
Dottorato in Biologia Avanzata – XIX ciclo

Indirizzo: Sistematica Molecolare

Università degli Studi di Napoli “Federico II”



Caratterizzazione molecolare delle unità trascrizionali
del cluster *36F* ad espressione maschio - specifica in
Drosophila melanogaster

Coordinatore:
Ch.ma Prof. ssa Silvana Filosa

Candidato:
Dott.ssa Di Cara Francesca

Relatore:
Ch.mo prof. Giuseppe Saccone

Correlatore:
Dott.ssa F. Anna Digilio

Introduzione	1
1.1 La spermatogenesi	3
1.2 Gonade maschile della <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.3 Citologia e ultrastruttura della spermatogenesi in <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.4 Fase di crescita degli spermatociti primari	6
1.4.1 Regolazione della traduzione	8
1.5 Differenziamento degli spermatidi	12
1.5.1 Onion Stage	13
1.5.2 Allungamento e maturazione degli spermatidi	14
1.5.3 Variazioni morfologiche dei derivati mitocondriali durante la fase di allungamento	15
1.5.4 Condensazione della cromatina e rimodellamento nucleare	15
1.5.5 Individualizzazione	16
1.6 Fecondazione in <i>Drosophila</i>	17
1.7 Controllo genetico della spermatogenesi	18
1.7.1 Controllo coordinato del differenziamento degli spermatidi e progressione del ciclo cellulare meiotico	20
1.8 Geni specifici della linea germinale maschile	25
1.9 Introduzione al lavoro sperimentale	27
Materiali e metodi	32
Elenco delle abbreviazioni utilizzate	33
Elenco dei reagenti.....	34
2.3 ELENCO DELLE SOLUZIONI UTILIZZATE	35
2.4 Anticorpi e antisieri	36
2.5 ENZIMI	36
2.6 Reagenti e Kit per biologia molecolare	37
2.7 Plasmidi	37
2.8 CEPPI DI <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> USATI	38
2.9 CICLO VITALE DI <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> A 25°C	39
2.10 Dieta di <i>Drosophila</i>	39

2.11	CEPPI BATTERICI UTILIZZATI PER CULTURA E TRASFORMAZIONE (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)	40
2.12	OLIGONUCLEOTIDI SINTETICI	40
2.13	Estrazione di DNA plasmidico	42
2.14	Recupero frammenti gel d'Agarosio	42
2.16	Reazione di defosforilazione del DNA	43
2.17	Reazione di ligasi	44
2.18	Preparazione di ceppi competenti di <i>E. coli</i> con CaCl ₂	44
2.19	Trasformazione batterica	45
2.20	Reazione di PCR	45
2.21	Costruzione di vettori ricombinanti	46
2.22	Preparazione di una sonda lacZ non radioattiva a singolo f ilamento di RNA marcata con la digossigenina	49
2.23	Preparazione di una sonda <i>mst36Fa</i> e <i>mst36Fb</i> non radioattiva a singolo filamento di RNA marcata con la digossigenina	51
2.24	Ibridazione in situ "whole mount" con sonda <i>lacZ</i> non radioattiva su ovari di <i>Drosophila</i>	52
2.25	Saggio di colorazione X-gal	53
2.26	Immagini	54
2.27	Costrutto pUAST/ <i>mst36Fa</i> GFP	54
2.28	Costrutto pUAST/ <i>mst36Fb</i> /RFP	55
2.29	Costrutto Sym-pUAST/ <i>Ia</i>	56
2.30	Costrutto Sym-pUAST/ <i>Ib</i>	56
2.31	Trasformazione della linea germinale di <i>Drosophila</i>	56
2.32	Rivelazione della proteina di <i>mst36Fa</i> fusa con la GFP nei testicoli di <i>D. melanogaster</i>	57
2.33	Colorazione Dapi	57
2.34	Immagini	57
2.35	Estrazione di proteine da testicoli di maschi adulti	57
2.36	SDS-Page	58
2.37	Colorazione del gel di proteine	58
2.38	Western blot	58
2.39	Estrazione di RNA totale da mosche adulte	59

2.40 RT-PCR	59
Risultati60
3.1 Caratterizzazione delle sequenze di regolazione in “cis” dei geni <i>mst36F</i>	61
3.1.1 Identificazione delle regioni di regolazione maschio-specifiche del gene <i>mst36Fa</i>	64
3.1.2 Isolamento della sequenza di regolazione della trascrizione del gene <i>mst36Fa</i>	66
3.1.3 Determinazione delle sequenze di regolazione post trascrizionali di <i>mst36Fa</i>	69
3.1.4 Determinazione delle sequenze di regolazione della trascrizione del gene <i>mst36Fb</i>	71
3.1.5 Determinazione delle regioni di regolazione post trascrizionale di <i>mst36Fb</i>	73
3.1.6 Analisi delle sequenze di regolazione degli <i>mst36F</i>	75
3.2 Profilo di espressione dei geni del cluster <i>mst36F</i> nei testicoli dei mutanti di arresto meiotico della classe <i>aly e can</i>	76
3.2.1 Profilo di espressione di <i>mst36Fa</i> nei testicoli dei mutanti della classe <i>aly</i>	79
3.2.2 Profilo di espressione di <i>mst36Fa</i> nei testicoli dei mutanti della classe <i>can</i>	79
3.2.3 Profilo di espressione di <i>mst36Fb</i> nei testicoli dei mutanti della classe <i>aly</i>	80
3.2.4 Profilo di espressione di <i>mst36Fb</i> nei testicoli dei mutanti della classe <i>can</i>	80
3.3 Analisi funzionale del cluster <i>mst36F</i>	82
3.3.1 Analisi bioinformatica del gene <i>mst36Fa</i>	83
3.3.2 Studio della localizzazione subcellulare della proteina MST36Fa	87
3.3.3 Studio del mutante ottenuto per interferenza genica di <i>mst36Fa</i>	93
3.3.4 Analisi molecolare del mutante <i>mst36Fa</i>	94
3.3.5 Analisi funzionale del mutante per interferenza genica <i>mst36Fa</i>	95
3.3.6 Analisi bioinformatica del gene <i>mst36Fb</i>	98

3.3.7 Studio della localizzazione sub-cellulare della proteina MST36Fb	100
3.3.8 Realizzazione del mutante ottenuto per interferenza genica di <i>mst36Fb</i>	101
3.3.9 Analisi molecolare del mutante per interferenza genica <i>mst36Fb</i>	103
3.3.10 Analisi funzionale del mutante per interferenza genica <i>mst36Fb</i>	105
Discussione	107
4.1 I geni dl cluster <i>mst36F</i> idetificano una nuova famiglia genica	109
4.2 Evoluzione delle regioni di regolazione della trascrizione	110
4.3 Regolazione post-trascrizionale del cluter <i>mst36F</i>	112
4.4 Studio funzionale del cluster <i>mst36F</i>	114
Bibliografia	118
Appendice	123

Ai miei genitori, mio fratello e mia zia Rosa...e tutti quelli che hanno sempre creduto in me ...

Introduzione

1.1 La spermatogenesi

La spermatogenesi in *Drosophila melanogaster* rappresenta un valido sistema modello per lo studio di diversi eventi biologici quali il differenziamento delle cellule staminali germinali, la regolazione del ciclo cellulare mitotico e meiotico, la citochinesi, i processi di differenziamento cellulare e subcellulare a livello genico, molecolare e citologico (Karess, 1984; Castrillon et al., 1993; Fuller, 1993) nonché per la comprensione dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica che si sono evoluti negli eucarioti superiori.

1.2 Gonade maschile della *Drosophila melanogaster*

Il processo di maturazione dei gameti maschili avviene nei testicoli e dura 10 giorni. I testicoli di maschio adulto della *D. melanogaster* sono due piccoli tubuli di circa 0.1mm di diametro e 2 mm di lunghezza (fig.1a). Ogni testicolo è chiuso all'estremità apicale che è rivolta verso la regione anteriore della mosca, ed aperto all'estremità basale nel dotto testicolare che è collegato alla vescicola seminale, in cui si riversano gli spermatozoi maturi. La coppia di vescicole seminali si unisce in un dotto comune che a sua volta si connette con il dotto eiaculatore, attraverso il quale gli spermatozoi sono trasferiti ai genitali esterni (Miller, 1950). L'intero apparato riproduttivo è formato da due componenti cellulari di diversa origine embrionale. La prima componente, che occupa il 90% dell'intero contenuto dei testicoli, è costituita dalle cellule della linea germinale che si originano durante le primissime fasi dello sviluppo embrionale, ma che rimangono quiescenti fino alla formazione del pupario. La seconda componente è di origine mesodermica, e deriva dalle cellule somatiche già presenti nel testicolo larvale ma anche e soprattutto, dal differenziamento del disco germinale gonadico (Bairati et al., 1967).

