellate*.

Pertanto *aub^{sting}*, in maniera analoga a quanto avviene per *rde1* di *C.elegans*, agendo con un meccanismo di interferenza mediato da dsRNA, potrebbe causare l'espressione inattesa delle sequenze *Stellate* normalmente silenziate. A supporto di questa ipotesi vi é l'evidenza che *sting* agisce nelle primissime fasi dello sviluppo, in cui é più probabile che possa agire l'interferenza.

ms(3L)scratch

Abbiamo caratterizzato *scratch* da un punto genetico e molecolare. La struttura molecolare del gene è stata analizzata a partire dalla sequenza di un frammento di 300 pb recuperato per "plasmid rescue" da omozigoti *scratch*; questo ci ha permesso di definire che l'inserzione del elemento *P(lacW)* è avvenuta nell'unico introne del gene *hsp83* (Hackett and Lis 1993) a valle di una sequenza consensus (HSE) specifica per proteine heat shock (Xiao and Lis,1989). Come risulta dal Northern mostrato in figura 19 l'analisi della trascrizione del gene *hsp83* rivela che il trascritto di *hsp83* è presente anche nei testicoli di maschi omozigoti per la mutazione e risulta, in questi, solo ridotto in quantità. Tuttavia abbiamo dimostrato, attraverso esperimenti di Northern e di Western, che il mutante omozigote *scratch* non risponde alla shock termico (rispettivamente Fig. 20 e 21) non essendoci il normale incremento sia nella trascrizione dell'RNA che nella quantità di proteina HSP83 dopo lo shock. Questa alterata risposta potrebbe essere una probabile conseguenza dell'inserzione dell'elemento P nelle vicinanze della regione HSE (Xiao et al.1989).

Per quanto riguarda *scratch* abbiamo selezionato revertanti *rosy (ry)*; tranne rev 22, alcuni (rev 7, rev 11, rev 17) conservano il fenotipo *scratch* ed altri (rev 52, rev 24) hanno acquisito anche il fenotipo letalità.

E' stato proposto un ruolo della proteina HSP83 nella spermatogenesi (Yue et al. 1999), in quanto, in individui controllo, è presente ad alti livelli nel citoplasma. Tra le molteplici funzioni che Hsp83 svolge nella regolazione del metabolismo cellulare, la proteina è probabilmente coinvolta nella organizzazione dei microtubuli, funzione essenziale per tutte le divisioni cellulari.

Per cercare di comprendere la causa della sterilità maschile nel mutante *scratch* abbiamo analizzato la localizzazione *in situ* del trascritto di *hsp83*, utilizzando ribosonde antisenso, sia nei maschi che nelle femmine omozigoti. Dai nostri risultati emerge che, a differenza del controllo dove si osserva una localizzazione citoplasmatica ed uniforme del trascritto di *hsp83*, nei testicoli di maschi omozigoti *scrt* vi è un accumulo a livello delle popolazioni meno differenziate (Fig.22 b) all'apice del testicolo. Inoltre, la quantità del trascritto è inferiore rispetto al controllo. Questi dati portano a concludere che, se *hsp83* svolge un ruolo fondamentale durante la spermatogenesi, la sua alterata localizzazione potrebbe essere responsabile della sterilità maschile.

Poiché è stato dimostrato (Ding et al. 1993) che *hsp83* si accumula precocemente nell'uovo, abbiamo analizzato ovari di femmine omozigoti *scrt* (Fig.23), mediante l'analisi dei trascritti di *hsp83 in situ*. Il trascritto mostra una

localizzazione citoplasmatica, anche durante gli stadi 6-8 della oogenesi, dove é normalmente assente (Ding et al.1993). E' da notare che tale espressione anomala non produce alcun effetto sulla fertilità nelle femmine. Tuttavia, questo dato risulta per noi molto interessante alla luce del ruolo che *hsp83* ricopre nelle primissime fasi dello sviluppo, essendo uno dei primi messaggeri ad essere localizzati nell'oozita in formazione (Ding et al.1993). Come per il mutante *aub^{sting}*, anche *scrt*, allele di *hsp83*, potrebbe essere utilizzato per definire se questo gene svolge un ruolo durante la spermatogenesi.

