

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"
FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
DIPARTIMENTO DI GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

Tesi di laurea sperimentale

Mutazioni che alterano la formazione della loop *kl-3*
del cromosoma Y di *Drosophila melanogaster*

Relatore:

Ch.mo Prof. Maurizio Gatti

Laureando:

Roberto Piergentili (Matr. 11083439)

ANNO ACCADEMICO 1992 - 1993

1^ TESINA

Una nuova ipotesi sull'origine terrestre degli insetti.

RELATORE:

Ch.mo Prof. Ernesto Capanna

2^ TESINA

Crescita e metabolismo di *Saccharomices cerevisiae* in colture cresciute in chemostato in condizioni di limitazione di Carbonio, Azoto, o Carbonio e Azoto.

RELATORE:

Ch.mo Prof. Pierluigi Donini

INDICE

RIASSUNTO: p. 4

INTRODUZIONE: p. 5

1.1: La spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*.

1.2: I fattori di fertilità del cromosoma Y.

1.3: Le *loops* formate dal cromosoma Y.

1.4: Il DNA delle *loops*.

1.5: Le proteine legate alle *loops*.

1.6: Ipotesi sul ruolo funzionale delle *loops*.

1.7: Un approccio genetico alla comprensione del ruolo funzionale delle *loops*.

MATERIALI E METODI: p. 21

2.1: Allevamento delle drosofile.

2.2: Stocks.

2.3: Allestimento dei preparati citologici di testicoli.

2.4: Immunofluorescenza indiretta.

2.5: Osservazioni al microscopio.

RISULTATI: p. 24

3.1: Identificazione di mutanti autosomici con difetti nelle *loops*.

3.2: Analisi genetica.

DISCUSSIONE: p. 34

BIBLIOGRAFIA: p. 37

RIASSUNTO

Negli spermatociti primi di *Drosophila melanogaster* sono presenti tre strutture analoghe alle "lampbrush loops" degli anfibi, formate dai fattori di fertilità del cromosoma Y *kl-5*, *kl-3* e *ks-1*. Tali strutture contengono e trascrivono DNA satellite altamente ripetitivo e legano grossi quantitativi di proteine. Il ruolo biologico delle loops è ancora largamente sconosciuto e non è chiaro se contengano geni codificanti o servano ad accumulare e processare proteine coinvolte nella spermatogenesi.

Allo scopo di definire i meccanismi di formazione e le possibili funzioni delle loops formate dal cromosoma Y sono stati esaminati citologicamente 85 mutanti autosomici maschio-sterili indotti da trasposizione dell'elemento P e da etil metansulfonato (EMS). Sono stati individuati cinque mutanti a quattro loci che specificamente sopprimono la formazione della loop *kl-3*. Tali mutanti, denominati *kl3-lf2*, *kl3-lf3*, *kl3-lf4* e *kl3-lf5*, sono stati caratterizzati citologicamente e mappati geneticamente.

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 molto conservato. In quasi tutti gli animali le cellule staminali vanno incontro ad un certo numero 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 I, va incontro ad un processo di accrescimento seguito dalla meiosi, attraverso cui si formano quattro cellule identiche, gli spermatidi, che differiscono dallo spermatocita I sia per grado di ploidia (n) che per quantità di DNA ($1C$). I quattro spermatidi si differenziano poi in quattro spermatozoi 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 quasi del tutto ignoti e costituiscono uno dei problemi più interessanti della biologia dello sviluppo. Un approccio per identificare questi meccanismi consiste nella dissezione genetica della spermatogenesi mediante analisi mutazionale.

Una descrizione sintetica della spermatogenesi di *Drosophila melanogaster* si può trarre dagli studi di microscopia ottica di Cooper (1965), Kempthues et al. (1982) e Fuller (1986), da quelli di microscopia elettronica riportati da Bates (1971), Lindsley e Tokuyasu (1980), Lin et al. (1981) e Church and Lin (1982, 1985). Inoltre nel nostro laboratorio è stata messa recentemente a punto una tecnica (vedi la sezione "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., 1993). In Figura 1 è presentato uno schema riassuntivo della spermatogenesi di *Drosophila melanogaster*.

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.

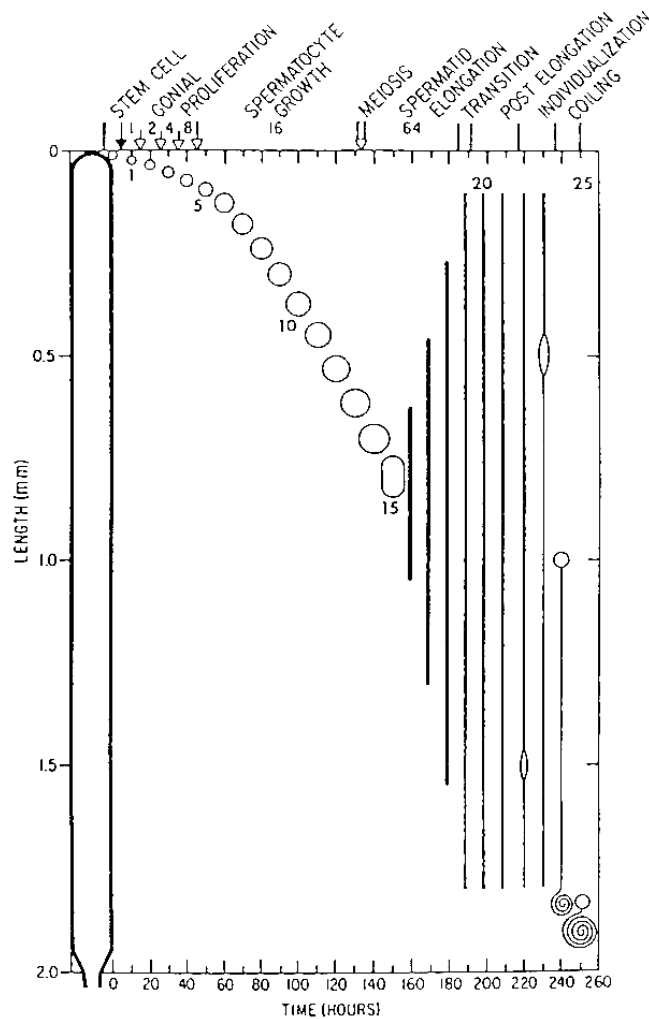


FIGURA 1. Rappresentazione schematica della spermatogenesi di *D. melanogaster* in cui è riportata la distribuzione spaziale e temporale delle 25 cisti derivanti da una singola cellula staminale. In ordinata è riportata la posizione di ciascuna cisti all'interno del testicolo; in ascissa è indicata la 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.

La citochinesi che accompagna le mitosi spermatogoniali è incompleta e gli spermatociti I restano connessi da ponti citoplasmatici che persistono per buona parte della spermatogenesi. Gli spermatociti I vanno incontro ad una fase di crescita lunga circa 90 ore, durante la quale il volume del loro nucleo aumenta di 25-30 volte. Dal punto di vista morfologico, gli spermatociti I appena formati sono simili agli spermatogoni, mentre gli spermatociti I maturi sono facilmente distinguibili da tutte le altre cellule sia per le dimensioni sia per la presenza all'interno del nucleo di tre grosse strutture filamentose dette "lampbrush-like loops", delle quali verrà detto dettagliatamente più avanti. Gli spermatociti I che si apprestano ad entrare in meiosi sono invece caratterizzati dalla presenza di granuli fortemente rifrangenti derivanti dalla disintegrazione delle loops stesse (Cenci et al., 1993).

In seguito alla meiosi si vengono a formare all'interno della ciste 64 spermatidi aploidi. Gli spermatidi sono ancora cellule citologicamente complete e possiedono pertanto tutti gli organelli: mitocondri, ribosomi, reticolo endoplasmatico, ecc. Durante la spermatogenesi 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 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; 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 associato ad un nucleo di uguali dimensioni (molto più piccolo di quello degli spermatociti primi).

All'"onion 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 spermatogenesi 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 di fatto 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 spermatozoi 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 spermatozoi vengono impacchettate in un fascio avente sezione esagonale e che progressivamente assume una configurazione convoluta. Quindi la "head cyst-cell" si rompe e gli spermatozoi si trasferiscono attivamente e separatamente nelle vescicole seminali. Gli spermatozoi maturi sono caratterizzati da una lunghissima coda; in *Drosophila melanogaster* tale struttura raggiunge i 2mm, mentre in *Drosophila hydei* si hanno code di circa 2cm (Lindsley and Tokuyasu, 1980; Lifschytz, 1987).

1.2: I fattori di fertilità del cromosoma Y.

L'Y è un cromosoma submetacentrico, totalmente eterocromatico, e rappresenta circa il 12% del genoma maschile (Pimpinelli et al., 1978). La sola funzione genetica del cromosoma Y è quella di controllare la fertilità maschile; infatti Bridges (1916) ha dimostrato che gli individui X/O sono maschi fenotipicamente normali, ma sterili.

Brosseau (1960) ha ipotizzato, in base a studi di complementazione, l'esistenza di 7 fattori di fertilità lungo il cromosoma Y, cinque 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*. In realtà però non si è mai riusciti a dimostrare l'effettiva esistenza del locus *kl-4*, per cui è opinione corrente che l'Y contenga solo 6 fattori di fertilità (Kennison, 1981; Hazelrigg et al., 1982; Gatti and Pimpinelli 1983), per i quali è stata mantenuta la stessa nomenclatura proposta da Brosseau. E' stato inoltre dimostrato che questi loci funzionano solo nella linea germinale maschile (Marsh and Wieschaus, 1978), e più precisamente solo negli spermatoziti I (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". 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 delle rispettive "lampbrush-like loops" (vedi paragrafo 1.3) e dei bracci esterni di dineina dei doppietti periferici dell'assonema, mentre i maschi deficienti per il locus *ks-1* mancano della loop omonima (vedi paragrafo 1.3) e presentano un errato allineamento dei derivati mitocondriali rispetto all'assonema in formazione (Hardy et al., 1981). I maschi recanti le deficienze dei loci *kl-2*, *kl-1* o *ks-2* non mostrano invece lesioni precoci, bensì le lesioni tardive comuni anche ai maschi X/O o deficienti per gli altri fattori di fertilità: nebenkerns anomali, errori durante il processo di individualizzazione degli spermatoziti, 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 maturazione (Kiefer, 1966 e 1973; Meyer 1968; Hess and Meyer, 1968; Hardy, Tokuyasu and Lindsley, 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 vi sono 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 50-150 volte più mutabili di quelli associati all'X.

Allo scopo di comprendere l'elevata mutabilità dei fattori di fertilità è stata condotta una estesa analisi citogenetica volta a chiarire l'organizzazione di tali loci. A tale scopo 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 tre dei sei fattori di fertilità, *kl-5*, *kl-3* e *ks-1*, hanno dimensioni fisiche gigantesche (Gatti and Pimpinelli, 1983). Come mostrato in Figura 2 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 di DNA), ciascuno di essi è costituito da circa 4 Mb di DNA, ed è 100 volte più esteso dei geni eucromatici. 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 (Lindsley and Tokuyasu, 1980).