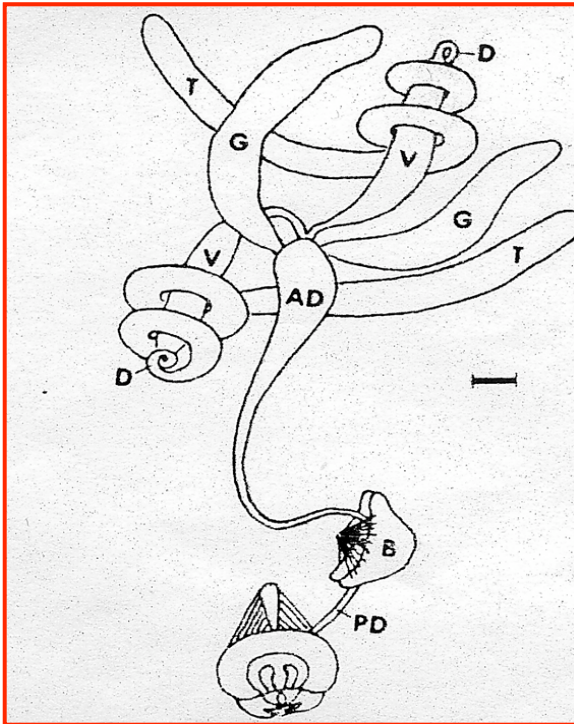
1.3 Citologia e ultrastruttura della spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*

La spermatogenesi in *D. melanogaster* è un processo continuo durante tutta la vita dell'adulto; come indicato da analisi citologiche dei testicoli che rivelano al loro interno la presenza di cellule a tutti gli stadi di sviluppo (fig.1b). L'intero processo di spermatogenesi può quindi essere rappresentato in un diagramma spazio-temporale, in cui procedendo dall'apice del testicolo verso la base sono presenti in vari punti ben definiti, cisti contenenti le cellule germinali in maturazione a differenti stadi di sviluppo (fig.1b).

Nell'estremità apicale del testicolo è localizzato il centro di proliferazione cellulare (fig.2.a) dove le cellule sono organizzate in modo da formare un cono centrale intorno al quale si vanno a disporre le cellule staminali (16-18 nelle larve e 5-9 nei testicoli dell'adulto), a loro volta circondate dalle cellule progenitrici delle cisti (Hardy et al, 1979).

Nel centro di proliferazione cellulare, una singola cellula staminale si divide in modo ineguale ogni 10 ore e dà origine ad un'altra cellula staminale di dimensione inferiore che resta ancorata all'apice testicolare, e ad una cellula di dimensioni maggiori, lo spermatogonio primario, che risulta distale rispetto all'apice testicolare, e che darà origine alla fine del suo processo di maturazione a 64 spermatozoi maturi. L'intero processo di maturazione dura circa duecentocinquanta ore ed avviene all'interno di uno spazio delimitato da due cellule somatiche dette cellule della cisti, che accompagneranno ciascuno spermatogonio e i suoi discendenti durante tutto il processo.

a



b

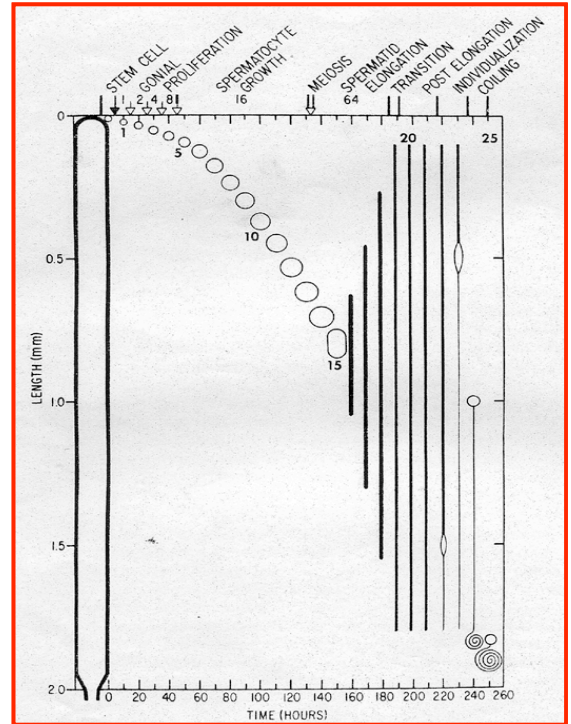


Fig.1- Processo di spermatogenesi in *D. melanogaster*. In a è schematizzato l'apparato riproduttivo del maschio adulto di *Drosophila melanogaster* (T: testicolo; D: dotto testicolare; V: vescicola seminale; G: ghiandola accessoria.; AD: dotto eiaculatore anteriore; PD: dotto eiaculatore posteriore; B: bulbo eiaculatore). In b è rappresentata la distribuzione spaziale e temporale durante il processo di spermatogenesi di 25 cisti che contengono una famiglia di cellule discendenti da una singola cellula staminale. Sull'asse delle ordinate è riportata lungo il testicolo, partendo dalla cellula staminale in divisione partendo dalla cellula staminale in divisione all'apice del testicolo, punto ad ordinata (0) fino alla liberazione degli spermatozoi maturi (ordinata 2). Sull'asse delle ascisse è indicata invece la posizione temporale di ogni cisti durante l'intero processo. Le frecce riportate in alto nel diagramma indicano ciascuna divisione cellulare, mentre le cifre riportate tra le frecce indicano il numero di cellule presunti in ciascuna cisti durante il processo.

1.4 Fase di crescita degli spermatociti primari

In *Drosophila melanogaster*, ogni spermatogonio primario va incontro a quattro divisioni mitotiche con citochinesi incompleta (Meyer et al, 1967; Tates, 1971) che daranno origine a sedici spermatociti primari, che resteranno interconnessi fra loro da ponti citoplasmatici per la maggior parte della spermatogenesi. I sedici spermatociti escono dalla mitosi ed entrano in una lunga profase meioica, durante la quale non si osserva formazione del complesso sinaptonemale in quanto durante la meiosi dei maschi in *Drosophila* non vi sono eventi di ricombinazione. La lunga profase meiotica dura circa novanta ore e durante questo periodo la cisti viene sospinta da una posizione sub-apicale ad una prossimale verso la metà del testicolo, dove avrà luogo la meiosi (fig.1b). I sedici spermatociti in maturazione subiscono un aumento del volume cellulare di ben venticinque volte quello iniziale (Lindsley and Tokuyasu, 1980) e una serie di eventi di riorganizzazioni che culminano con due divisioni meiotiche in rapida successione. Il nucleo diventa estremamente grande in seguito ad un accumulo di elementi reticolari e di ammassi ribonucleoproteici, mentre nel citoplasma si osserva un enorme aumento di mitocondri e ribosomi, nonché un aumento di estensione del reticolo endoplasmatico perinucleare. Da un punto di vista molecolare, in questo periodo si osserva un'intensa attività trascrizionale finemente regolata, che porta ad accumulare negli spermatociti premeiotici, tutte le informazioni necessarie per il processo differenziativo post meiotico della spermiogenesi; infatti la maggior parte se non tutti, i geni coinvolti nel successivo stadio di morfogenesi post-meiotica (Olivieri and Olivieri, 1965; Henning, 1967), vengono trascritti in questa fase premeiotica per poi essere tradotti, grazie all'esistenza di un programma di regolazione post-trascrizionale finemente modulato, anche diversi giorni dopo la loro sintesi, quando si rendono necessari prodotti genici.

Tutti i geni necessari alla progressione della spermatogenesi finora caratterizzati vengono trascritti sotto la guida di promotori maschio specifici che rispondono a fattori trascrizionali tessuto specifici.

Ad oggi, in realtà, le conoscenze circa i meccanismi molecolari che regolano il processo di spermatogenesi in *D. melanogaster*, sono ancora limitate rispetto a quelle che si hanno per altri processi di sviluppo quali l'embriogenesi o l'oogenesi. Questo è sicuramente dovuto al fatto che è piuttosto complesso dissezionare geneticamente le vie regolative che sono alla base di tale processo biologico, sia perché la maggior parte delle mutazioni maschio-sterile è dovuta ad alleli deboli di geni vitali (Castrillon et al., 1993) sia perché il controllo post-trascrizionale trasferisce l'effetto fenotipico di mutazioni a carico di eventuali geni regolativi solo in stadi più avanzati.

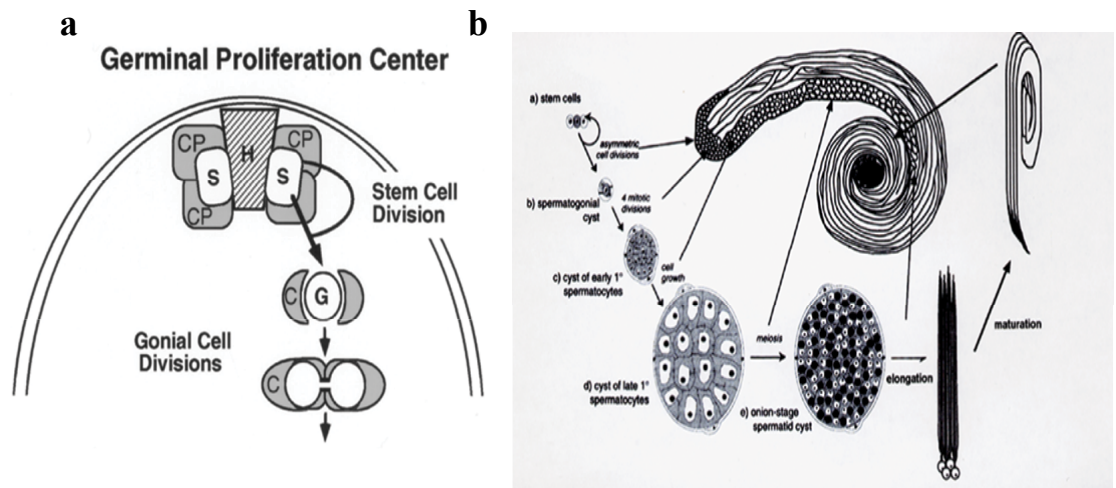


Fig.-2 a Rappresentazione schematica del centro di proliferazione germinale, H indica il cono costituito dalle cellule della linea somatica attaccate alle cellule che rivestono lo strato esterno del testicolo, S indica le cellule staminali che interagiscono con le cellule del cono; CP le cellule progenitrici della cisti che circondano le cellule staminali; G indica spermatogonio primario avvolto dalle cellule cisti differenziate C. (tratto e modificato da Fuller 1993)

b) Diagramma della morfologia dei gameti sviluppo a diversi stadi della spermatogenesi nei testicoli di maschio adulto della *Drosophila*. Le diverse tipologie cellulari all'interno del testicolo sono indicate dalle frecce a) cellule staminali, b) cisti contenente spermatogoni prima delle divisioni mitotiche, c) cisti contenente spermatociti primari, d) cisti contenente spermatociti maturi, e) cisti contenente spermatidi "onion stage", dove è possibile osservare in ogni cellula un nucleo adiacente al nebenkern struttura derivata dalla fusione dei mitocodri ed in seguito a questo stadio gli spermatidi di ogni cisti si allungano e si individualizzano per formare gli spermatozoi maturi. (tratto e modificato da Fuller, 1998)