E' stato recentemente dimostrato che la proteina HSP90, l'analogo di HSP83 di *Drosophila*, é un componente del "core" del centrosoma; l'utilizzo di inibitori, come la gentamicina, sortiscono l'effetto di produrre una anormale separazione del centrosoma, con la conseguente formazione di un fuso aberrante ed alterata segregazione dei cromosomi (Bodo et al. 2000).

Il ruolo dell'Hsp90, e quindi dell'Hsp83 come membro della stessa famiglia, per la funzione del centrosoma é conservato anche nei vertebrati e nella *Drosophila*.

Tutte queste indicazioni ci hanno indotto a condurre una analisi citologica delle diverse fasi della spermatogenesi del mutante omozigote *scrt*, al fine di collegare la sterilità a qualche anomalia durante la meiosi maschile. Abbiamo condotto la nostra analisi fondamentalmente sulla osservazione della organizzazione del fuso attraverso l'immunocolorazione indiretta con l'anticorpo anti tubulina (Blöse et al. 1982), e alla organizzazione della cromatina colorando con DAPI e confrontando i nostri risultati con quanto descritto per individui *wild type* da Cenci et al. (1994).

I difetti che abbiamo riscontrato nel nostro mutante riguardano la presenza di ponti di cromatina ed asters poco distanziati durante la prometafase I; nelle prometafasi II tardive, accanto alla cromatina condensata, si osservano piccole porzioni non aggregate; in telofase II la cromatina si presenta ai poli formata da più unità, a cui segue un fuso di forma irregolare. Questi difetti, benchè lievi, riflettono probabilmente alterazioni in altri componenti, ancora in fase di caratterizzazione, nella cui organizzazione é importante il ruolo di HSP 83. Questo è in linea con l'osservazione che il mutante *scrt* è l'unico allele vitale in omozigosi poichè è atteso che alterazioni più gravi porterebbero a letalità.

Le ipotesi sulle modalità con cui il gene per la proteina heat-shock Hsp83 intervenga nell'attivazione della trascrizione delle sequenze *Stellate* sono diverse, alla luce delle molteplici funzioni attribuite ad HSP 83. Infatti, sappiamo che Hsp90, alla cui famiglia appartiene Hsp83, svolge un importante funzione come "chaperone" molecolare (Hartl, 1996) per il mantenimento del "folding" delle proteine sia citoplasmatiche che nucleari. Un'altra funzione é legata al

trasferimento del segnale attraverso il pathway di Raf-Ras, con l'attivazione finale di una Map kinasi per il trasferimento del segnale dal citoplasma al nucleo; in particolare *hsp83* è essenziale per la funzionalità di Raf in vivo (Alexandra van der Stratn et al. 1997). Di conseguenza, l'attivazione delle sequenze *Stellate* potrebbe non essere un effetto diretto, quanto piuttosto il risultato indiretto dell'alterazione di uno dei tanti processi in cui è coinvolta l'Hsp83.

ms(2L)sirio

Il terzo ed ultimo mutante da noi studiato è stato *sirio*. Dall'analisi in banca dati abbiamo dedotto che si tratta di un gene non noto, privo di introni (Fig. 28), che presenta un cDNA di 1270 nucleotidi, dato da noi confermato (Fig. 29). Il trascritto è presente in tutti gli stadi di individui *wild type*, e risulta più abbondante nelle femmine (Fig. 29 linea 5) rispetto ai maschi (Fig. 29 linea 4).