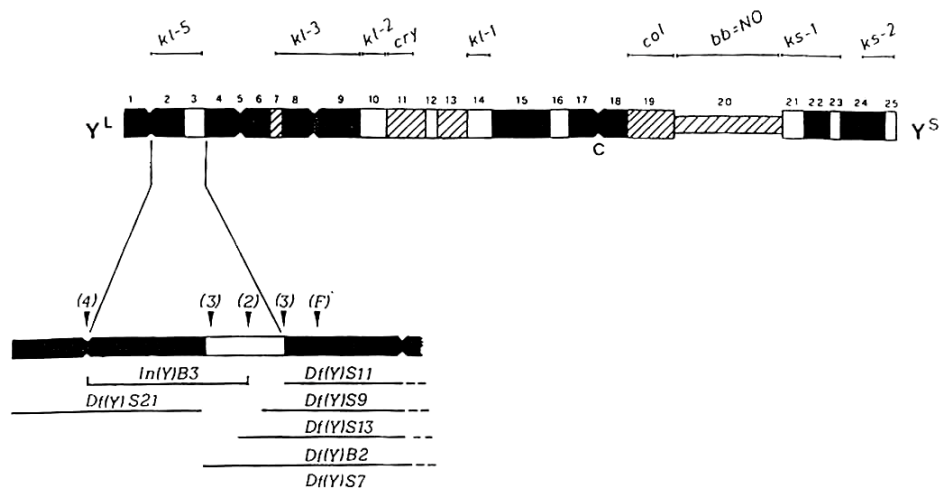


FIGURA 2. Mappa citogenetica del cromosoma Y di *D. melanogaster* (Pimpinelli et al., 1986). Nella parte più alta della figura è mostrato un diagramma del cromosoma Y di *D. melanogaster* differenziato longitudinalmente mediante colorazione con Hoechst33258 (Gatti e Pimpinelli 1983). I segmenti neri indicano forte fluorescenza, i segmenti tratteggiati debole fluorescenza e quelli bianchi assenza di fluorescenza. C indica la posizione del centromero, NO quella dell'organizzatore nucleolare. Sopra il cromosoma sono indicati, oltre ai 6 fattori di fertilità, anche il locus dei cristalli (*cry*), il locus *bobbed* (*bb=NO*) e il collocoro (*col*).

Nella parte più bassa della figura è riportato un ingrandimento della regione contenente il fattore di fertilità *kl-5* con i riordinamenti cromosomici sterili non complementanti tra loro che definiscono questa unità funzionale. Le 4 frecce a sinistra indicano i punti di rottura di traslocazioni Y-autosoma sterili e il numero tra parentesi corrisponde al numero di traslocazioni con il medesimo punto di rottura impiegate nell'analisi di complementazione. La freccia marcata con (F) indica il punto di rottura di una traslocazione X;Y fertile. Le linee orizzontali rappresentano un'inversione e 6 deficienze, per 5 delle quali è mostrato solo il punto di rottura distale. E' da notare che, mentre il limite destro di *kl-5* è definito dal punto di rottura fertile (F), l'assenza di deficienze o punti di rottura fertili a sinistra implica che la regione occupata da *kl-5* potrebbe estendersi ulteriormente in tale direzione. La posizione e l'estensione dei loci *kl-3* e *ks-1* sono state definite nello stesso modo e le linee orizzontali sopra il diagramma (a) rappresentano le loro dimensioni fisiche minime. I dati citogenetici hanno permesso di localizzare *kl-1*, *kl-2* e *ks-2* ma non di definirne l'estensione (Gatti and Pimpinelli 1983; Pisano et al. 1990).

1.3: 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 I (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 una o 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).

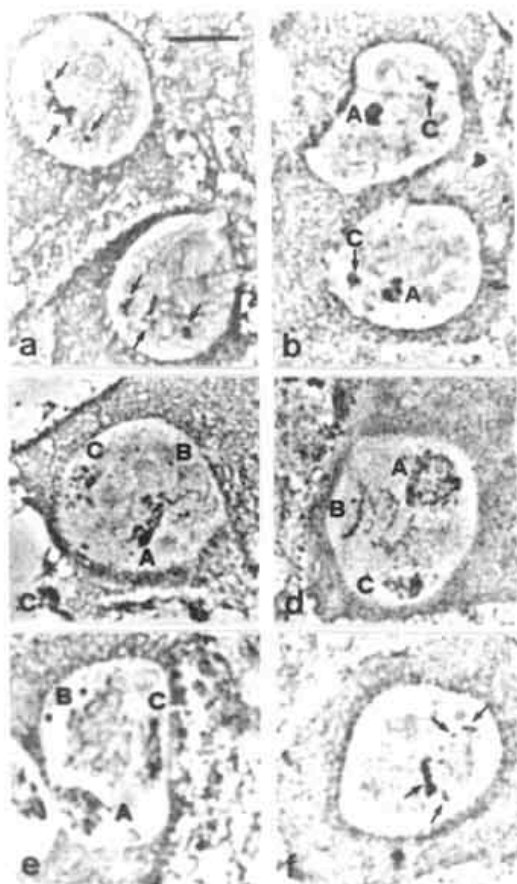


FIGURA 3. Ciclo di sviluppo delle loops degli spermatociti I di *D. melanogaster* osservato a contrasto di fase in preparati fissati e non colorati. (a) Due nuclei X/O che mostrano alcuni grani compatti (freccie) e nessuna struttura filamentosa. (b) Due nuclei di spermatociti giovani X/Y in cui sono visibili i primordi delle strutture A (loop *kl-5*) e C (loop *ks-1*). (c) Stadio precoce dello sviluppo delle loops: le strutture A e C si ingrandiscono mentre incomincia a formarsi la struttura B (loop *kl-3*). (d) ed (e) Stadi avanzati dello sviluppo delle loops. (f) Nuclei di spermatociti I in procinto di entrare in prima divisione meiotica. Si notino i granuli intranucleari derivanti dalla disintegrazione delle loops. Barra: 10 μ m.

E' stato osservato che le tre loops non si sviluppano simultaneamente (Bonaccorsi et al., 1988; vedi Fig. 3). Nei nuclei degli spermatociti giovani sono presenti soltanto due formazioni compatte corrispondenti ai primordi delle loops A e C. Con l'accrescimento degli spermatociti 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 negli spermatociti maturi la più grande delle tre loops. Le loops raggiungono le loro massime dimensioni negli spermatociti maturi dove occupano gran parte del nucleoplasma. All'inizio della profase meiotica si disintegrano però rapidamente formando dei granuli compatti che scompaiono completamente in profase avanzata (Fig. 3).

Bonaccorsi e collaboratori (1988) hanno dimostrato che le loops possono essere differenziate citologicamente mediante trattamento con Giemsa a pH10 che colora le loops A e C, ma non la B (Fig. 4). 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* (Fig. 5). 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 (Fig. 6).

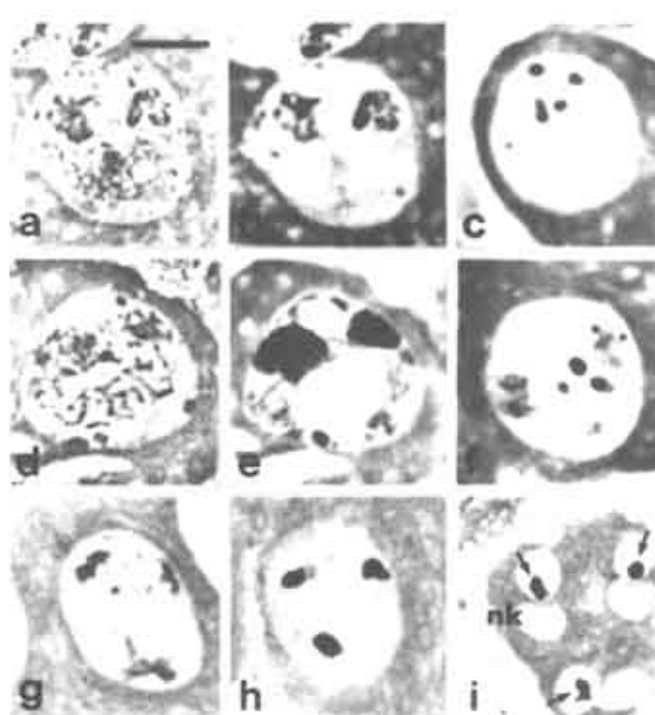


FIGURA 4. Spermatociti I e stadi postmeiotici della spermatogenesi di *D. melanogaster* dopo colorazione con Giemsa a pH10. (a) e (b) Lo stesso nucleo di spermatocita primo X/Y fotografato in contrasto di fase (a) e dopo colorazione con Giemsa al 2% per 20' (b). (c) Nucleo X/O colorato con Giemsa al 2% per 20'. E' da notare che le loops A e C e i "granuli X/O" sono le uniche strutture intranucleari rispettivamente colorate in (b) e in (c). (d) ed (e) Lo stesso nucleo X/Y fotografato a contrasto di fase (d) e dopo colorazione con Giemsa al 4% per 1h (e). Questo trattamento prolungato con una concentrazione più elevata di Giemsa colora pesantemente le loops A e C e i "granuli X/O" e, più debolmente, i tre aggregati di cromatina localizzati alla periferia del nucleo corrispondenti alle due coppie di autosomi di maggiori dimensioni e ai cromosomi sessuali appaiati. (g) Nucleo di spermatocita X/Y in cui le loops sono scomparse e i cromosomi iniziano a condensarsi prima della metafase meiotica. (h) Prima metafase meiotica. (i) Nuclei di spermatidi X/Y in cui la cromatina si localizza in posizione eccentrica (freccie). Sono visibili anche i derivati mitocondriali denominati *nebenkerns* (nk) associati ai nuclei degli spermatidi. Barra: 10µm.

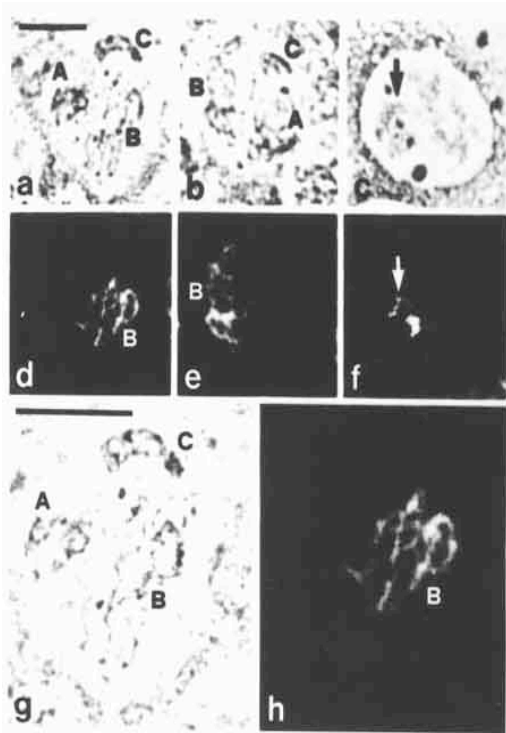


FIGURA 5. Differenziazione citologica della loop *kl-3* mediante immunofluorescenza indiretta con l'antisiero *sph-155* e immunoglobuline G anti-coniglio coniugate con fluoresceina. (a,d) e (b,e) Spermatociti primi di maschi *X/Y* fotografati a contrasto di fase (a,b) e a fluorescenza (d,e). (g) e (h) Lo stesso nucleo riportato in (a) e (d) fotografato ad un ingrandimento maggiore. Si noti che solo il filamento sottile della loop *kl-3* (B) reagisce con l'anticorpo; le loops *kl-5* (A) e *ks-1* (C) non mostrano alcuna reazione. (c) e (f) Nucleo di spermatocita *X/O* trattato con l'antisiero *sph-155* fotografato a contrasto di fase (c) e a fluorescenza (f). Sono chiaramente visibili degli aggregati fluorescenti localizzati vicino, ma non sovrapposti, ai granuli compatti ("granuli *X/O*") visibili a contrasto di fase. Le frecce in (c) ed (f) indicano la stessa posizione all'interno del nucleo. Barre: 10 μ m.

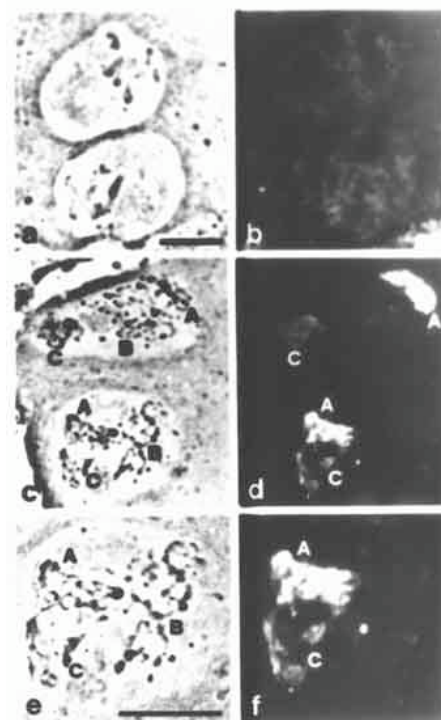


FIGURA 6. Differenziazione citologica delle loops *kl-5* e *ks-1* mediante immunofluorescenza indiretta con l'anticorpo monoclonale *S5* e IgG anti-topo coniugate con fluoresceina. (a) e (b) Due nuclei di spermatociti *X/O* dopo reazione con *S5* fotografati a contrasto di fase (a) e a fluorescenza (b). Da notare la fluorescenza diffusa del nucleo e la colorazione negativa del nucleolo. (c) e (d) Due nuclei *X/Y* fotografati a contrasto di fase (c) e in fluorescenza (d). (e, f) Il nucleo riportato nella parte inferiore dei pannelli (c) e (d) fotografato a maggiore ingrandimento. La loop *kl-5* (A) è più fluorescente della loop *ks-1* (C), mentre la loop *kl-3* (B) non mostra alcuna reazione con questo anticorpo. Si noti che l'anticorpo *S5* non reagisce con i filamenti delle loops *kl-5* e *ks-1* ma con la matrice, invisibile a contrasto di fase, che circonda queste strutture. Barre: 10 μ m.