1.4.1 Regolazione della traduzione

Da un punto di vista molecolare si ritiene che durante la spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*, la trascrizione dopo la meiosi sia minima, se non assente contrariamente a quanto avviene nel topo e nell'uomo dove molti geni sono trascritti durante le fasi post-meiotiche (Erickson, 1990). Numerose evidenze ottenute nel corso degli anni da diversi autori hanno sostenuto questa visione molecolare (Maines and Wasserman, 1998; White-Cooper et al., 1998; Kuhn et al., 1988; Scafer et al, 1993) e finora la sola eccezione in *Drosophila* è data dal gene *hsr-omega* (Bendena et al., 1991). Studi autoradiografici effettuati in un primo momento su *Drosophila hydei* ed estesi poi a *D. melanogaster*, suggeriscono che gran parte dell'mRNA richiesto per lo sviluppo degli spermatidi è trascritto negli spermatociti diploidi durante la fase di crescita. Inoltre, una quasi totale inibizione della sintesi di RNA nei testicoli in coltura non previene il differenziamento degli spermatociti maturi in spermatidi (Gould-Somero and Holland, 1974). Questa presunta assenza di trascrizione aploide in *D. melanogaster* può essere giustificata dal fatto che durante la meiosi, o poco prima, intervenga un sistema di controllo (Jianqiao Jiang and Helen White-Cooper, 2002) che "inattivi" l'azione dei fattori di trascrizione (Schäfer, 1995; White-cooper et al, 2000). Ciò che è chiaro è l'esistenza di un programma di sviluppo che prevede la sintesi di molecole di mRNA molto tempo prima che i rispettivi prodotti proteici vengano utilizzati. Infatti, se gran parte della trascrizione termina prima delle divisioni meiotiche la traduzione continua fino agli stadi più tardivi della spermiogenesi (Gould-Somero and Holland, 1974).

Il periodo di tempo che intercorre dall'inizio delle divisioni meiotiche fino alla completa maturazione degli spermatozoi dura un centinaio di ore; ciò lascia immaginare l'esistenza di un efficiente controllo traduzionale, che permette ai messaggeri di essere conservati a lungo nelle cellule senza essere né tradotti né degradati. Inoltre, poiché si ha un ordine temporale ben preciso di eventi e di

richieste di specifici prodotti, il controllo traduzionale non può essere generalizzato ed agire con le stesse modalità su trascritti diversi, ma deve essere molto fine, in modo da rendere disponibili i vari prodotti proteici secondo un ordine temporale ben preciso.

La prima evidenza a livello molecolare dell'esistenza di un controllo post-trascrizionale nella spermatogenesi di *D.melanogaster* è stata ottenuta dal gruppo di Schäfer per un gene espresso specificamente nella linea germinale maschile. Sebbene questo gene chiamato *mst87F* venga trascritto negli spermatociti primari, il rispettivo prodotto proteico è reso disponibile ben 3 giorni dopo, durante la fase di allungamento degli spermatidi (Schäfer et al., 1990). Questo è stato brillantemente suggerito dallo studio di varie linee transgeniche, portatrici di costrutti chimerici derivati dalla fusione di varie delezioni delle sequenze di regolazione in *cis* con il gene reporter della β -galattosidasi (*lacZ*) di *E. Coli*. In questo modo è stato identificato un elemento di 12 nucleotidi nella regione 5' non tradotta (o leader) del trascritto che è in grado di conferire il controllo negativo della traduzione (Kuhn et al., 1991). Questo elemento, noto come TCE (Translational Control Element) è stato in seguito ritrovato, ben conservato ed in posizione canonica (+28/+39), in altri geni sottoposti a controllo traduzionale durante la spermatogenesi della *D. melanogaster*, quali ad esempio il gene *janus b* (Yanicostas et al. , 1990) o i raggruppamenti genici delle regioni politeniche 84D e 98C (Kuhn et al. 1991; Schäfer et al. , 1990; Gigliottiet al., 1997). Alcuni di questi geni (*mst98C*) sono conservati nell'evoluzione in altre specie di Drosophilidi quali *D. affinis*, *D. simulans*, *D. bifurca*, *D. fulvimacula*, *D. hydei*, *D. immigrans* e *D. funebris* (Schafer et al., 1993) dove presentano omologia di sequenza, un analogo profilo di espressione tessuto, sesso e stadio specifico e, in *D. hydei*, la sequenza di regolazione traduzionale TCE conservata. Questa sequenza di controllo della traduzione, TCE, oltre ad essere un ipotetico sito bersaglio per proteine di

legame all'RNA, sembra responsabile di una poliadenilazione citoplasmatica aggiuntiva dei trascritti al momento della traduzione (Kuhn et al., 1991; Schäfer et al., 1990, 1993), che si traduce in una maggiore stabilità dei messaggeri. Negli anni a seguire sono stati identificati altri elementi regolativi a carico dei geni della spermatogenesi (Gigliotti et al., 1997; Santel et al., 1997, 1998).

Un primo esempio è offerto dal gene *mst84Db* (Gigliotti, 1997). A livello di quest'ultimo, come suggerito dall'analisi di linee transgeniche è stato dimostrato che il controllo post-trascrizionale è indipendente dal TCE, ma è ottenuto grazie a due nuovi elementi in *cis* che agiscono a livello di due diverse vie di regolazione; un primo elemento posizionato nella regione codificante e che simula il TCE in quanto è necessario per controllare la traduzione ed un secondo elemento localizzato nella porzione non tradotta in 3' che è necessario sia per conferire maggiore stabilità al messaggero sia per consentire una tardiva attivazione della traduzione.

Più recentemente, la dissezione delle regioni di regolazione del gene *don juan* ha permesso la caratterizzazione di un nuovo elemento di regolazione della traduzione (Blümer et al., 2002). Anche in questo caso, l'analisi dell'espressione genica ha rivelato che il trascritto è presente allo stadio pre-meiotico di spermatocita primario mentre la proteina si accumula negli stadi più tardivi post-meiotici. Il nuovo motivo di regolazione traduzionale (Blümer et al., 2002) è localizzato nella regione 5' non tradotta (+61/ +85) ed è stato denominato TRE (Translation Repression Element).

La repressione della traduzione è un meccanismo fondamentale per l'intero processo di spermiogenesi, ragion per cui sono stati intrapresi studi volti ad individuare non solo sequenze in *cis* ma anche i fattori in *trans* che intervengono nel processo. Tuttavia poiché questo meccanismo di blocco della traduzione trasferisce l'effetto fenotipico di mutazioni a carico di eventuali geni regolativi solo in stadi più avanzati, rende difficile dissezionare le vie geniche del processo di spermatogenesi. Per superare questi limiti negli ultimi venti anni sono stati

intrapresi esperimenti di mutagenesi mediata sia dalla mobilitazione occasionale dell'elemento trasponibile *P* nel genoma della mosca (Castrillon et al,1993) e sia da agenti chimici (Wakimoto, 2003). La collezione di mutanti ottenuta ha permesso l'identificazione di più di duemila linee mutanti maschio sterile che disturbano il processo di spermatogenesi in

fasi differenti. Sulla base di studi citologici, questi mutanti sono stati classificati in diversi gruppi distinti morfologicamente, come i mutanti pre-meiotici, mutanti post-meiotici o del differenziamento, mutanti della motilità degli spermatozoi che hanno completato il differenziamento e mutanti che impediscono allo spermatozoo di interagire con l'uovo e fecondarlo.

Questi studi hanno permesso di identificare fattori proteici espressi sia in maschio che in femmina ed altri esclusivamente maschio specifici. Esempi rilevanti sono il prodotto proteico del gene *boule* (Berhart CG, 1996), omologo dell'umano *delete in Azoospermia* che a sua volta codifica per una proteina che è coinvolta nell'attivazione della traduzione del trascritto di *twine*, che codifica per l'omologo testicolare specifico della ciclina *cdc25* (Edgar BA, 1989). Indispensabile per l'ingresso in meiosi degli spermatociti primari (parag.1.8.1). Un altro fattore di regolazione in *trans* responsabile della regolazione della traduzione negli spermatociti è la proteina Rb97D che interagisce con il trascritto *ks-1* (locus genico legato alla fertilità sul cromosoma Y), durante la profase meiotica. In questo caso mutazioni in *Rb97D* arrestano lo sviluppo dei gameti durante la spermiogenesi causando difetti nel rimodellamento del nucleo. Le conoscenze accumulate negli esempi sopra riportati hanno contribuito ad avvalorare l'ipotesi che il meccanismo di repressione della traduzione sia un aspetto fondamentale per la corretta progressione della spermiogenesi coinvolgendo la repressione dei trascritti e la loro successiva uscita dal blocco traduzionale (Fuller, 1998).

1.5 Differenziamento degli spermatidi

La profase meiotica culmina con due successive divisioni meiotiche che danno origine ad una cisti contenente sessantaquattro spermatidi aploidi ancora interconnessi da ponti citoplasmatici che iniziano il periodo differenziativo (spermiogenesi). Durante il periodo di differenziamento degli spermatidi, cellule aploidi tonde e sinciziali, subiscono numerose variazioni morfologiche necessarie per ottenere cellule flagellate dotate di motilità e capaci di interagire con l'uovo e di fecondarlo (Gould-Somero and Holland, 1974; Olivieri and Olivieri, 1965).