Sulla base del cDNA presente in banca dati, è stata dedotta una proteina teorica in cui nella parte carbossiterminale è stato identificato un segnale di localizzazione nucleare NLS BP ed una regione che sembra presente e conservata anche in proteine di altri organismi di funzione ancora non nota (Fig. 30). Il quadro complessivo che emerge dall'analisi su questo nuovo gene porta ad ipotizzare che possa svolgere un importante ruolo durante le prime fasi dello sviluppo.

Un punto da evidenziare è che non abbiamo ancora chiaro il meccanismo di attivazione delle sequenze *Stellate*, nè in condizioni di assenza di *crystal*, nè in presenza delle mutazioni autosomiche descritte. In ogni caso questo sistema ci ha permesso di identificare geni tutti accomunati dal fatto di essere richiesti nelle prime fasi dello sviluppo. Ciò che risulta interessante è il sistema *crystal-Stellate* ci ha consentito di identificare alleli vitali dei geni coinvolti e questo è evidentemente un vantaggio nello studio di questo tipo di geni.

L'analisi di altri mutanti a nostra disposizione e non ancora caratterizzati, ci permetterà di identificare alleli vitali di geni importanti nelle fasi precoci dello sviluppo, come è avvenuto per *sting* e *scratch*, e probabilmente nuovi, come per *sirio*.

Il sistema *crystal-Stellate* si propone quindi, come un sistema utile per la individuazione di geni che svolgono un ruolo nelle prime fasi dello sviluppo.

Lo studio inoltre delle alterazioni prodotte da queste mutazioni potrà in seguito aiutarci a comprendere il reale meccanismo che sta alla base dell'interazione delle sequenze del sistema *crystal-Stellate*.

BIBLIOGRAFIA

Biessmann H, Valgeirsdottir K, Lofsky A, Chin C, Ginther B, Levis R.W, Pardue M.L. (1992)

Het-A, a trasposable element specifically involved in "hearling" broken chromosomes ends in *Drosophila melanogaster*.

Mol.Cell.Biol. 12:3910-3918

Bier E, Vaessin H, Shepherd S, Lee K, McCall K, Barbel S, Ackerman L, Carretto R, Uemura T, Grell E, et al.(1989)

Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector.

Genes Dev. Sep;3(9):1273-87.

Bonaccorsi S, Pisano C, Puoti F, Gatti M.(1988).

Y chromosome loops in *Drosophila melanogaster*.

Genetics. Dec;120(4):1015-34.

Bodo M.H. Lange, Bachi A., Wilm M. and Gonzales C.(2000)

Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates.

EMBO Journal Vol 19(8): 1252-1262

Bohmert K, Camus I, Bellini C, Bouchez D, Caboche M, Benning C.(1998)

AGO1 defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development.

EMBO J. Jan 2;17(1):170-80.

Bozzetti, M.P., Massari, S., Finelli, P., Meggio, F., Pinna, L.A., Boldyreff, B., Issinger, O.G., Palumbo, G., Ciriaco, C., Bonaccorsi, S. (1995)

The Ste locus, a component of the parasitic cry-Ste system of *Drosophila melanogaster*, encodes a protein that forms crystals in primary spermatocytes and mimics properties of the beta subunit of casein kinase 2.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(13):6067--6071

Brown, S.W. and Nur, U. (1964)

Heterocromatic chromosomes in the coccids.

Science 145:130-136

Brown, S.W. (1966)

Heterocromatin .

Science 1966 151:417-425.

Caizzi R, Caggese C, Pimpinelli S.(1993)

Bari-1, a new transposon-like family in *Drosophila melanogaster* with a unique heterochromatic organization.

Genetics. Feb;133(2):335-45.

Castrillon DH, Gonczy P, Alexander S, Rawson R, Eberhart CG, Viswanathan S, DiNardo S, Wasserman SA (1993)
Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis.
Genetics Oct;135(2):489-505

Cenci G., Bonaccorsi S., Pisano C., Verni F., Gatti M. (1994)
Chromatin and microtubule organization during premeiotic, meiotic and early postmeiotic stages of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis.
J. Cell Science 107:3521-3534

Cox, Chao A., Chang L., Qiao D., Lin H. (1998)
A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal
Genes and Development 12:3715-3727

Cox, Chao A, Lin H. (2000)
Piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity is essential for stem cell self-renewal
Development 127:503-514

Cox, G.N., White J.D. and Kiffer B.I. (1986)
Isolation and partial characterization of the X/O spermatocyte crystals in *Drosophila melanogaster*.
Genetics 89: s17(suppl.)