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 sono stati esaminati citologicamente per la presenza e la normalità delle loops. I risultati di queste analisi, riportati in Figura 7, hanno dimostrato che la regione che forma la loop B è coestensiva con il locus *kl-3* (Fig. 8) 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 1.2 Mb di DNA.

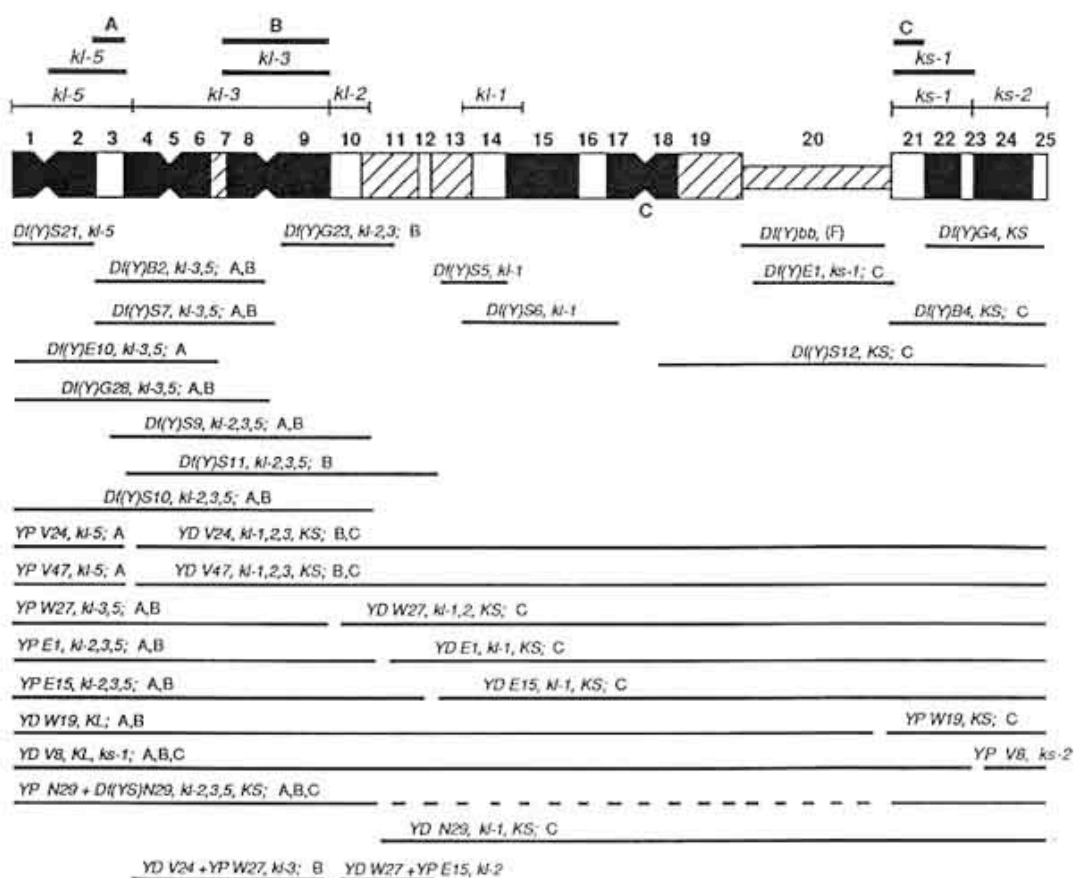


FIGURA 7. Mappatura per delezioni delle regioni che formano le loops. Le linee orizzontali sotto il diagramma indicano le delezioni del cromosoma Y usate negli esperimenti di mappatura. Su ogni linea vengono riportati, nell'ordine, la sigla di denominazione di ciascuna delezione, i fattori di fertilità e le loops deleti. Nella parte superiore, le linee più sottili indicano le dimensioni fisiche massime dei fattori di fertilità, quelle più spesse in posizione intermedia le loro dimensioni minime, e quelle più spesse nell'ultima riga le regioni che formano le loops (Gatti e Pimpinelli 1983; Bonaccorsi et al., 1988; Pisano et al., 1990).

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 vengano distrutte dalle tecniche di fissaggio impiegate.

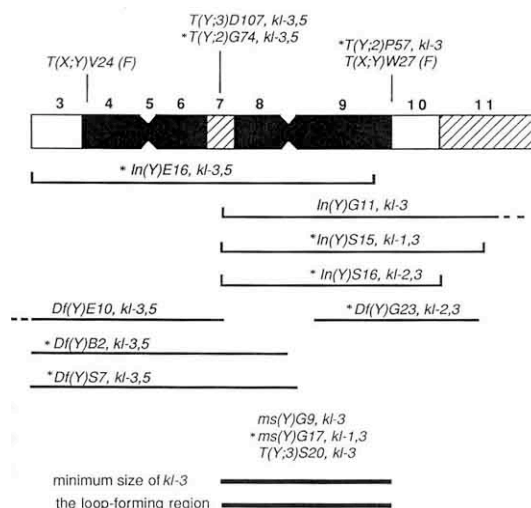


FIGURA 8. Organizzazione citogenetica del locus *kl-3*. Ad eccezione delle traslocazioni fertili *T(X;Y)V24* e *T(X;Y)W27*, tutte le mutazioni, deficienze e traslocazioni del cromosoma Y indicate in figura non complementano per la funzione *kl-3*. Questi riordinamenti cromosomici definiscono quindi le dimensioni fisiche minime del locus *kl-3* che corrispondono alla regione h7-h9. Dopo la denominazione di ciascun Y sterile sono indicati i fattori di fertilità per cui è difettivo; (F) indica i riarrangiamenti fertili. *ms(Y)G9*, *ms(Y)G17* e *T(Y;3)S20* mostrano una regione h7-h9 citologicamente normale. I cromosomi senza asterisco formano una loop *kl-3* normale; quelli con l'asterisco non formano la loop *kl-3* oppure ne sviluppano una fortemente difettiva (Bonaccorsi et al., 1988).

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 I.

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 o essere coinvolte nella regolazione dello sviluppo temporale delle loops durante l'accrescimento degli spermatociti I (Bonaccorsi et al., 1988).

1.4: Il DNA delle loops.

Una serie di studi compiuti da Peacock e collaboratori e da Brutlag e collaboratori (per una review vedi Lohe and Roberts, 1993) 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 et al., 1990; Bonaccorsi and Lohe, 1991). I risultati di questi esperimenti, riassunti in Figura 9, 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 e 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 h 8-9 che forma la loop *kl-3* ibrida soltanto con il DNA satellite leggero costituito da ripetizioni della sequenza AATAT.

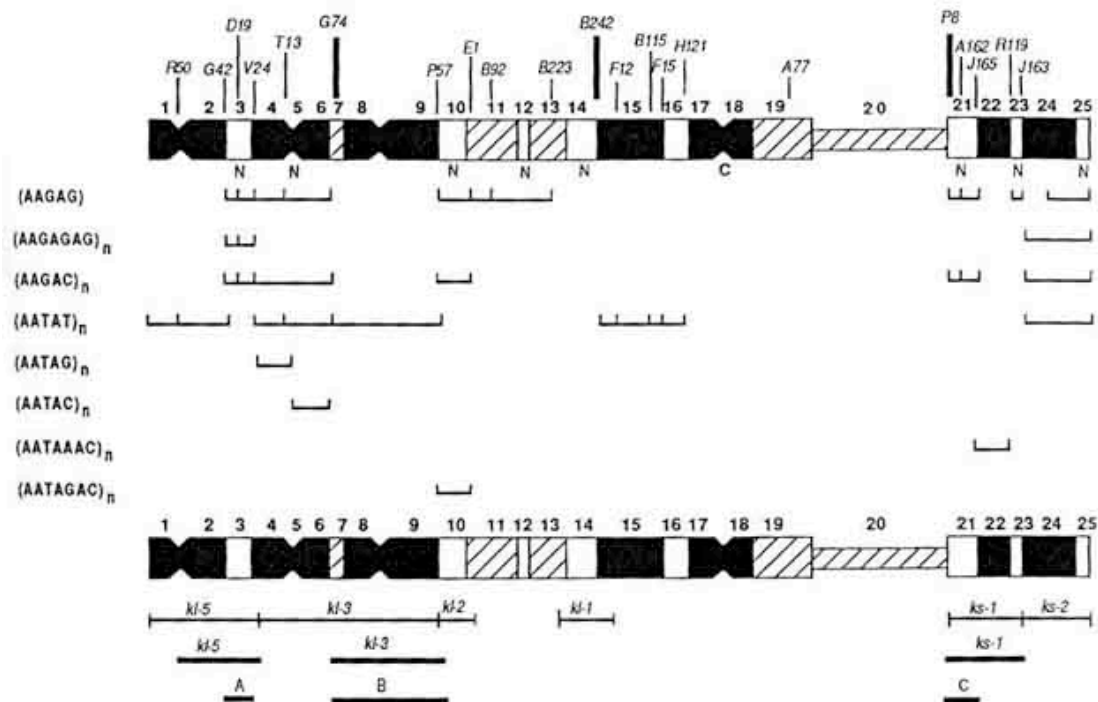


FIGURA 9. Localizzazione di 8 sequenze di DNA satellite lungo il cromosoma Y di *Drosophila melanogaster*. Il diagramma è una rappresentazione schematica del cromosoma Y colorato con Hoechst33258 (Gatti e Pimpinelli, 1983). I punti di rottura che hanno permesso la localizzazione dei satelliti sono riportati come piccoli segmenti verticali lungo le linee orizzontali, che rappresentano la distribuzione dei satelliti lungo il cromosoma. Le linee orizzontali nella parte bassa della figura rappresentano, a partire da quella più in alto, rispettivamente le dimensioni massime e minime dei fattori di fertilità, e le zone che formano le loops (Gatti e Pimpinelli, 1983; Bonaccorsi et al., 1988).

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 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, mostrati nelle figure 10 e 11, 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 II 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.

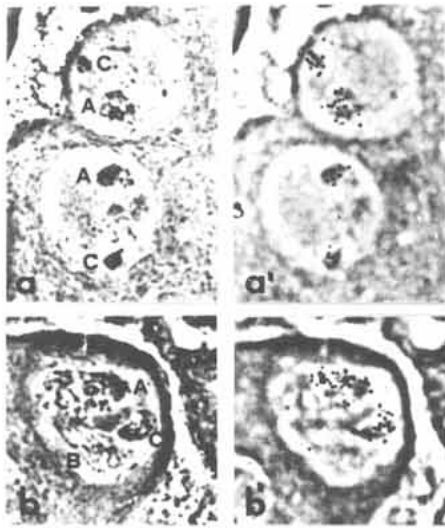


FIGURA 10. Ibridazione *in situ* della sequenza AAGAC su nuclei di spermatociti I di maschi X/Y di *D. melanogaster*. a, a': due nuclei giovani, fotografati prima (a) e dopo (a') l'ibridazione, che presentano solo le loops *kl-5* (A) e *ks-1* (C). Si noti che entrambe le loops sono chiaramente marcate. b, b': nucleo di spermatocita maturo fotografato prima (b) e dopo (b') l'ibridazione; si ha presenza di marcatura solo sulle loops *kl-5* e *ks-1*; la loop *kl-3* (B) è chiaramente priva di grani.