Da un punto di vista citologico intervengono profondi cambiamenti strutturali a carico dei principali componenti cellulari: la costruzione della vescicola acrosomiale a partire dall'apparato di Golgi, la condensazione e l'allungamento del nucleo, l'organizzazione dell'assonema e dei derivati mitocondriali, la formazione del flagello e l'assemblaggio del cono di actina per l'organizzazione del complesso d'individualizzazione (IC complex)(Tokuyasu and Lyndsley, 1980, Castrillon et al., 1993; Noguchi and Miller 2003). Tutte queste complesse trasformazioni sembrano mediate da riorganizzazioni del citoscheletro che stabilisce intimi contatti con ciascuno degli organi in via di differenziamento. Tutti questi eventi morfologici sono stati ben caratterizzati a livello ultrastrutturale al microscopio elettronico (Lindsley and Tokuyasu; Tokuyasu et al. 1972) e sono descritti in dettaglio nei sottoparagrafi successivi (1.5.1; 1.5.2; 1.5.3; 1.5.4; 1.5.5).

Alla fine del processo di individualizzazione, i singoli spermatozoi maturi sono rilasciati nel lume della vescicola seminale (fig.3).

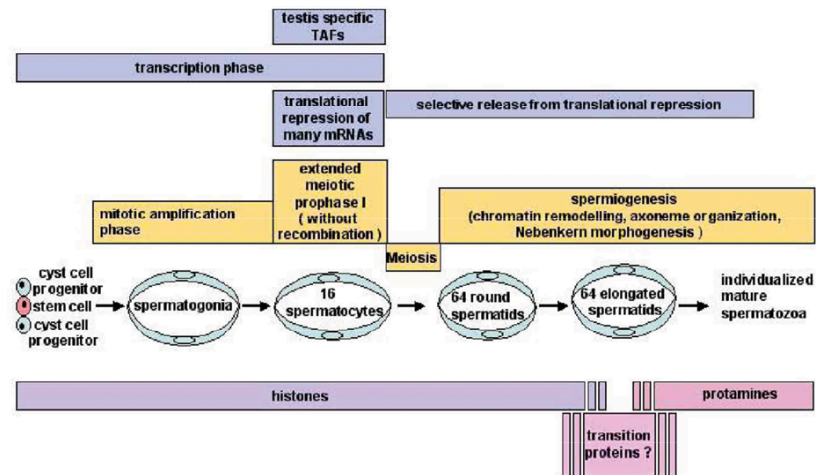


Fig.3- Rappresentazione schematica dei principali stadi di sviluppo della spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*. Da destra a sinistra sono evidenziati gli stadi in cui vengono attivati i meccanismi molecolari di regolazione della trascrizione, del blocco della traduzione e della condensazione della cromatina. (tratto e modificato da Renkawitz-Pohl et al, 2005)

1.5.1 Onion Stage

Durante le due divisioni meiotiche, i mitocondri all'interno del citoplasma degli spermatociti maturi, si allineano lungo il fuso per essere separati equamente nelle cellule figlie durante la citochinesi. Dopo la telofase II, i mitocondri in ogni spermatide si aggregano, si fondono e si intrecciano a formare due grandi strutture denominate derivati mitocondriali o Nebenkern visibili al microscopio a contrasto di fase come due sfere scure. Tali strutture osservate in sezione trasversale risultano simili ad una cipolla e per questo motivo, in letteratura, tale stadio di sviluppo è indicato come "onion stage" (Fig.2b).

Nello stadio di sviluppo successivo i derivati mitondriali cambiano in grandezza e forma, e da una struttura sferica di circa 7 μm evolvono in una struttura cilindrica lunga circa 1.8 mm. Queste variazioni morfologiche sono dipendenti dalla presenza del prodotto del gene *fuzzy onion*.

Nello stesso stadio di sviluppo si osservano ulteriori variazioni morfologiche a livello sub-cellulare: si organizza l'assonema a partire dalla base del nucleo, dove si crea una connessione tra la futura testa e il flagello dello spermatozoo

matturo; le vescicole dell'apparato del Golgi si fondono per formare la vescicola acrosomiale nella testa dello spermatozoo che si colloca sopra al nucleo, in posizione opposta al corpo basale del flagello (Fig.2b). All'interno del nucleo compare una struttura scura chiamata corpo proteico (formato per lo più da proteine basiche) che cresce nelle fasi successive del differenziamento. Questa struttura è un marcatore delle cisti contenenti gli spermatidi immaturi. Durante questo stadio è facile isolare mutanti con difetti di segregazione meiotica in quanto la grandezza del nucleo a questo stadio è proporzionale alla quantità di cromatina presente; quindi, variazioni dell'assetto aploide possono essere facilmente individuate osservando la grandezza del nucleo.

1.5.2 Allungamento e maturazione degli spermatidi

I cambiamenti morfologici che subiscono gli spermatidi negli stadi successivi all'onion stage sono particolarmente interessanti. I derivati mitocondriali (nebenkern) si dividono in due e si allungano nel flagello seguendo la formazione dell'assonema, il nucleo si rimodella, avviene l'individualizzazione degli spermatidi e l'avvolgimento degli spermatozoi maturi prima del loro rilascio nel lume testicolare.

1.5.3 Variazioni morfologiche dei derivati mitocondriali durante la fase di allungamento

Durante la fase di allungamento il nebenkern inizia a cambiare la sua organizzazione strutturale.

I derivati mitocondriali si dispongono lungo il flagello e assumono l'aspetto di due foglietti (Fuller, 1993). Iniziano a scomparire le numerose inclusioni citoplasmatiche ricche di ribosomi e di altri componenti, e in questo stadio è visibile nel citoplasma degli spermatidi solo un nucleo sferico e i due derivati mitocondriali disposti parallelamente e ben separati.

Nello stadio successivo i mitocondri si differenziano in maggiori e minori derivati mitocondriali. Sui maggiori derivati mitocondriali si deposita materiale granulare che gli conferisce un'intensa particolare colorazione che viene utilizzata per identificare gli spermatidi a tale stadio di sviluppo.

Una fitta rete di microtubuli si organizza nel citoplasma parallelamente ai derivati mitocondriali probabilmente contribuendo al loro allungamento.

1.5.4 Condensazione della cromatina e rimodellamento nucleare

Contemporaneamente al deposito dei granuli sui derivati mitocondriali si osserva il fenomeno del rimodellamento del nucleo. Il nucleo sferico in questo stadio si rimodella per assumere la forma di un ago. All'inizio del processo il nucleo si appiattisce da un lato e si incurva dall'altro assumendo una forma concava da un lato e convessa nel lato opposto. Tale processo è guidato dai microtubuli che possono essere osservati disposti da ambo i lati (concavo e convesso) del nucleo all'inizio del fenomeno e in seguito esclusivamente sulla superficie convessa.

Durante la fase del rimodellamento del nucleo la cromatina si condensa e l'eccesso di nucleoplasma viene espulso all'interno di vescicole dalla regione apicale dell'involucro nucleare. La cromatina continua a condensare fino ad una riduzione del volume nucleare di circa 200 volte.

Il passaggio dalla forma nucleosomale a quella condensata del DNA è indispensabile per ottenere una testa degli spermatozoi più idrodinamica e per proteggere il DNA da danni fisici e chimici. Il nucleo sarà nuovamente modificato solo dopo la fecondazione e prima della formazione del nucleo dello zigote (Loppin e Karr , 2005).

Durante la spermatogenesi dei mammiferi è noto che gli istoni sono modificati ed in parte sostituiti da varianti tessuto specifiche durante la profase meiotica. Dopo la meiosi gli istoni sono sostituiti da proteine di transizione TP1 e TP2 (Meistrich et al, 2003) e successivamente da proteine altamente basiche, le

protammine, che assicurano il rimodellamento della cromatina ad uno stato altamente condensato e trascrizionalmente silente tipico degli spermatozoi maturi. In *Drosophila*, i meccanismi molecolari della condensazione della cromatina dopo la meiosi non sono stati studiati nei dettagli; l'unica cosa certa è che non sono stati identificati istoni negli spermatozoi maturi mentre la presenza di proteine basiche è stata rivelata da esperimenti di istochimica (Das et al, 1964; Raja et al, 2005).

1.5.5 Individualizzazione

L'individualizzazione è lo stadio durante il quale i 64 fasci di spermatidi all'interno della cisti si separano gli uni dagli altri rompendo le connessioni intercellulari dei "ring canal". Il complesso di individualizzazione è costituito da un cono di actina che ha origine alla base del nucleo, dove è possibile osservare la formazione di un rigonfiamento nella cisti. Tale rigonfiamento si sposta lungo l'intera lunghezza del flagello partendo dalla testa fino ad arrivare alla base del flagello dove verrà espulsa (fig.3). Nella bolla (Waste bag) vengono raccolti l'eccesso di nucleoplasma e di citoplasma e i detriti cellulari derivati dal processo di individualizzazione in cui avviene la formazione delle nuove membrane degli spermatidi individualizzati. Durante l'individualizzazione si attiva un programma di apoptosi, e dati recenti, suggeriscono che l'organizzazione del complesso di individualizzazione sia dipendente dall'attivazione della caspasi. Quest'ultima è in grado di guidare la degradazione dell'eccesso di citoplasma che viene raccolto all'interno della "waste bag ", mentre il nucleo dello spermatozoo è protetto dall'azione della caspasi da dBruce un enzima coniugato all'ubiquitina E2 (Arama et al, 2003).

