

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA
"LA SAPIENZA"**

**FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
DIPARTIMENTO DI GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE**

**Dottorato di Ricerca in
Genetica e Biologia Molecolare**

X CICLO

**Dissezione genetica e molecolare della *loop kl-3*
formata dal cromosoma Y di *Drosophila melanogaster***

Dott. Roberto Piergentili

Docente guida: Prof. M. Gatti

Tutore: Prof. G. Palumbo

FEBBRAIO 1999

INDICE

RIASSUNTO	pag.	3
1. INTRODUZIONE		
1.1 La spermatogenesi in <i>Drosophila melanogaster</i> .	pag.	4
1.2 I fattori di fertilità del cromosoma Y.	pag.	8
1.2.1 Caratterizzazione genetica dei fattori di fertilità.	pag.	8
1.2.2 Le <i>loops</i> formate dal cromosoma Y.	pag.	10
1.2.3 Il DNA delle <i>loops</i> .	pag.	12
1.2.4 Le proteine legate alle <i>loops</i> .	pag.	14
1.2.5 Ipotesi sul ruolo funzionale delle <i>loops</i> .	pag.	16
1.3 Il DNA a tripla elica.	pag.	18
1.3.1 Le conformazioni del DNA	pag.	18
1.3.2 Rilevamento e ruolo del DNA triplex <i>in vivo</i> .	pag.	23
1.4 Scopo e organizzazione della tesi.	pag.	24
2. CAP. 1: Le <i>loops</i> contengono acidi nucleici a tripla elica.		
2.1 Immunocolorazione delle <i>loops</i> di <i>D. melanogaster</i> con anticorpi anti-triplex.	pag.	27
2.2 Analisi dei filamenti che compongono le <i>loops kl-5</i> e <i>ks-1</i> .	pag.	29
2.3 Immunocolorazione delle <i>loops</i> di <i>Drosophila hydei</i> con anticorpi anti-triplex.	pag.	31
2.4 Discussione.	pag.	32
3. CAP. 2: Caratterizzazione molecolare del gene <i>loopin-1</i> e del suo prodotto proteico.		
3.1 Premessa.	pag.	35
3.2 Analisi molecolare di <i>loopin-1</i> .	pag.	36
3.3 Conservazione evolutiva di <i>Loopin-1</i> .	pag.	40
3.4 Immunolocalizzazione di <i>Loopin-1</i> negli spermatozoi di <i>D. melanogaster</i> .	pag.	44
3.5 Ricerca di un mutante di <i>loopin-1</i> .	pag.	45
3.6 Discussione.	pag.	48
4. CAP. 3: Analisi di mutanti autosomici che alterano la formazione della <i>loop kl-3</i>.		
4.1 Premessa.	pag.	51
4.2 Mappatura per delezioni.	pag.	52
4.3 Caratterizzazione biochimica ed ultrastrutturale.	pag.	54
4.4 Discussione.	pag.	57
5. MATERIALI E METODI		
5.1 Allevamento delle drosophile.	pag.	59
5.2 Stocks.	pag.	59
5.3 Allestimento dei preparati citologici dei testicoli.	pag.	60
5.4 Immunofluorescenza indiretta.	pag.	61
5.5 Colorazione con Hoechst33258.	pag.	62
5.6 Ibridazione <i>in situ</i> .	pag.	62
5.7 Osservazione al microscopio.	pag.	63
5.8 Microscopia elettronica.	pag.	64
5.9 Colorazione con oro colloidale.	pag.	64
5.10 Estrazione e sequenziamento del DNA genomico.	pag.	65
5.11 Caratterizzazione biochimica dei mutanti maschio-sterili.	pag.	65
6. BIBLIOGRAFIA	pag.	66
7. SUMMARY		
7.1 Introduction.	pag.	76
7.2 Results and Discussion.	pag.	76
7.3 Conclusions.	pag.	77
8. RINGRAZIAMENTI	pag.	78

RIASSUNTO

Negli spermatociti primi di *D. melanogaster* sono presenti tre strutture analoghe alle *lampbrush loops* degli anfibi, formate dai fattori di fertilità *kl-5*, *kl-3* e *ks-1* presenti sul cromosoma Y. Tali strutture contengono e trascrivono DNA satellite altamente ripetitivo e legano grossi quantitativi di proteine. Scopo della mia Tesi di Dottorato è stato quello di analizzare geneticamente e molecolarmente la *loop kl-3*. I risultati ottenuti sono:

- 1) scoperta che la *loop kl-3* forma delle strutture a tripla elica;
- 2) completamento della sequenza di una delle proteine legate alla *loop kl-3* (*loopin-1*) e dimostrazione che tale proteina è conservata in molti Drosophilidi evolutivamente distanti;
- 3) caratterizzazione di 3 mutazioni autosomiche che alterano la formazione delle *loop kl-3*; è stato dimostrato che 2 di queste mutazioni rendono instabili 2 proteine assonemali ad alto peso molecolare e distruggono la formazione delle braccia esterne di dineina associate ai microtubuli del flagello;
- 4) analisi di una collezione di mutanti maschio-sterili ed individuazione di 15 mutazioni che producono alterazioni di vario tipo nelle *loops*.

1. INTRODUZIONE

1.1 La spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*.

Col termine *spermatogenesi* si intende tutta quella serie di processi che, a partire da una cellula staminale della linea germinale nella gonade maschile, porta alla formazione degli spermatozoi maturi. Dal punto di vista evolutivo la spermatogenesi è un processo altamente conservato. In quasi tutti gli animali le cellule staminali vanno incontro ad un numero fisso di divisioni mitotiche in cui mantengono costante, generazione dopo generazione, sia il grado di ploidia ($2n$) sia la quantità di DNA ($4C$). Dopo queste divisioni la cellula, detta *spermatocita primo*, va incontro ad un processo di accrescimento che viene poi seguito dalla meiosi, attraverso cui si formano quattro cellule identiche, gli *spermatidi*, che differiscono dallo spermatocita primo sia per grado di ploidia ($1n$) che per quantità di DNA ($1C$). I quattro spermatidi si differenziano poi in quattro *spermatozoi* maturi e mobili in grado di fecondare le cellule uovo della linea germinale femminile e dare origine allo zigote. I meccanismi che regolano la morfogenesi cellulare durante la spermatogenesi sono ancora largamente ignoti e costituiscono uno dei problemi più interessanti della biologia dello sviluppo.

Una descrizione sintetica della spermatogenesi di *Drosophila melanogaster* si può trarre dagli studi di microscopia ottica di Cooper (1965), Kemphues et al. (1982) e Fuller (1986), e da quelli di microscopia elettronica riportati da Tates (1971), Lindsley e Tokuyasu (1980), Lin et al. (1981) e Church and Lin (1982, 1985). Inoltre nel nostro laboratorio è stata messa a punto una tecnica (Materiali e Metodi) che ha permesso una dettagliata analisi citologica della spermatogenesi mediante colorazione del DNA con Hoechst33258 e immunocolorazione della tubulina (Cenci et al., 1994). In Figura 1.1 è presentato uno schema riassuntivo della spermatogenesi di *Drosophila melanogaster*.

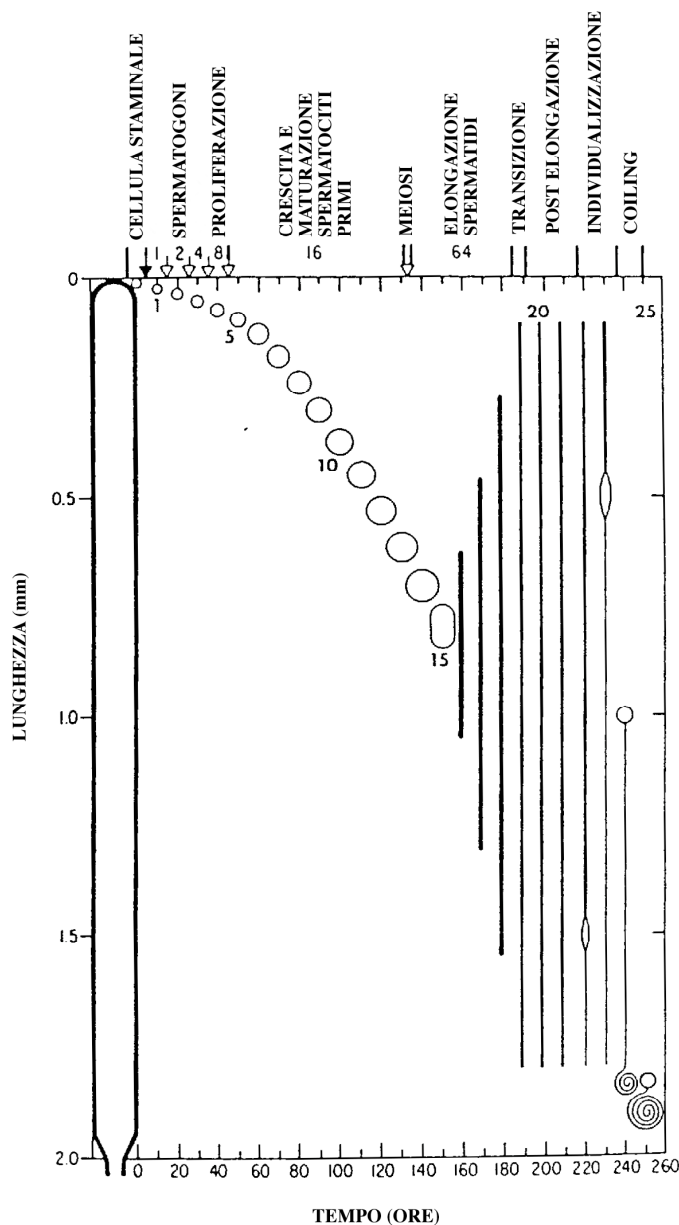


FIGURA 1.1 Rappresentazione schematica della spermatogenesi di *D. melanogaster* in cui è riportata la distribuzione spaziale e temporale delle 25 cisti derivanti da una singola cellula staminale. In ordinata è riportata la posizione di ciascuna cisti all'interno del testicolo; in ascissa è indicata la posizione temporale di ciascuna cisti durante lo sviluppo da cellula staminale a spermatozoo maturo.. Le frecce in alto rappresentano le divisioni cellulari. I numeri tra le frecce indicano il numero di cellule germinali di un determinato stadio presenti in ciascuna cisti. Le linee verticali in alto delimitano i vari stadi del processo di formazione dello spermatozoo.

All'apice del testicolo di *Drosophila* si trova un gruppo di 8-9 cellule staminali. Quando una di queste cellule si divide per mitosi, dà luogo ad un'altra cellula staminale e ad uno *spermatogonio primario*. Gli spermatogoni primari si dividono quattro volte per mitosi dando luogo a *spermatogoni secondari* e, dopo l'ultima divisione, a 16 *spermatociti primi*. Tutte queste divisioni avvengono all'interno di un involucro formato dal citoplasma di due cellule specializzate denominate *cyst-cells*. Tale involucro,

denominato “cisti” insieme alle cellule che lo contengono, permane per la maggior parte della spermatogenesi e subisce modificazioni soltanto nell’ultima fase della spermiogenesi.

La citochinesi che accompagna le mitosi spermatogoniali è incompleta e gli spermatociti primi restano connessi da ponti citoplasmatici che persistono per buona parte della spermatogenesi. Queste cellule vanno incontro ad una fase di accrescimento e maturazione lunga circa 90 ore, durante la quale il volume del loro nucleo aumenta di 25-30 volte. Dal punto di vista morfologico, gli spermatociti primi appena formati sono simili agli spermatogoni, mentre quelli maturi sono facilmente distinguibili da tutte le altre cellule sia per le loro dimensioni fisiche sia per la presenza all’interno del loro nucleo di tre grosse strutture filamentose dette *lampbrush-like loops*, delle quali verrà discusso dettagliatamente più avanti. Gli spermatociti primi che si apprestano ad entrare in meiosi sono invece caratterizzati dalla presenza di granuli fortemente rifrangenti derivanti dalla disintegrazione delle *loops* stesse (Bonaccorsi et al., 1988; Cenci et al., 1994).

In seguito alla meiosi si vengono a formare all’interno della cisti 64 *spermatidi* aploidi. Gli spermatidi appena formati sono ancora cellule citologicamente complete e possiedono pertanto tutti gli organelli come i mitocondri, i ribosomi o il reticolo endoplasmatico. Durante la spermiogenesi (con il termine *spermiogenesi* si indica il processo differenziativo che porta alla formazione degli spermatozoi a partire dagli spermatidi) queste cellule subiscono però profonde modificazioni: il nucleo si riduce notevolmente di volume e la maggior parte del citoplasma e degli organelli in esso contenuti vengono eliminati. Diverso destino hanno invece i mitocondri: negli spermatidi maturi questi organelli sono raggruppati in un’unica massa di forma sferica di circa 7µm di diametro, detta *nebenkern*. L’assemblaggio dei mitocondri in questa fase è molto preciso: il *nebenkern* appare sempre costituito da una serie di membrane concentriche, organizzate come le foglie di una cipolla, per cui questo stadio è stato denominato *onion stage* (Tates, 1971; Lindsley and Tokuyasu, 1980). La presenza del *nebenkern* permette anche di

riconoscere facilmente gli spermatidi: questi infatti risultano formati da un nebenkern, che in microscopia a contrasto di fase appare di colore scuro, associato ad un nucleo di colore chiaro e di uguali dimensioni (molto più piccolo di quello degli spermatociti primi e privo di strutture evidenti all'interno).

All'union stage segue la fase di *elongazione*: il nebenkern si allunga e si divide longitudinalmente in due strutture simmetriche tra le quali passa l'assonema in formazione. Anche il nucleo subisce profonde modificazioni: diventa sempre più allungato e sottile, e riduce il proprio volume di oltre 200 volte. Si viene poi a formare l'*acrosoma*, derivato da materiale proveniente dall'apparato del Golgi, che completa la maturazione degli spermatidi.

L'ultima fase della spermiogenesi è la *individualizzazione*. Questa inizia con la formazione di *coni di accrescimento* membranosi che, a partire dall'acrosoma, si allungano verso l'estremità dell'assonema, separando i 64 spermatidi della cisti. Anche le due cyst-cells si modificano: una diventa la *head cyst-cell* e forma una specie di "cappello" sopra i nuclei degli spermatidi e poi circonda, durante l'individualizzazione, le teste degli spermii tenendole raggruppate in un fascio; l'altra invece diventa la *tail cyst-cell* e avvolge il resto della cisti.

Terminata l'individualizzazione, ha inizio il processo di *coiling*: le code degli spermii vengono impacchettate in un fascio avente sezione esagonale che progressivamente assume una configurazione convoluta. Quindi la *head cyst-cell* si rompe e gli spermii si trasferiscono attivamente e separatamente nelle vescicole seminali. Nei drosophilidi gli spermii maturi sono caratterizzati da una lunghissima coda: in *Drosophila melanogaster* tale struttura raggiunge i 2mm di lunghezza, mentre in *Drosophila hydei* si hanno code di circa 20mm (Lindsley and Tokuyasu, 1980; Lifschytz, 1987) e in *Drosophila bifurca* addirittura di 60mm (Pitnick et al., 1995-1; Pitnick et al., 1995-2).

1.2 I fattori di fertilità del cromosoma Y.

1.2.1 Caratterizzazione genetica dei fattori di fertilità.

Il cromosoma Y di *Drosophila melanogaster* (Fig. 1.2) è un elemento genetico submetacentrico, totalmente eterocromatico, e rappresenta circa il 12% del genoma maschile (Pimpinelli et al., 1976). La principale funzione genetica del cromosoma Y è quella di conferire la fertilità maschile; già Bridges nel 1916 dimostrò che gli individui X/O sono maschi fenotipicamente normali, ma completamente sterili.

Brousseau (1960) ha ipotizzato, in base a studi di complementazione, l'esistenza di 7 fattori di fertilità lungo il cromosoma Y, cinque localizzati sul braccio lungo e due su quello corto, e li ha chiamati, a partire dall'estremità distale del braccio lungo: *kl-5*, *kl-4*, *kl-3*, *kl-2*, *kl-1*, *ks-1* e *ks-2*. Studi successivi non sono riusciti a dimostrare l'effettiva esistenza del locus *kl-4*, per cui attualmente si pensa che l'Y contenga solo 6 fattori di fertilità (Kennison, 1981; Hazelrigg et al., 1982; Gatti and Pimpinelli 1983), per i quali è stata tuttavia mantenuta la stessa nomenclatura proposta da Brousseau. È stato inoltre dimostrato che questi loci svolgono una funzione solo nella linea germinale maschile (Marsh and Wieschaus, 1978), e più precisamente solo negli spermatociti primi (per una review si veda Lindsley and Tokuyasu, 1980).

Le lesioni provocate al normale svolgimento della spermatogenesi nei maschi X/O e in quelli mancanti anche di un solo fattore di fertilità possono essere suddivise in *lesioni precoci* e *lesioni tardive* (Tab. 1.1). Studi ultrastrutturali di maschi recanti le deficienze dei loci *kl-5*, *kl-3* e *ks-1* hanno mostrato tipiche lesioni precoci: i primi due mancano dei bracci esterni di dineina dei doppietti periferici dell'assonema, mentre i maschi deficienti per il locus *ks-1* presentano un errato allineamento dei derivati mitocondriali rispetto all'assonema in formazione (Hardy et al., 1981). I maschi recanti deficienze dei loci *kl-2*, *kl-1* o *ks-2* non mostrano invece lesioni precoci caratteristiche. Essi presentano soltanto le

lesioni tardive comuni anche ai maschi X/O o deficienti per gli altri fattori di fertilità: derivati mitocondriali morfologicamente anormali, errori durante il processo di individualizzazione degli spermatidi, irregolarità nel numero e nella forma dei microtubuli dell'assonema e una generale disorganizzazione delle componenti degli spermatozoi che fa sì che questi degenerino prima della completa maturazione (Kiefer, 1966 e 1973; Meyer 1968; Hess and Meyer, 1968; Hardy et al., 1981).

Una caratteristica peculiare dei fattori di fertilità del cromosoma Y è la loro elevata mutabilità in seguito a trattamenti con radiazioni ionizzanti o con etil metansulfonato (Williamson, 1970 e 1972; Lindsley and Tokuyasu, 1980). E' stato osservato che il cromosoma Y è da una a tre volte più sensibile del cromosoma X all'induzione di mutazioni maschio-sterili (Lindsley and Tokuyasu, 1980). Dal momento che sull'Y sembrano esserci solo sei loci che possono mutare a sterili mentre l'X ne contiene da 100 a 350, si può stimare che i geni di fertilità associati al cromosoma Y siano da 50 a 150 volte più mutabili di quelli associati all'X. Allo scopo di comprendere l'elevata mutabilità dei fattori di fertilità è stata condotta un'estesa analisi citogenetica volta a chiarire l'organizzazione di tali loci. Sono stati caratterizzati mediante varie tecniche di bandeggio più di 300 riarrangiamenti a carico del cromosoma Y che determinano sterilità nel maschio. Tali riarrangiamenti sono stati poi impiegati in esperimenti di mappatura per delezioni che hanno permesso di localizzare con precisione i fattori di fertilità lungo il cromosoma Y (Kennison, 1981; Hazelrigg et al., 1982; Gatti and Pimpinelli, 1983). Uno dei risultati più interessanti di questi studi è stato la dimostrazione che almeno tre dei sei fattori di fertilità, *kl-5*, *kl-3* e *ks-1*, hanno dimensioni fisiche gigantesche (Gatti and Pimpinelli, 1983). Ognuno di questi loci è definito da una serie di punti di rottura che non complementano tra loro, distribuiti lungo estese regioni cromosomiche in cui non sono mai stati trovati punti di rottura compatibili con la fertilità. Tali regioni corrispondono quindi a singole unità funzionali (cistroni) necessarie per la fertilità maschile. Poiché i loci *kl-5*, *kl-3* e *ks-1* corrispondono a regioni cromosomiche che comprendono circa 1/10 della lunghezza totale

del cromosoma Y, le cui dimensioni si aggirano intorno alle 40 Mb (megabasi) di DNA, ciascuno di essi è costituito da circa 4 Mb di DNA, ed è circa 100 volte più esteso di un gene eucromatico medio. La mancanza di un numero sufficiente di punti di rottura a carico degli altri tre fattori di fertilità ha impedito di stabilire se anch'essi abbiano grandi dimensioni fisiche (Gatti and Pimpinelli, 1983; Pisano, Bonaccorsi and Gatti, dati non pubblicati); tuttavia anche questi loci mostrano la stessa, elevata sensibilità di *kl-5*, *kl-3* e *ks-1* agli agenti mutageni (Williamson 1970 e 1972; Lindsley and Tokuyasu, 1980).

1.2.2 Le loops formate dal cromosoma Y.

Le eccezionali dimensioni fisiche dei loci *kl-5*, *kl-3* e *ks-1* possono in parte essere spiegate dal fatto che essi formano tre gigantesche lampbrush-like *loops* all'interno del nucleo degli spermatociti primi (Bonaccorsi et al., 1988). Ciascuna di queste strutture consiste in un aggregato filamentoso più o meno compatto che ad una attenta analisi microscopica risulta costituito da un filamento continuo senza estremità libere evidenti. Questa organizzazione suggerisce che tali aggregati siano formati da due anse chiuse aventi un comune punto di ancoraggio. Due delle tre *loops* appaiono più compatte e costituite da un filamento abbastanza spesso (strutture A e C); l'altra, costituita da un filamento più sottile, appare invece più diffusa (struttura B).

E' stato osservato che le tre *loops* non si sviluppano simultaneamente (Bonaccorsi et al., 1988). Nei nuclei degli spermatociti primi giovani sono presenti soltanto due formazioni compatte corrispondenti ai primordi delle *loops* A e C. Con l'accrescimento di queste cellule tali strutture perdono progressivamente la loro iniziale compattezza ed iniziano a mostrare la loro natura filamentosa. A questo punto compare la *loop* B che si accresce poi rapidamente divenendo ben presto la più grande delle tre. Le *loops* raggiungono le loro massime dimensioni negli spermatociti primi maturi dove occupano gran parte del nucleoplasma. All'inizio della profase meiotica queste strutture si disintegrano

rapidamente formando dei granuli compatti che scompaiono completamente in profase avanzata.

Bonaccorsi e collaboratori (1988) hanno dimostrato che le *loops* possono essere differenziate citologicamente mediante trattamento con Giemsa a pH 10 che colora le strutture A e C, ma non la B. Inoltre questi autori hanno riportato che le *loops* possono essere selettivamente immunocolorate con anticorpi. L'anticorpo *sph-155*, che colora la *loop pseudonucleolo* di *Drosophila hydei* (Hulseboss et al., 1984), decora specificamente anche la *loop B* di *Drosophila melanogaster*. Inoltre l'anticorpo *S5*, diretto contro proteine che si legano ad RNA nascente (Saumweber et al., 1980) immunocolora intensamente la *loop A* e più debolmente la *loop C*.

La possibilità di differenziare le *loops* mediante metodi di colorazione ha permesso di mappare con precisione le regioni cromosomiche che formano tali strutture. A tale scopo sono stati costruiti maschi portatori di vari riarrangiamenti a carico del cromosoma Y, che poi sono stati esaminati citologicamente per la presenza e la normalità delle *loops*. I risultati di queste analisi hanno dimostrato che la regione che forma la *loop B* è coestensiva con il locus *kl-3* e contiene pertanto 4-5 Mb di DNA. La regione che forma la *loop A* mappa invece all'interno del locus *kl-5* coprendo soltanto 1/3 della sua estensione, per circa 1,3 Mb di DNA. La regione che forma la *loop C* è risultata mappare all'interno di *ks-1* e rappresenta anch'essa circa 1/3 del locus contenendo circa 1,3 Mb di DNA. Sulla base di queste osservazioni è stato proposto di denominare le tre *loops* con le sigle dei fattori di fertilità che le producono: la *loop A* è stata denominata *loop kl-5*, la *loop B* *loop kl-3* e la *loop C* *loop ks-1*. L'analisi citogenetica condotta da Bonaccorsi e collaboratori (1988) non ha rivelato la presenza di *loops* in corrispondenza dei fattori di fertilità *kl-2*, *kl-1* e *ks-2*. Appare quindi probabile che questi fattori di fertilità siano organizzati in modo differente da *kl-5*, *kl-3* e *ks-1* e non formino lampbrush-like *loops*. Alternativamente è possibile che questi loci formino delle *loops* che non vengono evidenziate o vengono distrutte dalle tecniche di fissaggio impiegate.

Presi nel loro insieme questi dati suggeriscono fortemente che ciascuna *loop* sia parte integrante di un differente fattore di fertilità e rappresenti la manifestazione citologica della sua attività nei nuclei degli spermatociti primi. Allo stato attuale della ricerca non è chiaro il ruolo delle regioni che non formano *loops* presenti nei fattori di fertilità *kl-5* e *ks-1*. Tali regioni potrebbero formare strutture che non vengono evidenziate dalle tecniche citologiche impiegate, oppure potrebbero essere coinvolte nella regolazione dello sviluppo temporale e/o spaziale delle *loops* durante l'accrescimento degli spermatociti primi (Bonaccorsi et al., 1988).