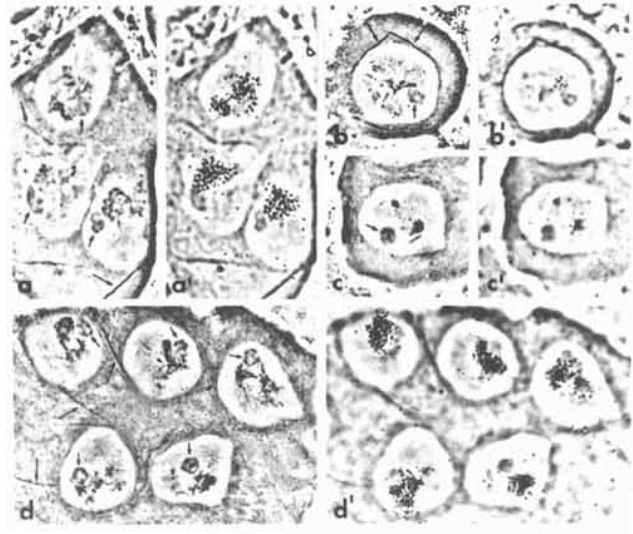


FIGURA 11. Ibridazione *in situ* della sequenza AAGAC su nuclei di spermatociti I di maschi aventi diversa costituzione genetica. a, a': nuclei di maschi X/Y^DX^PV24 che presentano la loop *kl-5* pesantemente marcata. b, b' e c, c': spermatociti I X/O (b, b') e X^DY^PT13 (c, c') che non presentano loops ma solo "granuli X/O". Si noti che in entrambi i casi è presente solo una scarsa marcatura associata ai granuli. d, d': cisti parziale di un maschio X/Y^DX^PW19 che presenta solo la loop *ks-1*. Si noti la pesante marcatura delle loops e l'assenza di grani nel citoplasma. Le frecce corte indicano il nucleolo; quelle lunghe i cristalli di natura proteica causati dalla deficienza della regione h11 del cromosoma Y (Hardy et al., 1984).

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.

Sono stati effettuati esperimenti di ibridazione *in situ* anche con DNA satellite composto da sequenze AATAT abbondantemente presenti nella regione che forma la loop *kl-3*. Tali esperimenti non hanno permesso però di rivelare trascritti omologhi a questo DNA associati alla loop (Bonaccorsi, risultati non pubblicati). Inoltre risultati preliminari di esperimenti di Northern blotting indicano che il DNA ripetitivo AATAT non viene trascritto o è molto scarsamente trascritto nei testicoli di maschi X/Y (Vernì e Bonaccorsi, dati non pubblicati). Questi dati, anche se preliminari, suggeriscono la possibilità che la loop *kl-3*, al contrario della *kl-5* e della *ks-1*, non accumuli trascritti di DNA altamente ripetitivo.

1.5: 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 delle proteine legate alle loops, e solo tre di esse sono state parzialmente caratterizzate. Una di queste, del peso di 70Kd, 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 sembra probabile che serva a stabilizzare gli abbondanti trascritti associati alle loops *kl-5* e *ks-1*.

Un'altra proteina legata alla loop *kl-3* è riconosciuta dall'antisiero sph-155, ottenuto iniettando nel topo una proteina testicolare di *Drosophila hydei* di 155Kd (Hulsebos et al., 1984). Esperimenti di "Western blotting" hanno tuttavia dimostrato che tale antisiero reagisce con varie bande proteiche presenti nel testicolo di *Drosophila melanogaster* (Pisano et al., dati non pubblicati). Al momento attuale non è pertanto possibile stabilire il tipo di proteina di *Drosophila melanogaster* riconosciuta dall'antisiero sph-155.

La terza proteina associata alle loops è certamente quella meglio caratterizzata. Si tratta di una proteina di 53Kd che è presente sulla loop *kl-3* e nella coda degli spermatozoi (Figure 12 e 13). 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 53Kd (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 testicolo-specifico presente soltanto in quest'organo ed assente in qualsiasi altro tessuto somatico dei maschi e 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).

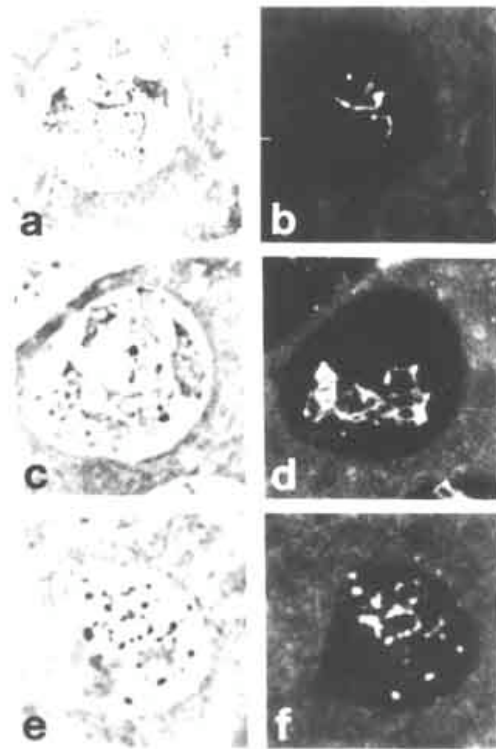


FIGURA 12. Nuclei di spermatociti I di maschi *X/Y* colorati mediante immunofluorescenza indiretta con l'anticorpo T53-1 e IgG anti-topo coniugate con fluoresceina. Si noti che l'anticorpo T53-1 decora la loop *kl-3* in tutte le fasi del suo sviluppo, da quando inizia a formarsi (a, b) a quando raggiunge le sue dimensioni massime negli spermatociti maturi (c, d). Negli spermatociti I che stanno per entrare in meiosi il T53-1 reagisce coi frammenti derivanti dalla degenerazione della loop *kl-3* (e, f). (a, c, e): contrasto di fase; (b, d, f): fluorescenza.

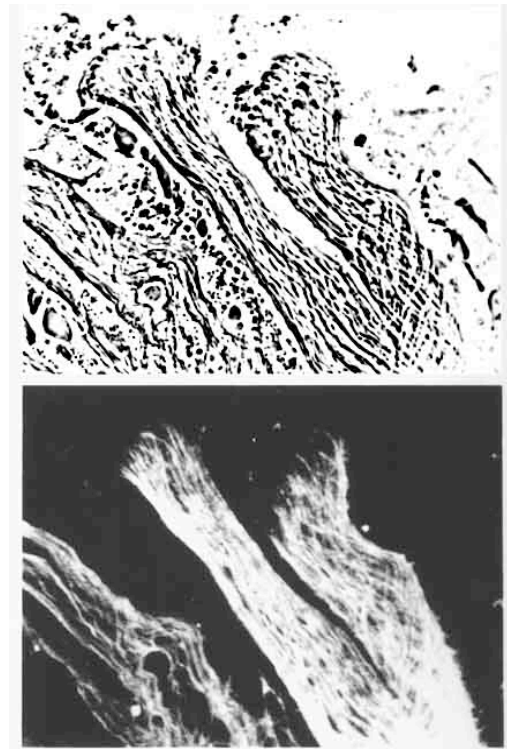


FIGURA 13. Immunofluorescenza indiretta con l'anticorpo T53-1 su fasci di spermatozoi maturi. Si noti l'intensa immunocolorazione dei flagelli e la totale assenza di colorazione delle teste degli spermi. (a): contrasto di fase; (b): fluorescenza.

Le caratteristiche della proteina riconosciuta dall'anticorpo T53-1 hanno 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 dimostrato che una di queste reagisce fortemente con l'anticorpo T53-1, suggerendo così che la proteina da esso riconosciuta possa appartenere alla famiglia delle tectine (Pisano et al., 1993).

1.6: Ipotesi sul ruolo funzionale delle loops.

Tutte le evidenze fin qui raccolte fanno supporre che la funzione delle loops possa essere di tipo 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 che sono state descritte in precedenza. E' anche stato ipotizzato che queste strutture, presenti solo nel genere *Drosophila*, si siano evolute per facilitare il normale sviluppo delle code degli spermatozoi di questi insetti (fino a 2mm in *Drosophila melanogaster* e ben 2cm in *Drosophila hydei*) (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-3* e *kl-5* provocano la simultanea assenza di due differenti polipeptidi ad alto peso molecolare ($M_r \sim 300,000Kd$) e dei bracci esterni di dineina dei doppietti periferici dell'assonema. Sulla base di questi dati gli autori hanno ipotizzato che i loci *kl-5* e *kl-3* contengano le sequenze codificanti per le dineine assonemiche.

A questo punto si possono fare due osservazioni. La prima è che le due teorie espone 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 che, a causa della grandezza dei loci, non siano state ancora evidenziate. La seconda prende in considerazione le tectine. Queste proteine sembrano avere un ruolo eminentemente strutturale e servirebbero a stabilizzare la struttura tridimensionale degli assonemi mediante la formazione di legami deboli instaurati con altre componenti dell'assonema stesso, quali i bracci esterni di dineina (Steffen and Linck, 1989). La mancanza della loop *kl-3* farebbe sì che la "tectina" di *Drosophila* non "funzioni regolarmente", causando difetti nell'assemblaggio dell'assonema che potrebbero risultare nella mancanza dei bracci di dineina.

1.7: Un approccio genetico alla comprensione del ruolo funzionale delle loops.

Le ipotesi precedentemente espone sul ruolo funzionale delle loops sono basate soltanto su un numero molto limitato di dati certi sulla loro composizione molecolare. In particolare

per stabilire se effettivamente le loops servano a legare proteine coinvolte nella spermiogenesi sarebbe necessario identificare i prodotti proteici che si legano a queste strutture. Un possibile approccio sperimentale per identificare tali proteine consiste nell'induzione di anticorpi policlonali o monoclonali contro polipeptidi testicolari e nel loro successivo impiego in esperimenti di immunofluorescenza indiretta per determinare se riconoscano proteine associate alle loops. Gli anticorpi diretti contro antigeni proteici delle loops possono essere poi utilizzati per identificare i geni che codificano per essi, isolando cloni che reagiscono positivamente con tali anticorpi da una libreria di espressione testicolo-specifica. Il sequenziamento del DNA in essi contenuto permetterà poi di stabilire la sequenza amminoacidica della proteina riconosciuta dall'anticorpo e di verificare le eventuali omologie di questa proteina con quelle contenute nella banca dati. Un esempio di questo approccio è stato riportato nel paragrafo 1.5 in cui sono stati descritti esperimenti di Pisano e collaboratori che hanno portato all'isolamento dell'anticorpo T53-1 diretto contro una proteina con caratteristiche analoghe a quelle delle tectine. Recentemente, mediante esperimenti di immunoriconoscimento di cloni batterici adsorbiti su membrane, è stato possibile isolare il gene che codifica per questa proteina ed iniziarne l'analisi molecolare (Gambino, Tesi di Dottorato, 1993).

Un altro approccio per individuare i componenti molecolari delle loops è quello genetico. Tale approccio consiste nell'induzione e nell'isolamento di mutanti che alterano la struttura delle loops. Il clonaggio e l'analisi molecolare dei geni specificati da questi mutanti permetterà poi di raccogliere informazioni sul tipo di proteina da essi codificate. L'approccio genetico, oltre all'individuazione dei componenti molecolari delle loops, permette di determinare funzioni necessarie alla formazione di queste strutture. Ad esempio tale approccio consente di identificare geni che regolano la formazione, l'accrescimento e la trascrizione delle loops.

In questa tesi ho seguito l'approccio genetico ed ho esaminato 3 collezioni di mutanti maschio-sterili per individuare lesioni in geni necessari alla formazione delle loops. L'analisi citologica di questi mutanti mi ha permesso di individuare 5 mutazioni a 4 loci che sopprimono in modo specifico la formazione della loop *kl-3*. Tali mutanti sono stati caratterizzati citologicamente con varie tecniche di immunofluorescenza indiretta e sono stati mappati con metodi statistici. I risultati degli esperimenti qui descritti costituiscono a mio parere una importante tappa preliminare per l'isolamento e la caratterizzazione molecolare di 4 geni coinvolti nella formazione della loop *kl-3*.

MATERIALI E METODI

2.1: Allevamento delle drosofile.