Alla fine dello stadio di individualizzazione gli spermatozoi ormai maturi sono in grado di muoversi e di raggiungere la vescicola seminale.

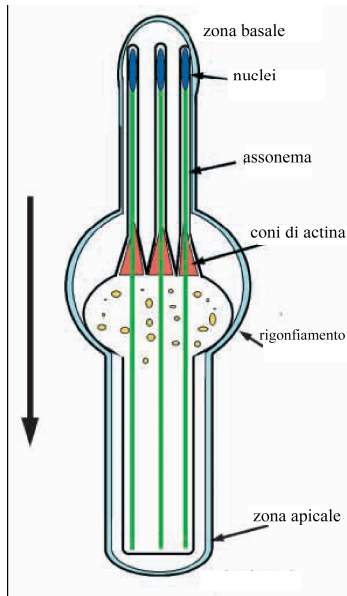


Fig.-3 Rappresentazione schematica di una cisti in individualizzazione. L'individualizzazione avviene all'interno del rigonfiamento della cisti. La riorganizzazione delle membrane ha luogo man mano che il cono di actina (triangolo rosso) si sposta dalla testa alla fine dell'assonema. La freccia indica la direzione del processo. Il citoplasma in eccesso e gli organelli vengono accumulati nella bolla (waste bag) man mano che il cono di actina avanza. Alla fine del processo il citoplasma e gli organelli raccolti nella bolla vengono espulsi dalla cisti e 64 spermatozi vengono rilasciati. (tratto da Nagouchi et al., 2003)

1.6 Fecondazione in *Drosophila*

Come descritto nei paragrafi precedenti il processo di spermatogenesi porta alla formazione dei gameti maschili maturi che sono cellule individualizzate e motili con un lungo flagello e una testa con un nucleo condensato pronte a fertilizzare la cellula uovo.

In *Drosophila* la fecondazione avviene nell'utero, poco dopo la maturazione della cellula uovo. Nel tratto genitale della femmina sono presenti due strutture, definite spermateca e ricettacolo seminale in cui viene conservata una quantità relativamente piccola di spermatozoi. Una femmina può accoppiarsi con più maschi e conservare nella spermateca i differenti spermatozoi per gran parte della sua vita. È stata dimostrata l'esistenza di un meccanismo di competizione tra gli spermatozoi provenienti da differenti individui per fecondare l'uovo. Le basi molecolari del fenomeno sono sconosciute e molti ricercatori hanno intrapreso studi per comprenderne sia i meccanismi molecolari che l'importanza del fenomeno nell'isolamento delle specie. Fino ad ora sembra evidente che la competizione tra gli spermatozoi sia legata al movimento degli spermatozoi nell'apparato genitale maschile e nel tratto eiaculatore del testicolo, durante il rilascio degli stessi dagli organi di conservazione presenti nella femmina e

durante l'ovoposizione. Questo implica che dopo l'accoppiamento vi è un lungo periodo durante il quale viene stabilita la paternità della prole.

La femmina deposita l'uovo poco tempo dopo la fecondazione. La cellula uovo della *Drosophila* è ferma in metafase I e in seguito all'ingresso degli spermatozoi si attiva il processo di ovulazione che consente di uscire dal blocco meiotico. Il nucleo degli spermatozoi maturi estremamente condensato dopo l'ingresso nella cellula uovo acquista l'aspetto di pronucleo maschile: le proteine basiche che vengono utilizzate per compattare il nucleo durante la spermatogenesi vengono rapidamente sostituite dagli istoni della madre. Questo cambiamento dello stato della cromatina, da stato di nucleo estremamente condensato ad uno pronto alla replicazione, tipico del pronucleo maschile, è un evento indispensabile per la formazione del nucleo dello zigote. Dopo la fusione tra il pronucleo femminile e il neo formato pronucleo maschile il nucleo dello zigote inizia la serie di divisioni mitotiche dell'embriogenesi.

1.7 Controllo genetico della spermatogenesi

L'analisi genetica della spermatogenesi in *Drosophila*, indica che la maggior parte degli eventi morfogenetici che intervengono durante il processo sono guidati da vie metaboliche indipendenti. La maggior parte dei mutanti da sterilità maschile presenta difetti in uno o più stadi del processo, mentre altri stadi procedono senza difetti dando origine a spermatidi che non riescono a portare a termine l'individualizzazione. Ad esempio, l'allungamento dei maggiori derivati mitocondriali, dei mitocondri del flagello e dell'assonema avviene in maniera indipendente. Infatti, maschi che esprimono la forma somatica della β -tubulina al posto di quella testicolo-specifica non formano l'assonema del flagello mentre sono in grado di organizzare i derivati mitocondriali.

Esistono però alcuni mutanti da sterilità maschile molto interessanti. Alcuni di questi provocano l'arresto dell'intero processo della spermatogenesi

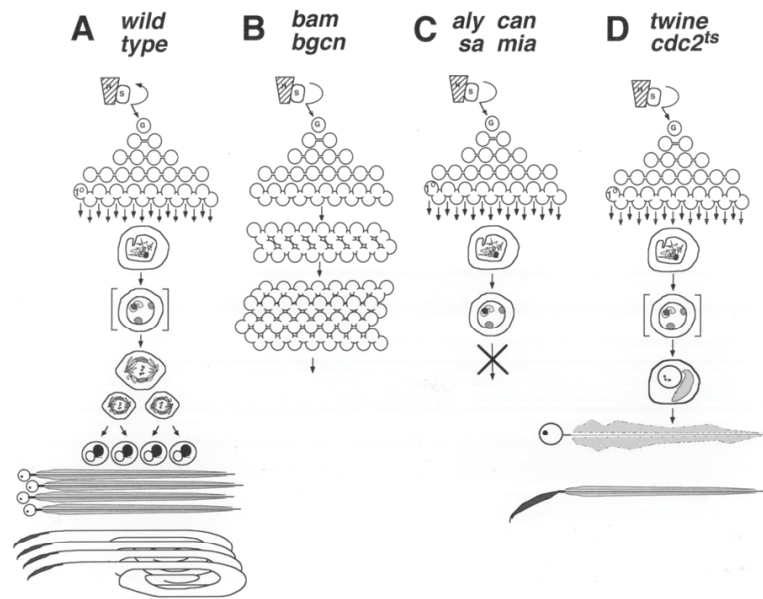


Fig.5-Mutazioni che bloccano la progressione della spermatogenesi hanno consentito di identificare geni che agiscono da regolatori dei momenti chiave durante il differenziamento dei gameti maschili. Confronto tra la progressione della spermatogenesi in un ceppo selvatico (A) e in ceppi mutanti (B, C, D). A) Spermatogenesi in individui selvatici. La cellula goniale (G) in seguito a 4 divisioni mitotiche dà origine a 16 spermatociti I interconnessi tra loro da ponti citoplasmatici. Gli spermatociti I attraversano un lungo periodo di crescita (90 ore) caratterizzato da attiva sintesi trascrizionale alla fine della quale entrano nel programma di divisione meiotica seguito dal differenziamento degli spermatidi. B) spermatogenesi in ceppi mutanti per il gene *bag of marbles* (*bam*) o *benign gonial cell neoplasm* (*bgn*). I prodotti dei geni *bam* e *bgn* nella linea germinale maschile sono essenziali per il passaggio dal programma di divisioni mitotiche degli spermatogoni a quello di divisioni meiotiche degli spermatociti primari. I testicoli dei ceppi mutanti per *bam* o *bgn* presentano cisti contenenti 32 o più spermatogoni destinati ad entrare poi in un programma di morte cellulare. C) Spermatogenesi in ceppi mutanti per i geni *always early* (*aly*), *cannonball* (*can*), *meiosis I arrest* (*mia*) o *spermatocyte arrest* (*sa*). La funzione dei geni da arresto meiotico *aly*, *can*, *mia*, e *sa* è necessaria sia per la progressione del ciclo cellulare meiotico sia per l'inizio del programma differenziativo degli spermatidi. Nei testicoli di ciascuno dei mutanti riportati, le cellule germinali negli stadi precoci di sviluppo e nella fase di crescita dello stadio di spermatocita I appaiono simili al selvatico ma arrestano lo sviluppo nel passaggio G2/M del ciclo cellulare meiotico. D) Spermatogenesi nei ceppi mutanti per i geni *twine* e *cdc2*. Nei mutanti *twine*, negli spermatociti in meiosi non avviene l'organizzazione del fuso, la segregazione dei cromosomi e la citochinesi. Ma nonostante tali difetti di divisione cellulare, il programma di differenziamento degli spermatidi ha inizio e nei testicoli di tali mutanti si osservano cisti contenenti spermatidi tetraploidi in differenziamento. Un fenotipo simile si osserva nei testicoli dei maschi mutanti per il gene *cdc2*.

perché colpiscono geni che controllano passaggi chiave dell'intero programma differenziativo.

Come mostrato in fig.5 possiamo dire che tre sono i passaggi fondamentali per il programma di sviluppo dei gameti maschili.

Il primo è all'inizio del processo, quando all'apice del testicolo le cellule figlie delle cellule germinali staminali devono decidere se restare cellula staminale o differenziarsi in spermatogonio primario, come indicato in figura 5B.

Come illustrato in figura 5C, il secondo passo fondamentale è dato dai geni di "arresto meiotico", cruciali per regolare la trascrizione negli spermatociti primari, sia di geni del ciclo cellulare che del differenziamento degli spermatidi, infine il terzo punto, schematizzato in fig. 5D è controllato da geni del ciclo cellulare meiotico.