Crouse VL. (1970)
Migration of a broken anesthetic needle: report of a case.
S C Dent J. Sep;28(9):16-9.

Crouse HV, Brown A, Mumford BC. (1971)
Chromosome inheritance and the problem of chromosome "imprinting" in *Sciara* (Sciaridae, Diptera).
Chromosoma. 34(3):324-39 8.

Cutforth T. and Rubin G., M., (1994)
Mutation in Hsp83 and cdc37 impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*.
Cell 77:1027-1036.

Devlin RH, Bingham B, Wakimoto BT. (1990)
The organization and expression of the light gene, a heterochromatic gene of *Drosophila melanogaster*.
Genetics. May;125(1):129-40.

- Dimitri P, Pisano C. (1989)
Position effect variegation in *Drosophila melanogaster*:
relationship between suppression effect and the amount of Y
chromosome.
Genetics. Aug;122(4):793-800.
- Dimitri P.(1991)
Cytogenetic analysis of the second chromosome heterochromatin of
Drosophila melanogaster.
Genetics. Mar;127(3):553-64.
- Ding D, Parkhurst SM, Halsell SR, Lipshitz HD.(1993)
Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and
embryogenesis.
Mol Cell Biol. Jun;13(6):3773-81.
- Elgin,S.C., Jackson SP. (1997)
Chromosomes and expression mechanisms
Curr.Opin.Genet.Dev. 7(2):149-151
- Fanti, L., Berloco, M., Pimpinelli, S. (1994)
Carnitine suppression of position-effect variegation in *Drosophila
melanogaster*.
Molec. gen. Genet. 244(6):588-595
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.(1998)
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in
Caenorhabditis elegans.
Nature. Feb 19;391(6669):806-11.
- Gatti ,M.and Pimpinelli,S. (1992)
Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin.
Annu. Rev. Genet. 26:239-275
- Ganetzky,B.(1977)
On the component of segregation distortion in *D. melanogaster*.
Genetics 86:325-355
- Gonczy P.,Viswanathan S., Dinardo S.(1992)
Probing spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* with
P-element enhancer detectors.
Development 114:89-98.
- Grigliatti, T. (1991)
Position-effect variegation an assay for non histone chromosomal
proteins and chromatin assembly and modifying factors.
Methods Cell Biol. 35:587-627.

Hardy RW, Lindsley DL, Livak KJ, Lewis B, Siversten AL, Joslyn GL, Edwards J, Bonaccorsi S. (1984)
Cytogenetic analysis of a segment of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*.
Genetics. Aug;107(4):591-610.

Hartl FU.(1996).
Molecular chaperones in cellular protein folding.
Nature. Jun 13;381(6583):571-9

Hackett R.W. and Lis J.T. (1983)
Localization of the hsp83 transcript within a 3292 nucleotide sequence from the 63B heat shock locus of *D. melanogaster*.
N.A.R. 11:7011-7030

Henning,W. (1999)
Heterocromatin .
Cromosoma. 108:1-9.

Heitz,E. (1928)
Das heterocromatin der Moose.
Jahrb.Wiss.Bot. 69:762-818.

John,B. (1989)
The biology of eterocromatin;molecular and structural aspect.
In Heterocromatined. Cambridge University(Press)
R.S.Verma. pag.1-147

Laemnli,E.K.(1970)
Clave of structural protein during the assembly of the bacteriophage T4.
Nature 227:680-685.

Levis R.W, Ganesan R, Houtchens K, Tolar LA, Sheen FM. (1993)
Transposons in place of telomeric repeats in place at a *Drosophila* telomere.
Cell 75:1083-1093.