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

2.2: Stocks.

Tutti i mutanti maschio-sterili analizzati 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 aricciate) e il cromosoma 3 multinvertito *TM6b* marcato con *Tubby* (*Tb*, larve, pupe ed adulti più tozzi del normale). A causa della traslocazione i due elementi multinvertiti di *TSTL* segregano di fatto sempre insieme (nei casi di segregazione adiacente i gameti prodotti non sono vitali perché sbilanciati geneticamente) e ciò permette di bilanciare simultaneamente tutti e due gli autosomi.

Negli esperimenti di mappatura dei mutanti maschio-sterili localizzati sul secondo cromosoma sono stati utilizzati due cromosomi multimarcati. Il primo contiene i marcatori: *aristaless* (*al*) che mappa a 2-0.4 e che produce ariste ridotte, *dumpy* (*dp*) che mappa a 2-13.0 e che rende le ali ridotte e lobate, *black* (*b*) che mappa a 2-48.5 e che rende il corpo nero, *purple* (*pr*) che mappa a 2-54.5 e produce occhi color porpora, *curved* (*c*) che mappa a 2-75.5 e determina ali divergenti e curvate verso il basso, e *plexus* (*px*) che mappa a 2-100.5 e produce venature soprannumerarie nelle ali. Il secondo contiene gli stessi marcatori precedentemente menzionati ed il marcatore dominante *Bristle* (*Bl*) che mappa a 2-54.8 e che produce setole più corte del normale. Sia il cromosoma *al dp b pr c px* che quello *al dp b pr Bl c px* vengono mantenuti in stocks bilanciati sul cromosoma multinvertito *SM1* che porta il marcatore dominante *Curly* (*Cy*) ed i marcatori recessivi *aristaless* (*al*), *cinnabar* (*cn*) e *speck* (*sp*).

Anche negli esperimenti di mappatura dei mutanti maschio-sterili localizzati sul terzo cromosoma sono stati utilizzati due cromosomi multimarcati. Il primo contiene i marcatori: *roughoid* (*ru*) che mappa a 3-0.0 e che produce occhi piccoli e di aspetto rugoso, *hairy* (*h*) che mappa a 3-26.5 e che produce sulle ali venature pelose, *thread* (*th*) che mappa a 3-43.2 e che produce ariste a forma di bastoncino, *scarlet* (*st*) che mappa a 3-44.0 e che determina occhi scarlatti, *curled* (*cu*) che mappa a 50.0 e che determina ali divergenti e piegate in alto, *stripe* (*sr*) che mappa a 3-62.0 e che produce sull'addome striature nere, *ebony-sooty* (*es*) che mappa a 3-70.7 e che determina un colore del corpo più scuro del tipo selvatico e

claret (ca) che mappa a 3-100.7 e determina occhi di color rubino. Il secondo produce gli stessi marcatori del primo più il marcatore dominante *Prickly (Pr)* che mappa a 3-90.0 e che produce setole molto corte. Sia il cromosoma *ru h th st cu sr e^s ca* che quello *ru h th st cu sr e^s Pr ca* vengono mantenuti in stocks bilanciati sul cromosoma multinvertito *TM3* che porta il marcatore dominante *Stubble (Sb)* ed i marcatori recessivi *radius incompletus (ri)*, *pink-peach (p^p)*, *separated (sep)*, *bithorax (bx)* ed *ebony-sooty (e^s)*.

2.3: Allestimento dei preparati citologici di testicoli.

I testicoli adulti e larvali sono stati dissezionati in TRIS-HCl 10mM, KCl 183mM, NaCl 47mM, PMSF 1mM, EDTA (Titriplex) 1mM, pH6.8 a temperatura ambiente, quindi schiacciati delicatamente tra vetrini porta e coprioggetto in 2-3µl dello stesso tampone, e poi immersi in azoto liquido. Dopo asportazione del vetrino coprioggetto i preparati sono stati fissati in metanolo freddo (-18/-20°C) per 5', poi passati in acetone a 4°C per 1', e infine in PBS (formula di Dulbecco modificata) contenente 1% Triton X-100 e 0.5% acido acetico a temperatura ambiente per 10'. I preparati così fissati sono stati lavati due volte per 5' in PBS e usati per successivi esperimenti citologici.

2.4: Immunofluorescenza indiretta.

I preparati fissati sono stati incubati per 90' a temperatura ambiente con l'anticorpo policlonale T53-1 che riconosce specificamente la loop *kl-3* (Pisano et al., 1993), diluito 1:10. Dopo due sciacqui da 5' ciascuno in PBS i preparati sono incubati con un anticorpo anti-IgG di topo coniugato con fluoresceina, diluito 1:30. Le incubazioni sono state effettuate in camera umida e dopo l'ultimo passaggio i preparati sono stati nuovamente lavati in PBS per almeno 10' e montati in PBS per l'osservazione al microscopio. Per effettuare la doppia immunocolorazione con l'anticorpo T53-1 e l'anticorpo S5 che riconosce le loops *kl-5* e *ks-1* (Bonaccorsi et al., 1988), 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 per circa 12h 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 prima descritta. Con questo accorgimento è stato possibile avere una doppia immunofluorescenza indiretta pur partendo da due anticorpi generati in topo.

2.5: Osservazioni al microscopio.

Le osservazioni e le fotografie sono state effettuate con un fotomicroscopio Zeiss III dotato di lampada a fluorescenza HBO100. Per l'osservazione dei preparati trattati con anticorpi coniugati con fluoresceina è usata la combinazione di filtri 09 (BP 455-490, FT 510, LP 420); per l'osservazione dei preparati immunocolorati con rodamina è usata la combinazione 01 (BP 365/11, FT 395, LP 397).

Per le fotografie è stata impiegata la pellicola Kodak Tri X-Pan.

RISULTATI

3.1: Identificazione di mutanti autosomici con difetti nelle loops.

Allo scopo di identificare mutazioni in geni necessari alla formazione delle loops del cromosoma Y ho esaminato citologicamente tre collezioni di mutanti maschio-sterili. La prima collezione è stata generata dal dottor Wasserman e collaboratori (Castrillon et al., 1993) e consiste in 36 mutanti autosomici indotti mediante mobilizzazione di un trasposone P marcato con *rosy*⁺, contenente il gene *lacZ* ed un plasmide batterico per il "plasmid rescue" (Cooley et al., 1988). Anche la seconda collezione di mutanti, gentilmente inviataci dal dottor Gonczy, Rockefeller University, consistente in 26 linee maschio-sterili, è stata generata per trasposizione di un costrutto P analogo al precedente e descritto in dettaglio da Wilson e collaboratori (1989). La terza collezione, ottenuta dal dottor Hackstein, Università di Nijmegen, Olanda, è invece composta da 23 mutanti maschio-sterili indotti da etil metansulfonato. Tali mutanti sono stati selezionati da una collezione di 400 mutanti maschio-sterili sulla base del fatto che presentavano apparenti alterazioni a carico dei nuclei degli spermatoцитi I analizzati in preparati *in vivo* (Hackstein, 1991).

I mutanti di tutte e tre le collezioni, localizzati sia sul secondo che sul terzo cromosoma, sono stati tutti ribilanciati sul doppio bilanciatore *TSTL*. Tale bilanciatore è una traslocazione tra il cromosoma multinvertito *SM1* ed il cromosoma multinvertito *TM6b* marcato con la mutazione *Tubby* (*Tb*) che conferisce un corpo tozzo e raccorciato rispetto al tipo selvatico sia nelle larve che negli adulti. Pertanto, una volta ribilanciati su *TSTL*, sia i mutanti omozigoti sul secondo che quelli sul terzo cromosoma possono essere facilmente riconosciuti per l'assenza del fenotipo *Tubby*.

Per effettuare la mia analisi citologica ho isolato larve omozigoti per i vari mutanti alla transizione tra il terzo stadio e lo stadio pupale. Ho quindi dissezionato i testicoli larvali e da essi ho allestito preparati citologici seguendo il protocollo sperimentale descritto in "Materiali e Metodi". Tali preparati sono stati immunocolorati con l'anticorpo S5, che si lega alle loops *kl-5* e *ks-1*, e con l'anticorpo T53-1, che riconosce la loop *kl-3*, e quindi esaminati al microscopio sia in fluorescenza che in contrasto di fase. Come mostrato nelle tabelle 1 e 2 soltanto due dei mutanti delle collezioni Wasserman e Gonczy, *ms(2)4818* ed *ms(3)3817*, hanno deboli effetti sulle loops. In *ms(2)4818* vi è una apparente disintegrazione precoce della loop *kl-3* che si frammenta in spermatoцитi non ancora completamente maturi. Tale effetto potrebbe però essere dovuto non ad un alterato comportamento della loop, ma ad un difettivo accrescimento degli spermatoцитi. Nella maggior parte degli spermatoцитi di *ms(3)3817* le loops hanno un aspetto normale, ma nel

10% degli spermatoцити di questo mutante una delle loops colorate dall'anticorpo S5 appare divisa in due metà identiche.

Tabella 1: Collezione ms Wasserman

Stock	loops			spermatidi	code
	<i>kl-3</i>	<i>kl-5</i>	<i>ks-1</i>		
ms(2)919	+	+	+	reg	m
ms(2)1284	+	+	+	reg	nm
ms(2)1504	+	+	+	reg	nm
ms(2)1659	+	+	+	reg	nm
ms(2)2316	+	+	+	reg	m
ms(2)4066	Omozigote letale				
ms(2)4445	+	+	+	reg	nm
ms(2)4818	¹ +	+	+	irreg ²	nm ³
ms(2)5235	+	+	+	reg	m
ms(2)5289	Omozigote letale				
ms(2)5704	+	+	+	reg	nm
ms(2)6268	+	+	+	reg	nm
ms(2)6410	+	+	+	reg	nm
ms(2)6491	+	+	+	reg	m
ms(2)6619	+	+	+	reg	nm
ms(2)7717	+	+	+	reg	nm
ms(2)7822	+	+	+	reg	nm
ms(2)8124	+	+	+	reg	nm
ms(2)8318	+	+	+	reg	nm
ms(2)9967	+	+	+	reg	nm
ms(3)414	+	+	+	reg	nm ⁴
ms(3)940	+	+	+	reg	nm
ms(3)1651	Omozigote letale				
ms(3)2075	+	+	+	reg	nm
ms(3)2245	+	+	+	reg	nm
ms(3)3565	+	+	+	reg	nm
ms(3)3817	+	⁵ -	⁵ -	reg	nm
ms(3)3957	+	+	+	reg	nm
ms(3)4202	+	+	+	reg	nm
ms(3)4895	+	+	+	reg	nm
ms(3)5090	+	+	+	reg	m
ms(3)6208	+	+	+	reg	nm
ms(3)7446	+	+	+	reg	nm
ms(3)7570	+	+	+	reg	nm
ms(3)8445 ⁶	+	+	+	irreg ⁷	nm
ms(3)10515	+	+	+	irreg ⁸	nm

Il simbolo "+" indica che la loop è normale, il simbolo "-" che la loop presenta qualche anomalia; "reg" indica spermatoцити regolari; "m" che le code sono mobili, "nm" che non lo sono. "nd" fenotipo non ancora determinato. I mutanti con difetti nelle loops sono evidenziati in grassetto.

(1) Disintegrazione precoce della loop *kl-3*. (2) Spermatoцити con nuclei e nebenkerns di dimensioni irregolari. (3) I nuclei degli spermatoцити non si differenziano regolarmente. (4) I nuclei degli spermatoцити sono dispersi lungo le code. (5) Le loops *ks-1* e *kl-5* occasionalmente divise in due. (6) Cristalli aghiformi negli spermatoцити I. (7) Spermatoцити con nuclei e nebenkerns di dimensioni irregolari. (8) Spermatoцити con nuclei e nebenkerns di dimensioni irregolari.