La maggior parte delle mutazioni che causano il blocco dell'intero processo di spermatogenesi ostacolano o il passaggio da mitosi a meiosi o l'inizio del differenziamento degli spermatociti in spermatidi. Studio dei mutanti, che arrestano il processo nella fase G2/M del ciclo cellulare della Meiosi I, suggeriscono l'esistenza di un meccanismo di regolazione incrociata che coordina la progressione del ciclo cellulare meiotico con l'inizio del differenziamento degli spermatidi (Fuller, 1998) (Fig.6).

1.7.1 Controllo coordinato del differenziamento degli spermatidi e progressione del ciclo cellulare meiotico

Come già precedentemente detto durante la spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*, le cellule staminali poste all'apice del testicolo si dividono in maniera asimmetrica, per originare una cellula staminale figlia e uno spermatogonio primario. Quest'ultimo si divide quattro volte per mitosi per dare origine a sedici spermatociti ancora interconnessi da ponti citoplasmatici e avvolti da due cellule di origine somatica, le cellule della cisti. Dopo la quarta divisione mitotica, le cellule attraversano una fase S durante la quale effettuano

la replicazione del loro genoma ed entrano poi in una lunga fase G2 (3,5 giorni) caratterizzata da intensa sintesi trascrizionale. Durante questo periodo, le cellule aumentano il loro volume di venticinque volte. In seguito all'ingresso in meiosi, la trascrizione cessa. I geni della successiva fase della spermiogenesi, richiesti per produrre gli spermatozoi maturi, sono trascritti durante la lunga fase G2 e i loro messaggeri sono tenuti sotto il controllo traduzionale per essere poi tradotti dopo la meiosi (Schafer, 1995). La via di controllo che è alla base della spermatogenesi è ad oggi scarsamente definita ma alcuni mutanti ad "arresto meiotico" sono stati identificati. Tutti questi mutanti hanno un fenotipo simile, nel senso che gli spermatociti primari arrestano lo sviluppo, e non iniziano la divisione meiotica e il differenziamento degli spermatidi. I geni di arresto meiotico caratterizzati ad oggi sono stati suddivisi in 2 classi. I geni della classe *aly* (*always early, metatopleti, achynta, visma, y coocki monster*) (White-Cooper et al, 1998; Hiller et al 2001; Ayyar et al, 2003; Perezgasga et al, 2004) sembrano coinvolti ad un livello più alto del controllo gerarchico (modellamento della cromatina) e regolano la trascrizione di alcuni geni coinvolti nell'ingresso in meiosi (*boule, twine, cyclin B*) e di numerosi geni della spermiogenesi (*es. fuzzy, onion, don juan, Janus b*) che sono richiesti per il corretto sviluppo degli spermatozoi maturi. In contrasto i geni di arresto meiotico della classe *can* (*cannonball spermatocyte arrest, meiosi I arrest, no hitter*) (Hiller et al, 2001; Lin et al, 1996; Jiang et al, 2002; Mikhaylova et al, 2006) non influenzano la trascrizione dei geni del ciclo cellulare ma sono richiesti per l'attivazione della trascrizione dei geni coinvolti nella spermiogenesi. Mutanti per *aly* mostrano lo stesso fenotipo dei mutanti *mia sa* e *can* lasciando intendere che *aly* controlla l'espressione di *can, mia e sa*. Un meccanismo di regolazione sembra assicurare che gli spermatociti non entrino in meiosi se i geni necessari per il differenziamento degli spermatidi non sono tradotti.

La progressione del ciclo cellulare meiotico è controllata da isoforme maschio-specifiche di proteine chiave, regolatrici del ciclo cellulare mitotico. La Ciclina

A, presente nel citoplasma delle cellule durante la fase di crescita, entra nel nucleo degli spermatociti primari maturi all'inizio della prima divisione meiotica dove viene poi degradata dalla chinasi Cdc2 all'inizio della metafase I, mentre l'mRNA scompare per tutta la meiosi per assicurare che non venga sintetizzata proteina durante la meiosi I. In individui selvatici i livelli di trascritto, la localizzazione e la fusione della Ciclina A sono modificati durante la lunga fase G2 della meiosi I dal prodotto del gene *roughex*.

Anche il passaggio G2/M e' comunque regolato da fattori specifici che vengono sintetizzati esclusivamente negli spermatociti primari. In *Drosophila*, le divisioni mitotiche sono regolate dal prodotto del gene *string* che codifica per l'omologo maschio specifico della chinasi Cdc25 che attiva il complesso Cdc2/Ciclina B per il passaggio G2/M.

Il prodotto String regola le divisioni mitotiche degli spermatogoni e non e' presente negli spermatociti I, dove invece e' espresso il gene *twine* un altro omologo di *cdc25*. Il prodotto del gene *twine* svolge la sua funzione insieme al prodotto del gene *boule*. *boule* e' trascritto negli spermatociti primari ed e' un trascritto testicolo specifico la cui funzione e' richiesta non solo per la transizione G2/M della meiosi I ma anche per il corretto differenziamento degli spermatidi.

Sebbene i geni *twine* e *ciclina b* siano espressi all'inizio dello stadio di spermatocita primario, l'accumulo dei rispettivi prodotti proteici e' rivelabile solo all'inizio della prima divisione meiotica. Studi su mutanti temperatura sensibili per il gene *cdc2* hanno dimostrato che la progressione della divisione meiotica e' indipendente dal processo di differenziamento degli spermatidi. Infatti, in assenza del prodotto del gene *cdc2* il ciclo cellulare meiotico si arresta ma il processo di differenziamento degli spermatidi continua allo stesso modo. Maschi mutanti per il gene *twine* non riescono a portare avanti la formazione del fuso, la segregazione dei cromosomi e la citochinesi durante la meiosi, ma presentano cisti con 16 spermatidi diploidi che continuano il differenziamento.

Fino ad oggi non sono state invece ancora individuate mutazioni che consentono la progressione della meiosi e che bloccano il differenziamento cellulare mentre sono state isolate mutazioni che bloccano entrambi i processi. Queste evidenze sperimentali consentono di affermare che la progressione del ciclo cellulare e il differenziamento degli spermatidi sono regolati da vie metaboliche comunicanti. Studi condotti negli ultimi dieci anni hanno consentito di ipotizzare un modello del circuito di regolazione che controlla e coordina la progressione del ciclo cellulare e il differenziamento degli spermatidi (Fuller, 1998, Perezgasga et al., 2004) (Fig.6) secondo il quale tutti i geni cardine responsabili della meiosi maschile in *Drosophila melanogaster* sono trascrizionalmente regolati dal gene *always early (aly)*.

Nei testicoli dei maschi mutanti per il gene *aly*, i geni *twine*, *boule* e *ciclina B* non vengono trascritti. Sebbene gli spermatociti trascrivono e accumulano altri trascritti, si arrestano nella fase G2/M della meiosi I e nei testicoli si accumulano spermatociti che presentano una cromatina parzialmente condensata.

Inoltre Aly controlla anche l'espressione di *can*, *mia* e *sa*. Questo meccanismo di regolazione sembra assicurare che gli spermatociti non entrino in meiosi se i geni necessari per il differenziamento degli spermatidi non sono tradotti. Testicoli dei maschi mutanti *can*, *mia*, *sa* mostrano spermatociti arrestati in G2/M con cromosomi parzialmente condensati e alti livelli di ciclina A. In questi mutanti *twine* è trascritto ma la proteina non viene prodotta forse perché il messaggero risulta non stabile o non tradotto; in questo modo, la proteina *twine* non può attivare Cdc2 e le cellule restano in fase G2/M. Quindi è stato ipotizzato un modello in cui geni trascritti sotto controllo di *can*, *mia* e *sa* agiscono per stabilizzare la proteina Twine. Più in generale, si può dire che la mancanza dell'espressione di geni regolati da geni di arresto meiotico *aly*, *can*, *mia*, *sa*, porta di conseguenza blocco della meiosi e del differenziamento.

I meccanismi molecolari che regolano e coordinano il programma di sviluppo dei gameti maschili risultano abbastanza conservati dalla *Drosophila* all'uomo,

come suggerito da recenti studi sulla conservazione di molti geni essenziali per lo sviluppo e il mantenimento nelle cellule della linea germinale in *Drosophila*. Ne è un esempio il gene *degenerative spermatocyte*, essenziale per il mantenimento delle cellule germinali staminali di cui è stato identificato l'omologo in topo che sembra essere espresso solo nel testicolo; o il gene murino *dazla* omologo del gene *boule* di *Drosophila* che è espresso negli spermatociti dove è necessario per il loro differenziamento. Partendo da tali dati preliminari, è interessante intraprendere studi volti ad individuare altri geni che regolano il processo di spermatogenesi in *Drosophila* per verificare se sono conservati nell'evoluzione e per individuare il loro ruolo tanto in *Drosophila* quanto nella spermatogenesi dei mammiferi dove possono risultare importanti per la comprensione della fertilità maschile.