1.2.3 Il DNA delle *loops*.

Una serie di studi compiuti da Peacock e collaboratori (1978) e da Brutlag (1980; per una review vedi Lohe and Roberts, 1988) hanno dimostrato che circa il 70% del cromosoma Y è composto da DNA satellite altamente ripetitivo. Allo scopo di determinare se i fattori di fertilità e le regioni che formano le *loops* contengano DNA satelliti, sono stati effettuati una serie di esperimenti di ibridazione *in situ* su cromosomi mitotici (Bonaccorsi and Lohe, 1991). I risultati di questi esperimenti, riassunti nella Figura 1.2, hanno dimostrato che la regione h3 da cui si sviluppa la *loop kl-5* contiene tre DNA satelliti a sequenza semplice: il primo formato da ripetizioni della sequenza AAGAG, il secondo formato da ripetizioni dell'eptamero AAGAGAG ed il terzo contenente unità ripetute AAGAC. La regione h21, che ha caratteristiche citologiche simili alla regione h3 e forma la *loop ks-1* contiene soltanto due dei DNA satelliti sopra menzionati, quelli costituiti da ripetizioni dei pentameri AAGAG e AAGAC. Infine la regione h8-9 che forma la *loop kl-3* ibrida soltanto con il DNA satellite costituito da ripetizioni della sequenza AATAT. Per verificare se i satelliti contenuti nelle regioni che formano le *loops* vengono trascritti durante la formazione e l'accrescimento di queste strutture, sono stati effettuati una serie di esperimenti di ibridazione *in situ* RNA/DNA (Bonaccorsi et al., 1990). A tale scopo sono

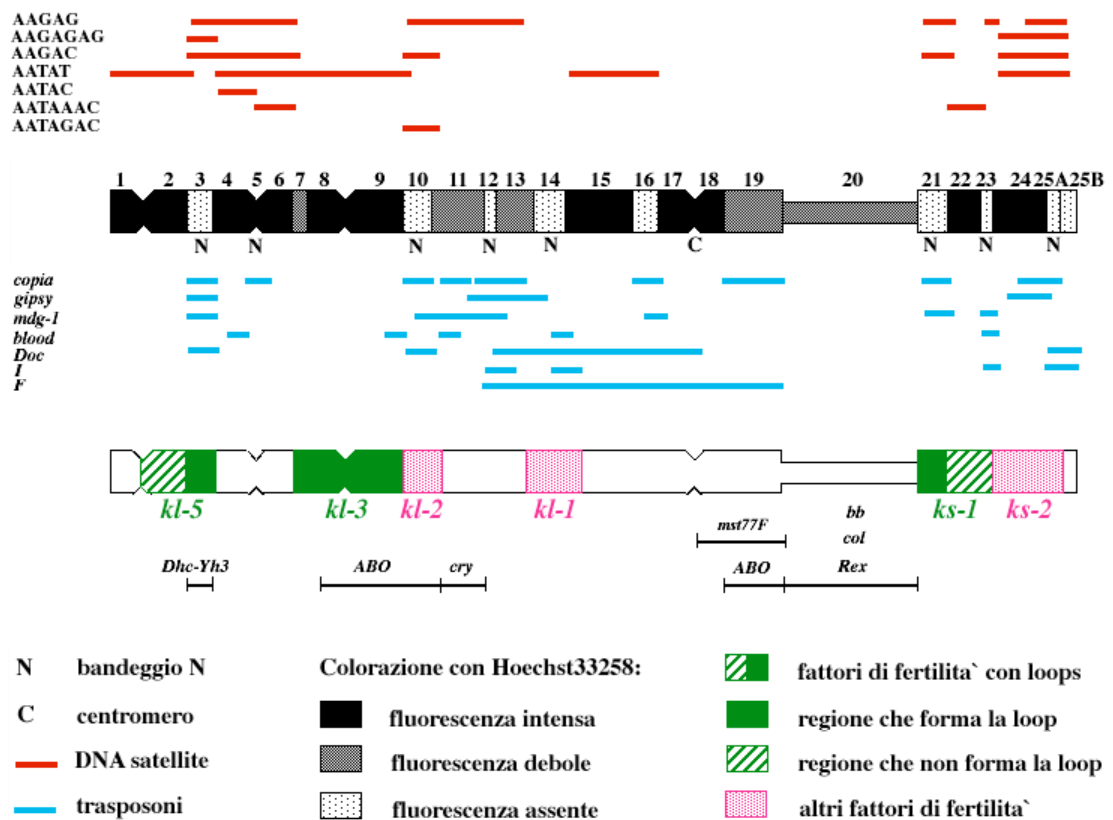


FIGURA 1.2 Rappresentazione schematica del cromosoma Y di *D. melanogaster*. Dall'alto in basso sono indicate: la localizzazione delle sequenze satelliti; il bandeggio che si ottiene mediante colorazione con Hoechst 33258 e la tecnica delle N-bande; la localizzazione delle sequenze trasponibili; la posizione e l'organizzazione dei fattori di fertilita`; la localizzazione di altri elementi genetici associati al cromosoma Y. Questo diagramma è tratto da Bonaccorsi and Lohe (1991), Gatti and Pimpinelli (1992), Russell and Kaiser (1993) e Pimpinelli et al., 1995.

stati allestiti preparati citologici testicolari che non sono stati denaturati prima dell'ibridazione *in situ*, lasciando così disponibili all'ibridazione con sonde di DNA soltanto molecole di RNA. I risultati di questi esperimenti hanno rivelato che le sequenze AAGAG e AAGAC vengono abbondantemente e specificamente trascritte a livello delle *loops kl-5* e *ks-1* (Bonaccorsi et al., 1990; Bonaccorsi, dati non pubblicati). Non sono mai stati osservati trascritti corrispondenti a questi DNA satelliti negli spermatogoni, negli spermatociti secondari o negli spermatidi. Inoltre è stato osservato che i trascritti accumulati

sulle *loops* non sembrano migrare nel citoplasma e vengono degradati insieme alle *loops* durante la profase meiotica I. Questi dati citologici sono stati confermati da esperimenti di Northern blotting che hanno messo in evidenza trascrizione dei satelliti AAGAG e AAGAC nei maschi X/Y ma non nei maschi X/O.

Oltre che di sequenze satelliti, il cromosoma Y è molto ricco anche di sequenze trasponibili (Pimpinelli et al., 1995). Queste sequenze sono state mappate mediante ibridazione *in situ* lungo tutto il cromosoma Y (ad eccezione della zona h20, dove è mappato l'organizzatore nucleolare, e della zona h6-h8, che corrisponde a gran parte del locus *kl-3*), e sono quindi molto abbondanti anche in corrispondenza di tutti i fattori di fertilità (Fig. 1.2). E' interessante notare che per ciascuno degli elementi studiati sono state osservate delle zone di ibridazione discrete che sono notevolmente conservate in popolazioni naturali provenienti da aree geografiche molto distanti. Si può pertanto concludere che ciascun trasposone si sia concentrato in poche aree caratteristiche dove potrebbe anche aver progressivamente acquisito un ruolo funzionale (Pimpinelli et al., 1995). Non è tuttavia noto se gli elementi trasponibili localizzati nei fattori di fertilità siano trascrizionalmente attivi e se abbiano un ruolo nella formazione o nel funzionamento delle *loops*.

1.2.4 Le proteine legate alle *loops*.

Una serie di esperimenti citochimici effettuati da Bonaccorsi e collaboratori (1988) hanno dimostrato che le tre *loops* formate dal cromosoma Y vengono colorate da dansil-cloruro e Coomassie blue, due composti che reagiscono specificamente con le proteine. Con le condizioni sperimentali usate da questi autori questi reagenti colorano le *loops* ma non la cromatina o gli organelli citoplasmatici, indicando che queste strutture accumulano notevoli quantità di proteine. Purtroppo si sa ancora molto poco sulla natura e la funzione

delle proteine legate alle *loops*; finora ne sono state individuate 4 che sono state solo parzialmente caratterizzate.

Una di queste, del peso di 70 Kd, è riconosciuta specificamente dall'anticorpo S5 che è diretto contro una proteina che lega l'RNA nascente (Saumweber et al., 1980; Risau et al., 1983). Tale proteina è associata alla *loop kl-5* ed in minor quantità alla *loop ks-1* (Menzel and Glatzer, 1985; Bonaccorsi et al., 1988). Il ruolo biologico di questa proteina non è attualmente conosciuto, anche se è probabile che serva a stabilizzare gli abbondanti trascritti associati alle *loops kl-5* e *ks-1*.

Una proteina piuttosto ben caratterizzata, che si lega in modo specifico alla *loop ks-1*, è Boule. Il fenotipo dei mutanti in questo gene è quello di un blocco totale della meiosi maschile. Le cellule che non entrano in meiosi differenziano in spermatidi che non riescono però a maturare in spermatozoi e degenerano. L'analisi della sequenza ha mostrato che Boule contiene domini di legame all'RNA, ed è probabile che interagisca direttamente con questo acido nucleico. È interessante notare che l'omologo umano di Boule, denominato *Deleted in Azoospermia* (DAZ), condivide con il gene di *Drosophila* sia la collocazione (il cromosoma Y) sia il pattern di espressione, sia il fenotipo terminale (Eberhart et al., 1996).

La terza proteina è denominata RB97D. Anche questa possiede dei domini in grado di legare RNA, e come le precedenti è legata anch'essa alla *loop ks-1*, anche se sembra che riconosca parti della *loop* che non sono completamente sovrapponibili con quelle riconosciute dall'anticorpo S5. Le mutazioni nel gene che codifica per RB97B provocano la degenerazione degli spermatidi, anche se la proteina è citologicamente rilevabile soltanto prima della meiosi (Heatwole and Haynes, 1996).

La quarta proteina associata alle *loops* è un polipeptide di 53 Kd che è presente sulla *loop kl-3* e nella coda degli spermatozoi. Tale proteina è riconosciuta dall'anticorpo T53-1 che è stato ottenuto iniettando topi con una frazione proteica testicolare di *Drosophila melanogaster* avente un apparente peso molecolare di 53 Kd (Pisano et al., 1993). Saggi

di *Western blotting* hanno mostrato che l'anticorpo *T53-1* riconosce una sola banda in esperimenti di elettroforesi monodimensionale ed un solo spot proteico in elettroforesi bidimensionali, comportandosi quindi come un anticorpo policlonale monospecifico. Esperimenti di immunofluorescenza indiretta e di *Western blotting* hanno chiaramente dimostrato che la proteina riconosciuta dall'anticorpo *T53-1* è un polipeptide testicolare-specifico presente soltanto in quest'organo ed assente da qualsiasi altro tessuto somatico dei maschi o nelle femmine. E' stato inoltre osservato che questa proteina è presente sia nei maschi X/Y che nei maschi X/O, fatto questo che esclude la possibilità che sia codificata dal cromosoma Y. Inoltre dati di immunofluorescenza indiretta hanno mostrato che essa entra regolarmente a far parte dell'assonema in formazione anche nei maschi X/O (Pisano et al., 1993).

Le caratteristiche biochimiche della proteina riconosciuta dall'anticorpo *T53-1* hanno inizialmente suggerito che essa potesse far parte delle tectine, una famiglia di proteine insolubili in sarkosyl-urea che formano filamenti lungo gli assonemi. Sulla base di questa ipotesi è stata estratta la frazione sarkosyl-urea insolubile dalle code degli spermatozoi di *Drosophila melanogaster* ed è stato dimostrato che essa consta di 4 specie proteiche maggiori. Esperimenti di *Western blotting* hanno messo in evidenza che una di queste reagisce fortemente con l'anticorpo *T53-1* (Pisano et al., 1993). Come verrà descritto nei risultati di questa Tesi, il clonaggio del gene che codifica per questa proteina (denominata Loopin-1) ha dimostrato la sua omologia con una leucina-amminopeptidasi presente nella lente oculare dei bovini. Al momento non è noto quale possa essere la funzione di Loopin-1, anche perché risulta sconosciuto anche il ruolo della sua omologa bovina.

1.2.5 Ipotesi sul ruolo funzionale delle *loops*.

Il fatto che le *loops* accumulino proteine suggerisce che queste strutture svolgano un ruolo strutturale; in altre parole, il loro compito potrebbe essere quello di creare una

impalcatura sulla quale andrebbero a depositarsi alcune proteine coinvolte nella spermatogenesi. Tali proteine potrebbero essere semplicemente accumulate sulle *loops* in attesa della loro utilizzazione; alternativamente una volta associate alle *loops* potrebbero essere preassemblate tra di loro, o subire delle modificazioni post-traduzionali necessarie al loro corretto funzionamento negli stadi postmeiotici. In ogni caso la mancanza delle *loops* provocherebbe un errato assemblaggio dell'assonema, e questo si risolverebbe nelle lesioni a carico del flagello degli spermatozoi descritte in precedenza. E' anche stato ipotizzato che le *loops* formate dal cromosoma Y, presenti solo nel genere *Drosophila*, si siano evolute per facilitare il normale sviluppo delle lunghissime code degli spermatozoi di questi insetti (Pisano et al., 1993).

Un altro possibile ruolo dei fattori di fertilità che formano le *loops* è stato proposto da Goldstein et al. (1982) che hanno osservato che deficienze dei loci *kl-2*, *kl-3* e *kl-5* provocano l'assenza di quattro polipeptidi ad alto peso molecolare ($M_r \sim 300-400$ Kd). L'analisi ultrastrutturale ha inoltre messo in evidenza che le deficienze di *kl-3* e *kl-5* causano l'assenza dei bracci esterni di dineina dei doppietti periferici dell'assonema (Tabella 1.1). Sulla base di questi dati gli autori hanno ipotizzato che i loci *kl-5* e *kl-3*

TABELLA 1.1: fenotipi dovuti all'assenza dei fattori di fertilità del cromosoma Y di *D. melanogaster*.

Fattore di fertilità mancante	Lesioni precoci (premeiotiche)	Lesioni tardive (postmeiotiche)
<i>kl-5</i>	assenza della <i>loop</i> A	Assenza dei bracci esterni di dineina dei doppietti periferici dell'assonema; assenza di un polipeptide ad alto peso molecolare (M_r ca. 300Kd); errata individualizzazione degli spermatozoi (sincizi); mancata espulsione dei residui citoplasmatici dagli spermatozoi; code non mobili.
<i>kl-3</i>	assenza della <i>loop</i> B	Assenza dei bracci esterni di dineina dei doppietti periferici dell'assonema; assenza di un polipeptide ad alto peso molecolare (M_r ca. 300Kd); errato allineamento assonema/derivati mitocondriali.
<i>kl-2</i>	-----	Assenza di un polipeptide ad alto peso molecolare (M_r ca. 350Kd)
<i>kl-1</i>	-----	Errato allineamento assonema/ <i>nebenkern</i> ; mancanza delle strutture tubulari nel <i>lumen</i> delle cisti; <i>coiling</i> errato; perdita dell'orientamento degli spermatozoi; perdita degli spermatozoi nella cisti; code degli spermatozoi immobili; è noto un mutante sterile con code mobili.
<i>ks-1</i>	assenza della <i>loop</i> C	Mancanza delle strutture tubulari nel <i>lumen</i> delle cisti; errato allineamento assonema/ <i>nebenkern</i> ; maggior numero di spermatozoi irregolari rispetto ai mutanti di <i>kl-1</i> ; <i>coiling</i> apparentemente normale ma con code degli spermatozoi immobili.
<i>ks-2</i>	-----	Errato allineamento assonema/ <i>nebenkern</i> dall' <i>onion stage</i> in poi; errori nell'individualizzazione: <i>nebenkerns</i> senza assonemi e viceversa (fenotipo simile ai mutanti di <i>kl-5</i>).

contengano le sequenze codificanti per le dineine assonemiche. A conferma di questa ipotesi Gepner e Hays (1993) hanno dimostrato la presenza di un gene per la catena pesante di una dineina assonemica, denominato *Dhc-Yh3*, nella banda h3 del cromosoma Y di *D. melanogaster*, in corrispondenza del locus *kl-5*. Inoltre, è stato dimostrato che in *D. hydei*, all'interno del fattore di fertilità *threads*, che per molti versi risulta essere analogo al locus *kl-5* di *D. melanogaster*, è stato trovato un gene per la dineina omologo a *Dhc-Y3h* (Kurek et al., 1998).

A questo punto si possono fare due osservazioni. La prima è che le due teorie esposte non si escludono necessariamente. E' infatti del tutto plausibile che all'interno delle sequenze satellite, aventi la funzione strutturale proposta da Bonaccorsi e collaboratori (1988) e da Pisano e collaboratori (1993), siano anche presenti delle sequenze codificanti (Gepner and Hays, 1993). Rimane tuttavia da stabilire se queste sequenze codificanti, che almeno nel caso del gene *Dhc-Y3h* vengono trascritte, producono effettivamente delle proteine funzionali coinvolte nella spermatogenesi. Parallelamente, non è ancora noto il ruolo funzionale delle proteine legate alle *loops*. In particolare sarebbe importante stabilire se queste proteine si legano alle *loops* solo per stabilizzarle o se tale legame è un prerequisito per il loro corretto funzionamento.

1.3 Il DNA a tripla elica.

1.3.1 Le conformazioni del DNA.

Varie sono le forme tridimensionali in cui è possibile trovare il DNA. Senza dubbio, la più nota è la cosiddetta "forma B" (DNA-B), quella scoperta da Watson e Crick, caratterizzata biochimicamente da 10,4 coppie di basi per giro d'elica, passo d'elica di circa 3,4nm, diametro di circa 2,3nm e andamento destrorso. Ben presto si scoprì però che questa struttura non è rigida, bensì varia a seconda delle condizioni chimico-fisiche in cui il

DNA stesso si trova. Infatti quando cristalli di DNA-B vengono disidratati o viene diminuito il loro contenuto salino, la molecola di DNA si accorcia e diventa più tozza, assumendo una conformazione nota come DNA-A. In questo caso si hanno circa 11 coppie di basi per giro d'elica, il passo diminuisce fino a 2,46nm, il diametro sale a 2,55nm e l'orientamento spaziale relativo delle basi azotate varia notevolmente; l'andamento e il tipo di appaiamento a livello delle basi azotate resta invece invariato. Anche la composizione in basi del DNA può avere grande influenza sulla sua stessa struttura. Ad esempio, in un filamento con nucleotidi C e G alternati, in presenza di una elevata concentrazione di cationi, il DNA assume una conformazione nota come DNA-Z. Questo DNA, più lungo e sottile del DNA-B, ha 12 coppie di basi per giro d'elica che, a livello del legame glicosidico, sono alternativamente *sin* e *anti*, dando all'intera struttura un andamento sinistrorso e a "zig-zag" (da cui il nome). Questo DNA ha un passo di ben 4,56nm e un diametro di soli 1,84nm; inoltre il solco maggiore del DNA-B nel DNA-Z diventa una superficie convessa senza alcun solco, mentre il solco minore si trasforma in una profonda fessura.

TABELLA 1.2: parametri molecolari del DNA triplex (da Frank-Kamenetskii e Mirkin, 1995).

	Triplexes				B-DNA	A-DNA
	YR*Y		YR*R			
	X-ray	NMR	X-ray	NMR		
Axial rise (Å)	3.3	3.4	—	3.6	3.4	2.6
Helical twist (°)	31	31	—	30	36	33
Axial displacement (Å)	-2.5	-1.9	—	-1.9	-0.7	-5.3
Glycosidic torsional angle	anti	anti	—	anti	anti	anti
Sugar pucker	C2' endo	C2' endo	—	C2' endo	C2' endo	C3' endo

Tra la fine degli anni '50 ed i '60 si cominciò a studiare un'altra forma alternativa del DNA, che venne poi chiamato *triplex* o DNA a tripla elica (Felsenfeld et al., 1957). La formazione di questo tipo di DNA, i cui parametri biochimici sono indicati in Tabella 1.2, è dovuta all'inserimento di un singolo filamento di acido nucleico (RNA o DNA) all'interno

del solco maggiore di un duplex di DNA, RNA o misto (Wells et al., 1988; Frank-Kamenetskii and Mirkin, 1995; Spink and Chaires, 1999). Il filamento che si inserisce nel duplex è di solito antiparallelo rispetto all'omologo del duplex (Moser and Dervan, 1987; Beal and Dervan, 1991), è stabilizzato dalla formazione di legami idrogeno con le basi azotate del duplex (detti *legami Hoogsteen*) (Figura 1.3) e porta alle strutture che è possibile vedere nella Figura 1.4.

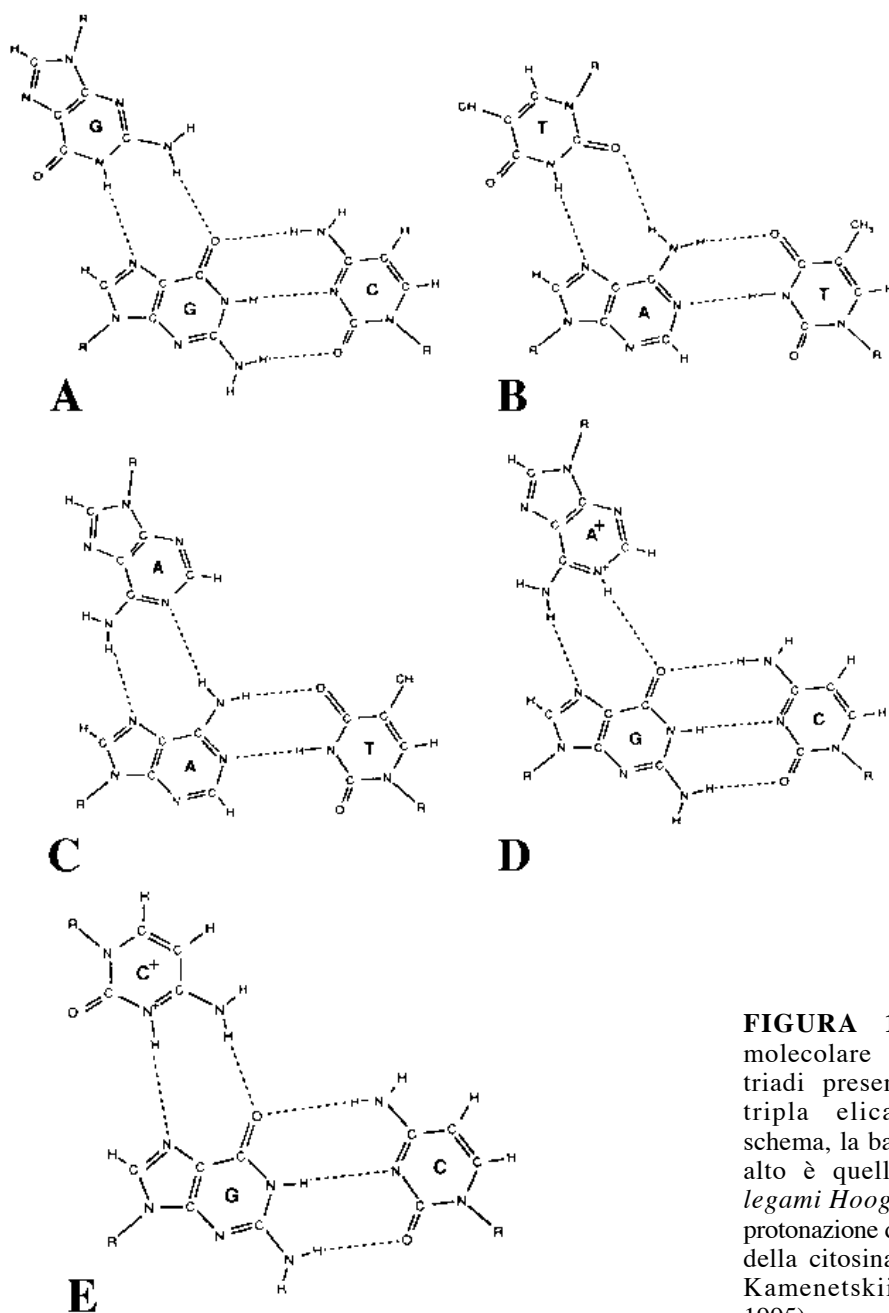
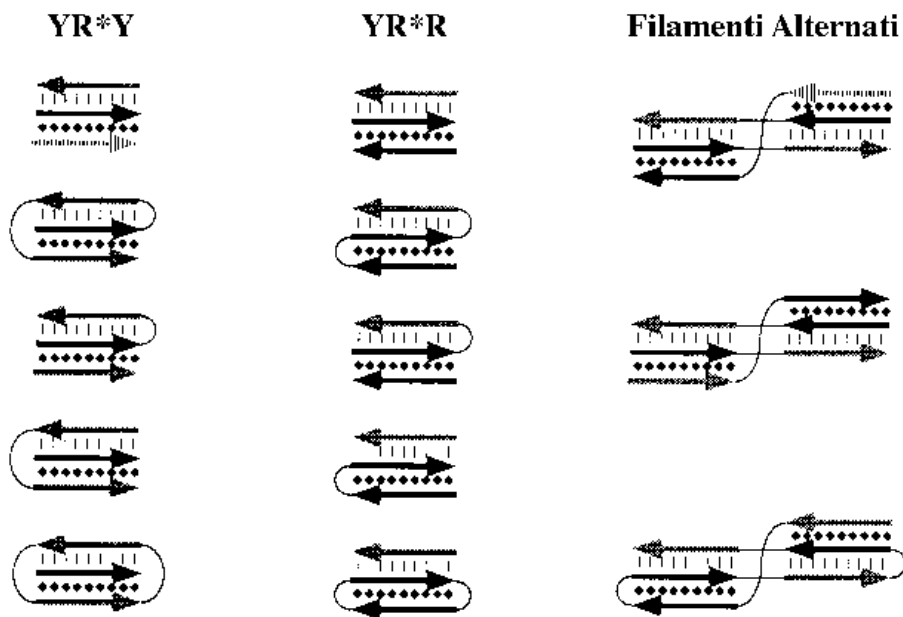
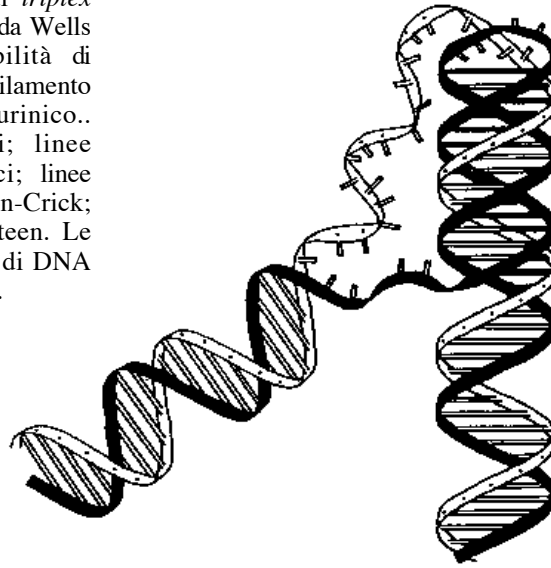


FIGURA 1.3 Struttura molecolare di alcune delle triadi presenti nel DNA a tripla elica. In ciascuno schema, la base azotata più in alto è quella che forma i *legami Hoogsteen*. Notare la protonazione dell'adenina (D) e della citosina (E) (da Frank-Kamenetskii and Mirkin, 1995).