Tabella2: Collezione ms Goczy

Stocks	loops			spermatidi	code
	<i>kl-3</i>	<i>kl-5</i>	<i>ks-1</i>		
ms(3)987	+	+	+	irreg ¹	m
ms(3)1024	+	+	+	reg	m
ms(3)973	+	+	+	reg	m
ms(3)1011	+	+	+	reg	m
ms(3)1073	+	+	+	reg	m
ms(3)975	+	+	+	reg	m
ms(3)1066	+	+	+	reg	m
ms(3)969	+	+	+	reg	nm
ms(3)993	+	+	+	reg	m
ms(3)1090	+	+	+	reg	nm
ms(3)1104	+	+	+	reg	m
ms(2)913	+	+	+	reg	nm ²
ms(2)1052	Arresto spermatogoniale				
ms(2)356 J	+	+	+	reg	m
ms(2)1059	+	+	+	reg	nm
ms(2)985	+	+	+	reg	m
ms(2)990	+	+	+	reg	m
ms(2)1006 ³	+	+	+	reg	m
ms(2)776 J	Omozigote letale				
ms(2)938	+	+	+	reg	m
ms(2)1058	+	+	+	reg	m
ms(2)1083 ⁴	+	+	+	irreg ⁴	nd
ms(2)904	+	+	+	reg	m
ms(2)916	+	+	+	reg	m
ms(2)1028	+	+	+	reg	m
ms(2)1122	+	+	+	reg	nm

(1) Nuclei di varie dimensioni negli spermatidi. (2) Fasci di code disorganizzati e rottura di alcuni flagelli. (3) Cristalli aghiformi negli spermatociti I. (4) Semiletale; spermatidi con nuclei e nebenkerns irregolari.

L'analisi citologica dei mutanti della collezione Hackstein ha invece permesso di identificare sei mutanti, denominati *ms(2)HA-10*, *ms(2)HA-30*, *ms(2)HB-108*, *ms(3)HB-223*, *ms(3)HB-267* ed *ms(3)HB-933*, con difetti molto evidenti a carico delle loops (Tabella 3 e Figure 15-19). In *ms(2)HA-10* oltre ad un difettivo sviluppo di tutte e tre le loops sono stati osservati vari tipi di irregolarità. Gli spermatociti di questo mutante non raggiungono le dimensioni degli spermatociti maturi di tipo selvatico e sembra esserci un arresto almeno parziale allo stadio di spermatocita I. Inoltre in questo mutante sono fortemente difettivi anche gli stadi postmeiotici. In particolare, i nuclei degli spermatidi sono molto più grandi del normale avendo dimensioni soltanto leggermente inferiori a quelle degli spermatociti. E' pertanto probabile che i difetti nelle loops osservati in *ms(2)HA-10* siano dovuti ad una alterazione del differenziamento delle cellule germinali e non ad una lesione in un gene specificamente necessario alla formazione di queste strutture.

Tabella 3: Collezione ms Hackstein

Stocks	loops			spermatidi	code
	<i>kl-3</i>	<i>kl-5</i>	<i>ks-1</i>		
ms(2)HA-DTS	+	+	+	reg	nm
ms(2)HB-X	+	+	+	reg	nd
ms(2)HA-10	-	(+)	(+)	irreg ¹	nm
ms(2)HA-30	-	+	+	reg	nm
ms(2)HB-50	+	+	+	reg	nm
ms(2)HB-108	-	+	+	reg	nm
ms(2)HB-194	Arresto allo stadio di spermatociti I				
ms(2)HB-198	+	+	+	irreg ²	nd
ms(2)HA-328	+	+	+	nd	nd
ms(2)HB-328	Omozigote letale				
ms(3)HB-4	+	+	+	nd	nd
ms(3)HA-20	+	+	+	nd	nd
ms(3)HB-99	+	+	+	nd	nd
ms(3)HB-101	+	+	+	irreg ³	nd
ms(3)HB-166	+	+	+	nd	nd
ms(3)HB-223	-	+	+	reg	nm
ms(3)HB-229	+	+	+	nd	nd
ms(3)HB-267	-	+	+	reg	nm
ms(3)HB-359	+	+	+	nd	nd
ms(3)HB-570	Arresto allo stadio di spermatociti I				
ms(3)HB-693	+	+	+	reg	nm
ms(3)HB-846	+	+	+	reg	nm
ms(3)HB-933	-	+	+	reg	nm

(1) Irregolare differenziamento dei nuclei degli spermatidi. (2) Spermatidi con nuclei e nebenkerns di dimensioni variabili. (3) Spermatidi con nuclei e nebenkerns di dimensioni variabili.

In *ms(2)HA-30*, *ms(2)HB-108*, *ms(3)HB-223*, *ms(3)HB-267* ed *ms(3)HB-933* è invece presente un chiarissimo difetto a carico della loop *kl-3*. Tale loop è completamente assente in *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-223* (Figure 14, 15 e 16), mentre in *ms(2)HA-30*, *ms(2)HB-108* e *ms(3)HB-933* (Figure 14, 17, 18 e 19) si osservano soltanto delle porzioni molto limitate di questa struttura. In tutti e 5 questi mutanti le loops *kl-5* e *ks-1* appaiono completamente normali. Inoltre, in nessuno di essi sono stati osservati difetti nell'accrescimento degli spermatociti o negli stadi postmeiotici. Va infine sottolineato che *ms(2)HA-30*, *ms(2)HB-108*, *ms(3)HB-223*, *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-933* presentano tutti fasci di flagelli immobili, del tutto simili a quelli che si possono osservare in maschi X/O o in maschi che portano mutazioni in uno dei 6 fattori di fertilità del cromosoma Y. Prese nel loro insieme le caratteristiche fenotipiche di questi mutanti suggeriscono che ciascuno di essi identifichi una funzione specificamente necessaria allo sviluppo della loop *kl-3*. Ho pertanto focalizzato la mia attenzione su di loro ed ho portato avanti una serie di esperimenti diretti alla loro caratterizzazione genetica.

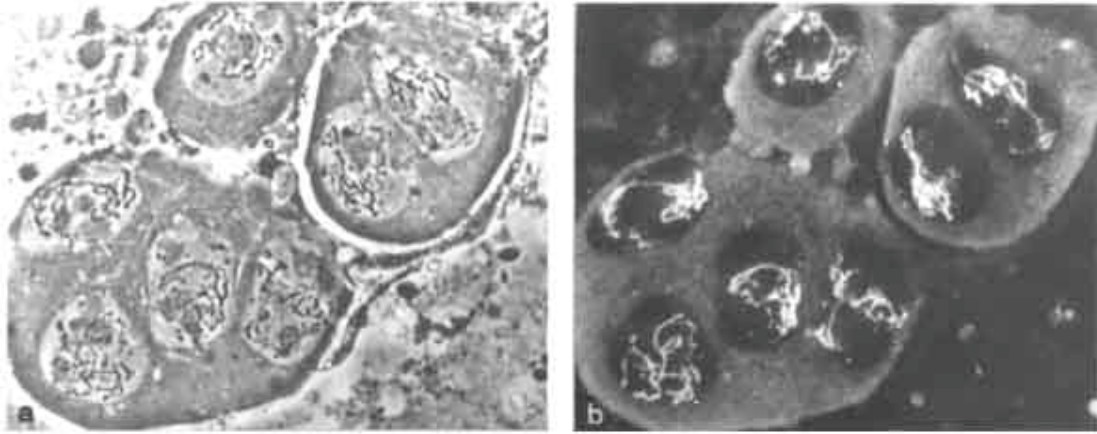


FIGURA 14. Nuclei di spermatociti I maturi di maschio Oregon-R immunocolorati con l'anticorpo T53-1. Si notino le dimensioni e l'intensa colorazione della loop *kl-3* completamente sviluppata.

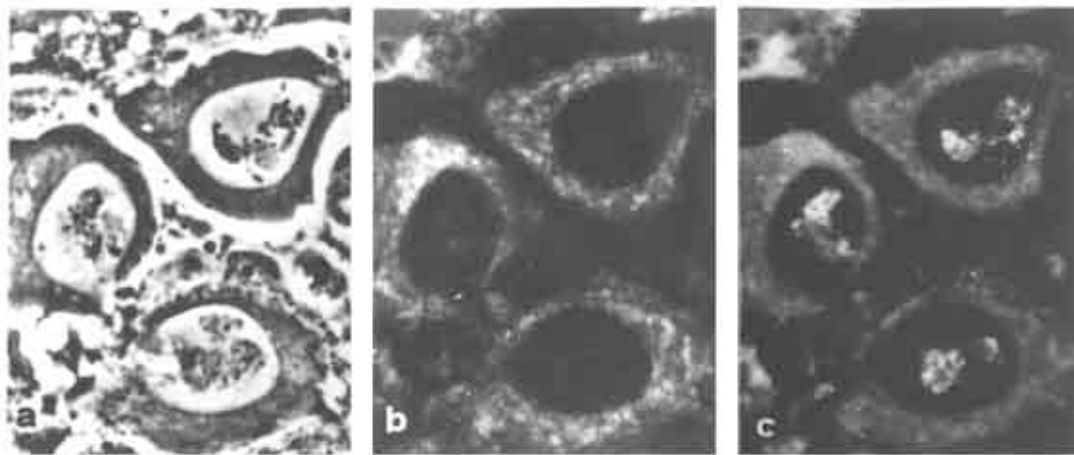


FIGURA 15. Nuclei di spermatociti I maturi di maschio omozigote per la mutazione *ms(3)HB-267*. La loop *kl-3* sembra totalmente assente (b) mentre le loops *kl-5* e *ks-1* risultano normalmente sviluppate (c). (a): contrasto di fase; (b): immunocolorazione con T53-1; (c): immunocolorazione con S5.

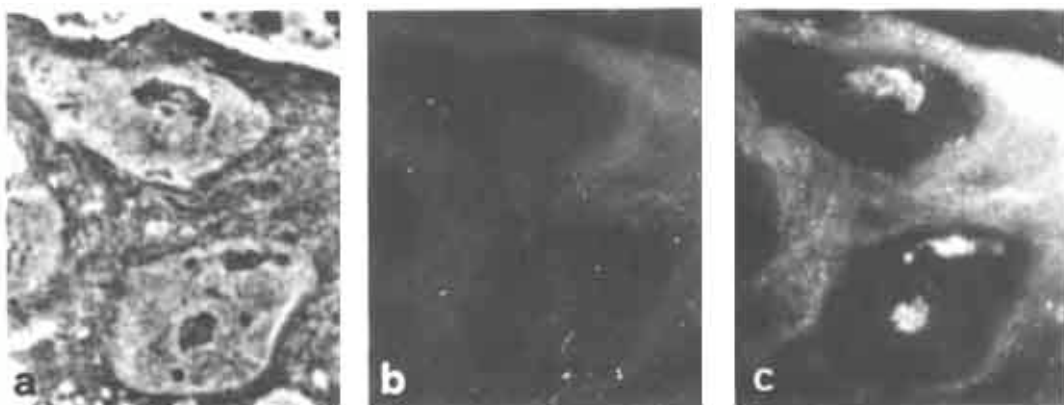


FIGURA 16. Nuclei di spermatociti I maturi di maschio omozigote per la mutazione *ms(3)HB-223*. La loop *kl-3* sembra totalmente assente (b) mentre le loops *kl-5* e *ks-1* risultano normalmente sviluppate (c). (a): contrasto di fase; (b): immunocolorazione con T53-1; (c): immunocolorazione con S5.

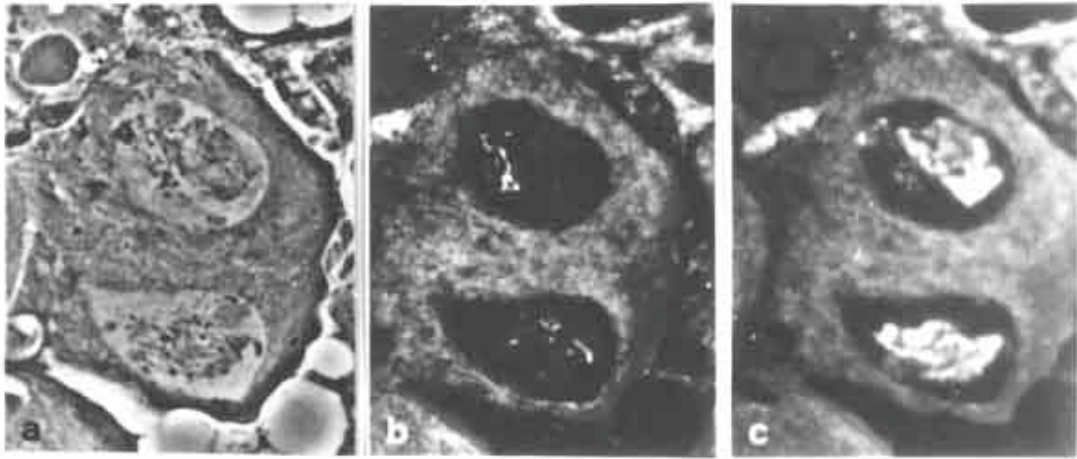


FIGURA 17. Nuclei di spermatociti I maturi di maschio omozigote per la mutazione *ms(2)HA-30*. Si notino le dimensioni estremamente ridotte della loop *kl-3* (b). Le loops *kl-5* e *ks-1* risultano invece normalmente sviluppate (c). (a): contrasto di fase; (b): immunocolorezione con T53-1; (c): immunocolorezione con S5.