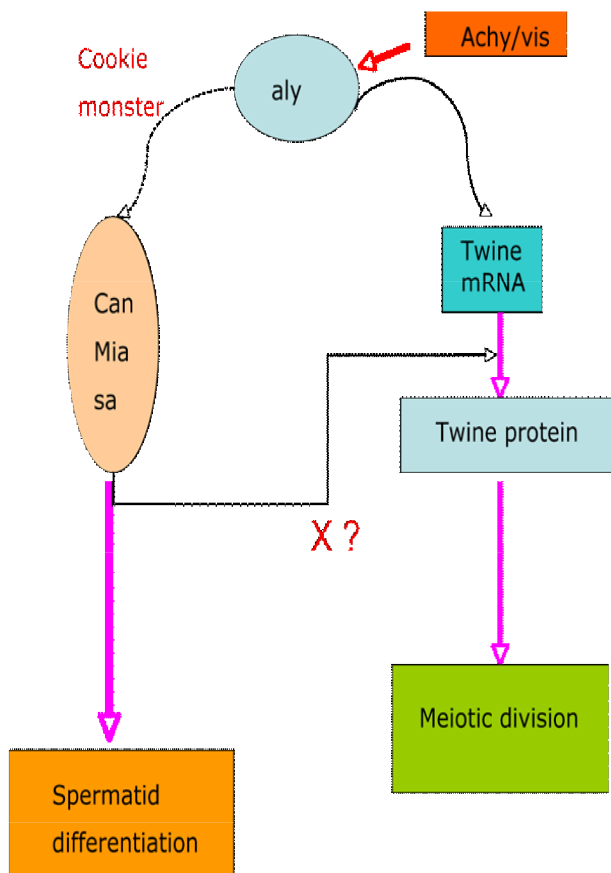


Fig.6- Modello ipotetico del meccanismo di regolazione che coordina la progressione del ciclo cellulare meiotico e del differenziamento degli spermatidi durante la spermatogenesi in *Drosophila melanogaster*. I prodotti dei geni *can*, *mia*, *sa* sembra che cooperano per attivare la trascrizione tessuto specifica di geni che causano il differenziamento degli spermatidi e anche arresto del ciclo cellulare meiotico, perché necessari all'attivazione di un ipotetico gene (o geni) X non ancora identificato che a sua volta è necessario per l'accumulo della ciclina Twine negli spermatociti primari. Anche il prodotto del gene *aly* è necessario per l'inizio del differenziamento degli spermatidi probabilmente poiché è richiesto per attivare *can*, *mia* e *sa*. Inoltre il prodotto del gene *aly* è necessario per attivare la trascrizione di *twine*, *cyckinB* e *boule* negli spermatociti primari e quindi interviene indirettamente nella regolazione del ciclo cellulare meiotico.

1.8 Geni specifici della linea germinale maschile

La produzione di gameti maschili maturi, come riportato in dettaglio nei paragrafi precedenti, coinvolge processi biologici quali la mitosi, la meiosi e fenomeni di differenziamento cellulare degli spermatidi. Il complesso meccanismo molecolare richiede l'attivazione di un gran numero di geni, molti dei quali sono stati isolati e caratterizzati negli ultimi decenni, consentendo di far luce sui meccanismi chiave del processo e di ipotizzare modelli molecolari. Inoltre studi del profilo di espressione e di localizzazione cellulare dei geni maschio specifici, caratterizzati finora, hanno consentito di identificare nuovi componenti della macchina molecolare che guida le ultime fasi del differenziamento degli spermatidi.

In generale, i trascritti presenti durante la spermatogenesi sono specifici della linea germinale maschile e sono omologhi a trascritti di geni espressi nella linea somatica in differenti tessuti e momenti cellulari. Altri trascritti maschio specifici si ottengono da forme alternative di geni espressi in altri tessuti che vengono prodotti o utilizzando promotori e fattori trascrizionali testicolare specifici che legano differenti siti di inizio della trascrizione, o attraverso eventi di splicing alternativo mediato da fattori di splicing cellula specifici o attraverso il riconoscimento di differenti siti di poliadenilazione. La serie di eventi biologici che si succedono durante la spermatogenesi sembra avvalersi sia dei prodotti di geni altamente conservati nell'evoluzione (come i geni cardine della meiosi conservati dal lievito all'uomo) sia della comparsa di nuove funzioni geniche.

La duplicazione genica è la fonte principale nella comparsa di nuove funzioni geniche ed è un importante strumento del motore evolutivo. Un gene ancestrale sottoposto ad un evento di duplicazione genica accumula una serie di mutazioni occasionali che unite a una serie di processi evolutivi quali l'evoluzione neutrale e la selezione positiva portano ad una divergenza funzionale della copia del gene duplicato. Studi condotti negli ultimi quindici anni hanno rivelato che geni

legati alla riproduzione evolvono più rapidamente (Coulthart et al, 1988; Civetta et al, 1995) rispetto a quelli espressi in altri tessuti. In particolare vari studi condotti sul genoma di *Drosophila* suggeriscono che i geni maschio specifici, espressi nei gameti e nelle ghiandole accessorie, sono tra i geni che evolvono più velocemente nel genoma della mosca, in accordo con quanto osservato nel genoma dei mammiferi (Torgerson et al, 2002) come pure in quello di altri taxa quali gasteropodi (Hellberg et al. 2000), mollusks (Swanson et al, 1995) e nell'uomo (Wyckoff et al, 2000).

Lo sviluppo di un profilo di espressione testicolare specifico dei geni duplicati rispetto ai geni ancestrali è quindi una tendenza comune nella scala evolutiva ed in particolare, sembra essere guidato da un particolare evento di specializzazione (subfunctionalization) che tende a separare i geni della linea somatica da quelli della linea germinale nella comparsa di una nuova funzione per il gene duplicato sotto selezione positiva.

Il meccanismo che guida questo fenomeno di selezione positiva, per la comparsa di nuove funzioni di geni testicolare specifici, non è stato ben spiegato.

Una delle tesi più acclamate sembra supportare ragioni legate alla fertilità e alla competizione degli spermatozoi. L'elevato accumulo di geni maschio specifici potrebbe essere giustificato dalla complessità del processo di gametogenesi del maschio; mentre un fenomeno di co-evoluzione tra geni dei recettori della cellula uovo e geni maschio specifici, coinvolti nei meccanismi di riconoscimento cellula uovo-spermatozoo e di fecondazione, spiegherebbe l'alto tasso di speciazione che agisce sui geni testicolare specifici durante l'evoluzione.

1.9 Introduzione al lavoro sperimentale

Nel corso di un “cammino cromosomico”, che ha portato al clonaggio del gene *mst-1* di *D. melanogaster*, è stata identificata, sul braccio sinistro del cromosoma 2, una regione genomica di circa 10 kb densamente trascritta, nella quale mappano diverse unità di trascrizione (Palmer et al., 1993; Digilio et al., 1996).

Il sottoclonaggio di questa regione genomica immediatamente a valle del gene *mst-1* e le successive analisi di “Northern blot”, hanno rivelato una serie di trascritti maschio e femmina specifici, i cui geni sono stati analizzati nel laboratorio in cui ho svolto la mia tesi di dottorato. Come si può osservare dalla fig. 7, a circa 1 kb dall'estremità 3' del gene *mst-1* è stato mappato il gene *tosca* (*tos*) che codifica per un' esonucleasi femmina-specifica coinvolta nel processo di riparo degli appaiamenti errati del DNA (MMR) che si originano in seguito a ricombinazione meiotica. Questo gene si trova nell'introne di un'altra unità di trascrizione, non ancora caratterizzata, denominata *ct* (*constitutive transcript*), che è espressa in maniera ubiquitaria durante tutto il ciclo vitale della mosca. Immediatamente a valle del gene *tosca* sono state mappate 2 unità di trascrizione ad espressione maschio-specifica.

Questi due geni, denominati *mst36Fa* ed *mst36Fb* identificano una nuova famiglia genica della linea germinale maschile. La terminologia adottata riflette la loro espressione maschio specifica (male-specific transcript), la localizzazione genomica (36F) e l'ordine temporale con cui sono stati identificati. Una preliminare caratterizzazione ha portato a determinarne l'organizzazione molecolare e il fine profilo di espressione. *mst36Fa* ed *mst36Fb* sono lunghi rispettivamente 1809 e 1751 cb intervallati da una regione intergenica di appena 62 cb. I due trascritti presentano quattro regioni esoniche intervallate da tre sequenze introniche lunghe in media 50 nt. Esperimenti di primer extension, S1 mapping e PCR 5' Race unitamente all'isolamento dei rispettivi cloni di cDNA comprensivi di coda di poliadenina, hanno consentito di definire le estremità 5' e

3' per entrambi i trascritti nonchè le ripetitive regioni codificanti lunghe 1470 cb e 1413 cb.

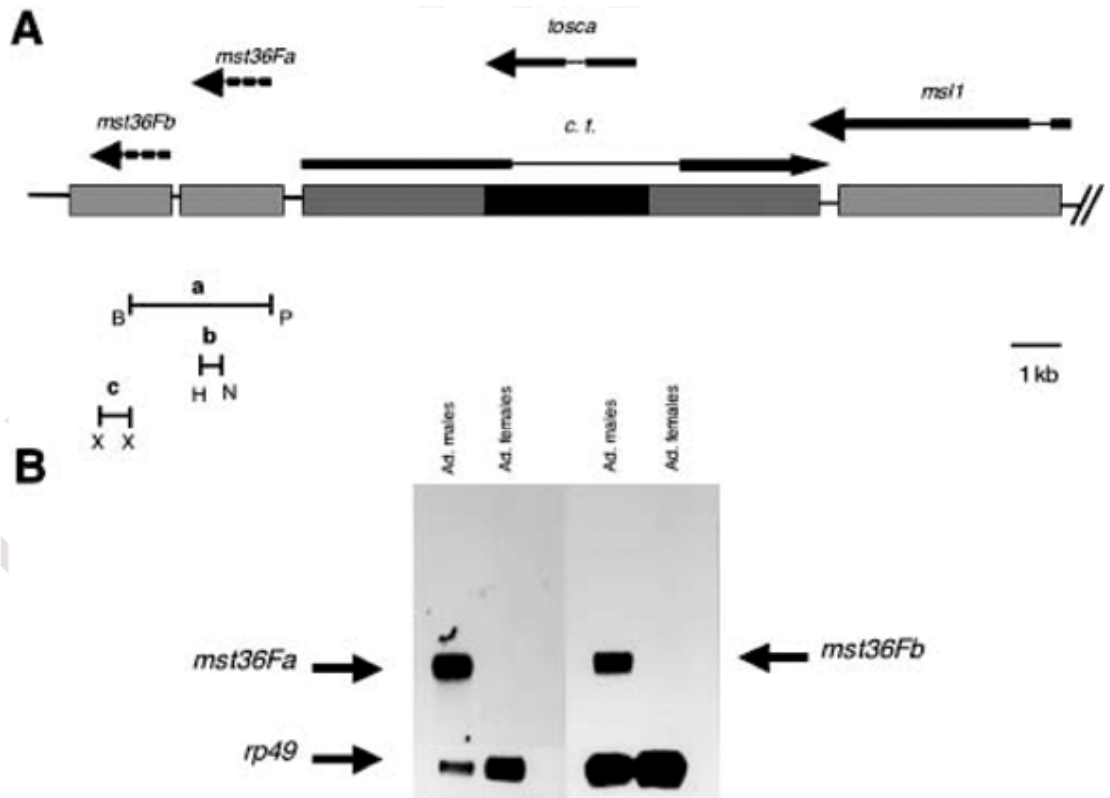


Fig.7- A) Schema della regione genomica 36F6-10 della *Drosophila melanogaster*. Le frecce rappresentano le unità trascrizionali, con la linea sottile che indica le regioni introniche e la linea doppia nera quelle esoniche. Le teste delle frecce indicano le direzioni di trascrizione. B) Northern della sesso specificità. L'esperimento è stato condotto utilizzando sonde gene-specifiche e RNA totale e poly(A⁺) estratto da maschi adulti (Am) e femmine (Af).