FIGURA 1.4 In alto, un modello di *triplex* intramolecolare composto di solo DNA (da Wells et al., 1988). Sotto, varie possibilità di associazione dei triplex. Y: filamento omopirimidinic; R: filamento omopurinico.. Linee intere: filamenti omopurinici; linee tratteggiate: filamenti omopirimidinici; linee verticali: legami idrogeno di tipo Watson-Crick; rombi: legami idrogeno di tipo Hoogsteen. Le frecce indicano la polarità dei filamenti di DNA (da Frank-Kamenetskii and Mirkin, 1995).



Come già accennato prima, tutte le combinazioni tra acidi nucleici possono formare un triplex: i tre filamenti possono essere solo DNA, solo RNA o misti con tutte le possibili combinazioni di DNA e RNA. Quello che cambia è la stabilità delle diverse combinazioni (Roberts and Crothers, 1992; Escude et al., 1993; Booher et al., 1994; Wang et al., 1994); in generale, si può affermare che i triplex più stabili risultano essere quelli in cui tutti e tre i filamenti sono di DNA o in cui ci sia un filamento di RNA inserito in un duplex di DNA (Han and Dervan, 1993), con questi ultimi in certi casi più stabili dei primi (Escude et al.,

1992). Una volta formato, il triplex può indurre la sua stessa estensione nelle zone immediatamente adiacenti, anche se queste non contengono sequenze adatte a subire questa transizione (Kohwi-Shigematsu and Kohwi, 1985; McCarthy and Heywood, 1987; Boles and Hogan, 1987).

Per la formazione dei triplex devono di norma sussistere delle condizioni particolari sia dal punto di vista della sequenza nucleotidica sia dal punto di vista chimico-fisico. Per quanto riguarda la sequenza nucleotidica inizialmente sembrava necessario che ci fossero su di un filamento del duplex solo purine e, ovviamente, sull'altro solo pirimidine. Queste sequenze sono sovrarappresentate rispetto all'atteso in tutti i genomi eucariotici (Behe, 1987) e nei virus eucariotici (Beatty and Behe, 1988), mentre non lo sono né in *E. coli* né nei batteriofagi (con l'eccezione del batteriofago I_{ke}). È stato però successivamente dimostrato che si possono avere triplex anche senza avere necessariamente un filamento omopurinicco; questi triplex, oltre ad essere altrettanto stabili in condizioni fisiologiche, sono in grado di bloccare l'attività *in vitro* della DNA-polimerasi (Dayn et al., 1992).

Per quanto riguarda le condizioni chimico-fisiche che favoriscono la formazione dei triplex *in vitro*, la prima e più importante è la presenza di un ambiente acido con un pH uguale o inferiore a 5,5. Questo è dovuto al fatto che per facilitare l'interazione tra le basi azotate della triade è necessario che l'adenina e la citosina del terzo filamento vengano protonate in modo da poter formare legami idrogeno con la guanina (Figura 1.3). In assenza di questi legami supplementari il triplex può formarsi, ma risulta altamente instabile. Inoltre è richiesta anche un'alta concentrazione di ioni Mg^{2+} o comunque di cationi bivalenti che aiutano a stabilizzare la triade C*GC alleviando le tensioni elettriche e steriche che si vengono a creare tra i diversi piani delle triadi (Malkov et al., 1993). Tutto questo ovviamente non significa che i triplex non possano formarsi anche *in vivo*. Per quanto riguarda il pH, una volta formate le triadi C*GC con la citosina protonata sono stabili anche a pH fisiologico (Bhaumik et al., 1998; Mariappan et al., 1999); inoltre è stato ampiamente dimostrato che in presenza di una concentrazione pari a quella fisiologica

(Tabor and Tabor, 1984) di spermina, spermidina o altre poliammine (sostanze normalmente presenti nella maggior parte delle cellule batteriche ed eucariotiche, che contribuiscono a stabilizzare vari tipi di macromolecole) non è più necessario che la citosina venga protonata. Le triadi formate in presenza di poliammine hanno una stabilità paragonabile a quella delle triadi T*AT anche a pH 7,3 (Hampel et al., 1991; Barawkar et al., 1996; Rajeev et al., 1997).

1.3.2 Rilevamento e ruolo del DNA triplex *in vivo*.

Mentre esistono varie tecniche in grado di rilevare la presenza di DNA triplex *in vitro* (Uddin et al., 1997; Cherny et al., 1998; Rutigliano et al., 1998; Mariappan et al., 1999), non è attualmente possibile avere una rilevazione certa e diretta della loro presenza *in vivo*, perché molte delle tecniche di evidenziazione dei triplex sono anche capaci di indurne la formazione. Le tecniche più usate e meno invasive per la rilevazione dei triplex si basano sull'uso di particolari sostanze intercalanti del DNA, di molecole che interagiscono diversamente con DNA duplex e triplex, e di anticorpi specifici. Tra le sostanze intercalanti, molto promettente sembra essere la corallina (Lee et al., 1993; Moraru-Allen et al., 1997), un antibiotico antitumorale contenente 4 anelli aromatici fusi e che è in grado di legarsi strettamente e specificamente sia alle triadi T*AT che a quelle C*GC, mentre il bromuro di etidio è specifico per le sole triadi T*AT e ne promuove anche la formazione in sistemi *in vitro* (Fang et al., 1994; Shchyolkina and Borisova, 1997). Tra le molecole che interagiscono diversamente con DNA duplex e triplex, vanno senz'altro ricordate le endonucleasi S1 e P1 che, oltre alle varianti strutturali del DNA che lo diversificano dalla forma B, sembrano riconoscere e processare anche i triplex. E' stato inoltre dimostrato che la Fe^{II}•bleomicina, un derivato dell'antibiotico antitumorale bleomicina, favorisce in modo specifico il taglio di ambedue i filamenti del DNA a livello della giunzione duplex/triplex (Kane et al., 1995). Per quanto riguarda gli anticorpi, ne sono noti due denominati Jel318

(specifico per i triplex T*AT) e Jel466 (specifico per i triplex C*GC) (Lee et al., 1987; Burkholder et al., 1988; Lee et al., 1989; Agazie et al., 1994; Mol et al., 1994). Questi anticorpi riconoscono specificamente i triplex e non sembrano interagire con il DNA a doppia elica. Utilizzati su preparati citologici, hanno mostrato dei *pattern* di reazione riproducibili sia su *Chironomus tentans*, sia su *Drosophila melanogaster* (Burkholder et al., 1991), sia su cromosomi di mammifero (Burkholder et al., 1988; Agazie et al., 1994), e sono perciò i reagenti più indicati in questo tipo di ricerche.

Non è ancora chiaro quale possa essere il ruolo dei triplex *in vivo*; è possibile però fare delle ipotesi basate su varie scoperte fatte negli ultimi anni. Ad esempio esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che il triplex è un potente repressore di *c-myc* (Cooney et al., 1988; Postel et al., 1991; Kim et al., 1998) e del gene del procollagene α -1(I) (Ririe and Guntaka, 1998; Nakanishi et al., 1998). E' stato anche osservato che i triplex spesso sono in grado di interferire nel riconoscimento tra DNA a due eliche e proteine che vi si legano come i fattori di trascrizione (per *reviews*, vedere ad esempio Scanlon et al., 1995; Curcio et al., 1997; Helene et al., 1997; Vasquez and Wilson, 1998). Analogamente, la formazione di triplex può agire come segnale di arresto *in vitro*, e rallentare *in vivo*, la trascrizione di geni eucariotici clonati in SV-40 (Rao, 1996). Se il triplex viene legato covalentemente tramite esposizione ai raggi UV può bloccare la trascrizione anche *in vivo* (Grigoriev et al., 1993). Infine è noto che nell'uomo esistono delle proteine che sono in grado di riconoscere specificamente i triplex (Kiyama et al., 1991; Musso et al., 1998). Presi nel loro insieme questi dati indicano che con ogni probabilità la formazione di triplex svolge un ruolo importante nella regolazione genica *in vivo*.

1.4 Scopo e organizzazione della Tesi.

Sebbene le *lampbrush-like loops* formate dal cromosoma Y siano state scoperte quasi 40 anni fa (Meyer et al., 1961) e sebbene molti gruppi di ricerca abbiano intensamente

lavorato sul ruolo biologico di queste strutture, le loro reali funzioni sono ancora sconosciute. Fino al 1988 non era addirittura certo che le *loops* corrispondessero ai fattori di fertilità. Questa dimostrazione è stata fornita dal lavoro di Bonaccorsi e collaboratori (1988) che sono riusciti a determinare che le *loops kl-5*, *kl-3* e *ks-1* comappano con i rispettivi fattori di fertilità. Ciò non ha tuttavia aiutato molto a capire le reali funzioni delle *loops*. Infatti i fenotipi terminali dei mutanti in *kl-5*, *kl-3* e *ks-1* hanno solo rivelato problemi nel completamento della maturazione degli spermatozoi e, nel caso di *kl-5* e *kl-3*, l'assenza dei bracci esterni di dineina dell'assonema. Anche se la dimostrazione che in *kl-5* mappa un gene per la dineina (Gepner and Hays, 1993) suggerisce che almeno una delle *loops* contenga un gene a sequenza unica che viene trascritto regolarmente, rimane da spiegare perché la trascrizione di questo gene sia associata alla formazione di una *lampbrush-like loop* e perché la *loop kl-5* accumuli tante proteine. Nell'ipotesi che le *loops* siano la manifestazione citologica dell'espressione di geni a sequenza unica, rimane anche da spiegare perché la *loop kl-3* accumuli una proteina che poi si localizza nel flagello degli spermatozoi.

Sulla base di queste considerazioni mi è sembrato che una delle chiavi per cercare di capire le funzioni delle *loops* sia quella di aumentare la conoscenza sulla loro struttura molecolare. A tale scopo ho usato tre approcci sperimentali. Il primo (descritto nel Capitolo 1) è consistito nell'uso di anticorpi anti-triplex per verificare se alcune delle *loops* contenessero strutture a tripla elica. Il secondo approccio (Capitolo 2) è stato quello di caratterizzare ulteriormente la proteina Loopin-1 legata alla *loop kl-3*. Un cDNA incompleto del gene era stato precedentemente isolato da Gambino (1993). In questa Tesi ho continuato il lavoro completando il sequenziamento del gene e dimostrando che è privo di introni. Ho anche studiato la conservazione evolutiva di Loopin-1 e la sua localizzazione durante la spermatogenesi. Il terzo approccio (Capitolo 3) è consistito nell'isolamento e nella caratterizzazione di mutazioni autosomiche che alterano la formazione delle *loops*. Poiché i geni identificati da queste mutazioni sono necessari al normale sviluppo delle

loops, è logico aspettarsi che essi codifichino per componenti strutturali delle *loops* o per proteine che regolano la formazione di queste strutture. Pertanto il clonaggio molecolare di questi geni potrebbe fornire ulteriori informazioni sulla struttura delle *loops* che potrebbero contribuire in modo significativo a delucidarne le funzioni. In questa Tesi ho caratterizzato tre geni necessari alla corretta formazione della *loop kl-3*, esaminando il fenotipo biochimico e ultrastrutturale delle mutazioni che li identificano.

2. CAPITOLO 1: Le *loops* contengono acidi nucleici a tripla elica.

2.1 Immunocolorazione delle *loops* di *D. melanogaster* con anticorpi anti-triplex.

Sulla base dei risultati sulla composizione molecolare dei fattori di fertilità del cromosoma Y di *D. melanogaster* (Bonaccorsi et al., 1990; Bonaccorsi and Lohe, 1991; Lohe and Roberts, 1993) riassunti in Figura 1.2, ho voluto saggiare l'eventuale presenza di acidi nucleici a tripla elica nelle *loops* presenti nei nuclei degli spermatociti primi. A tale scopo ho utilizzato gli anticorpi monoclonali anti-triplex denominati *Jel318* e *Jel466*.

Questi anticorpi sono caratterizzati da una elevata affidabilità sia dal punto di vista della specificità (nessuna reazione crociata con il DNA a doppia elica) sia dal punto di vista della riproducibilità dei risultati (Lee et al., 1987; Burkholder et al., 1988; Lee et al., 1989; Burkholder et al., 1991; Agazie et al., 1994; Mol et al., 1994). Inizialmente ho saggiato gli anticorpi su preparati allestiti seguendo le procedure standard di fissaggio descritte nella sezione Materiali e Metodi di questa Tesi. Questa metodologia mi ha permesso di ottenere dei buoni risultati con l'anticorpo *Jel466*. Questo anticorpo, che reagisce soprattutto con i triplex di tipo C*GC, immunocolora in modo specifico la *loop kl-5*, che contiene DNA satellite altamente ripetitivo composto da sequenze AAGAC, AAGAG ed AAGAGAG (Figura 2.1). Inoltre questo anticorpo non riconosce tutta la *loop* come accade per l'anticorpo S5 (vedi Introduzione), ma una struttura granulare all'interno di essa. In nessun caso è stata osservata immunocolorazione della *loop ks-1* e solo occasionalmente è stata rilevata una debole immunofluorescenza della *loop kl-3* (Figura 2.1).

E' interessante notare che la *loop ks-1* è molto simile alla *loop kl-5*: questa *loop* è infatti morfologicamente quasi identica alla *kl-5*, contiene e trascrive abbondantemente gli stessi DNA satelliti della *kl-5* (se si eccettua l'assenza, in *ks-1*, del satellite AAGAGAG) e viene

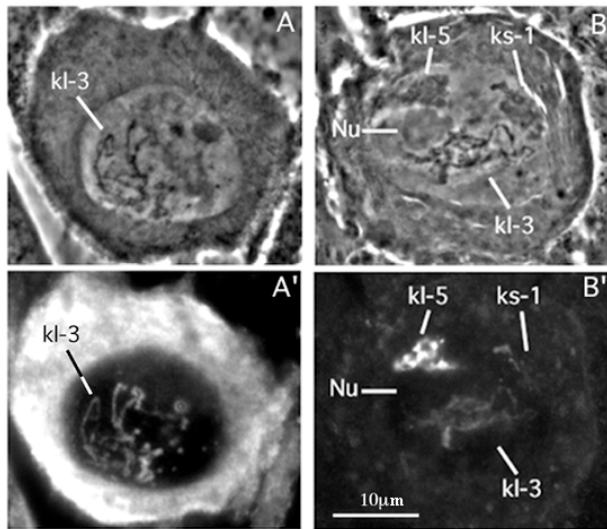


FIGURA 2.1 Immunocolorazione con anticorpi anti-triplex delle *loops* nei nuclei degli spermatociti primi maturi di *Drosophila melanogaster*. A, B: contrasto di fase; A', B': immunofluorescenza. A': immunocolorazione della loop *kl-3* con l'anticorpo Jel318; notare l'intensa colorazione del citoplasma. B': immunocolorazione della loop *kl-5* con l'anticorpo Jel466; notare che viene riconosciuta solo una parte della *loop*, a livello dell'asse di DNA/RNA; è presente anche una debole immunocolorazione a carico della loop *kl-3*; pressoché nulla la colorazione di *ks-1* e del citoplasma. Nu: nucleolo. Barra: 10 μm.

decorata dall'anticorpo *S5* che si lega anche alla *kl-5*. L'assenza di triplex nella *loop ks-1* è quindi una delle poche caratteristiche che differenzia questa *loop* da quella *kl-5*. Viste le somiglianze citologiche tra le *loops kl-5* e *ks-1*, ho effettuato una serie di incroci che mi hanno permesso di determinare con certezza quale delle due presenta triplex. Ho incrociato femmine wild-type (Oregon-R) con maschi *T(X;Y)V24* che portano una traslocazione tra i cromosomi sessuali in cui il cromosoma Y è rotto tra le regioni h3 e h4 (Figura 1.2) e il cromosoma X nell'eterocromatina. Da questo incrocio si ottengono maschi che portano un cromosoma Y deleto della regione h1-h3 e mancano della *loop kl-5*. Analogamente, incrociando femmine Oregon-R con maschi *T(X;Y)W19* in cui il punto di rottura del cromosoma Y è posto tra le regioni h20 e h21 ho ottenuto una prole maschile che porta una deficienza del locus *ks-1* e non forma la *loop* corrispondente. In questo modo sono riuscito a separare fisicamente le *loops kl-5* e *ks-1* ed a confermare che l'immunocolorazione ottenuta con Jel466 è effettivamente a carico della *loop kl-5*.

Per quanto riguarda l'anticorpo Jel318, che riconosce specificamente il triplex T*AT, la tecnica di fissaggio standard non ha permesso di evidenziare alcuna reazione a carico delle *loops*. Tuttavia pretrattando i preparati con tripsina prima della loro incubazione con l'anticorpo primario, è stato possibile ottenere una colorazione intensa e specifica a carico

della *loop kl-3*; le altre due *loops* e il DNA a doppia elica delle *clumps* di cromatina non vengono invece colorati. Il fatto che la colorazione sia visibile solo dopo il pretrattamento con tripsina induce a pensare che i triplex siano presenti anche in preparati non trattati con questo enzima proteolitico, ma che non siano accessibili a Jel318 perché coperti dalle proteine legate alla *loop*.

Al momento non è possibile determinare la natura dei triplex associati alle *loops kl-5* e *kl-3*. Gli anticorpi utilizzati non permettono infatti di sapere se essi siano composti di solo DNA oppure contengano anche RNA. Il fatto che il locus *kl-5* trascrive abbondantemente i suoi satelliti e che questo RNA non migra nel citoplasma ma viene eliminato in profase meiotica I (Bonaccorsi et al., 1990), porterebbe a pensare che i triplex associati alla *loop kl-5* siano ibridi DNA/RNA.

2.2 Analisi dei filamenti che compongono le *loops kl-5* e *kl-3*.

Per poter analizzare meglio l'organizzazione citologica delle due *loops* che formano triplex ho ritenuto utile ottenere dei preparati in cui i filamenti delle *loops* fossero il più possibile distesi e non compattati in strutture a gomito. Purtroppo non esistono in letteratura tecniche standard che permettano di ottenere ciò, né è stato possibile adottare per questi tessuti le tecniche che consentono di ottenere fibre di DNA da cellule di mammifero in coltura. Come si può vedere nella sezione Materiali e Metodi, per ottenere dei buoni preparati citologici da analizzare in microscopia a contrasto di fase è necessario schiacciare molto delicatamente i testicoli di *Drosophila* tra vetrini porta- e copri-oggetto; a far distendere il preparato è sufficiente la sola forza del tampone che per capillarità si espande tra i due tipi di vetrino. Tentando vari approcci sono riuscito ad ottenere dei buoni preparati di *loops* distese esercitando una forte pressione sul vetrino coprioggetto posto sul preparato *in vivo*. Quello che si ottiene in questo modo è che i nuclei degli spermatozoi primi, che sono molto più grandi e delicati di quelli delle altre cellule della linea germinale,

vengono completamente disgregati permettendo ai filamenti delle *loops* di distendersi. Tutte le altre cellule della linea germinale mantengono invece il loro DNA compatto come nei preparati citologici non fortemente schiacciati.

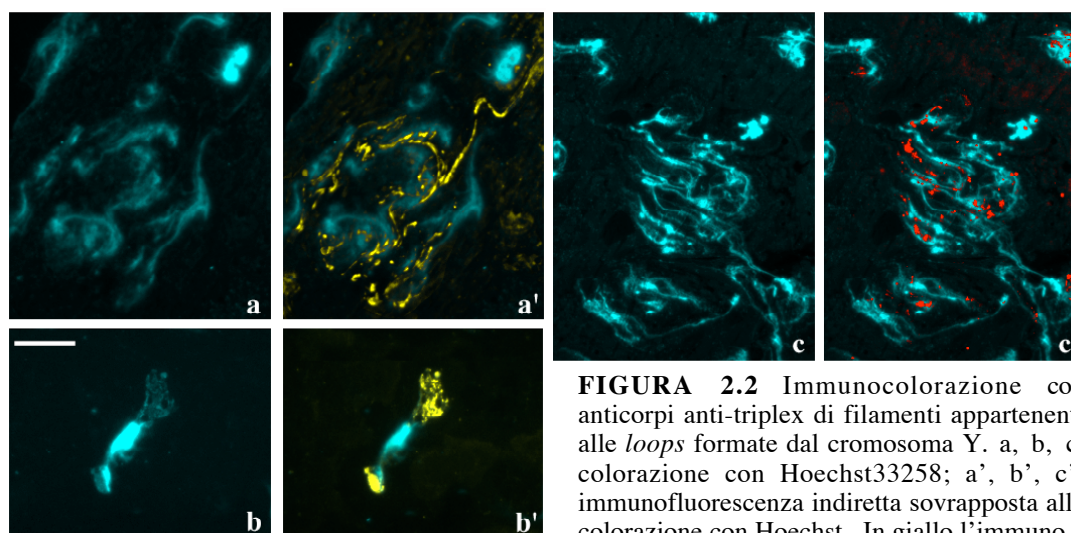


FIGURA 2.2 Immunocolorazione con anticorpi anti-triplex di filamenti appartenenti alle *loops* formate dal cromosoma Y. a, b, c: colorazione con Hoechst33258; a', b', c': immunofluorescenza indiretta sovrapposta alla colorazione con Hoechst. In giallo l'immunocolorazione con Jel318; in rosso l'immunocolorazione con Jel466. In b e b' è possibile vedere una loop *kl-3* compatta, non distesa dallo schiacciamento del preparato. Barra: 10µm.

I risultati ottenuti con questa tecnica sono illustrati nella figura 2.2. L'anticorpo Jel318 immunocolora un filamento debolmente colorato dall'Hoechst che spesso si estende per lunghi tratti senza soluzione di continuità. Inoltre in alcuni casi questo filamento è organizzato in strutture a gomitolo fortemente immunocolorate dall'anticorpo e non sovrapposte alle masse di cromatina intensamente colorate dall'Hoechst. Tali gomitoli filamentosi hanno la stessa morfologia delle *loops* presenti in nuclei intatti, non distrutti dallo schiacciamento. E' quindi logico concludere che anche i filamenti estesi mostrati in Figura 2.2 provengano dalla *loop kl-3*. Risultati del tutto analoghi a quelli appena descritti sono stati anche ottenuti omettendo il trattamento con tripsina. Ciò suggerisce che lo *shock* causato dallo schiacciamento liberi alcuni epitopi che, nei preparati ottenuti in modo standard, sono coperti dalle proteine legate alle *loops*.

Per quanto riguarda l'anticorpo Jel466, che, come prima descritto, in preparati non schiacciati decora una porzione interna della *loop kl-5*, l'immunocolorazione è ben diversa

da quella di Jel318: non ha un andamento continuo, ma è granulare e discontinua, anche se in molti casi è possibile riconoscere un allineamento dei granuli fluorescenti lungo il filamento delle *loops* (Fig. 2.2). Questa osservazione indica che il filamento della *loop kl-5* non è un triplex continuo come quello della *loop kl-3*, ma contiene soltanto alcuni tratti ben spaziati tra loro che assumono questa particolare conformazione del DNA.

2.3 Immunocolorazione delle *loops* di *Drosophila hydei* con anticorpi anti-triplex.

Per saggiare la possibile conservazione evolutiva della presenza di triplex nelle *loops* formate dal cromosoma Y, ho deciso di provare i due anticorpi su *D. hydei*, una specie evolutivamente molto distante dalla *D. melanogaster* (circa 58 milioni di anni) e molto ben caratterizzata a livello delle *loops* degli spermatozoi primari. In questa specie sono state evidenziate 5 *loops* formate da altrettanti fattori di fertilità posti sul cromosoma Y (per *reviews* si veda Gatti and Pimpinelli, 1992, e Hackstein and Hochstenbach, 1995). Quattro delle cinque *loops* di questa specie (*threads, th; pseudonucleolus, ps; tubular ribbons, tr; clubs, cl*) mappano sul braccio lungo del cromosoma Y, e una (*nooses, ns*) sul braccio corto. Anche queste *loops* sembrano essere formate da loci di dimensioni fisiche dell'ordine delle migliaia di kilobasi, e trascrivono in prevalenza DNA mediamente ripetuto, probabilmente derivato da sequenze satellite degenerate che non mostrano omologia di sequenza con il DNA satellite di *D. melanogaster*. Nonostante questo, utilizzando le tecniche di fissaggio standard descritte in Materiali e Metodi è stato possibile mettere in evidenza che anche due *loops* di *D. hydei* contengono triplex. Entrambi gli anticorpi (Jel318 e Jel466), sia in assenza che in presenza di trattamento con tripsina, reagiscono con le *loops Pseudonucleolus* e *Clubs*. Non è stata osservata immunocolorazione delle altre *loops*, né della cromatina o del nucleolo (Figura 2.3).