Lifschytz E, Hareven D. (1977)
Gene expression and the control of spermatid morphogenesis in *Drosophila melanogaster*.
Dev Biol. Jul 15;58(2):276-94

Livak KJ. (1984)
Organization and mapping of a sequence on the *Drosophila melanogaster* X and Y chromosomes that is transcribed during spermatogenesis.
Genetics Aug;107(4):611-34.

- Livak KJ.(1990)
Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* *Stellate* genes
and their transcripts.
Genetics Feb;124(2):303-316.
- Lynn K, Fernandez A, Aida M, Sedbrook J, Tasaka M, Masson P,
Barton MK.(1999)
The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis
development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1
gene.
Development Feb;126(3):469-81.
- Lyttle TW.(1991)
Segregation distorters.
Annu Rev Genet.;25:511-57
- Locke J, Kotarski MA, Tartof KD.(1988)
Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in
Drosophila and a mass action model that explains their effect.
Genetics. Sep;120(1):181-98.
- Lori L.Wallrath (1998)
Unfolding the mysteries of heterocromatin.
Current opinion in Genetics e Developpment.
Vol.8:147-153.
- Lovett,J.A.(1983).
Molecular aspects of Y chromosomal function in *Drosophila
melanogaster* spermatogenesis.
Ph.D.Thesis,Indiana University Bloomington Indiana
- Lyon,M.F.(1972)
X-Chromosome inactivation and developmental patterns in
mammalians.
Biol.Rev. Camb Philos Soc. 47(1):1-35
- Mahajan R, Dhar Y, John PC, Sokhey J.(1998)
Merit of mobilization technique in transfer of non-
autotransferable R-plasmids.
J Commun Dis. Dec;30(4):257-61.
- Mason,J.M.and Biessman (1995)
The unusual telimeres of *Drosophila*.
Trens Genetics 11:58-62
- McLean JR, Merrill CJ, Powers PA, Ganetzky B. (1994)
Functional identification of the Segregation distorter locus of
Drosophila melanogaster by germline transformation.
Genetics. May;137(1):201-9.

Merrill C, Bayraktaroglu L, Kusano A, Ganetzky B.(1999)
Truncated RanGAP encoded by the Segregation Distorter locus of
Drosophila.
Science. Mar 12;283(5408):1742-5.

Mlodzik M, Hiromi Y, Goodman CS, Rubin GM. (1992)
The presumptive R7 cell of the developing *Drosophila* eye receives
positional information independent of *sevenless*, *boss* and *sina*.
Mech Dev. Mar;37(1-2):37-42.

Montgomery MK, Xu S, Fire A.(1998)
RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic
interference in *Caenorhabditis elegans*.
Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 22;95(26):15502-7

Monk L.(1988)
Genomic imprinting.
Genes Dev. 2:927-925.

Moussian B, Schoof H, Haecker A, Jurgens G, Laux T.(1998)
Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot
meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis.
EMBO J. Mar 16;17(6):1799-809.

Mlodzik M and Hiromi (1992)
methods in Neuroscience
Academic in Press

Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. (1998)
Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma*
brucei.
Proc Natl Acad Sci U S A. Dec 8;95(25):14687-92

Palumbo, G., Berloco, M., Fanti, L., Bozzetti, M.P., Massari, S.,
Caizzi, R., Caggese, C., Spinelli, L.,
Pimpinelli, S.(1994)
Interaction systems between heterochromatin and euchromatin in
Drosophila melanogaster.
Genetica 94(2-3):267-274

Pardue ML, Hennig W. (1990)
Heterochromatin: junk or collectors item?
Chromosoma Dec;100(1):3-7.