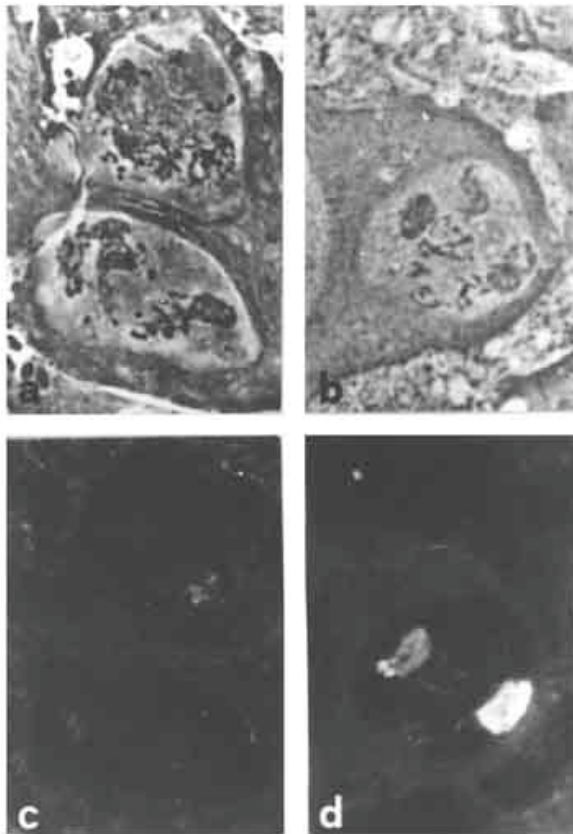


FIGURA 18. Nuclei di spermatociti I maturi di maschio omozigote per la mutazione *ms(2)HB-108*. Si notino le dimensioni estremamente ridotte della loop *kl-3* (c). Le loops *kl-5* e *ks-1* risultano invece normalmente sviluppate (d). (a,b): contrasto di fase; (c): immunocolorezione con T53-1; (d): immunocolorezione con S5.

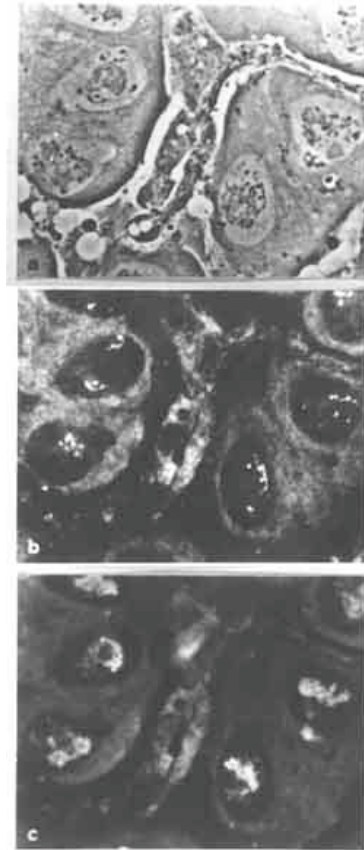


FIGURA 19. Nuclei di spermatociti I maturi di maschio omozigote per la mutazione *ms(3)HB-933*. Si notino le dimensioni estremamente ridotte della loop *kl-3* (b). Le loops *kl-5* e *ks-1* risultano invece normalmente sviluppate (c). (a): contrasto di fase; (b): immunocolorezione con T53-1; (c): immunocolorezione con S5.

3.2: Analisi genetica.

Prima di procedere all'analisi genetica di *ms(2)HA-30*, *ms(2)HB-108*, *ms(3)HB-223*, *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-933* ho voluto verificare il grado di sterilità di questi mutanti. A tale scopo ho incrociato separatamente 20 maschi omozigoti per ciascun mutante con femmine vergini del ceppo Oregon-R. Ho anche incrociato 20 femmine omozigoti per ciascun mutante con maschi Oregon-R per verificarne la fertilità. In tutti i casi i maschi sono risultati completamente sterili mentre ho avuto risultati differenti per la fertilità femminile. Le femmine omozigoti per *ms(2)HA-30* e *ms(3)HB-267* presentano la stessa fertilità delle loro sorelle eterozigoti per il mutante ed il cromosoma bilanciante. Le femmine omozigoti per *ms(3)HB-223* presentano invece una fertilità del 25% rispetto alle sorelle eterozigoti di controllo, mentre le femmine omozigoti per le mutazioni *ms(2)HB-108* e *ms(3)HB-933* sono completamente sterili.

Un secondo passo della mia analisi genetica è consistito nell'effettuare tests di complementazione tra i mutanti che mappavano sullo stesso cromosoma. Ho pertanto incrociato in tutte le possibili combinazioni individui eterozigoti per *ms(3)HB-223*, *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-933* ed i rispettivi cromosomi bilanciatori. Ho quindi isolato la prole maschile e femminile derivante da questi incroci e le ho testate per la fertilità. I maschi eterozigoti per *ms(3)HB-223* e *ms(3)HB-933* e per *ms(3)HB-223* e *ms(3)HB-267* sono risultati fertili mentre quelli eterozigoti per *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-933* sono risultati completamente sterili, indicando quindi che queste due mutazioni sono alleliche.

La prole femminile prodotta da questi tests di complementazione è invece risultata completamente fertile, suggerendo che la sterilità femminile degli omozigoti per *ms(3)HB-933* sia dovuta ad una lesione in un gene diverso da quello identificato dal gruppo di complementazione maschio-sterile definito da *ms(3)HB-223* e *ms(3)HB-933*.

I tests di complementazione tra i due mutanti sul secondo cromosoma hanno prodotto prole maschile e femminile completamente fertile, indicando che *ms(2)HA-30* e *ms(2)HB-108* non sono alleli.

La terza fase dell'analisi genetica è stata la mappatura statistica delle 5 mutazioni maschio-sterili. Per mappare i mutanti sul secondo cromosoma (Fig. 20) ho incrociato individui eterozigoti per il mutante ed il doppio bilanciante *TSTL*, con individui eterozigoti per il cromosoma multimarcato *al dp b pr c px* ed il bilanciante *SMI*. Da questo incrocio ho recuperato femmine eterozigoti per il mutante ed il cromosoma multimarcato, che ho incrociato per maschi eterozigoti per il bilanciante *SMI* e per un cromosoma portante gli stessi marcatori presenti in eterozigosi nelle femmine più il marcatore dominante *Bl*. Dalla prole di tale incrocio ho isolato maschi eterozigoti per i cromosomi ricombinanti ricevuti dalla madre e per il cromosoma multimarcato ricevuto dal padre, che sono stati incrociati

con femmine eterozigoti per il mutante e il doppio bilanciatore *TSTL*. I maschi eterozigoti per il cromosoma ricombinante ed il cromosoma mutante derivanti da questo incrocio (riconoscibili per l'assenza dei marcatori dominanti *Bl* e *Cy*) sono stati quindi testati per la fertilità.

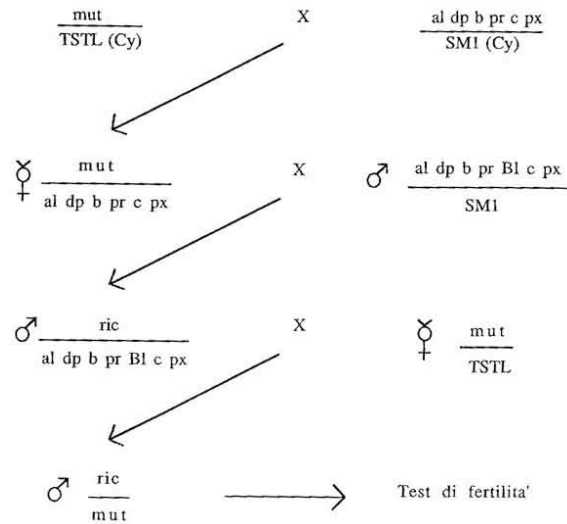


FIGURA 20. Schema per la mappatura genetica dei mutanti sul secondo cromosoma.

Mediante questa serie di incroci ho prima individuato l'intervallo all'interno del quale è localizzato il mutante maschio-sterile. Tale intervallo è definito dai due marcatori esterni i cui ricombinanti reciproci contengono ambedue, sebbene in proporzioni differenti, la mutazione maschio-sterile. Successivamente ho focalizzato la mia attenzione soltanto sui ricombinanti tra questi due marcatori, che sono stati specificamente isolati e saggiati per la fertilità in combinazione con il cromosoma originale portante la mutazione maschio-sterile. I risultati di questa analisi genetica presentati nelle Figure 21 e 22 indicano che *ms(2)HA-30* mappa tra *curved* e *plexus*, in posizione 2-86.8; *ms(2)HB-108* mappa invece tra *dumpy* e *black*, in posizione 2-46.6.

CALCOLO DELLA POSIZIONE DI MAPPA DELLA MUTAZIONE *ms(2)HA-30*

Categorie ricombinanti

c + + = 23
 c m + = 8
 + + px = 61
 + m px = 60

Posizione di mappa di *ms(2)HA-30*

$$75.5 + \frac{8+61}{152} \times 25 = 86.8$$

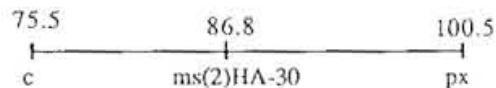


FIGURA 21

CALCOLO DELLA POSIZIONE DI MAPPA DELLA MUTAZIONE MS(2)HB-108

Categorie ricombinanti

Posizione di mappa di ms(2)HB-108

dp + + = 3
 dp m + = 54
 + + b = 68
 + m b = 4

$$13 + \frac{68+54}{129} \times 35.5 = 46.6$$

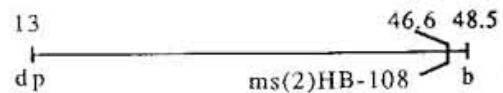


FIGURA 22

Per quanto riguarda la mappatura dei mutanti sul terzo cromosoma ho seguito uno schema di incroci (Fig. 23) analogo a quello precedentemente descritto per il secondo cromosoma. In tali incroci ho impiegato un cromosoma 3 multimarcato con *ru h th st cu sr e^s ca*, ed ho recuperato i ricombinanti tra questo cromosoma e quello portante la mutazione maschio-sterile, ponendoli in eterozigosi su un altro cromosoma avente gli stessi marcatori, con l'aggiunta del marcatore dominante *Prickly*. Anche in questo caso ho prima definito l'intervallo all'interno del quale era localizzato il mutante che è stato poi mappato utilizzando soltanto i due marcatori esterni.

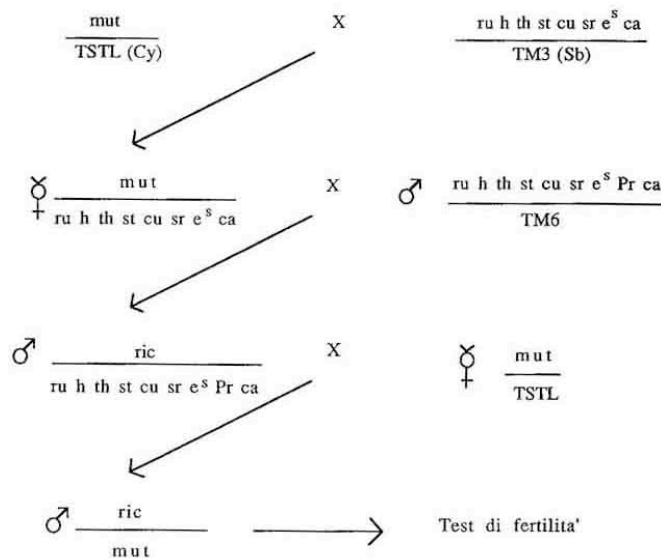


FIGURA 23. Schema per la mappatura genetica dei mutanti sul terzo cromosoma.