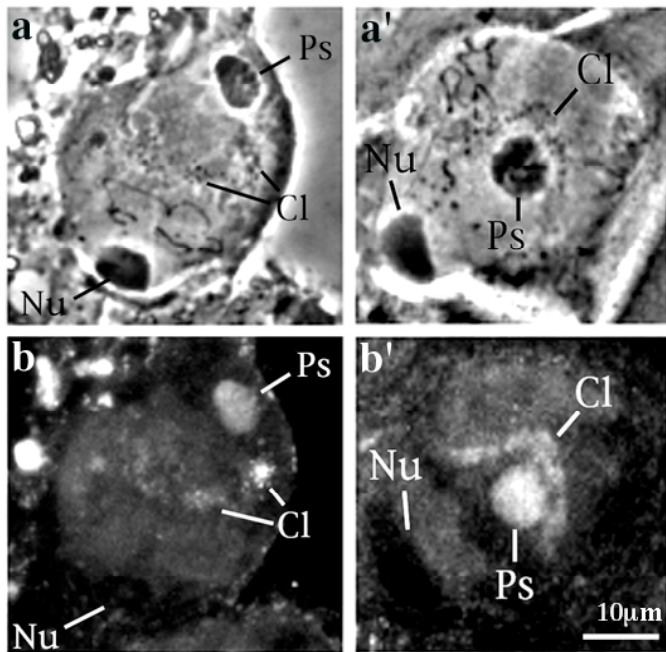


FIGURA 2.3 Immunocolorazione con anticorpi anti-triplex delle *loops* nei nuclei degli spermatociti primi maturi di *Drosophila hydei*. In alto: contrasto di fase; in basso: immunofluorescenza. A sinistra: immunocolorazione con l'anticorpo Jel318; a destra: immunocolorazione con l'anticorpo Jel466; notare che in entrambi i casi vengono riconosciute due *loops*, *Pseudonucleolus* (*Ps*) e *Clubs* (*Cl*). Nu: nucleolo. Barra: 10 μ m.

2.4 Discussione.

Come già riportato nella parte introduttiva di questa Tesi, l'anticorpo Jel318 riconosce preferenzialmente triplex ricchi in AT, mentre l'anticorpo Jel466 ha una preferenzialità per i triplex ricchi in GC (Burkholder et al., 1988; Agazie et al., 1994). I dati da me ottenuti hanno dimostrato che Jel318 immunocolora la *loop kl-3* che contiene DNA satellite ricco in AT (Figura 1.2), mentre Jel466 reagisce specificamente con porzioni della *loop kl-5*, che si origina da una regione cromosomica contenente DNA satellite ricco in GC (Figura 1.2). Ambedue gli anticorpi sono invece in grado di colorare le *loops Clubs* e *Pseudonucleolus* di *D. hydei* che contengono varî tipi di DNA mediamente ed altamente ripetitivo non particolarmente arricchito in basi AT o GC (Hackstein and Hochstenbach, 1995). Pertanto questi dati sono in buon accordo con la specificità biochimica dei due anticorpi. Rimane però da stabilire qual è il significato biologico della presenza di triplex nelle *loops kl-3* e *kl-5*.

Studi di immunolocalizzazione dei triplex hanno dimostrato che in preparati fissati Jel318 colora intensamente le regioni pericentromeriche del topo e le G-bande dei

cromosomi murini e umani (Burkholder et al., 1988; Agazie et al., 1994). E' stato anche osservato che questo anticorpo colora le regioni pericentromeriche di cromosomi di topo non fissati, suggerendo che le strutture a triplex sono presenti anche *in vivo*. Jel466 produce un pattern di immunocolorazione complementare a quello di Jel318, colorando le R-bande (Agazie et al., 1994) di cromosomi murini e umani. Presi nel loro insieme questi risultati confermano la specificità di Jel318 per le regioni ricche in AT e quella di Jel466 per quelle ricche in GC, ed indicano che strutture a triplex sono presenti lungo tutti i cromosomi di mammifero. Perciò, sulla base di questi dati immunocitochimici, è difficile attribuire un significato funzionale ai triplex. A questo riguardo sono invece più interessanti i risultati ottenuti immunocolorando con Jel318 i cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster* e *Chironomus tentans* (Burkholder et al., 1991). E' stato osservato che in *D. melanogaster* vengono intensamente colorate le bande, mentre risultano poco fluorescenti le interbande. Sono state anche individuate alcune bande particolarmente fluorescenti. Una di queste, localizzata nella regione 81F, è nota contenere DNA satellite 1,672 gr/cm³ composto da pentameri AATAT ed eptameri AATATAT. La reazione di questa banda con Jel318 non sembra essere dovuta al tipo di DNA in essa contenuto perché studi di competizione usando le sequenze sopra indicate non hanno prodotto un indebolimento della fluorescenza della regione 81F (Burkholder et al., 1991). E' stato quindi concluso che l'anticorpo Jel318 non ha una particolare affinità col DNA satellite in sé, ma con la struttura a triplex che esso assume nella regione 81F (Burkholder et al., 1991). E' stato anche ipotizzato che la struttura a triplex di questo DNA satellite sia correlata col fatto che esso non viene trascritto nelle ghiandole salivari di *Drosophila* (Burkholder et al., 1991). L'immunocolorazione con Jel318 ha inoltre mostrato che sia i *puffs* di *D. melanogaster* che quelli di *C. tentans*, in cui avviene attiva trascrizione, sono negativi all'anticorpo. I dati citologici sui cromosomi politenici, unitamente ai dati su geni isolati (vedere Introduzione) indicano quindi che i triplex si formano prevalentemente in regioni trascrizionalmente inattive.

E' difficile pensare che le *loops kl-5* e *kl-3* di *D. melanogaster* e le *loops Clubs* e *Pseudonucleolus* di *D. hydei* siano trascrizionalmente inattive in quanto è stato ampiamente dimostrato che queste strutture trascrivono abbondantemente il DNA in esse contenuto e che questo RNA rimane associato alle *loops* fino alla disintegrazione di queste strutture, prima della meiosi I (Bonaccorsi et al., 1991; Hackstein and Hochstenbach, 1995). E' invece più facile pensare che le *loops* contengano triplex, forse formati di solo RNA, coinvolti non nella regolazione della trascrizione, ma nel mediare il legame di proteine specifiche alle *loops*. Proteine che si associano preferenzialmente ai triplex sono state individuate in cellule umane (Kiyama and Camerini-Otero, 1991; Musso et al., 1998). Ad esempio studi condotti in cellule HeLa hanno mostrato l'esistenza di almeno tre polipeptidi di 100, 60 e 15 Kd che si legano di preferenza ai triplex ricchi in AT (Musso et al., 1998). A questo riguardo è interessante rilevare che la *loop kl-3* di *D. melanogaster* e la *loop Pseudonucleolus* di *D. hydei* legano ambedue la proteina riconosciuta dall'anticorpo T53-1. Si potrebbe quindi avanzare l'ipotesi che questa proteina si legni a queste *loops* interagendo con i triplex in esse contenuti.

3. CAPITOLO 2: Caratterizzazione molecolare del gene *loopin-1* e del suo prodotto proteico.

3.1 Premessa.

Come descritto nella parte introduttiva di questa Tesi, Pisano e collaboratori (1993) avevano ottenuto un anticorpo policlonale monospecifico denominato T53-1 che reagiva contro una proteina di 53 Kd associata alla *loop kl-3* e alle code degli spermatozoi. Tale proteina era presente solo nei testicoli e precipitava con la frazione sarkosyl-urea insolubile dei flagelli degli spermatozoi. Questo dato, unitamente al peso molecolare della proteina, aveva suggerito che essa appartenesse al gruppo delle tectine, una famiglia di proteine filamentose presenti lungo gli assonemi di varie specie (per reviews si veda Murray, 1991 e Stephens, 1995).

Successivamente è stato clonato il gene che codifica per la presunta tectina mediante *screening* di una libreria di espressione testicolo-specifica con l'anticorpo T53-1 (Gambino, 1993). Questo *screening* ha prodotto un solo cDNA, che è risultato omologo ad una leucina amminopeptidasi bovina, e che mappa nella regione 53C del secondo cromosoma. Usando tale cDNA è stato anche dimostrato che esso viene trascritto solo nel testicolo, in accordo con la localizzazione testicolo-specifica della proteina riconosciuta dall'anticorpo T53-1 (Gambino 1993). Infine, è stato ottenuto un anticorpo contro la proteina codificata da questo cDNA, denominato T53-F1, che, come il T53-1, riconosce una sola banda elettroforetica di 53 Kd e reagisce con la *loop kl-3* e con la coda degli spermatozoi. Presi nel loro insieme questi dati indicano chiaramente che la proteina riconosciuta da T53-1 non ha omologie con le tectine note, ma risulta omologa ad una leucina amminopeptidasi. Ciò non vuol dire che si tratti effettivamente di una peptidasi perché non è noto se abbia attività peptidasica *in vitro* o *in vivo*. Pertanto, d'ora in poi mi

riferirò a questa proteina con il nome di Loopin-1 e denominerò il gene che la codifica *loopin-1*.

Come menzionato, Gambino (1993) è riuscita ad isolare un solo cDNA che codifica per la Loopin-1. Una comparazione del peso molecolare della proteina codificata da tale cDNA con quello della proteina riconosciuta dall'anticorpo T53-F1 fa pensare che si tratti di un cDNA incompleto al 5'. Questa ipotesi è rafforzata dalla comparazione di questo cDNA con quelli di leucina amminopeptidasi omologhe che presentano regioni codificanti più estese al 5'. Sulla base di questi dati si può stimare che il cDNA isolato da Gambino (1993) manchi di un tratto codificante al 5' corrispondente a circa 90 amminoacidi. Pertanto in questa Tesi ho continuato il lavoro sulla Loopin-1, completando la sequenza codificante per questa proteina e determinando la struttura molecolare del gene mediante sequenziamento ed analisi del DNA genomico. Ho inoltre utilizzato l'anticorpo T53-F1 per studiare la conservazione evolutiva di Loopin-1 e della sua immunolocalizzazione all'interno del genere *Drosophila*. Ho infine effettuato un serio tentativo per indurre ed isolare una mutazione nel gene *loopin-1*. Questo tentativo è stato purtroppo infruttuoso, ma mi ha permesso di raccogliere informazioni sulla regione genomica che contiene questo gene e di delineare una strategia alternativa per isolare mutanti a carico di *loopin-1*.

3.2 Analisi molecolare di *loopin-1*.

Come precedentemente menzionato Gambino (1993) aveva isolato un solo cDNA (denominato 1A) corrispondente al gene *loopin-1* (Figura 3.1). Per completare l'analisi

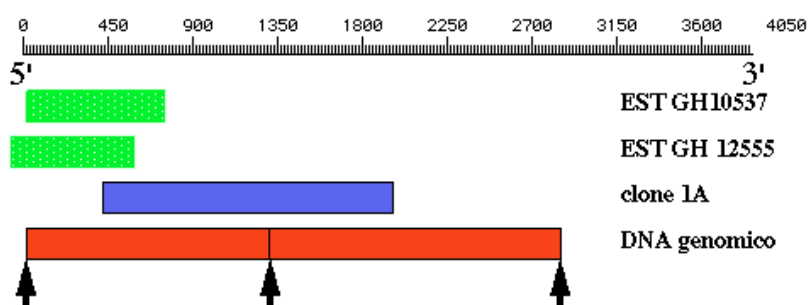


FIGURA 3.1 DNA usati per l'analisi molecolare di *loopin-1*. In verde sono indicate le sequenze EST al 5' del gene, in blu il cDNA 1A. La barra rossa corrisponde al DNA genomico sequenziato e le frecce indicano siti di restrizione PvuII.

molecolare di questo gene ho usato il cDNA 1A come sonda per lo *screening* di una libreria genomica. Tale *screening* mi ha permesso di isolare vari fagi positivi. Ho digerito uno di questi fagi con l'enzima PvuII che taglia il clone 1A in un solo sito localizzato nella parte centrale della sequenza (Figura 3.1). Ho quindi effettuato un *Southern blotting* del DNA fagico usando come sonda il DNA 1A. Questo esperimento ha messo in evidenza due bande di DNA fagico di 1350 e 1500 coppie di basi (Figura 3.1). Tali bande sono state eluite dal gel e subclonate nel vettore Bluescript; sono state quindi completamente sequenziate utilizzando il metodo di Sanger (1977) (Figura 3.2).

```

1  cagctggcaa tagaaatacg aaacaaaatt ctcagtgtta acaaaaaaaaaa tttgtgaaaa
61  aatacgcgcg tcaccaaatt ttagagttac gtggctcggg ggtgaccaac aaacgtatta
121 atattataga aacattgcaa gttgtacaaa atttcctatt cgtgtgttca ttgtaattct
181 caatttgata ttgatattga AGAATGCCTT CGTACAAGAA CATGTCTTTG GTGCGCGCTG
241 GCCTGCGTAT GGTGCGCCAA AATCGTCTGT GACAATCTGT GATACCGTCA TATCGCCGCT
301 ATGCGACATC CTGCAAGAGT CCCAAGGGTG TTGTGGTTGG TGTTTATACC AAGGATGGCG
361 ATAAGCCATC GAAAACCACC GCAAATGCAG TGACCTTGGG TGATGCTCTG GGTGGCAAGC
421 TGTTGACCCT GATCCGTGAA CGTGGAATGG ACGGCACTCC CGGAAAGGGT CTGCTCTTCA
481 GTGGCTTCGA GGGTGAATAC CAGGCGGTTG CCGTTGTCCG TGTGGGCAA CAGGGAGCAG
541 CCTACAATGA AAACGAGGAA CTGGACGAGG GTATGGAGAA TGTGCGAGTG GCAGCGGGCA
601 CTGGAGCCCG AGCCCTGCAG CTCCAGGGCA TGTATGAGGT GCATGTGGAT TCCATGGACT
661 ATCCGGAGCA GCGCGCCGAG GGAGCCGCGC TGGCCGTATG CGGTTATAAT GCCAACAAGA
721 GGAAGAAGAA CCGCATTGAG ACCCCAAGC TCGATATGTA CCGCAAGGGT GACCGGGATG
781 CCTGGGTGCG TGGTCTGTTC AAGGCAGAAAT CCCAGAAATTT GGCCAGACGT TTGTCCGACA
841 CGCCTGCCAA TATGATGACG CCCTCGATAT TCGCACAGGC CGCCGTGGAT GCCTTGTGCC
901 CGTGCGGTGT TTCCGTGGAG GTGCGCTCCA TGGACTGGAT CGAGGATATG AACCTCAATT
961 CCTTCCTAAT GATCGCCAAG GGTTCGTGCG AACCACCTCT ATTGCTGGAG TGCAGCTACT
1021 GCGGCACCAC GCCCGAGGAT CGTCCGTTTC TGCTGCTCGG CCAGGCTCTG ACCTTCCACA
1081 GTGGTGGCTT GTGCCTGAAG CCCAAGACGG GTATGGACCA GTACCGCGGC GCCATGGCCG
1141 GAGCTGCTGT TTGTGTGGGT GTTCTTCGTG CCGCCGCCGC CCTTTCGCTC CCGTGAACA
1201 TCACGGCCGT GATGCCGCTC TGCGAGCACA TGCCCTCTGG AATGGCCGTC AAGTGCGGCG
1261 ATGTGGTGAC CCTGCTCAAT GGCACCACAA TGGGCATCAA GAATGTGGAC AAGCGACCCG
1321 TGGTGCAGCT GGCCGATCCG CTACTCTATG CCCAGGCCAC GTACAAGCCC AACATGGTCA
1381 TCGATATCGG AACTGTGGCC ATGGGTGTTA ACTATGCCGT TGGCGGCGGT GCCAGTGGCT
1441 TGTGGACCAC CTCGAAAGTCT GTGTGGCAA ACTTCCGCAA ATCCGGTGGT CTGACTGGCG
1501 ATCGCGTCTG GCGTTTCCCC CTGTTCAAGT ACTACAAACA GATCGTGAAC AAGAATATCA
1561 CCTATGATCT GTGCAACACC GGTCGAGGAC CTGCCAGTTC CTGCCGCGG GCTGCCATCC
1621 TTCACACCC TTTCCGTGTC GCGGAATGGG CCCATCTGGA CATCCGTGGC ACCGGCATGA
1681 CCACCACAAT CAACCCAGG CCTTACCTAC TCAAGGACTC GATGACCGGA CGCCGACGC
1741 GCACTGTTAT CCAGTTCATG TACCAGATGG CCTGCTCCGG Ctagtagagt ccatgccatg
1801 tagacacacc ttccttgtgg gcctccatgt tggcccatgt attcgatatt tgatgctttg
1861 gtacagtgtt tgcacagaaa aaacattctg gtctggagaa gccatcctcg taaggttca
1921 ctttaatatc gttggcaata aattgtataa attatgagaa tttcaagttg gaaccaaatt
1981 gtattgatgt tcttgcaaaa attagctatg taaatgcata gtaccaaatt taagcaaaat
2041 tgtaaatcta ttcgcccatt aaaagtattc aatcaagcaa atgtgtaac ttgagtaatt
2101 tcaccttttg aaacgacctt tcgaatcaaa atttgatttc caatcgata aatagtcct
2161 gattttccaa ctcgattgat ggcagcattg cggattttcc tggctttgat gtgcatgtg
2221 attatggtga ctataaaata tttacctttt ggctggagtg acgggaaaat tgccttgaa
2281 gtctgagggtg tgcggtggat tgggtgggtg gggaggggga ggggttgatg ccaatcaatg
2341 gaattcggca aatggcatta tgaggttgac ttgattgtcc acatatactt attcatactc

```

```

2401 gtacgaatgg acgaggcact tacttacgtg ccagcattta tccggcagaa tgttatggct
2461 aattgcaaac ggtgcacgaa atggcaaatg tctctttcaa tatttaattg gtccctggca
2521 ggcttagatg ctcaagtgcg tccttttcgt cctgccaagg atcagggtcaa catgagcatt
2581 tgactgcaag ccatgtaact gcagttggca aatggtggct aaacgatgcc gttttatatg
2641 tgtgtgtgtg tgtgtgtttg tgcctttgac tcggattggt tgctggcggt tggccatgca
2701 aatttaattt tgcctctctg aatgcgaaat ggcatacttc tggattatat attacacaca
2761 cacgcacaca cacacacaca gtgtcagtgt ccctggggcc tcggtgcaga cccttagcac
2821 tgcacttaac gcatacagct g

```

FIGURA 3.2 Struttura del gene *loopin-1*. La sequenza riportata corrisponde al DNA genomico isolato da una libreria fagica (vedi Figura 3.1 e testo per spiegazioni). In maiuscolo è indicato l'ORF più lungo. Le sequenze in verde, magenta e blu corrispondono all'EST più lungo che inizia 9 basi prima del DNA genomico sequenziato. Il DNA in color magenta indica l'inizio dell'ORF più lungo, che termina prima delle due triplette non senso TAG disegnate in rosso. Delle due triplette ATG poste all'inizio dell'ORF e sottolineate, la seconda è il più probabile sito di inizio di traduzione perché è contornata da una più alta frequenza di basi che sono in accordo con la sequenza consenso di Cavener (vedi Tabella 3.1 e testo). Il DNA in blu indica l'inizio del cDNA 1A che termina con la tripletta GAA (in blu, nucleotidi 1971-1973) a cui era associata una coda di poli-A. Si noti la completa sovrapposizione tra cDNA e DNA genomico, che indica che *loopin-1* è un gene privo di introni.

Successivamente un'analisi delle banche dati mi ha permesso di individuare due EST (Figura 3.1) al 5' del gene *loopin-1*, ambedue sovrapposti al cDNA ed al DNA genomico sequenziati. Questi due ESTs ed il cDNA 1A identificano un *open reading frame* (ORF) di 1581 nucleotidi che termina con due triplette non senso TAG (Figura 3.2). Il 5' di questo ORF è preceduto da una regione non tradotta di 200 nucleotidi; il 3' è seguito da una regione non tradotta di 192 nucleotidi (a cui nel cDNA una coda di poli-A). È interessante notare che i due ESTs ed il cDNA 1A sono completamente sovrapposti al DNA genomico. Ciò indica che il gene *loopin-1* è privo di introni, anche se non si può escludere che possa contenere un introne a monte della regione non tradotta al 5' finora sequenziata.

La traduzione dell'ORF più lungo identificato dal cDNA 1A e dagli ESTs risulta in una proteina putativa di 527 amminoacidi. Tale proteina contiene due metionine nei primi otto amminoacidi. Per determinare quale proteina corrisponda al primo amminoacido di Loopin-1 ho comparato la sequenza di DNA attorno a ciascuna di esse con la sequenza consenso per l'inizio di traduzione in *Drosophila*, identificata da Cavener and Ray (1991). Delle sette basi che precedono la prima metionina, soltanto due sono in accordo con tale sequenza, mentre cinque delle sette basi che precedono la seconda corrispondono alla

sequenza consenso di Cavener (Tabella 3.1). E' quindi probabile che la proteina Loopin-1 inizi con la seconda metionina codificata dall'ORF e si estenda per 520 amminoacidi (Figura 3.3).

Tabella 3.1: Comparazione tra la sequenza di Cavener e l'inizio putativo di trascrizione di *loopin-1*.

sito di Cavener	A/C	A/G	C	C	A	A	A/C	ATG
primo ATG	t	t	g	a	A	g	A	ATG
secondo ATG	C	A	a	g	A	A	C	ATG

1	AGNRNTKQNS	QC*QKQFVKK	YARHQILELR	GSEVTNKRIN	IIETLQVVQN	FLFVCSL*FS		
61	I*Y*Y*R	MPS	YKNMSLVRAG	LRMVRQNRSG	QSVIPSRYRY	ATSCKSPKGV	VVGYYTKDGD	
121	KPSKTTANAV	TLDDALGGKL	LTLIRERGM	GTPGKGLLFS	GFEGEYQAVA	VVGVGKQGA		
181	YNENEELDEG	MENVRVAAGT	GARALQLQGM	YEVHVDSDY	PEQAAEGAAL	AVCGYNANKR		
241	KKNRIQTPKL	DMYGKGRDA	WVRGLFKAES	QNLARRLSDT	PANMMTPSIF	AQAAVDALCP		
301	CGVSVEVRSM	DWIEDMNLNS	FLMIAKGSCE	PPLLECSYC	GTPEDRPVL	LLQGLTFHS		
361	GGLCLKPKTG	MDQYRGAMAG	AAVCVGLRA	AAALSPLNI	TAVMPLCEHM	PSGMAVKCGD		
421	VVTLNLTMT	GKNDKRPV	VQLADPLLYA	QATYKPKLVI	DIGTVAMGVN	YAVGGASGL		
481	WTSKSVWQN	FRKSGGLTGD	RVWRFPFLFY	YKQIVNKNIT	YDLCNTGRGP	ASSCLAAAIL		
541	HTLVPCAWEA	HLDIRGTGMT	TTINRPYLL	KDSMTGRPTR	TVIQFMYQMA	CSG	**SPCHV	
601	DTPSLWASML	AHVFDI*CFG	TVFAQKKHSG	LEKPSR*RF	LISLAINCIN	YENFKLEPNC		
661	IDVLAKISYV	NA*YQI*AKL	*IYSPIKSIQ	SSKCGNLSNF	TF*NDLSNQN	LISNRINMA*		
721	FNSIDGSIA	DFPGFDVRCD	YVDYKIFTFW	LE*RENCL*S	LRCVDWWGG	EGEGLMPING		
781	IRQMAL*G*L	DCPHILIHTR	TNGRGTYLRA	SIYPAECY*G	LQTVHEMANV	SFNI*LVPGR		
841	LRCSSASFSS	CQSGQHEHL	TASHVTAVGK	CWLNDVLYV	CVCVCLCL*L	GLFAGVWPK		
901	FNFALSNAKW	HTSGLYIHT	RTHTHTVSVS	LGPRCRPLAL	HLTHTAXXX			

FIGURA 3.3 Proteina putativa prodotta dal gene *loopin-1*. La proteina, indicata in verde, è fatta partire dal secondo ATG dell'ORF più lungo. Gli asterischi corrispondono a codoni di stop.

La sequenza amminoacidica di Loopin-1 è stata comparata con le sequenze depositate in banca dati. Questa analisi ha messo in evidenza che Loopin-1 presenta una significativa omologia con numerose ammino-peptidasi provenienti da differenti organismi che includono varie specie di batteri, di piante e di animali. La proteina più omologa a Loopin-1 è una leucina ammino-peptidasi proveniente dal cristallino dell'occhio dei bovini (37% di identità e 54% di similitudine).