Pardue M.L.and De Baryshe P.G. (1999)
Telomeres and Telomerase.
Chromosoma 108:73-82

- Parsell DA, Lindquist S.(1993).
The function of heat-shock proteins in stress tolerance:
degradation and reactivation of damaged proteins.
Annu Rev Genet.27:437-96
- Parsell DA, Taulien J, Lindquist S.(1993).
The role of heat-shock proteins in thermotolerance.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Mar 29;339(1289):279-85;
discussion 285-6.
- Pimpinelli S, Sullivan W, Prout M, Sandler L.(1985)
On biological functions mapping to the heterochromatin of
Drosophila melanogaster.
Genetics. Apr;109(4):701-24.
- Pimpinelli, S., Bonaccorsi, S., Gatti, M.,
Sandler, L.(1986)
The peculiar genetic organization of *Drosophila melanogaster*
heterochromatin.
Trends Genetics 2(1):17-20
Pimpinelli,S. and Goday,C (1989)
Unusual kinetochore and chromatin diminution in *Parascaris*.
Trends Genetics 5:310-315
- Pimpinelli, S., Dimitri, P.(1989).
Cytogenetic analysis of segregation distortion in *Drosophila*
melanogaster: the cytological organization of the *Responder (Rsp)*
locus.
Genetics 121:765-772
- Powers PA, Ganetzky B. (1991)
On the components of segregation distortion in *Drosophila*
melanogaster. V. Molecular analysis of the *Sd* locus.
Genetics. Sep;129(1):133-44.
- Sanchez Alvarado A, Newmark PA.(1999).
Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during
planarian regeneration.
Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 27;96(9):5049-54.
- Schmidt, A., Palumbo, G., Bozzetti, M.P., Tritto, P., Pimpinelli,
S., Schafer, U.(1999)
Genetic and molecular characterization of *sting*, a gene involved
in crystal formation and meiotic drive in the male germ line of
Drosophila melanogaster.
Genetics 151(2):749-760
- Reuter G, Giarre M, Farah J, Gausz J, Spierer A, Spierer P.
Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of
a gene encoding an unusual zinc-finger protein.

Nature. (1990) Mar 15;344(6263):219-23.

Reuter G, Spierer P.(1992)
Position effect variegation and chromatin proteins.
Bioessays. Sep;14(9):605-12.

Rutherford SL, Lindquist S. (1998)
Hsp90 as a capacitor for morphological evolution.
Nature Nov 26;396(6709):336-42.

Schupbach T., and Wieschaus E. (1991)
Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology.
Genetics 129 :1119-1136

Sharp C.B., Hiller A.L., Holm D.G.(1985).
Further characterization of genetic elements associated with the segregation distortion in *D.m.*
Genetics 110:671-688

Shulz T.(1937)
Variegation in *D.* and the inert chromosome regions.
Proc Natl Acad Sci USA 22; 27-33

Spradling ,A.C., Karpen,G., Claser,R.L. and Zhang,P. (1992)
Evolutionary conservation of developmental mechanism:DNA elimination in *Drosophila*.
In Evolutionary conservation of Developmental mechanisms.
A.Spradling ed.(New York):Wiley-Liss :39-53

Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC.(1999)
The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*.
Cell. Oct 15;99(2):123-32.

Tabara H, Grishok A, Mello CC.(1998)
RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence.
Science. Oct 16;282(5388):430-1.

Temin, R.G., Ganetzky, B., Powers, P.A., Lyttle, T.W., Pimpinelli, S., Dimitri, P., Wu, C.I., Hiraizumi, Y.
(1991)
Segregation distortion in *Drosophila melanogaster*: genetic and molecular analyses.
Am. Nat. 137:287-331

Thrash-Bingham CA, Salazar H, Freed JJ, Greenberg RE, Tartof KD.(1995)

Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology.
Cancer Res. Dec 15;55(24):6189-95.

Tomkiel J, Fanti L, Berloco M, Spinelli L, Tamkun JW, Wakimoto BT, Pimpinelli S.(1995)
Developmental genetical analysis and molecular cloning of the abnormal oocyte gene of *Drosophila melanogaster*.
Genetics. Jun;140(2):615-27.