I risultati di questi analisi indicano che *ms(3)HB-223* mappa tra *hairy* e *thread* in posizione 3-42.5 (Fig. 24) mentre *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-933* mappano tra *curved* e *stripe*, rispettivamente in posizione 3-59.5 e 3-57.2 (Figure 25 e 26). In quest'ultimo caso, ovviamente, la leggera discrepanza tra i due valori è dovuta al numero relativamente basso di ricombinanti esaminati, specialmente nel caso di *ms(3)HB-267*. Tuttavia, dal momento che i due mutanti sono alleli, la loro posizione di mappa può essere ricavata cumulando i dati ottenuti. I risultati di tale operazione pongono il gruppo di complementazione definito da questi due mutanti in posizione 58.1.

Vorrei sottolineare che l'analisi dei ricombinanti tra il cromosoma multimarcato ed *ms(3)HB-933* ha rivelato che la sterilità maschile e la sterilità femminile associate a questo mutante sono separabili. Ciò indica che il cromosoma che porta la mutazione maschio-sterile *ms(3)HB-933* porta anche una seconda mutazione femmina-sterile, indipendente dalla prima.

CALCOLO DELLA POSIZIONE DI MAPPA DELLA MUTAZIONE *ms(3)HB-223*

Categorie ricombinanti

Posizione di mappa di *ms(3)HB-223*

h + + = 4
 h m + = 85
 + + th = 69
 + m th = 3

$$26.5 + \frac{85+69}{161} \times 16.7 = 42.5$$

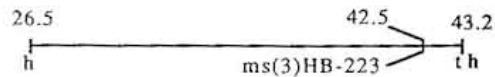


FIGURA 24

CALCOLO DELLA POSIZIONE DI MAPPA DELLA MUTAZIONE *ms(3)HB-267*

Categorie ricombinanti

Posizione di mappa di *ms(3)HB-267*

cu + + = 5
 cu m + = 12
 + + sr = 19
 + m sr = 3

$$50 + \frac{12+19}{39} \times 12 = 59.5$$



FIGURA 25

CALCOLO DELLA POSIZIONE DI MAPPA DELLA MUTAZIONE *ms(3)HB-933*

Categorie ricombinanti

Posizione di mappa di *ms(3)HB-933*

cu + + = 5
 cu m + = 13
 + + sr = 21
 + m sr = 18

$$50 + \frac{13+21}{57} \times 12 = 57.2$$

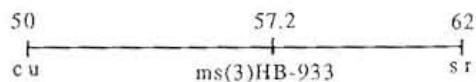


FIGURA 26

DISCUSSIONE

La mia analisi citologica di 85 mutanti maschio-sterili, indotti in 3 differenti laboratori con sistemi differenti di mutagenesi, ha portato all'identificazione di 5 mutanti [*ms(2)HA-30*, *ms(2)HB-108*, *ms(3)HB-223*, *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-933*] a 4 loci che influenzano drasticamente la formazione della loop *kl-3*. Sono stati anche individuati 2 mutanti che producono alterazioni minori a carico della loop *kl-3* [*ms(2)4818*] e delle loops *kl-5* e *ks-1* [*ms(3)3817*], ed un mutante [*ms(2)HA-10*] fortemente difettivo nello sviluppo delle cellule germinali, in cui è parzialmente inibito anche lo sviluppo di tutte le loops.

I mutanti che più drasticamente influenzano le loops sono stati individuati nella collezione di linee maschio-sterili inviatoci dal Dott. Hackstein. Ciò non sorprende in quanto tali linee, come già precedentemente menzionato, sono state selezionate da una collezione di circa 400 mutanti maschio-sterili sulla base del fatto che presentavano alterazioni a carico dei nuclei degli spermatociti primi analizzati in preparati *in vivo*. In particolare, in alcuni di questi mutanti era stata osservata una apparente riduzione del materiale filamentoso intranucleare corrispondente alla loop *kl-3* (Bonaccorsi et al., 1988; Hackstein, 1991). Queste osservazioni preliminari *in vivo* sono state puntualmente verificate dalla mia analisi citologica che ha portato all'identificazione di 5 mutanti in cui la loop *kl-3* è parzialmente o completamente assente. Pertanto il non aver reperito mutanti a carico delle loops *kl-5* e *ks-1* molto probabilmente non dipende da una relativa rarità delle mutazioni che alterano queste strutture, ma piuttosto dal fatto che il campione esaminato era specificamente arricchito in mutanti della loop *kl-3*.

Le mutazioni da me identificate, pur essendo a carico di 4 loci differenti, presentano fenotipi estremamente simili. In tutti i casi infatti si ha l'assenza pressoché totale della loop *kl-3* mentre le loops *kl-5* e *ks-1* appaiono normali. Sulla base di questo fenotipo propongo di denominare i 4 loci con il nome generico "*kl-3 loop-forming*" seguito da un numero d'ordine. Pertanto d'ora in avanti *ms(2)HA-30* sarà indicato come *kl-3 loop-forming-2* (*kl3-lf2*), *ms(2)HB-108* come *kl-3 loop-forming-3* (*kl3-lf3*), *ms(3)HB-223* come *kl-3 loop-forming-4* (*kl3-lf4*), *ms(3)HB-267* e *ms(3)HB-933* come *kl-3 loop-forming-5* (*kl3-lf5*). Non ho ritenuto opportuno designare alcun gene con il nome *kl-3 loop-forming-1* perché questo appellativo è stato riservato per il gene che codifica per l'antigene riconosciuto dall'anticorpo T53-1, nel caso che le mutazioni a suo carico risultino in difetti morfologici della loop *kl-3*.

Al momento attuale è molto difficile immaginare quali siano le funzioni specificate da *kl3-lf2*, *kl3-lf3*, *kl3-lf4* e *kl3-lf5*. Posso soltanto cercare di elencarne alcune sulla base di un ragionamento puramente teorico. Una funzione che potrebbe essere identificata da questi mutanti è quella di codificare per prodotti genici necessari alla decondensazione della fibra

cromosomica che forma la loop. La loop *kl-3* è prevalentemente costituita da DNA satellite a sequenza semplice AATAT. Tale DNA non è tuttavia presente soltanto nella regione che forma la loop *kl-3*, ma anche in altre regioni eterocromatiche che non formano loops negli spermatoцитi I. Deve quindi essere ipotizzato che nella regione *kl-3*, oltre a questo satellite, siano presenti delle sequenze segnale che permettano la decondensazione selettiva di questa porzione genomica. Se questo è vero, è possibile che uno o più tra i loci da me individuati codifichino per proteine che riconoscono questi segnali permettendo così la formazione della loop *kl-3*.

Un'altra possibilità che può essere considerata è che, una volta formata, la loop *kl-3* debba essere stabilizzata da prodotti genici specifici che ne mantengano lo stato decondensato. Si può pertanto immaginare che uno o più tra i geni da me analizzati possa svolgere questo tipo di funzione.

Una terza ipotesi si basa sulla possibilità che qualcuno dei mutanti da me descritti contenga all'interno dei suoi spermatoцитi I una loop *kl-3* perfettamente sviluppata ma non associata a proteine e quindi invisibile sia a contrasto di fase che con colorazione con anticorpi. Ciò implicherebbe che il mutante o i mutanti di questo tipo codifichino per proteine particolarmente abbondanti della loop *kl-3* o proteine che mediano l'associazione di altri polipeptidi a questa loop. La natura di tali proteine è attualmente del tutto sconosciuta; esse potrebbero essere proteine necessarie per la spermioistogenesi, tipo quella riconosciuta dall'anticorpo T53-1 che, come ho precedentemente menzionato, potrebbe appartenere alla famiglia delle tectine. Alternativamente potrebbe trattarsi di proteine associate alla loop a cui la tectina si lega. Per discriminare tra queste possibilità è in atto nel nostro laboratorio un grosso esperimento di mutagenesi per ottenere mutazioni nel gene per la "tectina". L'esame del fenotipo di questi mutanti chiarirà il ruolo di questa proteina nel determinare la struttura della loop *kl-3*. In ogni caso l'unico tipo di lavoro sperimentale che potrà fornire informazioni dirette sul ruolo di *kl3-lf2*, *kl3-lf3*, *kl3-lf4* e *kl3-lf5* nella formazione della loop *kl-3* sarà il clonaggio e l'analisi molecolare di questi geni e la conseguente determinazione della struttura primaria delle proteine da essi identificate. La caratterizzazione di queste proteine e lo studio del loro comportamento durante la spermatogenesi servirà a chiarire almeno in parte un sistema genetico di grande complessità e fascino quale quello dei fattori di fertilità del cromosoma Y. Vale infatti la pena di ricordare, in conclusione di questa discussione, l'organizzazione del locus *kl-3*. Questo fattore di fertilità è costituito da una regione cromosomica completamente eterocromatica contenente 4-5 Mb di DNA, in prevalenza composto da sequenze semplici AATAT ripetute milioni di volte. L'espressione di *kl-3* si manifesta con la formazione di una coppia di gigantesche "lampbrush loops" per la cui formazione è corretto

funzionamento sono necessari almeno 5 geni eucromatici autosomici: i quattro geni da me identificati in questo lavoro di tesi ed il gene che codifica per la "tectina".

BIBLIOGRAFIA

- Ashburner, M., 1989.
Drosophila: A laboratory Handbook.
Cold Spring Harbor, New York.
- 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.
- Bonaccorsi, S., C. Pisano, F. Puoti and M. Gatti, 1988.
Y chromosome loops in *Drosophila melanogaster*.
Genetics **120**:1015-1034.
- 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.
- 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.
- Cenci, G., S. Bonaccorsi, C. Pisano, F. Verni and Gatti M., 1993.
A cytological dissection of *Drosophila melanogaster* spermatogenesis.
Submitted.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fuller, M. T., 1986.
Genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila*: the role of the testis-specific γ -tubulin and interacting genes in cellular morphogenesis.
In: J. G. Gall (Ed.): *Gametogenesis and the Early Embryo*. 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. and B. S. Baker, 1989.
Genes controlling essential cell cycle functions in *Drosophila melanogaster*.
Genes Dev. **3**:438-453.

- 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 S. Pimpinelli, 1992. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu. Rev. Genet.* **26**:239-275.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, pp. 91-115. In: *Chromosome Structure and Function*, edited by J. P. Gustafson and R. Appels. 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.
- 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*. Edited by F.H. Ruddle. Academic Press, New York.
- 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.

- 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. pp. 225-294.
In: The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 2nd. Edited by M. Ashburner and T. R. F. Wright. 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. pp. 148-186. Verma R. ed., 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.
- 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 and T. C. Kaufman, 1989.
Developmental distribution of RNA and protein products of the *Drosophila* tubuline gene family.
Dev. Biol. **132**:45-61.
- 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.
Drosophila Info. Serv. **61**:121.
- Meyer, G. F., 1968.
Spermiogenese in normalen und Y-defizienten Männchen von *Drosophila melanogaster* und *D. hydei*.
Z. Zellforsch Mikroskop Anat. **84**:141-175.
- 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.
- 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.
- 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*. Edited by M. Ashburner. Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Risau, W., P. Symmons, H. Saumweber and M. Frash, 1983. Nonpackaging and packaging proteins of hnRNA in *Drosophila melanogaster*. *Cell* **33**:529-541.
- Russell, S. R. H., 1989. Isolation of male specific genes from *Drosophila melanogaster*. Ph. D. Thesis, Glasgow University.
- Saumweber H., P. Symmons, R. Kabish, H. Will and F. Bonhoeffer, 1980. Monoclonal antibodies against chromosomal proteins of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **80**:253-275.
- 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.
- Tates, A. D., 1971. Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Ph. D. Thesis, Leiden University.
- 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 chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **119**:43-47.
- 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.