3.3 Conservazione evolutiva di Loopin-1.

Per studiare la conservazione evolutiva della proteina Loopin-1 nell'ambito dei drosophilidi, ho saggiato l'anticorpo T53-F1 su specie più o meno evolutivamente distanti (Figura 3.4). Nel portare avanti questa analisi ho mantenuto invariato il protocollo di

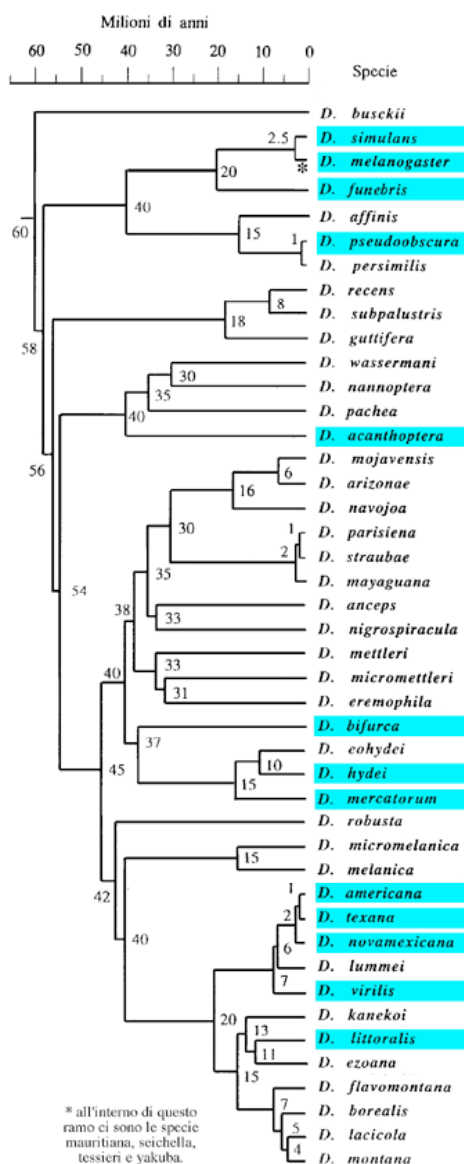


FIGURA 3.4 Albero evolutivo delle principali specie di drosophilidi note. In alto è indicata la scala temporale in milioni di anni, i numeri all'interno dello schema rappresentano approssimativamente l'epoca in cui si è avuta la separazione di due rami. In azzurro sono evidenziate le specie utilizzate per gli esperimenti di immunofluorescenza indiretta con l'anticorpo T53-F1. Lo schema è stato ripreso in parte e modificato da Pitnick et al., 1995.

TABELLA 3.2: Loopin-1 in diverse specie di *Drosophilidi*.

specie	lunghezza spermio (mm)	lunghezza spermio nelle uova	colorazione con T53-1	grandezza loop	note
<i>D. simulans</i>	1,14±0,01	1,14	si	3	1;2;3;6
<i>D. melanogaster</i>	1,9±0,01	1,78	si	3	1;3
<i>D. mauritiana</i>	1,036	nd	si	2÷3	1;2;4
<i>D. seichella</i>	1,649	nd	si	2	2;3
<i>D. tessieri</i>	da 1,0 a 2,0	nd	si	3	1;2;5;6
<i>D. yakuba</i>	1,681	nd	si	3	1;2;5;6
<i>D. funebris</i>	8,29	nd	si	1	2;3;6
<i>D. pseudobscura</i>	0,36	0,36	si	1÷2	1;2;3;6
<i>D. acanthoptera</i>	5,83±0,09	(++)	si	2÷3	1;2;3;6
<i>D. bifurca</i>	58,29±0,67	1,6	si	1	2;3
<i>D. hydei</i>	23,32±0,51	1,31	si	2	2;3
<i>D. mercatorum</i>	nd	nd	si	2÷3	2;3;6
<i>D. americana</i>	5,22±0,02	nd	si	1÷2	2;4
<i>D. texana</i>	5,08±0,04	nd	si	1÷2	2;4
<i>D. novamexicana</i>	6,72±0,15	nd	si	3	1;3
<i>D. virilis</i>	5,70±0,16	nd	si	3	1;4
<i>D. littoralis</i>	7,72±0,08	(++)	si	3	1;3;6

Note alla tabella.

- specie: le specie sono elencate nello stesso ordine dell'albero evolutivo.
- lunghezza spermio nelle uova: (++) indica che la coda entra quasi totalmente.
- grandezza loop: i riferimenti sono rispetto alla grandezza del nucleo (3=loop molto estesa; 1=loop molto ridotta).
- note:
 1. di aspetto simile alla *D. melanogaster*;
 2. aggregati compatti;
 3. buona corrispondenza contrasto di fase/fluorescenza
 4. poca corrispondenza contrasto di fase/fluorescenza
 5. nessuna corrispondenza contrasto di fase/fluorescenza
 6. citoplasma fortemente colorato

I dati relativi alle prime tre colonne sono stati in parte ripresi da Joly et al., 1991; Bressac et al., 1991; Pitnick and Markow, 1994; Pitnick et al., 1995; Karr and Pitnick, 1996.

fissaggio utilizzato per i testicoli di *D. melanogaster*. In questo modo i polipeptidi omologhi a Loopin-1 subiscono sempre lo stesso tipo di fissaggio rendendo confrontabili i risultati ottenuti nelle diverse specie. I risultati ottenuti, riassunti in Tabella 3.2, mostrano innanzitutto che in tutte le specie testate l'anticorpo T53-F1 colora intensamente le code

degli spermatozoi (dati non mostrati), così come è sempre possibile rilevare un segnale fluorescente all'interno dei nuclei degli spermatociti primi (Figure 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8).

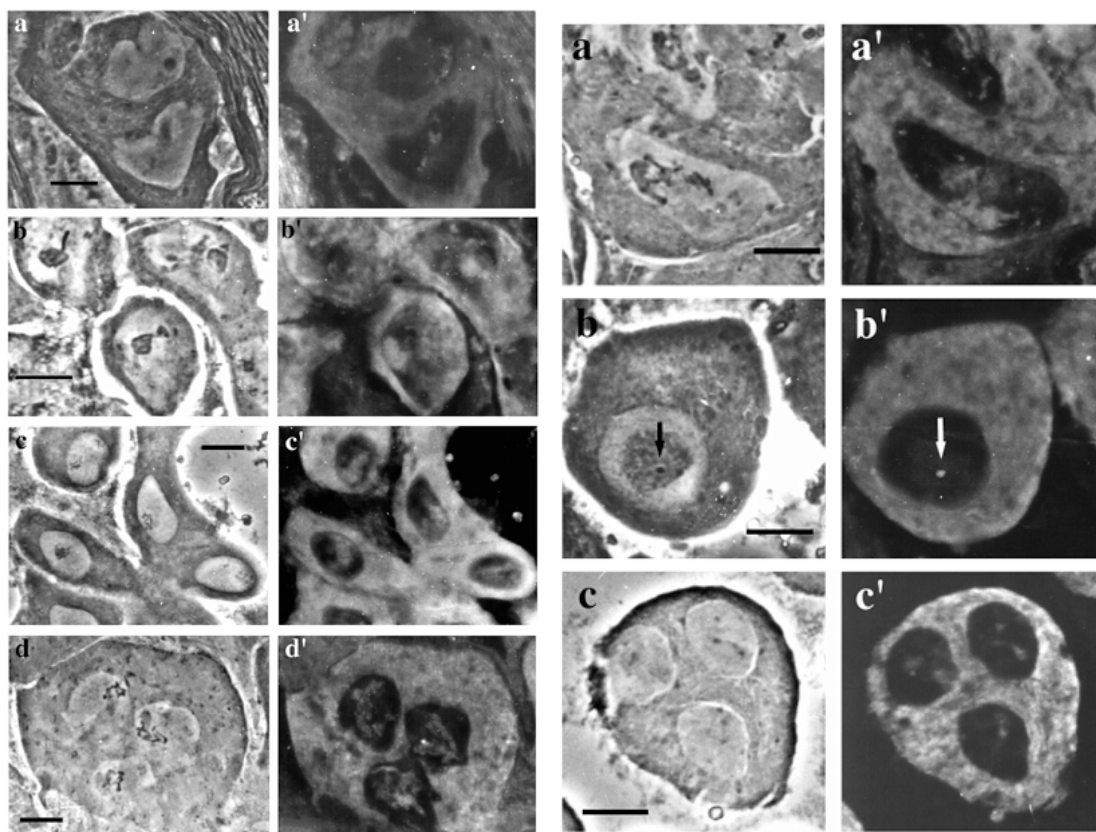


FIGURA 3.5 Nuclei di spermatociti primi maturi di maschi di *Drosophila mauritiana* (a, a'), *Drosophila seichella* (b, b'), *Drosophila tessieri* (c, c') e *Drosophila yakuba* (d, d'). a, b, c, d: contrasto di fase; a', b', c', d': immunofluorescenza con l'anticorpo T53-F1. Barra: 10 μ m.

FIGURA 3.6 Nuclei di spermatociti primi maturi di maschi di *Drosophila simulans* (a, a'), *Drosophila funebris* (b, b') e *Drosophila pseudoobscura* (c, c'). a, b, c: contrasto di fase; a', b', c': immunofluorescenza con l'anticorpo T53-F1. Barra: 10 μ m.

Quello che risulta molto variabile è il tipo di segnale visibile in questi nuclei. In alcuni casi si hanno segnali fluorescenti molto estesi che corrispondono a strutture filamentose chiaramente evidenti anche in microscopia a contrasto di fase. Questo tipo di immunocolorazione è stato osservato in specie evolutivamente vicine alla *Drosophila melanogaster* (*D. tessieri*, *D. yakuba*, *D. simulans*), anche se strutture fluorescenti di aspetto filamentoso sono presenti anche in specie molto distanti dalla *D. melanogaster* (*D. littoralis*). In alcune specie le strutture decorate dall'anticorpo T53-F1 hanno un aspetto citologico

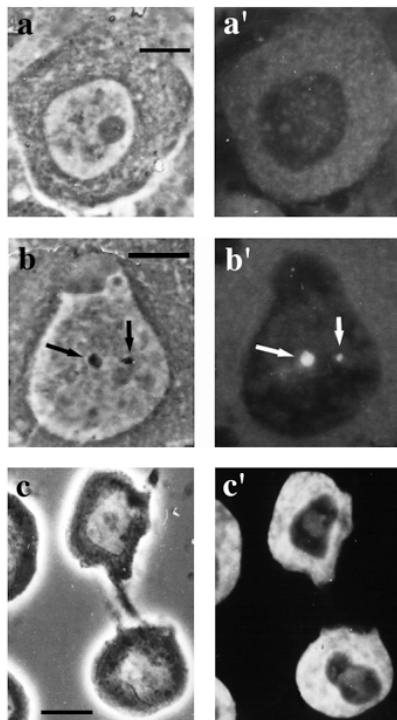


FIGURA 3.7 Nuclei di spermatociti primi maturi di maschi di *Drosophila acanthoptera* (a, a'), *Drosophila bifurca* (b, b') e *Drosophila mercatorum* (c, c'). a, b, c: contrasto di fase; a', b', c': immunofluorescenza con l'anticorpo T53-F1. Barra: 10 μ m.

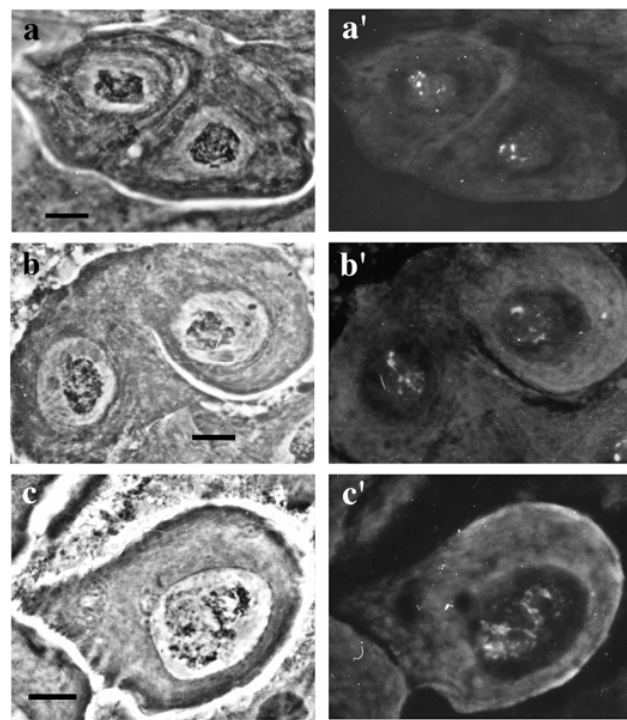


FIGURA 3.8 Nuclei di spermatociti primi maturi di maschi di *Drosophila americana* (a, a'), *Drosophila texana* (b, b') e *Drosophila littoralis* (c, c'). a, b, c: contrasto di fase; a', b', c': immunofluorescenza con l'anticorpo T53-F1. Barra: 10 μ m.

molto differente da quello delle *loops* di *D. melanogaster*: in alcuni casi si osservano delle strutture puntiformi dalle dimensioni molto ridotte (*D. funebris*, *D. bifurca*), mentre in altri casi sono presenti strutture più estese di forma discoidale che occupano la parte centrale del nucleo degli spermatociti primi (*D. mercatorum*). Anche la corrispondenza tra immunocolorazione e positività in microscopia a contrasto di fase è variabile: in alcune specie la corrispondenza è evidente (*D. simulans*, *D. pseudoobscura*, *D. funebris*, *D. bifurca*), in altre la sovrapposizione è solo parziale (*D. americana*, *D. texana*, *D. virilis*), in altre ancora non sono evidenti a contrasto di fase strutture che corrispondono a quelle colorate da T53-F1 (*D. tessieri*, *D. yakuba*).

Malgrado le differenze morfologiche tra le strutture intranucleari immunocolorate da T53-F1, i dati ottenuti indicano chiaramente che in tutte le 16 specie una proteina omologa

alla Loopin-1 si accumula in strutture intranucleari presenti negli spermatociti primi. Inoltre in tutte le specie analizzate è stata osservata immunocolorazione dalla coda degli spermatozoi. E' quindi evidente che nel corso dell'evoluzione è stata conservata non solo la struttura della Loopin-1, ma anche il suo *pattern* di localizzazione durante la gametogenesi. E' interessante notare che la dimensione delle strutture intranucleari (*loops*) decorate da T53-F1 non è correlata con la lunghezza delle code degli spermi. Vi sono infatti specie con code molto lunghe e *loops* molto ridotte (*D. bifurca*), e specie con code relativamente corte e *loops* molto prominenti (*D. simulans*, *D. tessieri*). Pertanto questi due parametri (lunghezza delle code degli spermi e grandezza relativa delle *loops*) non possono essere messi in relazione diretta tra loro. Neanche la porzione di coda di spermatozoo che entra nell'uovo in seguito alla fecondazione sembra essere correlata all'aspetto citologico delle *loops*, in quanto anche in questo caso è possibile trovare tutte le possibili combinazioni tra quantità di coda penetrata, lunghezza dello spermatozoo e aspetto e dimensioni delle *loops*.

3.4 Immunolocalizzazione di Loopin-1 negli spermatozoi di *Drosophila melanogaster*.

Per ottenere ulteriori informazioni sul ruolo di Loopin-1 nella spermiogenesi di *Drosophila melanogaster*, ho studiato la sua localizzazione nella coda degli spermi a livello ultrastrutturale. Seguendo i protocolli standard illustrati nella sezione Materiali e Metodi di questa Tesi, ho allestito delle sezioni di vescicole seminali di maschi adulti. Tali preparati sono stati incubati con l'anticorpo T53-F1 che è stato visualizzato mediante l'uso di un anticorpo secondario di topo coniugato con oro colloidale in sfere del diametro di 5 nm. Come mostrato in Figura 3.9, Loopin-1 non si accumula nell'assonema, ma nel derivato mitocondriale ad esso strettamente associato.

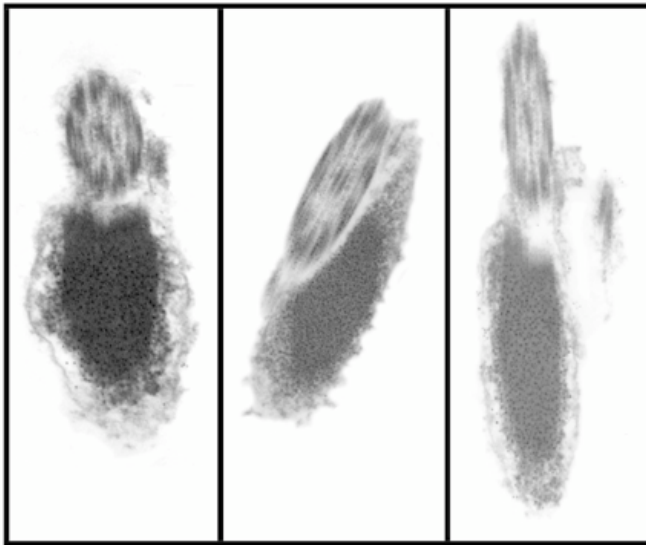


FIGURA 3.9 Immunocolorazione al microscopio elettronico di Loopin-1 negli assonemi di maschi adulti di *D. melanogaster*. L'anticorpo T53-F1 è stato coniugato con sfere di oro colloidale del diametro di 5nm, che al microscopio elettronico appaiono come punti scuri. Notare la colorazione associata al derivato mitocondriale, ma non all'assonema. Ingrandimento: 60000X.

3.5 Ricerca di un mutante di *loopin-1*.

Sebbene si conosca la sequenza della proteina Loopin-1 e la sua localizzazione prima nella loop e poi nel derivato mitocondriale del flagello degli spermatozoi, non è ancora possibile formulare una ipotesi sul suo ruolo funzionale. Il modo più semplice e diretto per avere dati in questo senso sarebbe quello di ottenere una mutazione nel gene *loopin-1* e analizzare a vari livelli il fenotipo ad essa associato. Ho pertanto elaborato una strategia sperimentale per l'isolamento di mutazioni in questo gene. Va innanzitutto considerato che, poiché sia il gene *loopin-1* che il suo prodotto proteico sono espressi solo nel testicolo, ci si può aspettare che mutazioni a carico di questo gene presentino sterilità maschile. Ho quindi deciso di isolare mutazioni maschio-sterili a carico di geni localizzati nella regione 53C, dove mappa il gene *loopin-1* (Figura 3.10). Una strategia sperimentale

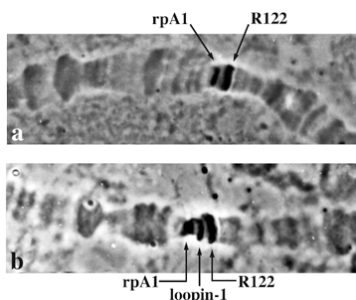


FIGURA 3.10 Localizzazione per ibridazione *in situ* su cromosomi politenici dell'elemento trasponibile P denominato R122, del gene *loopin-1* e del gene *rpA1*. Per l'ibridazione mostrata nel pannello a sono state usate contemporaneamente una sonda contenente sequenze di P e del gene *white* ed una sonda *rpA1*. Per l'ibridazione mostrata nel pannello b oltre alle precedenti sonde è stata anche usata una sonda *loopin-1*. Si noti che *loopin-1* mappa tra R122 ed *rpA1* in posizione 53C9-10, mentre R122 è localizzato nella regione 53C6.

per isolare tali mutazioni consiste nel mutagenizzare maschi di *Drosophila* con raggi X o EMS, incrociare questi maschi con femmine che portano una delezione della regione di interesse e recuperare poi i cromosomi che causano sterilità maschile se posti in eterozigosi con tali delezioni. Se necessario, si può poi procedere all'esecuzione di tests di complementazione per verificare quanti loci di sterilità mappano nella regione di interesse. Sulla base di questi risultati si possono infine saggiare i mutanti ottenuti per vedere quale di essi altera la struttura o il prodotto del gene per il quale si cerca la mutazione.

Per poter seguire questa strategia sperimentale ho dovuto per prima cosa cercare di indurre delezioni nella regione 53C. Ciò si è reso necessario perché non esistono delezioni di tale regione che contiene due geni *Minute*. Questi geni in singola dose (per esempio in individui eterozigoti per una deficienza che rimuove una copia di un gene *Minute*) provocano semiletalità ed una caratteristica riduzione delle dimensioni delle setole (vedi Discussione in questo Capitolo). Uno di questi geni, denominato *rpA1* e corrispondente ad una proteina ribosomale, è stato caratterizzato da Qian e collaboratori (1988) e mappato al confine tra la regione 53C e la regione 53D, distalmente al gene *loopin-1*. Dell'altro gene non si conosce ancora la localizzazione precisa. Ho quindi tentato di indurre una deficienza sufficientemente piccola da rimuovere il gene *loopin-1* senza eliminare una copia del secondo gene *Minute*. A tale scopo ho mappato per ibridazione *in situ* il gene per Loopin-1, dimostrando che è localizzato nella regione 53C9-10 (Figura 3.10). Ho anche ripetuto l'ibridazione *in situ* usando come sonda il DNA di *rpA1* e confermato che questo gene mappa nella regione 53C14-15, al confine con la regione 53D (Figura 3.10). Ho infine mappato per ibridazione *in situ* tre elementi trasponibili P ingegnerizzati contenenti il gene *white*⁺. L'elemento R122 mappa in 53C6 (Figura 3.10), l'elemento 1257 in 53C11-12 e l'elemento 947 in 53C-53D (dati non mostrati). Di questi elementi, R122 è omozigote vitale, mentre gli altri due causano letalità in omozigosi. Ho quindi scelto di lavorare con R122 perché facilitava sia la costruzione dei ceppi da usare per la mutagenesi, sia l'individuazione di delezioni nella regione.

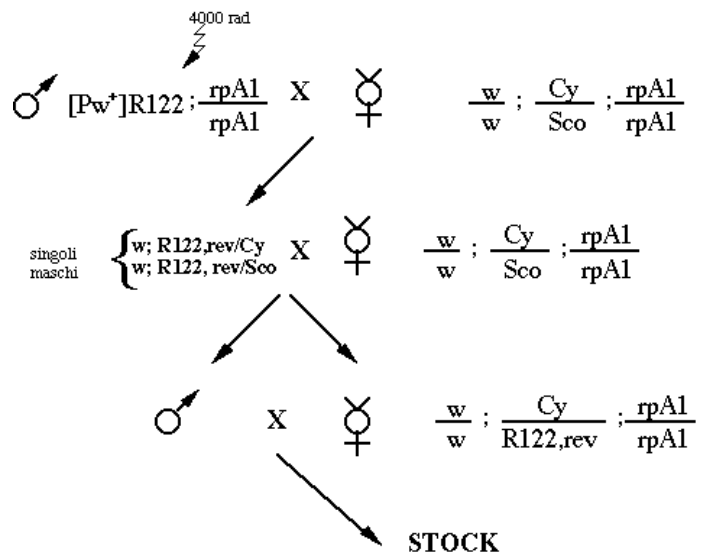


FIGURA 3.11 Schema di incroci usato per isolare deficienze che rimuovono l'elemento trasponibile R122 marcato con il gene *white*⁺. Maschi R122 sono stati irradiati con 4000 rad di raggi X e incrociati con le femmine indicate. Dalla prole maschile di questo incrocio sono stati isolati maschi con occhio bianco che sono stati incrociati singolarmente con le femmine indicate per bilanciare i cromosomi 2 che hanno perso *white*⁺.

In una prima serie di esperimenti, per ottenere una delezione della regione 53C9-10, ho irradiato maschi omozigoti per l'inserto R122 e contemporaneamente omozigoti per un' inserzione del gene *rpAl* localizzata sul terzo cromosoma. Tale inserzione, che ci è stata gentilmente inviata dal Dott. Jacobs-Lorena, era stata ottenuta da Qian e collaboratori (1988) trasformando le mosche con un vettore P contenente una copia intatta del gene *rpAl*. Come indicato in Figura 3.11, i maschi irradiati sono stati incrociati con femmine *w/w; Cy/Sco; rpAl/rpAl* e sono stati recuperati in F₁ maschi con l'occhio bianco. Tali maschi dovevano contenere o una mutazione del gene *white* o una delezione che rimuoveva la regione contenente l'inserto R122. La mia speranza era di individuare delezioni che rimuovessero contemporaneamente R122 (localizzato in 53C6) e *loopin-1* (53C9-10). La presenza di copie aggiuntive di *rpAl* mi avrebbe inoltre permesso di recuperare delezioni che, a partire da un punto di rottura prossimale a R122, si estendessero distalmente oltre la regione 53C14-15 (dove mappa *rpAl*). Da questi esperimenti ho ottenuto 15 cromosomi irradiati che non contenevano il gene *white*⁺ ed erano omozigoti letali. Purtroppo però nessuno di essi presentava delezioni evidenti nella regione 53C, né mostrava di aver perso il gene *loopin-1* (dati non mostrati).

Ho anche tentato di ottenere una delezione della regione 53C9-10 cercando di far excidere in modo impreciso l'elemento R122, dopo averlo messo in presenza della fonte di trasposasi [2-3]. In questo caso ho mutagenizzato 917 cromosomi ottenendone 13 privi dell'inserto R122 ed omozigoti letali, ma nessuno di essi è risultato privo della regione che contiene *loopin-1*. Non sono pertanto riuscito ad ottenere una deficienza di questa regione e ciò non mi ha permesso di portare a termine la strategia sperimentale che prevedeva l'isolamento di mutazioni maschio-sterili localizzate nella regione 53C9-10.

3.6 Discussione.

La proteina Loopin-1 è codificata da un gene privo di introni che mappa sul secondo cromosoma in posizione 53C9-10. Questa proteina è omologa a numerose leucino-amminopeptidasi di vari organismi animali e vegetali. L'omologia è diffusa lungo tutta la sequenza di Loopin-1, che non presenta domini omologhi a proteine diverse dalle leucino-amminopeptidasi. Al momento attuale non è tuttavia noto se Loopin-1 sia effettivamente una peptidasi che svolge questo ruolo enzimatico *in vivo*. Questa proteina, data la sua abbondanza, potrebbe anche svolgere un ruolo strutturale (Gambino, 1993). Casi in cui proteine enzimatiche svolgono funzioni strutturali sono ben documentati. Basti pensare alle cristalline delle lenti oculari che presentano omologie significative con vari tipi di enzimi (Wistow and Piatigorsky, 1987).