Tomkiel J, Pimpinelli S, Sandler L.(1991)
Rescue from the abnormal oocyte maternal-effect lethality by ABO heterochromatin in *Drosophila melanogaster*.
Genetics. Jul;128(3):583-94.

Tomkiel J(1990).
Genetic studies on the interaction of abnormal oocyte mutation with heterochromatin in *Drosophila melanogaster*.
Ph.D. thesis Department of Genetics U. of Washington .

Tokuyasu KT, Peacock WJ, Hardy RW. 1977
Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VII.
Effects of segregation distorter (SD) chromosome.
J Ultrastruct Res. Jan;58(1):96-107.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci U S A Sep;76(9):4350-4

Van der Straten A., Rommel C., Dickson B. and Hafer E.(1997).
Hsp83 is required for Raf-mediated signaling in *Drosophila*.
Embo Journal Vol 16(8):1961-1969.

Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. (1999)
Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos.
Biochem Biophys Res Commun. Sep 16;263(1):156-61.

Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB.(1998).
Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA.
Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 10;95(23):13959-64.

Wakimoto, B.T. and Hearn, M.G. (1990)

The effects of chromosome rearrangements on the expression of heterochromatic genes in chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*.

Genetics 125:141-154

Wakimoto, B.T. (1999)

Beyond the nucleosome. Epigenetic aspects of PEV in *Drosophila*.

Cell 93:321-324

Weiler K.S., Wakimoto, B.T. (1995)

Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*.

Annu. Rev. Genet. 29:577-605

Wianny F, Zernicka-Goetz M. (2000)

Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development.

Nat Cell Biol. Feb;2(2):70-5.

Wilson E.W., Connel J.E., Macdonald P.M. (1996)

Development 122:1631-1639

Wu CI, Lyttle TW, Wu ML, Lin GF. (1988)

Association between a satellite DNA sequence and the Responder of Segregation Distorter in *D. melanogaster*.

Cell. Jul 15;54(2):179-89.

Xiao H. and Lis J.T. (1989)

Heat shock and developmental regulation of the *Drosophila melanogaster hsp83* gene.

Mol. Cell. Biol. 9:1746-1753

Yasuhisa A., Luke M., Laemli U.K. (1991).

Chromosomal assembly in vitro topoisomerase II is required for condensation.

Cell 64: 137-148.

Yue L, Karr TL, Nathan DF, Swift H, Srinivasan S,

Lindquist S. (1999)

Genetic analysis of viable Hsp90 alleles reveals a critical role in *Drosophila* spermatogenesis.

Genetics Mar;151(3):1065-79.

Kennerdell JR, Carthew RW. (1998)

Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway.

Cell. Dec 23;95(7):1017-26.

Kobayashi M, Habuchi H, Yoneda M, Habuchi O, Kimata K. (1997)

Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase.

J Biol Chem. May 23;272(21):13980-13986

Uemura T, Ohkura H, Adachi Y, Morino K, Shiozaki K, Yanagida M. (1987)

DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*.
Cell. Sep 11;50(6):917-25.

Zucherkandl, E. (1975)

Reserches sur les proprietés et activitè biologique de la chromatine.
Biochemie 56: 937-954

Zucherkandl Henning W. (1995)

Tracking heterocromatin .
Chromosoma 104:75-83.

RINGRAZIAMENTI

Desidero sinceramente ringraziare la Prof.ssa Maria Pia Bozzetti per aver attivamente contribuito alla mia formazione e crescita scientifica, per le sue qualità umane e per la sua disponibilità unica. Ringrazio inoltre la Dott.ssa Laura Fanti ed il Prof. Sergio Pimpinelli per aver contribuito criticamente al mio lavoro nel corso di questi anni. Infine un pensiero va a quanti lavorano nel gruppo del Prof. Palumbo in particolare alle Dott.sse Rosalba D'Alessandro e Maria Berloco con cui ho piacevolmente condiviso il mio lavoro quotidiano.