L'analisi dell'immunolocalizzazione di Loopin-1 a livello ultrastrutturale ha mostrato che questa proteina è concentrata nei derivati mitocondriali dell'assonema in elongazione. Ciò suggerisce che Loopin-1 svolga una funzione all'interno di queste strutture. Si ritiene che i derivati mitocondriali costituiscano una fonte di energia ed una riserva di membrane per l'assonema in elongazione. E' quindi logico postulare che Loopin-1 potrebbe essere coinvolta o nella produzione di energia o nel metabolismo delle membrane.

Più interessante del ruolo biologico di Loopin-1 nei flagelli degli spermatozoi è la ragione per cui questa proteina si lega alla *loop kl-3*. L'analisi di 16 specie di drosofilidi, alcune delle quali molto distanti evolutivamente, ha rivelato che in ognuna di esse l'anticorpo T53-F1 riconosce strutture intranucleari degli spermatociti primi e le code degli spermatozoi. Il fatto che questo anticorpo reagisca con proteine di specie così diverse indica chiaramente che Loopin-1 è una proteina molto conservata. Inoltre, è anche conservato il comportamento di Loopin-1, che prima di concentrarsi nelle code degli spermatozoi, si lega ad una *loop* formata dal cromosoma Y. Poiché *D. melanogaster* e *D. americana* sono separate da 58 milioni di anni, è probabile che questo comportamento fosse già presente nell'antenato comune da cui queste due specie si sono evolute. Malgrado l'evidente conservazione evolutiva del *pattern* di localizzazione di Loopin-1 durante la spermatogenesi, il significato biologico del legame di questa proteina alle *loops* è ancora del tutto sconosciuto. L'unica informazione al riguardo è che la localizzazione di Loopin-1 nella coda degli spermatozoi non richiede il legame di questa proteina alla *loop kl-3* (Pisano et al., 1993); gli spermatozoi dei maschi *kl-3⁻* mostrano però difetti nei bracci esterni di dineina dell'assonema e degenerano prima della maturazione. Quale è dunque la ragione per la quale Loopin-1 si associa alla *loop kl-3*? Al momento attuale si può solo speculare che Loopin-1 possa interagire con altre proteine legate alla *loop kl-3*, modificandole a livello postraduzionale, forse esercitando un'attività amminopeptidasi.

Il modo migliore per comprendere il ruolo biologico di Loopin-1 sarebbe quello di isolare mutazioni nel gene che codifica per questa proteina, ed esaminarne i fenotipi a vari livelli. Ho tentato di portare avanti questo approccio, ma non sono riuscito ad ottenere deficienze della regione 53C9-11, dove mappa *loopin-1*. Le ragioni di questo fallimento non stanno nel metodo sperimentale o nelle dimensioni dell'esperimento da me effettuato, ma nella natura della regione 53C. Come precedentemente menzionato, in questa regione vi sono due geni aploinsufficienti: uno è il gene che codifica per la proteina ribosomale *rpA1*, e l'altro è per ora sconosciuto. Avendo condotto i miei esperimenti in presenza di

extracopie selvatiche di rpA1, l'unica ragione plausibile per non avere ottenuto deficienze della regione 53C9-11 è che in questa zona mappi l'altro gene aploinsufficiente. Naturalmente questo gene non può essere *loopin-1*, che è espresso solo nei testicoli e che, con ogni probabilità, dovrebbe essere identificato da mutazioni maschio-sterili e non da mutazioni letali o semiletali.

La grande difficoltà nell'ottenere deficienze che rimuovano *loopin-1* mi ha suggerito altre possibili strategie per ottenere mutazioni in questo gene. Una di esse potrebbe essere il *local jumping*, utilizzando l'elemento R122 (che mappa a 53C6) o l'elemento 1257 che mappa a 53C11-12. Questa tecnica si basa sul fatto che nelle femmine gli elementi P tendono a trasporarsi in regioni vicine a quelle del loro sito di inserzione originale. Alternativamente, potrei saggiare per *Western blotting* una serie di mutanti maschio-sterili sul secondo cromosoma per individuare mutazioni che producono alterazioni quantitative o qualitative della *Loopin-1*. A questo proposito va sottolineato che B. Wakimoto (Seattle), D. Lindlsey e C. Zuker (San Diego) hanno recentemente isolato più di 1.500 mutanti maschio-sterili sul secondo cromosoma e li hanno messi a disposizione della comunità dei drosofilisti.

4. CAPITOLO 3: Analisi di mutanti autosomici che alterano la formazione della *loop kl-3*.

4.1 Premessa.

Un approccio per capire i meccanismi di funzionamento delle *loops* consiste nell'isolamento di mutazioni non legate al cromosoma Y che ne alterano il normale sviluppo. Nella mia Tesi di Laurea ho descritto quattro di queste mutazioni, denominate *ms(2)HA30*, *ms(3)HB223*, *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933*. Il clonaggio dei geni specificati da queste mutazioni può infatti fornire importanti informazioni sui componenti strutturali delle *loops* e/o sui meccanismi che ne regolano la formazione. *ms(2)HA30* provoca una disintegrazione precoce della *loop kl-3*, alterando quindi il pattern temporale di sviluppo di questa *loop*; *ms(3)HB223* causa la totale assenza della *loop kl-3*; *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933*, che sono mutazioni alleliche, hanno un effetto fenotipico leggermente diverso: in *ms(3)HB267* si ha una assenza completa della *loop kl-3*, mentre in *ms(3)HB933* la *loop* è fortemente ridotta. In nessuno di questi mutanti si hanno alterazioni rilevabili a carico delle *loops kl-5* e *ks-1* (Figure 4.1 e 4.2). Nella mia Tesi di Laurea ho

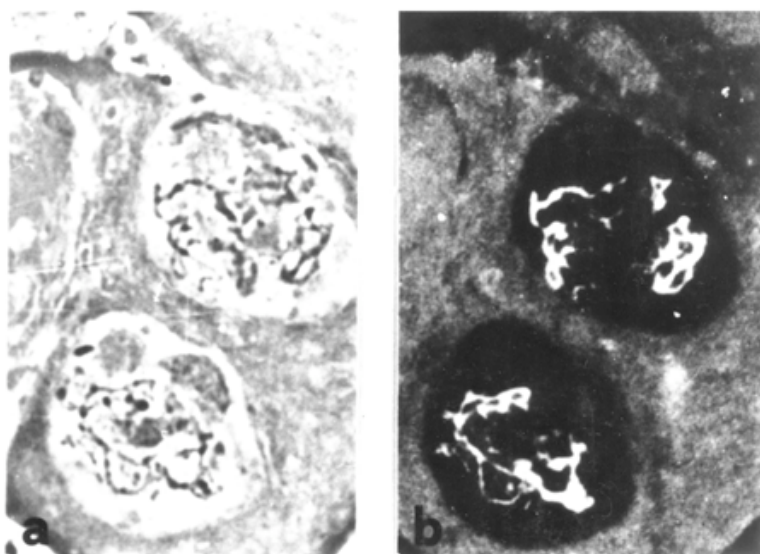


FIGURA 4.1 Immunolocalizzazione della *loop kl-3* con l'anticorpo T53-F1 in spermatociti di tipo selvatico (Oregon-R). a: contrasto di fase; b: immunofluorescenza.. Si noti la natura filamentosa e l'estensione della *loop kl-3*.

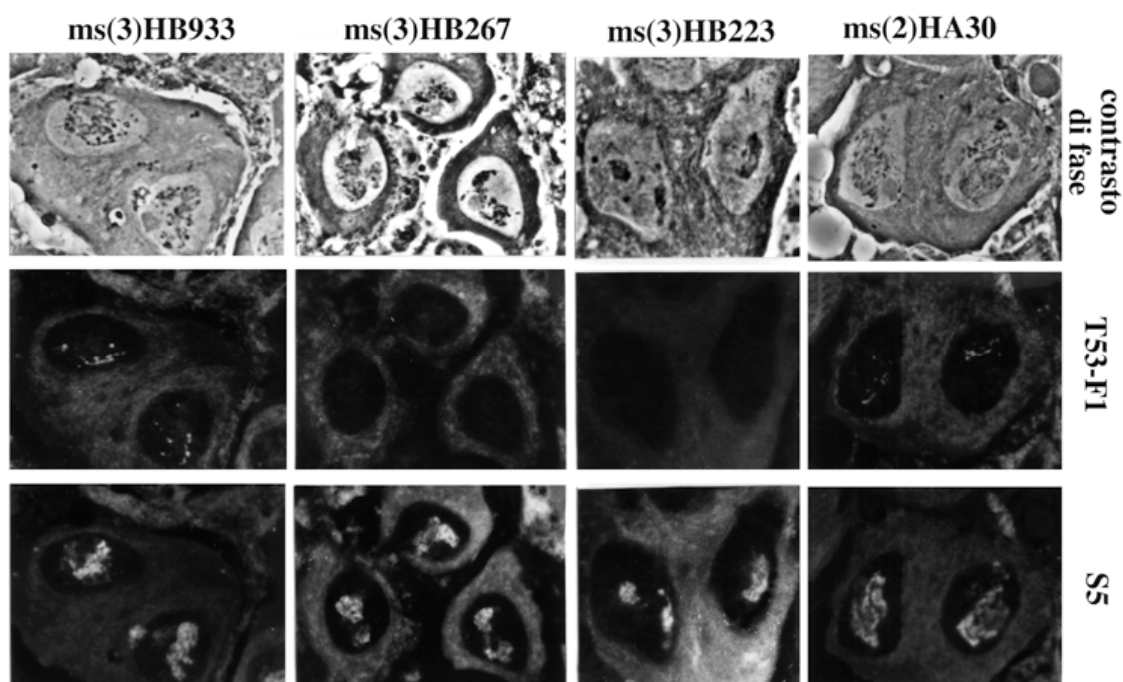


FIGURA 4.2 Assenza della loop *kl-3* in *ms(2)HA30*, *ms(3)HB223*, *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933*. L'immunocolorezione con T53-F1 mostra l'assenza o l'estrema riduzione della loop *kl-3* (si confronti questa figura con la Figura 4.1). Le immagini a contrasto di fase e l'immunocolorezione con S5 mostrano che in questi mutanti vi è un normale sviluppo delle loops *kl-5* e *ks-1*.

mappato statisticamente queste mutazioni, dimostrando che *ms(2)HA30* mappa 86.8, *ms(3)HB223* in posizione 42.5, *ms(3)HB267* (e il suo allele *ms(3)HB933*) in posizione 58.1. Nel presente lavoro ho mappato queste tre mutazioni su deficienza ed ho analizzato il loro fenotipo biochimico ed ultrastrutturale.

4.2 Mappatura per delezioni.

Per mappare *ms(2)HA30*, *ms(3)HB223* e *ms(3)HB267* ho incrociato maschi in cui queste mutazioni erano in eterozigosi con un cromosoma bilanciante marcato con *Tb*, con femmine portatrici di una delezione in eterozigosi con lo stesso bilanciante (vedi Materiali e Metodi per i dettagli sperimentali). Ho quindi raccolto le larve non *Tb* che portavano la mutazione in eterozigosi con la deficienza. Da queste larve ho allestito preparati di testicoli che sono stati esaminati per la presenza e la normalità della loop *kl-3*. Ho inoltre

recuperato maschi F_1 adulti mutante/deficienza che sono stati testati per la fertilità incrociandoli con femmine vergini del tipo selvatico. In questo modo ho mappato su delezione sia il fenotipo citologico a carico della *loop kl-3* che la sterilità maschile.

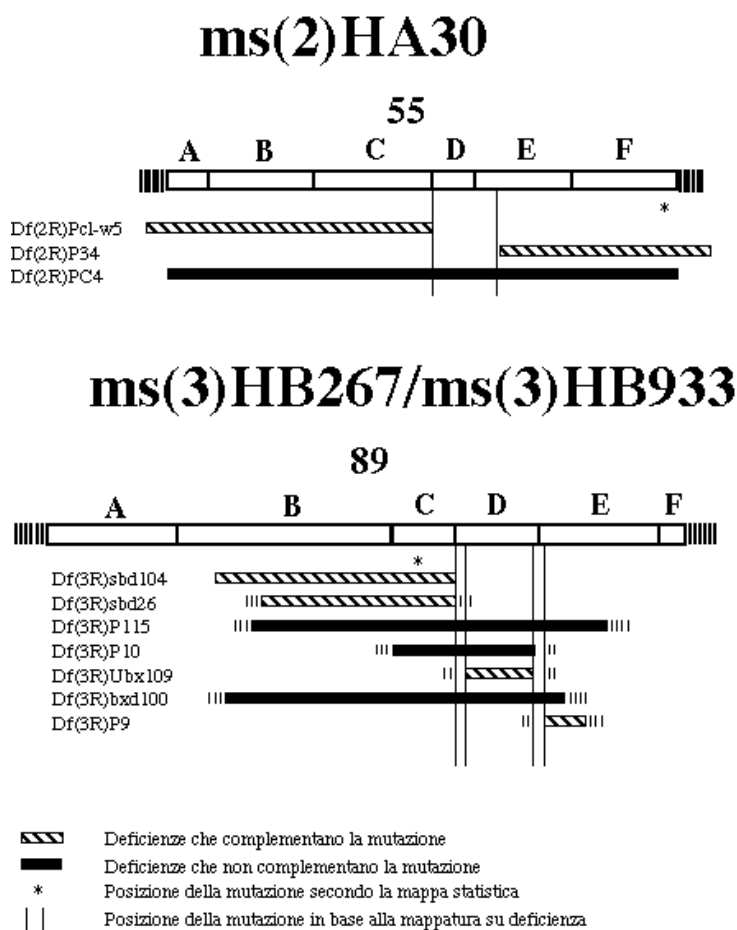


FIGURA 4.3 Mappatura su deficienza dei mutanti *ms(2)HA30* e *ms(3)HB267/ms(3)HB933*. Lo schema in alto rappresenta una regione dei cromosomi politenici, le barre sotto di esso le deficienze usate per la mappatura. Le linee verticali agli estremi delle deficienze indicano le regioni per le quali non è certa l'estensione delle defezioni.

I risultati di questa analisi sono riassunti in Figura 4.3. Come si può vedere la mutazione *ms(2)HA30* è compresa tra 55D1 e 55E6, in quanto complementa (per fenotipo citologico e sterilità maschile) sia con *Df(2R)Pcl-w5* che con *Df(2R)P34*, ma non complementa con *Df(2R)PC4*. Per quanto riguarda *ms(3)HB267* ed il suo allele *ms(3)HB933*, la mappatura su deficienza presenta una certa ambiguità in quanto i dati in mio possesso non mi permettono di discriminare con sicurezza se la mutazione mappa nella regione 89 D1-2 oppure nella regione 89D9-E1 (Figura 4.3). Tuttavia un test di complementazione tra *Df(3R)Ubx109* e *Df(3R)P9* ha mostrato che gli individui eterozigoti

hanno un fenotipo semiletale, con gli *escapers* caratterizzati da un evidente fenotipo *Ubx*. Questo dato, unitamente ai risultati della mappatura statistica, fa supporre che la posizione di mappa della mutazione sia effettivamente 89D1-2.

Non è stato possibile mappare con precisione *ms(3)HB223*, che è posto in una zona del cromosoma 3 (la zona 69) della quale non esistono deficienze note. Sono state tuttavia saggiate molte altre deficienze, sia a monte che a valle di questa zona, che hanno tutte complementato con la mutazione, per cui appare probabile che *ms(3)HB223* mappi effettivamente tra 69B5 (estensione massima della deficienza più distale nota) e 70A1 (estensione massima della deficienza più proximale nota).

4.3 Caratterizzazione biochimica ed ultrastrutturale.

Poiché *ms(2)HA30*, *ms(3)HB223* ed *ms(3)HB267* alterano la *loop kl-3*, ho voluto verificare se in questi mutanti vi fossero gli stessi difetti provocati da mutazioni *kl-3⁻* legate all'Y. Come si ricorderà, una delle caratteristiche dei mutanti *kl-3⁻* è l'assenza dei bracci esterni di dineina nell'assonema (vedi Introduzione). Ho pertanto esaminato al microscopio elettronico i mutanti con difetti nella *loop kl-3* per vedere se presentassero alterazioni nei bracci esterni di dineina. Nel caso di *ms(3)HB223* ho esaminato maschi omozigoti, mentre nel caso di *ms(2)HA30*, *ms(3)HB267* ed *ms(3)HB933* ho esaminato maschi emizigoti per queste mutazioni (cioè maschi in cui le mutazioni erano poste in combinazione con una deficienza che le scopriva). I risultati di questa analisi (Figura 4.4) mostrano chiaramente che i mutanti *ms(3)HB223* e *ms(3)HB267* hanno bracci di dineina assenti o ridotti come gli individui *V24/W27*, che portano l'elemento $X^P Y^D$ di $T(X;Y)V24$ e l'elemento $Y^P X^D$ di $T(X;Y)W27$, e sono quindi deleti per l'intera regione di Y che forma la *loop kl-3*. Un simile fenotipo ultrastrutturale è stato osservato anche in maschi emizigoti per *ms(3)HB933*, che è una mutazione allelica a *ms(3)HB267* (dati non mostrati). I maschi

emizigoti per *ms(2)HA30* non presentano invece difetti evidenti nei bracci esterni di dineina.

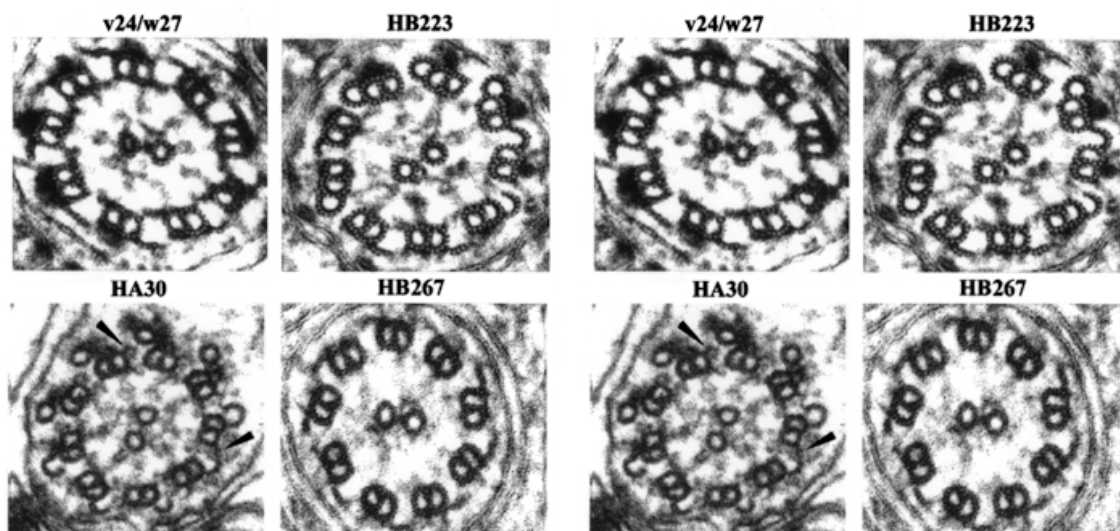


FIGURA 4.4 Sezioni trasversali di assonemi di maschi adulti di *D. melanogaster*. I bracci esterni di dineina sono indicati da punte di frecce. I maschi *V24/W27* sono deleti per il locus *kl-3* (vedi testo per dettagli) e mancano dei bracci esterni di dineina. Nei maschi *HA30/DfPC4* i bracci esterni di dineina sembrano normali sia per grandezza che per posizione. Nei maschi omozigoti per *HB223* e nei maschi *HB267/DfP10* i bracci esterni di dineina sono completamente assenti. Ingrandimento: 160000X.

Un secondo tipo di caratterizzazione dei mutanti difettivi nella *loop kl-3* è stato quello di verificare se in essi fosse presente la proteina ad alto peso molecolare che è assente nei maschi *kl-3⁻*. Come menzionato nella parte introduttiva di questa Tesi, le delezioni che rimuovono i fattori di fertilità *kl-5*, *kl-2* e *kl-3* causano l'assenza di 3 polipeptidi di oltre 300Kd, rispettivamente denominati 5, 2 e 3. Inoltre, le delezioni di *kl-2* causano la riduzione quantitativa del polipeptide 2'. Per questa analisi ho utilizzato gli stessi tipi di maschi usati per la microscopia elettronica: maschi omozigoti per *ms(3)HB233* ed emizigoti per *ms(2)HA30*, *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933*. I risultati ottenuti, mostrati in Figura 4.5, indicano che nei maschi *ms(2)HA30/Df* il pattern elettroforetico è del tutto simile a quello del tipo selvatico, senza alterazioni quantitative o qualitative del polipeptide 3. Nei mutanti *ms(3)HB223/ms(3)HB223*, *ms(3)HB267/Df* e *ms(3)HB933/Df* mancano invece i polipeptidi 2, 3 e 5, a fronte del fatto che i maschi deleti per la regione che forma la

loop kl-3 mancano solo del polipeptide 3 (Goldstein et al., 1982). In questi esperimenti non ho preso in esame il polipeptide 2' a causa della difficoltà di determinare con precisione le sue variazioni quantitative.

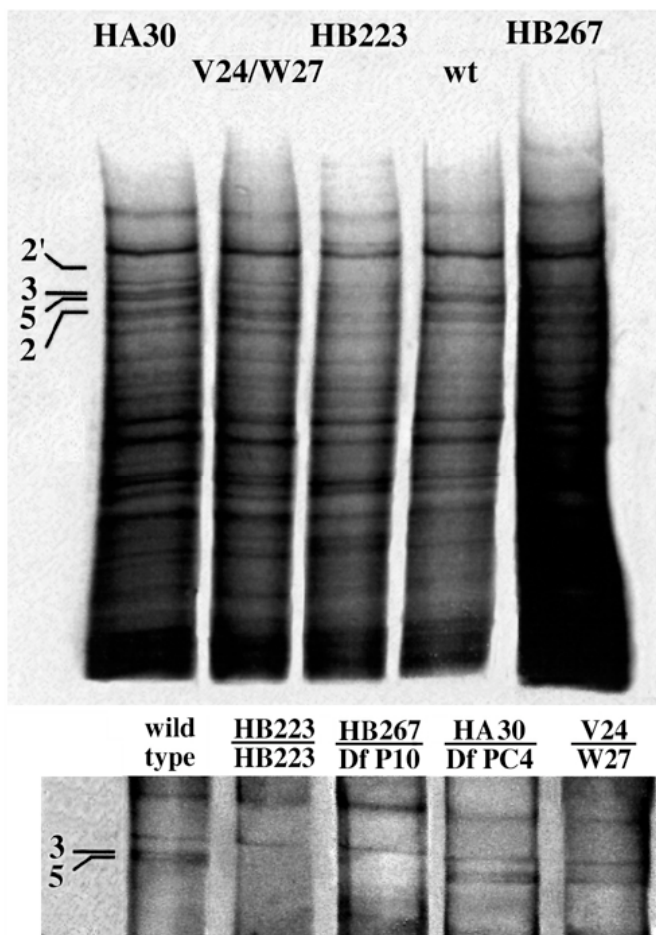


FIGURA 4.5

In alto: incorporazione di metionina radioattiva in proteine testicolari di adulti di *Drosophila melanogaster* di vari genotipi. I maschi *HA30* e *HB267* sono emizigoti e quelli *HB223* omozigoti; i maschi *wt* sono *wild type* e quelli *V24/W27* portano una delezione del locus *kl-3* (vedere testo per dettagli). Si noti che i maschi *V24/W27* mancano del polipeptide 3; gli altri maschi mutanti non differiscono dal tipo selvatico.

In basso: elettroforesi di proteine testicolari estratte da maschi di vari genotipi. Sono indicati solo i polipeptidi 3 e 5; il polipeptide 2 si riesce a vedere su gel ma è difficile da visualizzare su fotografia. Si noti che i maschi *V24/W27* mancano del polipeptide 3; negli altri maschi mutanti sono simultaneamente assenti i polipeptidi 3 e 5.

Lo sconcertante risultato che i mutanti *ms(3)HB223* e *ms(3)HB267* mancano dei polipeptidi 2, 3 e 5 mi ha indotto a verificare se l'assenza di questi polipeptidi fosse dovuta alla loro mancata sintesi oppure ad una loro instabilità. A tale scopo, ho marcato le proteine testicolari con metionina contenente zolfo radioattivo, le ho sottoposte ad elettroforesi e quindi visualizzate mediante autoradiografia. Questa analisi ha rivelato che i maschi omozigoti per *ms(3)HB223* e quelli emizigoti per *ms(2)HA30*, *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933* presentano tutti lo stesso *pattern* elettroforetico del tipo selvatico e sintetizzano normalmente i polipeptidi 5, 3 e 2. Questo risultato contrasta con il dato che i

mutanti *kl-5*, *kl-3* e *kl-2* legati all'Y non sintetizzano rispettivamente i polipeptidi 5, 3 e 2 (Tabella 1.1; Goldstein et al., 1982).

4.4 Discussione.

La caratterizzazione citologica di *ms(2)HA30*, *ms(3)HB223*, *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933* ha mostrato che questi mutanti presentano difetti differenti a carico della *loop kl-3*. In *ms(2)HA30* la *loop* si forma regolarmente ma si disintegra precocemente rispetto al tipo selvatico. Negli altri tre mutanti la *loop* è fortemente ridotta o assente. Gli esami ultrastrutturali ed elettroforetici condotti su *ms(2)HA30* hanno mostrato che questo mutante in nessun caso differisce dal tipo selvatico. Pertanto, sembra che la distruzione precoce della *loop kl-3* non influisca sulla struttura degli assonemi e sulla stabilità del polipeptide 3. Va tuttavia considerato che i mutanti *ms(2)HA30* sono completamente sterili. Ciò suggerisce che il loro difetto nella *loop* possa prodursi in alterazioni fenotipiche non ancora identificate, ma comunque tali da causare sterilità.

L'analisi fenotipica di *ms(3)HB223* e dei due alleli *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933* ha invece messo in luce un fenotipo del tutto inaspettato. Ambedue queste mutazioni sopprimono la formazione dei bracci esterni di dineina dell'assonema, in accordo con il fatto che sopprimono anche la formazione della *loop kl-3*. Tuttavia in questi mutanti sono assenti i polipeptidi 3, 2 e 5 e non solo il 3 come ci si potrebbe aspettare. Inoltre, sia *ms(3)HB223* che le mutazioni alleliche *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933* sintetizzano tutti e tre questi polipeptidi, a fronte del fatto che le mutazioni di *kl-3* causano l'assenza del polipeptide 3. Si deve quindi concludere che i geni specificati da *ms(3)HB223* e *ms(3)HB267/ms(3)HB933* non siano essenziali per la sintesi dei polipeptidi 2, 3 e 5, ma solo per la loro stabilizzazione. L'assenza dei bracci di dineina osservata in questi mutanti ben si accorda con questo fenotipo biochimico in quanto è logico aspettarsi che alcuni dei

polipeptidi resi instabili dalle mutazioni possano corrispondere a catene pesanti della dineina assonemale.

I dati biochimici su *ms(3)HB223* e *ms(3)HB267/ms(3)HB933* non forniscono invece una facile spiegazione degli effetti specifici di queste mutazioni sulla *loop kl-3*. Si potrebbe postulare che i prodotti di questi geni, oltre ai polipeptidi 5, 2 e 3, stabilizzino anche altri componenti strutturali della *loop kl-3*. Alternativamente, l'integrità strutturale della *loop kl-3* potrebbe essere garantita dal polipeptide 3 stesso. Non è possibile che tale ruolo possa essere svolto dai polipeptidi 2 e 5 poiché delezioni dei fattori di fertilità *kl-2* e *kl-5* non alterano la struttura della *loop kl-3* (Bonaccorsi et al., 1988).

Relativamente alla possibilità che il polipeptide 3 sia necessario alla formazione ed al mantenimento della *loop kl-3*, è necessario ricordare che deficienze della regione che forma questa *loop* determinano la scomparsa di questo polipeptide sia tra le proteine neosintetizzate (marcate con metionina radioattiva) che tra le proteine totali testicolari (Goldstein et al., 1982). Sulla base di questi risultati, Goldstein e collaboratori (1982) hanno proposto che il fattore di fertilità *kl-3* contenga il gene strutturale che codifica per il polipeptide 3. Il fatto che mutanti in cui la formazione della *loop kl-3* è completamente soppressa riescono a sintetizzare un normale quantitativo di polipeptide 3, mette in dubbio questa ipotesi e suggerisce che tale polipeptide venga sintetizzato da un gene diverso da *kl-3*. Tuttavia, se ciò fosse vero, bisognerebbe spiegare perché le deficienze della regione *kl-3* causano la mancata sintesi del polipeptide 3, mentre le mutazioni autosomiche che sopprimono la formazione della *loop kl-3* non influenzano la sintesi di questo peptide, ma ne alterano solo la stabilità. Al momento attuale non mi sento di avanzare ipotesi per spiegare questi dati. Ritengo però che tutto potrà essere chiarito quando saranno disponibili informazioni sulla natura molecolare del polipeptide 3 e dei prodotti genici di *ms(3)HB223* e *ms(3)HB267*.

5. MATERIALI E METODI

5.1 Allevamento delle drosofile.

Tutti i ceppi di *Drosophila* utilizzati sono stati allevati a 25°C. Il terreno di coltura standard è composto da farina di mais, agar, lievito e acido propionico (con funzione antifermentativa).

5.2 Stocks.

$T(X;Y) V24$ e $T(X;Y)W27$ sono traslocazioni reciproche fertili rotte nell'eterocromatina prossimale dell'X, che coinvolgono un cromosoma X marcato con $y w f$ e un cromosoma Y marcato con B^S e y^+ (Kennison, 1981; Hardy et al., 1984). Per l'analisi di spermatozoi primi contenenti una specifica *loop* sono stati utilizzati maschi portatori dell'elemento $Y^D X^P$ di ciascuna traslocazione, ottenuti incrociando maschi $T(X;Y)$ per femmine $y w f$.

I mutanti maschio-sterili $ms(2)HA30$, $ms(3)HB223$, $ms(3)HB267$ e $ms(3)HB933$ sono stati indotti con EMS. Il mutante sul secondo cromosoma è marcato con $cn bw$ (due mutazioni che influenzano il colore dell'occhio ed in omozigosi determinano occhio bianco), quelli sul terzo cromosoma con $st e$ (rispettivamente occhio scarlatto e corpo scuro) Tutti questi mutanti sono mantenuti in *stocks* stabili per mezzo del doppio bilanciatore *TSTL*, costituito da una traslocazione tra il cromosoma 2 multinvertito *CyO* marcato con *Curly* (*Cy*, ali arricciate) ed il cromosoma 3 multinvertito *TM6b* marcato con *Tubby* (*Tb*, larve, pupe e adulti più tozzi del normale). A causa della traslocazione i due elementi multinvertiti di *TSTL* segregano sempre insieme (nei casi di segregazione adiacente i gameti prodotti non sono vitali perché geneticamente sbilanciati) ed inoltre la combinazione *TSTL* non può andare in omozigosi perché sia *Cy* che *Tb* danno in questo caso letalità; ciò permette di bilanciare simultaneamente entrambi gli autosomi maggiori.

Nel caso dei mutanti del terzo cromosoma, alcuni *stocks* sono mantenuti sul solo cromosoma 3 multinvertito *TM6c*, marcato con *Tb* e *Stubble* (*Sb*, adulti con setole corte e tozze).

Le deficienze usate per la mappatura dei mutanti della collezione Hackstein ci sono state fornite dallo Stock Center Europeo di Umea. Le deficienze del secondo cromosoma sono state bilanciate su *TSTL Cy Tb*, quelle del terzo su *TM6c Tb, Sb*, due cromosomi descritti precedentemente. I marcatori presenti sui cromosomi portatori di deficienze sono descritti in dettaglio in Lindsley e Zimm (1992). Nel caso delle mutazioni maschio-sterili sul secondo cromosoma maschi *ms(2)/TSTL* sono stati incrociati con femmine *Df/TSTL*. I maschi *ms(2)/Df* nati dall'incrocio sono facilmente riconoscibili sia a livello di larve, perché privi del marcatore *Tb*, che negli adulti, perché privi del marcatore *Cy*. E' stato quindi possibile sia caratterizzare citologicamente le larve per la presenza delle *loops*, che testare gli adulti per la fertilità, mediante incrocio con femmine vergini di tipo selvatico. Nel caso delle mutazioni maschio-sterili sul terzo cromosoma lo schema di incrocio seguito è stato analogo a quello appena descritto, in quanto sia le mutazioni maschio-sterili che le deficienze utilizzate sono state bilanciate sul cromosoma *TM6c Tb Sb*, che permette di riconoscere facilmente sia le larve che gli adulti *ms(3)/Df*.

5.3 Allestimento dei preparati citologici di testicoli.

I testicoli adulti, pupali o larvali sono stati dissezionati in TRIS-HCl 10mM, KCl 183mM, NaCl 47mM, EDTA (Titriplex) 1mM, pH6,8 a temperatura ambiente, quindi schiacciati delicatamente tra vetrini porta- e copri-oggetto in 2-3ml dello stesso tampone, ed immersi in azoto liquido. Dopo asportazione del vetrino copri-oggetto, i preparati sono stati fissati immergendoli in metanolo freddo (-18/-20°C) per 5', poi passandoli in acetone a -20°C per 1' ed infine in PBS (formula di Dulbecco) contenente 1% Triton X-100 e 0,5% acido acetico, per 10' a temperatura ambiente. I preparati così fissati sono stati lavati due volte per 5' in PBS ed utilizzati entro 2 giorni per successivi esperimenti citologici.

Per quanto riguarda l'analisi delle *loops* estese, è stato possibile ottenere dei buoni risultati con gli spermatoцитi maturi semplicemente schiacciando con forza, anziché delicatamente, il preparato prima del passaggio in azoto liquido. Durante lo schiacciamento bisogna fare attenzione ad esercitare sul preparato una pressione perfettamente perpendicolare, evitando cioè movimenti traslatori del coprioggetto rispetto al portaoggetto.

5.4 Immunofluorescenza indiretta.

I preparati fissati sono stati incubati per 60-90' con un anticorpo primario (*Jel318*, *Jel466*, *T53-1* o *S5*, tutti diluiti 1:10). Dopo due sciacqui da 5' ciascuno in PBS i preparati sono stati incubati con un anticorpo di pecora anti-IgG di topo coniugato con fluoresceina (FLUOS; Boehringer), diluito anch'esso 1:10. Dopo un ulteriore sciacquo in PBS di almeno 10' per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario; i vetrini sono stati montati nello stesso tampone o colorati con Hoechst33258 (secondo la tecnica descritta nel successivo paragrafo) prima di essere osservati al microscopio.

Per ottenere risultati con l'anticorpo *Jel318* è stato necessario, prima dell'incubazione, un pretrattamento dei vetrini con una soluzione contenente tripsina. I vetrini sono stati immersi per 60-90 secondi in 50ml di PBS contenente 10ml di una soluzione pari a 0,5g di tripsina e 0,2g di EDTA per litro di soluzione salina A di Puck modificata (Life Technologies). Dopo questo passaggio i vetrini sono stati abbondantemente sciacquati in PBS per eliminare l'eccesso di tripsina.

Con entrambi gli anticorpi anti-triplex è stato inoltre necessario incubare subito i vetrini con l'anticorpo, perché già dopo 24 ore non è più possibile rilevare alcuna colorazione.

Per effettuare la doppia immunocolorazione con gli anticorpi *T53-1* ed *S5* sui mutanti difettivi nella formazione delle *loops* i preparati sono stati trattati per 90' con l'anticorpo *S5* diluito 1:10. Sono stati poi incubati con un anticorpo anti-IgG di topo coniugato con rodamina (TRITC, Cappel) per circa 12 ore a 4°C. Questo lungo trattamento con

l'anticorpo secondario è stato effettuato per saturare tutti i siti antigenici dell'anticorpo monoclonale S5. I vetrini così trattati sono poi stati immunocolorati con l'anticorpo T53-1 seguendo la procedura descritta prima. Con questo accorgimento è stato possibile avere una doppia immunofluorescenza indiretta pur partendo da due anticorpi generati in topo. Questo trattamento non è stato possibile con gli anticorpi anti triplex in quanto, come detto prima, le strutture riconosciute da tali anticorpi risultano instabili nel tempo, anche dopo immunocolorazione.

5.5 Colorazione con Hoechst33258.

Dopo l'immunocolorazione i preparati sono stati lasciati asciugare all'aria per alcuni minuti, reidratati per 5' a temperatura ambiente in tampone fosfato (NaCl 0,15M, KCl 0,03M, Na₂HPO₄ 0,01M) a pH7 e quindi colorati per 15' in Hoechst33258 (5mg/ml) disciolto nello stesso tampone; sono stati infine lavati rapidamente ancora nello stesso tampone. I vetrini così trattati sono stati lasciati asciugare all'aria, montati in tampone fosfato citrato (Na₂HPO₄ 0,16M, C₆H₅Na₃O₇ 0,04M) a pH7 ed infine sigillati con Rubber Cement.

5.6 Ibridazione *in situ*.

I preparati dei cromosomi politenici sono stati allestiti secondo le tecniche standard, dissezionando le ghiandole salivari di larve al terzo stadio in acido acetico al 45% e fissandole in una goccia di acido acetico/H₂O/acido lattico (3:2:1) posta su un coprioggetto siliconato. Dopo lo schiacciamento, i preparati sono stati immersi in azoto liquido. Il coprioggetto è stato poi rimosso con una lametta, i preparati immersi in etanolo assoluto a -20°C per 20' e lasciati asciugare all'aria. Dopo un pretrattamento di 30' in 2xSSC a 60°C i vetrini sono stati immersi per 10' nello stesso tampone a temperatura

ambiente e quindi denaturati per 2' in NaOH 70mM. Dopo uno sciacquo di 5' in 2xSSC a temperatura ambiente, i vetrini sono stati immersi in alcool al 70%(2x5') e al 95% (2x5'), lasciati asciugare all'aria e immediatamente ibridati. Su ciascun vetrino sono stati applicati 10µl di miscela di ibridazione (1µl di 20xSSC, 5ml di formammide deionizzata, 2µl di destran solfato al 50% in H₂O, 2µl di H₂O bidistillata) contenente 3µg di SSD (Salmon Sperm DNA) e 20ng di DNA marcato con biotina dUTP mediante *nick translation* (prima di essere posta sui vetrini, la miscela è stata bollita per 7' per consentire la denaturazione della sonda). I vetrini sono stati coperti con un coprioggetto 24x24, sigillati con Rubber Cement e incubati per una notte a 45°C in camera umida. Dopo aver rimosso il coprioggetto mediante immersione in 2xSSC a 53°C (3x20'), i vetrini sono stati sciacquati in PBS (2x5') a temperatura ambiente, quindi immersi in PBS contenente 0,1% Triton-X per 2' e di nuovo sciacquati in PBS (3x5'). I passaggi successivi per la rilevazione del segnale sono stati effettuati utilizzando il kit della Enzo Biochemicals. I vetrini sono stati incubati con 200 ml di DETEK Hrp Complex (diluito 1:200 in Complex Dilution Buffer) per 30' a 37°C in camera umida, quindi sciacquati in PBS (2x5') a temperatura ambiente e incubati con 100 ml di AEC-Substrate Mixture per 30' a 37°C in camera umida. I vetrini sono stati quindi sciacquati in PBS, colorati per 5-7sec. con Giemsa al 5% in tampone fosfato 10mM (pH6,8) e montati in H₂O per l'osservazione al microscopio.

5.7 Osservazione al microscopio.

Le osservazioni al microscopio e le fotografie sono state effettuate con un fotomicroscopio Zeiss III RS dotato di lampada a fluorescenza HBO da 100 Watt. Per l'osservazione dei preparati trattati con anticorpi coniugati con fluoresceina e rodamina sono state rispettivamente usate le combinazioni di filtri Zeiss 09 (BP 455-490/ FT 510/ LP 520) e 15 (BP 546, FT 580, LP 590); per l'Hoechst è stata usata la combinazione 01 (BP 390-420, FT 425, LP 450). Per le fotografie è stata impiegata la pellicola Kodak T-Max 100.

I preparati per l'analisi dei triplex sono stati analizzati con un microscopio Zeiss Axioplan dotato di una lampada a fluorescenza HBO da 50 Watt e delle stesse combinazioni di filtri descritte precedentemente e collegato ad una CCD (*Charge Coupled Device*) camera Photometrics. I segnali fluorescenti sono stati registrati come immagini digitali separate utilizzando il software IP Lab Spectrum. Le immagini sono state poi convertite in formato Photoshop 2.5 (Adobe Systems Inc., MountainView, CA), pseudocolorate e sovrapposte.

5.8 Microscopia elettronica.

Testicoli dissezionati da individui adulti sono stati fissati per 1 ora a temperatura ambiente in tampone fosfato 0,1 M (pH 7,2) contenente glutaraldeide al 3%, lavati 4 volte per 5' in tampone fosfato e postfissati per un'ora nello stesso tampone contenente 1% OsO₄. Dopo altri 4 lavaggi da 5' in tampone fosfato i testicoli sono stati disidratati con etanolo (30%, 50% e 70% tre volte, 5' ciascuno, a 4°C, e poi 95% e 100% tre volte, 10' ciascuno, a temperatura ambiente), quindi inclusi in Epon. Le sezioni sottili sono state colorate con acetato di uranile al 3% e citrato di piombo.

5.9 Colorazione con oro colloidale.

I testicoli degli adulti sono stati dissezionati in PBS e poi fissati per 20' in paraformaldeide al 3,7% in PBS. Sono stati quindi permeabilizzati con una soluzione 0,5% Triton X-100 in PBS per 10' e sciacquati per tre volte in PBS (10' per ogni passaggio). I testicoli così trattati sono stati incubati per 2 ore a temperatura ambiente con l'anticorpo primario T53-1 diluito 1:10 in PBS contenente 0,1% BSA, lavati sei volte (10' ognuna) in PBS e poi incubati con l'anticorpo secondario (anti-IgG di topo diluito 1:10 in PBS contenente 0,1% BSA) coniugato con oro colloidale (diametro delle sfere: 5 nm) per 1 ora,

e infine lavati (3x10') in PBS. Sono stati quindi sciacquati in tampone fosfato 0,1M (pH7,2) per 10', immersi per 1h in glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato, lavati altre due volte (10' ciascuna) nello stesso tampone e infine passati in una soluzione di tetraossido di osmio all'1% in tampone fosfato. Dopo averli sciacquati nello stesso tampone (2x10') sono stati disidratati e inclusi secondo le tecniche standard sopra riportate.

5.10 Estrazione e sequenziamento del DNA genomico.

Per la preparazione del DNA, l'elettroforesi su gel di agarosio, l'analisi di genoteche, il *Southern blotting*, l'ibridazione, l'autoradiografia, il sequenziamento del DNA, il subclonaggio e l'analisi di sequenze sono state seguite le procedure standard descritte da Sanger et al. (1977) e da Sambrook et al. (1989). Il clone genomico utilizzato negli esperimenti è stato isolato da una library genomica di *D. melanogaster* in λ EMBL 3 ottenuta dal Dott. Kim Kaiser (University of Glasgow, Scotland). L'autoradiografia è stata effettuata con sonde marcate con biotina chemiluminescente (Boeringher). Il subclonaggio è stato condotto tramite l'uso degli enzimi di restrizione PvuII e SmaI in un vettore Bluescript.

5.11 Caratterizzazione biochimica dei mutanti maschio-sterili.

La caratterizzazione biochimica dei mutanti maschio-sterili *ms(2)HA30*, *ms(3)HB223*, *ms(3)HB267* e *ms(3)HB933* è stata eseguita seguendo i protocolli standard di Laemmli (Laemmli, 1970). La sola variante applicata è che, a causa dell'alto peso molecolare delle proteine analizzate (tra i 300 ed i 400 Kd), è stato utilizzato un gel di poliacrilamide al 3-5%.

6. BIBLIOGRAFIA

- Agazie, Y. M., J. S. Lee and G. D. Burkholder, 1994.
Characterization of a new monoclonal antibody to triplex DNA and immunofluorescent staining of mammalian chromosomes.
J. Biol. Chem. **269**:7019-7023.
- Ashburner, M., 1989.
Drosophila: A laboratory Handbook.
Cold Spring Harbor, New York.
- Barawkar, D. A., K. G. Rajeev, V. A. Kumar and K. N. Ganesh, 1996.
Triplex formation at physiological pH by 5-Me-dC-N-4-(spermine)[X] oligodeoxynucleotides: non protonation of N₃ in X of X*G:C triad and effect of base mismatch ionic strength on triplex stabilities.
Nuc. Acids Res. **24**:1229-1237.
- Beal, P. A. and P. B. Dervan, 1991.
Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation.
Science **251**:1360-1363.
- Beatty, A. M. and M. J. Behe, 1988.
An oligopurine sequence bias occurs in eukaryotic viruses.
Nuc. Acids Res. **16**:1517-1528.
- Behe, M. J., 1987.
The DNA sequence of the human α -globin region is strongly biased in favour of long strings of contiguous purine or pyrimidine residues.
Biochemistry **26**:7870-7875.
- Bhaumik, S. R., K. V. R. Chary, G. Govil, K. Liu and H. T. Miles, 1998.
A novel palindromic triple-stranded structure formed by homopyrimidine dodecamer d-CTTCTCCTCTTC and homopurine hexamer d-GAAGAG.
Nuc. Acids Res. **26**:2981-2988.
- Boles, T. C. and M. E. Hogan, 1987.
DNA structure equilibria in the human *c-myc* gene.
Biochemistry **26**:367-376.
- Bonaccorsi, S., C. Pisano, F. Puoti and M. Gatti, 1988.
Y chromosome *loops* in *Drosophila melanogaster*.
Genetics **120**:1015-1034.
- Bonaccorsi, S., M. Gatti, C. Pisano and A. Lohe, 1990.
Transcription of satellite DNA on the Y chromosome *loops* of *Drosophila melanogaster*.
Chromosoma **99**:260-266.
- Bonaccorsi, S. and A. Lohe, 1991.
Fine mapping of satellite DNA sequences along the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*: relationships between satellite sequences and fertility factors.
Genetics **129**:177-189.
- Booher, M. A., S. Wang and E. T. Kool, 1994.
Base pairing and steric interactions between pyrimidine strand bridging *loops* and the purine strand in DNA pyrimidine•purine•pyrimidine triplexes.
Biochemistry **33**:4645-4651.
- Bridges, C. B., 1916.
Non-disjunction as a proof of the chromosome theory of heredity.
Genetics **1**:1-52 and 107-163.
- Brosseau, G.E., 1960.
Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*.
Genetics **45**:257-274.
- Brutlag, D.L., 1980.
Molecular arrangement and evolution of heterocromatic DNA.
Annu. Rev. Genet. **14**:121-144.

- Burkholder, G. D., L. J. P. Latimer and J. S. Lee, 1988.
Immunofluorescent staining of mammalian nuclei and chromosomes with a monoclonal antibody to triplex DNA. *Chromosoma* **97**:185-192.
- Burkholder, G. D., L. J. P. Latimer and J. S. Lee, 1991.
Immunofluorescent localization of triplex DNA in polytene chromosomes of *Chironomus* and *Drosophila*. *Chromosoma* **101**:11-18.
- Castrillon, D. H., P. Gonczy, S. Alexander, R. Rawson, C.G. Eberhart, S. Viswanathan, S. DiNardo and S.A. Wasserman, 1993.
Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* **135**:489-505.
- Cavener, D. R. and S. C. Ray, 1991.
Eukaryotic start and stop translation sites. *Nuc. Acids Res.* **19**:3185-3192.
- Cenci, G., S. Bonaccorsi, C. Pisano, F. Verni and Gatti M., 1994.
Chromatin and microtubule organization during premeiotic, meiotic and early postmeiotic stages of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *J. Cell Sci.* **107**: 3521-3534.
- Cherny, D. I., A. Fourcade, F. Svinarchuk, P. E. Nielsen, C. Malvy and E. Delain, 1998.
Analysis of various sequence-specific triplexes by electron and atomic force microscopies. *Biophys. J.* **74**(2 Pt 1):1015-1023.
- Church, K. and H.P.P. Lin, 1982.
Meiosis in *Drosophila melanogaster*. the prometaphase-1 kinetochore microtubule bundle and kinetochore orientation in males. *J. Cell Biol.* **93**:365-373.
- Church, K. and H.P.P. Lin, 1985.
Kinetochore microtubules and chromosome movement during prometaphase in *Drosophila melanogaster* spermatocytes studied in life and with the electron microscope. *Chromosoma* **92**:273-282.
- Cooley, L., R. Kelley and A. C. Spradling, 1988.
Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**:1121-1128.
- Cooney, M., G. Czernuszewicz, E. H. Postel, S.J. Flint and M. E. Hogan, 1988.
Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human *c-myc* gene *in vitro*. *Science* **241**:456-459.
- Cooper, K.W., 1965.
Normal spermiogenesis in *Drosophila*. In: *Biology of Drosophila* (M. Demerec ed.), pp. 1-61. Hafner Publishing Company, New York and London.
- Curcio, L. D., D. Y. Bouffard and K. J. Scanlon, 1997.
Oligonucleotides as modulators of cancer gene expression. *Pharmacol. Ther.* **74**:317-332.
- Dayn, A., G. M. Samadashwily and S. M. Mirkin, 1992.
Intramolecular DNA triplexes - Unusual sequence requirements and influence on DNA polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:11406-11410.
- Di Benedetto, A.J., D.M. Lakich, W.D. Kruger, J.M. Belote, B.S. Baker and M. F. Wolfner, 1987.
Sequences expressed sex specifically in *Drosophila melanogaster* adults. *Dev. Biol.* **119**:242-251.
- Eberhart, C. G., J. Z. Maines and S. A. Wasserman, 1996.
Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human *Deleted in Azoospermia*. *Nature* **381**:783-785.

- Escude, C., J. S. Sun, M. Rougee, T. Garestier and C. Helene, 1992.
Stable triple helices are formed upon binding of RNA oligonucleotides and their 2'-O-methyl derivatives to double-helical DNA.
C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Sci. Vie, Paris **315**:521-525.
- Escude, C., J. C. Francois, J. S. Sun, G. Ott, M. Sprinzl, T. Garestier and C. Helene, 1993.
Stability of triple helices containing RNA and DNA strands: experimental and molecular modeling studies.
Nuc. Acids Res. **21**:5547-5553.
- Fang, Y., C. L. Bai, P. C. Zhang, E. H. Cao, Y. J. He and Y. Q. Tang, 1994.
Interaction of ethidium bromide with a triplex DNA dA(10)•2dT(10).
Sci. Chi. B-Chem. Life Sci. Earth Sci. **37**:1306-1312.
- Felsenfeld, G., D. R. Davies and A. Rich, 1957.
Formation of a three-stranded polynucleotide molecule.
J. Am. Chem. Soc. **79**:2023-2024.
- Frank-Kamenetskii, M. D. and S. M. Mirkin, 1995.
Triplex DNA structures.
Annu. Rev. Biochem. **64**:65-95.
- Fuller, M.T., 1986.
Genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila*: the role of the testis-specific α -tubulin and interacting genes in cellular morphogenesis.
In: Gametogenesis and the Early Embryo (J. G. Gall Ed.), pp. 19-42. Alan R. Liss. New York.
- Gambino, I., 1993.
Clonaggio e analisi di *tekl-3*, un gene che codifica una proteina associata alla *loop kl-3* del cromosoma Y di *Drosophila melanogaster*.
Tesi di Dottorato, Università di Roma "La Sapienza".
- Gatti, M., S. Pimpinelli and G. Santini, 1976.
Characterization of *Drosophila* heterochromatin. I. Staining and decondensation with Hoechst33258 and quinacrine.
Chromosoma **57**:351-375.
- Gatti, M. and S. Pimpinelli, 1983.
Cytological and genetic analysis of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Organization of the fertility factors.
Chromosoma **88**:349-373.
- Gatti, M. and B.S. Baker, 1989.
Genes controlling essential cell cycle functions in *Drosophila melanogaster*.
Genes Dev. **3**:438-453.
- Gatti, M. and S. Pimpinelli, 1992.
Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin.
Annu. Rev. Genet. **26**:239-275.
- Gepner, J. and T. S. Hays, 1993.
A fertility region on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:11132-11136.
- Goldstein, L. S. B., R. W. Hardy and D.L. Lindsley, 1982.
Structural genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **79**:7405-7409.
- Grigoriev, M., D. Praseuth, A. L. Guieysse, P. Robin, N. T. Thuong, C. Helene and A. Harel-Bellan, 1993.
Inhibition of gene expression by triple helix-directed DNA cross-linking at specific sites.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **90**:3501-3505.
- Hackstein, J. H. P., 1987.
Spermatogenesis: genetic aspects.
Results Probl. Cell Differ. **15**:63-116.
- Hackstein, J. H. P., 1991.
Spermatogenesis in *Drosophila*. A genetic approach to cellular and subcellular differentiation.
Eur. J. Cell Biol. **56**:151-169.

- Hackstein, J. H. P. and R. Hochstenbach, 1995.
The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements.
Trends Genet. **11**:195-200.
- Hampel, K. J., P. Crosson and J. S. Lee, 1991.
Polyamines favor DNA triplex formation at neutral pH.
Biochemistry **30**:4455-4459.
- Han, H. Y. and P. B. Dervan, 1993.
Sequence-specific recognition of double helical RNA and RNA•DNA by triple helix formation.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **90**:3806-3810.
- Hardy, R. W., K. T. Tokuyasu and D. L. Lindsley, 1981.
Analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* bearing deletions for Y-chromosome fertility genes.
Chromosoma **83**:593-617.
- Hartl, D. L., J. W. Ajioka, H. Cai, A. R. Lohe, E. R. Lozovskaya, D. A. Smoller and I. W. Duncan, 1992.
Towards a *Drosophila* genome map.
Trends Genet. **8**:70-75.
- Hazelrigg, T., P. Fornili and T. C. Kaufman, 1982.
A cytogenetic analysis of X-ray induced male steriles on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*.
Chromosoma **87**:535-559.
- Heatwole, V. M. and S. R. Haynes, 1996.
Association of RB97D, an RRM protein required for male fertility, with a Y chromosome lampbrush *loop* in *Drosophila* spermatocytes.
Chromosoma **105**:285-292.
- Helene, C., C. Giovannangeli, A. L. Guieysse-Peugeot and D. Praseuth, 1997.
Sequence-specific control of gene expression by antigene and clamp oligonucleotides.
Ciba Found Symp. **209**:94-102.
- Hess, O., 1967.
Morphologische variabilität der chromosomalen funktionsstrukturen in den spermatocytenkernen von *Drosophila*-arten.
Chromosoma **21**:429-445.
- Hess, O. and G. F. Meyer, 1968.
Genetic activities of the Y chromosome in *Drosophila* during spermatogenesis.
Advan. Genet. **14**:171-228.
- Hilliker, A. J. and C. B. Sharp, 1988.
New perspectives on the genetics and molecular biology of constitutive heterochromatin
In: Chromosome Structure and Function (J. P. Gustafson and R. Appels ed.), pp. 91-115. Plenum Press, New York.
- Hulsebos, T. J. M., J. H. P. Hackstein and W. Hennig, 1984.
Lampbrush *loop*-specific protein of *Drosophila hydei*.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **81**:3404-3407.
- Joly, D., C. Bressac, J. Devaux and D. Lachaise, 1991.
Sperm length diversity in *Drosophilidae*.
Dros. Inf. Serv. **70**:104-108.
- Kane, S. A., S. M. Hecht, J. S. Sun, T. Garestier and C. Helene, 1995.
Specific cleavage of a DNA triple helix by Fe^{II}-bleomycin.
Biochemistry **34**:16715-16724.
- Karr, T. L. and S. Pitnick, 1996.
The ins and outs of fertilization.
Nature **379**:405-406.
- Kemphues, K. J., E. C. Raff, R. A. Raff and T. C. Kaufman, 1980.
Mutation in testis-specific β -tubulin in *Drosophila*: analysis of its effects on meiosis and map location of the gene.
Cell **21**:445-451.
- Kemphues, K. J., T. C. Kaufman, R. A. Raff and E. C. Raff, 1982.
The testis-specific β -tubulin subunit in *Drosophila melanogaster* has multiple functions in spermatogenesis.
Cell **31**:655-670.

- Kennison, J. A., 1981.
The genetical and cytological organization of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*.
Genetics **98**:529-548.
- Kennison, J. A., 1983.
Analysis of Y-linked mutation to male sterility in *Drosophila melanogaster*.
Genetics **103**:219-234.
- Kiefer, B. I., 1966.
Ultrastructural abnormalities in developing sperm of X/O *Drosophila melanogaster*.
Genetics **54**:1441-1452.
- Kiefer, B. I., 1973.
Genetics of sperm development in *Drosophila*.
In: Genetic Mechanisms of Development (F.H. Ruddle ed.). Academic Press, New York.
- Kim, H. G., J. F. Reddoch, C. Mayfield, S. Ebbinghaus, N. Vigneswaran, S. Thomas, D. E. Jones Jr and D. M. Miller, 1998.
Inhibition of transcription of the human *c-myc* proto-oncogene by intermolecular triplex.
Biochemistry **37**:2299-2304.
- Kimble, H., J. P. Incardona and E. C. Raff, 1989.
A variant of β -tubulin isoform (β -3) is expressed primarily in tissues of mesodermal origin in embryos and pupae, and is utilized in populations of transient microtubules.
Dev. Biol. **131**:507-521.
- Kiyama, R. and R. D. Camerini-Otero, 1991.
A triplex DNA-binding protein from human cells: purification and characterization.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:10450-10454.
- Kohwi-Shigematsu, T. and Y. Kohwi, 1985.
Poly(dG)-poly(dC) sequences, under torsional stress, induce an altered DNA conformation upon neighboring DNA sequences.
Cell **43**:199-206.
- Kurek, R., A. M. Reugels, K. H. Glätzer and H. Bünemann, 1998.
The Y chromosomal fertility factor *Threads* in *Drosophila hydei* harbors a functional gene encoding an axonemal dynein β heavy chain protein.
Genetics **149**:1363-1376.
- Laemmli, U. K., 1970.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**:680-685.
- Lee, J. S., G. D. Burkholder, L. J. P. Latimer, B. L. Haug and R. P. Braun, 1987.
A monoclonal antibody to triplex DNA binds to eukaryotic chromosomes.
Nuc. Acids Res. **15**:1047-1061.
- Lee, J. S., L. J. Latimer, B. L. Haug, D. E. Pulleyblank, D. M. Skinner and G. D. Burkholder, 1989.
Triplex DNA in plasmids and chromosomes.
Gene **82**:191-199.
- Lee, J. S., L. J. P. Latimer and K. J. Hampel, 1993.
Coralyne binds tightly to both T•A•T-containing and C•G•C⁺-containing DNA triplexes.
Biochemistry **32**:5591-5597.
- Lifschytz, E. and D. Hareven, 1977.
Gene expression and the control of spermatid morphogenesis in *Drosophila melanogaster*.
Devel. Biol. **58**:276-294.

- Lifschytz, E. and G. F. Meyer, 1977.
Characterization of male-meiotic sterile mutations in *Drosophila melanogaster*.
Chromosoma **64**:371-392.
- Lifschytz, E., 1987.
The genetic control of spermatogenesis.
Int. Rev. Cytol. **109**:211- 258.
- Lin, H. P. P., Ault, J. G. and K. Church, 1981.
Meiosis in *Drosophila melanogaster*. I. Chromosome identification and kinetochore microtubule numbers during the first and second meiotic divisions in males.
Chromosoma **83**:507-521.
- Linck, R. W., L. A. Amos and B. Amos, 1985.
Localization of tektin filaments in microtubules of sea urchin sperm flagella by immunoelectron microscopy.
J. Cell. Biol. **100**:126-135.
- Linck, R. W. and G. L. Langevin, 1982.
Structure and chemical composition of insoluble filamentous components of sperm flagellar microtubules.
J. Cell Sci. **58**:1-22.
- Linck, R. W. and R. E. Stephen, 1987.
Biochemical characterization of tektins from sperm flagellar doublet microtubules.
J. Cell Biol. **104**:1069-1075.
- Lindsley, D. L. and E. H. Grell, 1968.
Genetic variations of *Drosophila melanogaster*.
Carnegie Inst. Wash. Publ. **627**.
- Lindsley, D. L. and K. T. Tokuyasu, 1980.
Spermatogenesis.
In: *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 2nd, pp. 225-294 (M. Ashburner and T.R.F. Wright ed.). Academic Press, New York.
- Lindsley, D. L. and G. Zimm, 1992.
The genome of *Drosophila melanogaster*.
Academic Press, New York.
- Lohe, A. R. and D. L. Brutlag, 1986.
Multiplicity of satellite DNA sequences in *Drosophila melanogaster*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:696-700.
- Lohe, A. R. and P. Roberts, 1988.
Evolution of satellite DNA sequences in *Drosophila*.
In: *Molecular and Structural Aspects of Heterochromatin* (Verma R. ed.), pp. 148-186. Cambridge Univ. Press.
- Lohe, A. R., A. J. Hilliker and P. A. Roberts, 1993.
Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*.
Genetics **134**:1149-1174.
- Malkov, V. A., O. N. Voloshin, V. N. Soyfer and M. D. Frank-Kamenetskii, 1993.
Cation and sequence effects on stability of intermolecular pyrimidine-purine-purine triplex.
Nuc. Acids Res. **21**:585-591.
- Mariappan, S.V.S., P. Catasti, L.A. Silks III, E.M. Bradbury and G. Gupta, 1999.
The high-resolution structure of the triplex formed by the GAA/TTC triplet repeat associated with Friedreich's Ataxia.
J. Mol. Biol. **285**:2035-2052.
- Marsh, J. L. and E. Wieschaus, 1978.
Is sex determination in germ line and soma controlled by separate genetic mechanisms?
Nature **272**:249-251.
- Matthews, K. A., F. B. D. Miller, T. C. Kaufman, 1989.
Developmental distribution of RNA and protein products of the *Drosophila* tubuline gene family.
Dev. Biol. **132**:45-61.
- McCarthy, J.G. and S.M. Heywood, 1987.
A long polypyrimidine-polypurine tract induces an altered DNA conformation on the 3' coding region of the adjacent myosin heavy chain gene.
Nuc. Acids Res. **15**:8069-8085.

- McNeill Alexander R., 1995.
Big flies have bigger cells.
Nature **375**:20.
- Menzel, S. and K. H. Glatzer, 1985.
Localization of RNP antigens in primary spermatocytes of *Drosophila melanogaster* by indirect immunofluorescence and their correlation to fertility factors.
Dros. Info. Serv. **61**:121.
- Meyer, G. F., O. Hess and W. Beermann, 1961.
Phasenspezifische Funktionsstrukturen in Spermatocytenkernen von *Drosophila melanogaster* und ihre Abhängigkeit vom Y Chromosom.
Chromosoma **12**:676-716.
- Meyer, G. F., 1968.
Spermiogenese in normalen und Y-defizienten Männchen von *Drosophila melanogaster* und *D. hydei*.
Z. Zellforsch Mikroskop Anat. **84**:141-175.
- Mol, C. D., A. K. S. Muir, M. Cygler, J. S. Lee and W. F. Anderson, 1994.
Structure of an immunoglobulin Fab fragment specific for triple-stranded DNA.
J. Biol. Chem. **269**:3615-3622.
- Moraru-Allen, A. A., S. Cassidy, J. L. Asensio Alvarez, K. R. Fox, T. Brown and A. N. Lane, 1997.
Coralyne has a preference for intercalation between TA•T triples in intramolecular DNA triple helices.
Nuc. Acids Res. **25**:1890-1896.
- Moser, H. E. and P. B. Dervan, 1987.
Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triplex helix formation.
Science **238**:645-650.
- Murray, J. M., 1991.
Structure of flagellar microtubules.
Int. Rev. Cytol. **125**:47-93.
- Musso, M., L. D. Nelson and M. W. Van Dyke, 1998.
Characterization of purine-motif triplex DNA-binding proteins in HeLa extracts.
Biochemistry **37**:3086-3095.
- Nakanishi, M., K. T. Weber and R. V. Guntaka, 1998.
Triple helix formation with the promoter of human α -1(I) procollagen gene by an antiparallel triplex-forming oligodeoxyribonucleotide.
Nuc. Acids Res. **26**:5218-5222.
- Olivieri, G. and A. Olivieri, 1965.
Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*.
Mut. Res. **2**:366-380.
- Peacock, W. J., A. R. Lohe, W. L. Gerlach, P. Dunsmuir, E. S. Dennis and R. Appels, 1978.
Fine structure and evolution of DNA in heterochromatin.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **42**:1121-1135.
- Pimpinelli, S., G. Santini and M. Gatti, 1976.
Characterization of *Drosophila* heterochromatin. II. C- and N-banding.
Chromosoma **57**:377-386.
- Pimpinelli, S., G. Santini and M. Gatti, 1978.
³H-Actinomycin-D binding to mitotic chromosomes of *Drosophila melanogaster*.
Chromosoma **66**:389-395.
- Pimpinelli, S., W. Sullivan, M. Prout and L. Sandler, 1985.
On biological functions mapping to the heterochromatin of *Drosophila melanogaster*.
Genetics **109**:701-724.
- Pimpinelli, S., M. Berloco, L. Fanti, P. Dimitri, S. Bonaccorsi, E. Marchetti, R. Caizzi, C. Caggese and M. Gatti, 1995.
Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **92**:3804-3808.

- Pisano, C., S. Bonaccorsi and M. Gatti, 1992.
The *kl-3* loop of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* binds a tektin-like protein.
Genetics **133**:569-579.
- Pisano, C. and M. Gatti, 1989.
In: *Drosophila: a Laboratory Manual* (M. Ashburner ed.).
Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Pitnick, S. and T. A. Markow, 1994.
Male gametic strategies: sperm size, testes size, and the allocation of ejaculate among successive mates by the sperm-limited fly *Drosophila patchea* and its relatives.
Am. Nat. **143**:785-819.
- Pitnick, S., G. S. Spicer and T. A. Markow, 1995.
How long is a giant sperm?
Nature **375**:109.
- Pitnick, S., T. A. Markow and G. S. Spicer, 1995.
Delayed male maturity is a cost of producing large sperm in *Drosophila*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 10614-10618.
- Postel, E. H., S. J. Flint, D. J. Kessler and M. E. Hogan, 1991.
Evidence that a triplex forming oligodeoxyribonucleotide binds to the *c-myc* promoter in HeLa cells, thereby reducing *c-myc* mRNA levels.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**:8227-8231.
- Qian, S., S. Hongo and M. Jacobs-Lorena, 1988.
Antisense ribosomal protein gene expression specifically disrupts oogenesis in *Drosophila melanogaster*.
Proc. Natl. Acad. Sci. **85**:9601-9605.
- Rajeev, K. G., V. R. Jadhav and K. N. Ganesh, 1997.
Triplex formation at physiological pH: comparative studies on DNA triplexes containing 5-Me-dC tethered at N₄ with spermine and tetraethyleneoxyamine.
Nuc. Acids Res. **25**:4187-4193.
- Rao, B. S., 1996.
Regulation of DNA replication by homopurine-homopyrimidine sequences.
Mol. Cell. Bioc. **156**:163-168.
- Ririe, S. S. and R. V. Guntaka, 1998.
An RNA oligonucleotide corresponding to the polypyrimidine region of the rat α -1(I) procollagen promoter forms a stable triplex in inhibits transcription.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **249**:218-221.
- Risau, W., P. Symmons, H. Saumweber and M. Frash, 1983.
Nonpackaging and packaging proteins of hnRNA in *Drosophila melanogaster*.
Cell **33**:529-541.
- Roberts, R. W. and D. M. Crothers, 1992.
Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition.
Science **258**:1463-1466.
- Russell, S. R. H., 1989.
Isolation of male specific genes from *Drosophila melanogaster*.
Ph. D. Thesis, Glasgow University.
- Russell, S. R. H. and K. Kaiser, 1993.
Drosophila melanogaster male germ line-specific transcripts with autosomal and Y-linked genes.
Genetics **134**:293-308.
- Rutigliano, C., N. Bianchi, M. Tomassetti, L. Pippo, C. Mischiati, G. Feriotto and R. Gambari, 1998.
Surface plasmon resonance for real-time monitoring of molecular interaction between a triple helix forming oligonucleotide and the Sp1 binding sites of human Ha-ras promoter: effects of the DNA-binding drug chromomycin.
Int. J. Oncol. **12**:337-343.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989.
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Press.

- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson, 1977.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **74**:5463-5467.
- Saumweber H., P. Symmons, R. Kabish, H. Will and F. Bonhoeffer, 1980.
Monoclonal antibodies against chromosomal proteins of *Drosophila melanogaster*.
Chromosoma **80**:253-275.
- Scanlon, K. J., Y. Ohta, H. Ishida, H. Kijima, T. Ohkawa, A. Kaminski, J. Tsai, G. Horng and M. Kashani-Sabet, 1995.
Oligonucleotide-mediated modulation of mammalian gene expression.
FASEB J. **9**:1288-1296.
- Shchyolkina, A. K. and O. F. Borisova, 1997
Stabilizing and destabilizing effects of intercalators on DNA triplexes.
FEBS Lett. **419**:27-31.
- Spink, C. H. and J. B. Chaires, 1999.
Effects of hydration, ion release, and excluded volume on the melting of triplex and duplex DNA.
Biochemistry **38**:496-508.
- Steffen, W. and R. W. Linck, 1988.
Evidence for tektins in centrioles and axonemal microtubules.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA **85**:2643-2647.
- Steffen, W. and R. W. Linck, 1989.
Tektins in ciliary and flagellar microtubules and their association with other cytoskeletal systems.
Cell Movement **2**:67-81.
- Stephens, R. E., 1995.
Ciliogenesis in sea urchin embryos - a subroutine in the program of development.
Bioessays **17**:331-340.
- Suchowersky, O., M. Kiess and T. C. Kaufman, 1974.
Recovery and partial characterization of X and Y linked temperature-sensitive male sterility on an attached X^Y chromosome in *Drosophila melanogaster*.
Dros. Inf. Serv. **51**:55-56.
- Suchowersky, O., 1975.
Analysis of Y-linked temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster* causing male sterility or great aspirations.
M. Sc. Thesis, University of British Columbia, Canada.
- Tabor, C. W. and H. Tabor, 1984.
Polyamines.
Annu. Rev. Biochem. **53**:749-790.
- Tates, A. D., 1971.
Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*.
Ph. D. Thesis, Leiden University.
- Uddin, A. H., P. A. Piunno, R. H. Hudson, M. J. Damha and U. J. Krull, 1997.
A fiber optic biosensor for fluorimetric detection of triple-helical DNA.
Nuc. Acids Res. **25**:4139-4146.
- Vasquez, K. M. and J. H. Wilson, 1998.
Triplex-directed modification of genes and gene activity.
Trends Biochem. Sci. **23**:4-9.
- Wang, S. H., M. A. Booher and E. T. Kool, 1994.
Stabilities of nucleotide *loops* bridging the pyrimidine strands in DNA pyrimidine•purine•pyrimidine triplexes: special stability of the CTTTG loop.
Biochemistry **33**:4639-4644.
- Wells, R. D., D. A. Collier, J. C. Hanvey, M. Shimizu and F. Wohlrab, 1988.
The chemistry and biology of unusual DNA structures adopted by oligopurine•oligopyrimidine sequences.
FASEB J. **2**:2939-2949.
- Williamson, J. H., 1970.
Ethyl methanesulfonate-induced mutants in the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*.
Mut. Res. **10**:597-605.

Williamson, J. H., 1972.
Allelic complementation between mutants
in the fertility factors of the Y chromo-
some of *Drosophila melanogaster*.
Mol. Gen. Genet. **119**:43-47.

Williamson, J. H. and E. Meidinger,
1979.
Y chromosome hyperploidy and male
fertility in *Drosophila melanogaster*.
Canad. J. Genet. Cytol. **21**:21-24.

Wilson, C., R.K. Pearson, H.J. Bellen,
C.J. O'Kane, U. Grossniklaus, and W. J.
Gehring, 1989.

P-element-mediated enhancer detection:
an efficient method for isolating and
characterizing developmentally regulated
genes in *Drosophila*.
Genes Dev. **3**:1301-1314.

Wistow, G. and J. Piatigorsky, 1987.
Recruitment of enzymes as lens
structural proteins.
Science **236**:1554-1556.

7. SUMMARY

7.1 Introduction.

Primary spermatocyte nuclei of *D. melanogaster* exhibit three giant lampbrush-like *loops* formed by the *kl-5*, *kl-3* and *ks-1* Y-chromosome fertility factors. These structures contain and abundantly transcribe highly repetitive, simple sequence DNAs and accumulate large amounts of non-Y-encoded proteins.

The biological role of the Y *loops* is poorly understood. It has been suggested that these structures fulfill a protein binding function, accumulating polypeptides involved in spermiogenesis. Another possibility is that the Y *loops* contain coding sequences for sperm proteins such as the dynein heavy chain polypeptides. These views on loop functions are not mutually exclusive and it is conceivable that these structures play a dual role in *Drosophila* spermatogenesis: a conventional protein coding function coupled with a binding function of non-Y encoded polypeptides

7.2 Results and Discussion.

In my Thesis I carried out three series of experiments. First, I immunostained the Y *loops* with two anti-triplex antibodies: Jel318 and Jel466 which are specific for T*AT and C*GC triplets, respectively. Jel318 immunostains the *kl-3* loop and Jel466 the *kl-5* loop. I have also shown that these antibodies stain the *loops Pseudonucleolus* and *Clubs* of *D. hydei*. I have suggested that the triplexes associated with the Y *loops* may mediate the binding of proteins to these structures.

In a second series of experiments I completed the molecular analysis of *loopin-1*, a gene that encodes a protein bound to the *kl-3* loop and to the sperm flagellum. Loopin-1 is homologous to several leucin-aminopeptidases from a variety of animal and plant species, and is accumulated in the mitochondrial derivative during sperm elongation. To determine the evolutionary conservation of Loopin-1 I immunostained 16 *Drosophila* species,

representative of distant groups within the genus, with an antibody (T53-F1) directed to Loopin-1. In all these species T53-F1 immunostains intranuclear structures of primary spermatocytes and the sperm tails. These data indicate a high level of conservation not only of Loopin-1 but also of its accumulation in both the Y *loops* and the sperm flagella, suggesting the presence of an integrated system of high selective value. I also attempted to induce mutations in the *loopin-1* gene. However, I did not succeed in generating deficiencies of region 53 C9-11 (where *loopin-1* maps), probably due to the existence of a haploinsufficient locus located very close to *loopin-1*.

In a third series of experiments, I characterized two autosomal mutations [*ms(3)HB223* and the allelic mutations *ms(3)HB267* and *ms(3)HB933*] that suppress the formation of the *kl-3* loop. These mutations have been finely mapped and their phenotypes have been examined at both the ultrastructural and biochemical levels. Both mutations elicit the same phenotypes. They suppress the formation of the outer dynein arm of the axoneme and destabilize three high molecular weight polypeptides ($M_R \sim 300$ kDa). It has been previously shown that these polypeptides are absent in males deficient for the *kl-5*, *kl-3* and *kl-2* loop-forming regions, respectively. The precise relationships between the different phenotypes elicited by *ms(3)HB223* and *ms(3)HB267* are difficult to understand. I therefore attempted only some speculations about the role of these genes during spermatogenesis.

7.3 Conclusions.

The identification of genes that control the *kl-3* loop formation, coupled with the finding that it binds Loopin-1 and contains nucleic acid triplexes, suggests that the Y *loops* are complex genetic entities. The *kl-3* loop corresponds to a single Y-linked complementation group but its formation and functioning requires at least 4 autosomal gene products. I believe that the molecular characterization of these products will be instrumental to elucidate the functional role of this still largely enigmatic structure.

8. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la Dott.ssa Caterina Mencarelli (Università di Siena) per l'aiuto ed i consigli negli esperimenti di microscopia elettronica e di biochimica delle proteine, il Sig. Carlo Santolamazza che mi ha guidato nella caratterizzazione molecolare di *loopin-1*, la Dott.ssa Silvia Bonaccorsi e il mio Docente Guida Prof. Maurizio Gatti che mi hanno seguito durante lo svolgimento della Tesi. Ringrazio infine il Dr. Jeremy S. Lee (University of Saskatchewan, Canada) che mi ha gentilmente inviato gli anticorpi anti-triplex.