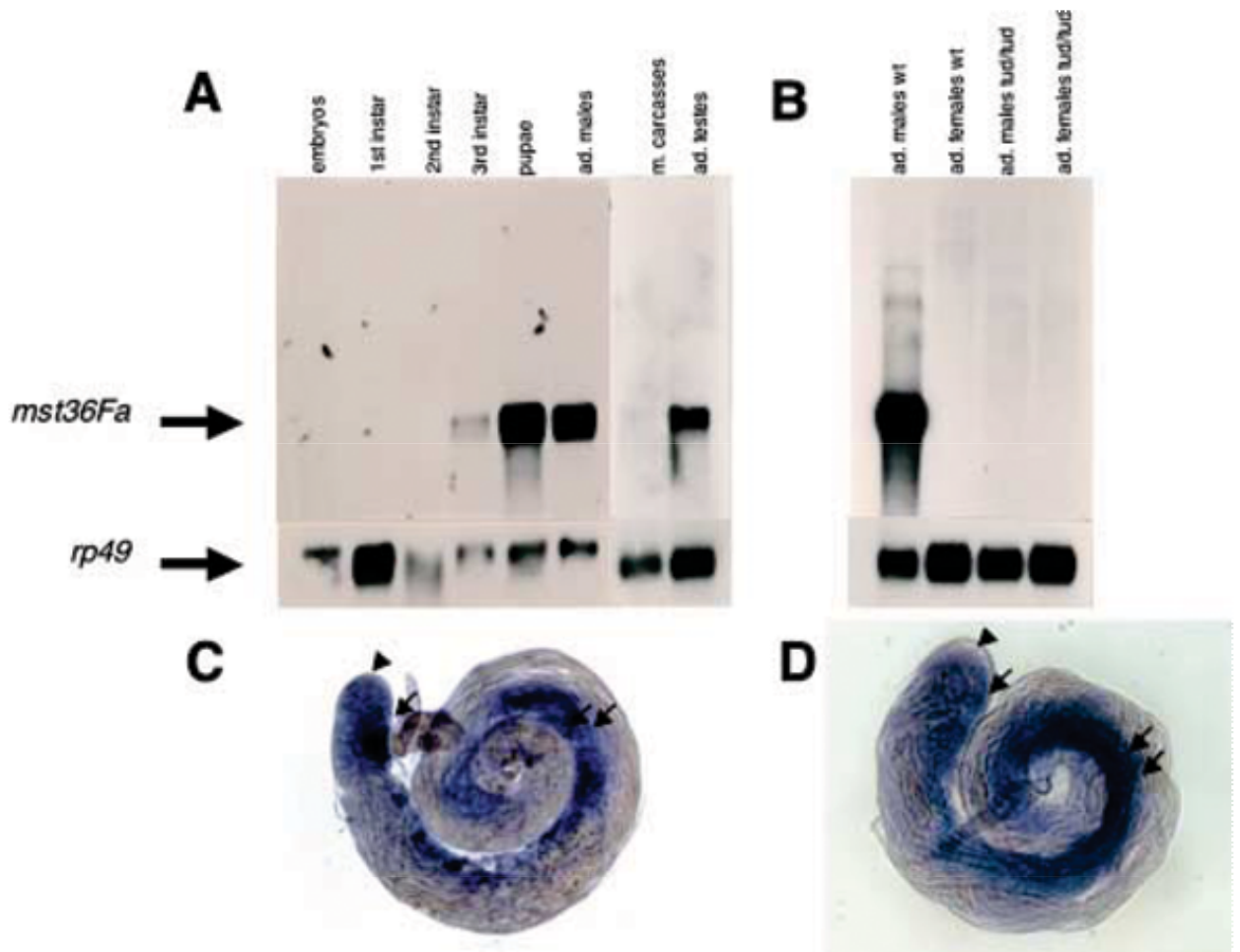


Fig.8- A-B) Northern blot stadio e tessuto specificità. L'esperimento è stato condotto utilizzando una sonda specifica per il trascritto *mst36Fa*. Il trascritto compare nella popolazione di RNA totale estratta da larve III stadio di sviluppo, pupe e maschi adulti. Nell'adulto il trascritto è presente esclusivamente nei testicoli e in particolare nella linea germinale del testicolo come dimostrato dalla sua assenza all'interno della popolazione di RNA totale estratta da mosche del ceppo mutante Tud (B). (C, D) Esperimenti di ibridazione in situ con sonda gene specifica marcata con digossigenina su testicoli di maschio adulto rivela che il trascritto *mst36Fa* (C) ed *mst36Fb* (D) sono specifici delle cellule della linea germinale, in quanto i trascritti compaiono negli spermatociti in fase di crescita e persistono nel citoplasma delle cellule germinali in sviluppo fino agli stadi tardivi del differenziamento spermatidico.

Introduzione 1

cacaaaaaataacttcagaatagaaaacataaaaacaaaaataaacaaaaaactctaaaaATGCCCCATAAAAAGACGAAGCATTGAA
AGCGGTGGTACCTGGCATGATTAGTCTCGAAGGAGAGCAATTTGACCCCTGGGAAATTCCTTTCCCTTGCCGGAGCAAAGAAGATC
CATCAATGTGCCGAGTGAGTATCTCAAGGATCTGATAAGGAGCAGAGTCCCGAGTGGCTCATAGTGGTTAGATCTACAGTGGG
GACGTTTCGATAGTCAAGCGGCCAGTGGAGCTCCAAGACACAGATGTAAAGGAAGCCAGGCTATGGTGGTGTGCAGATGGCCAAA
AGCGCCAAAAGACGTCCGTAAGGAGAACAATGGAGGAAGTCATAGCCAGCATAAGATTGAGGTCCACCATAATAGCAGATCTCATT
GCCAAGTCCAAAAGCGGCCATCGAATTCTATCGGTTCTGCTCAGACAGTTGCGACTCTTCTCGATGCCCTGGCCAGGCGATC
TGGAGGAGACCCCAAACAATCTGTTCAGCTGGTGGTGGATGACTTCTTATTGCGACTGGACGTAAGCAGATCTACCTTGATGTCC
TCAATCGGGAGCGAAGTGTCAAGGATCTTGATTGCGTTAAGTTCTGCAAGGATCTCAGCGAGATCGAACACCTTATACACGAAATTA
GAAGATTTTCGAGACGACGTAGACCTCTGCGAAAAATAGCCTACATTTGTTAAAGtaaggggtgtttcgattgctttgtagctttaa
ctgcgacattgacatatgtgttctattgcagAAATGCCCAATACCACATGAATGCCCTTGGGTAAAGAGCCTTAATGATAATATCG
AAAATCTGGCATCCAGTGGTCACTGCTTGGTCAATGAGCAAAGTGGCTCCTTGACGTCGTACGTCGTAACCTCATCGGCAATGA
TAGTGTTCGAAAGGAAATCAGgtgagtggttactatgagccatatttgaaaactcatcttcttccgcagCCCTGAACCCGATTG
AAACGCGATATCAATCAACTGGTTTAAAAGCTGTACGGATCAGCGTCTGACCCGGATGAACGAAAGAAATGTGGAGATAAAAAGAG
AGCTACAAGACCTGGAGGTACAAGCAGTGCAGGATGAAAAGGTGCAGTATTCCTCCGGACTCATGTATGAGTTGGAGGTGGGAAAGC
TTAGGAAAAGCATTCGAAATTTGGCAGGACCGACTTGATACCGATTGGAAACACGCCGACGTCATGTGCACCGTATCAAGGCTTGAC
TGCAAAAGGTTAAGGACGACCTAAAGTTTTACATGGAACAGAAGGATATGTATCTTCAGCGAATCAAAGAAGTGAAGCACTCATAG
ATCAGGAAAGGATGATTCGCGAAGAAAGGgtaagtcttggcagagaaatcgaattatggagtcatttagatgaaatgtcactagG
AATTAGCCGCCTTAAAACGAATGTCGAGGGGTCTTAAAGAAAATCTGTACCAAAGCTACAAAAACTTTCAAAGAAGTCTAAAG
GGAAGTCTGAAAAGAAGTCTGAAGTGAAGTCTGAAATCAAGTCCGATACAAAGCCTGAAATGAAGACGAAAGGAAATCTGACCTAA
AAGCTGAAAAGAAATCCAAAACGATGGCGGAAAATCTCAAAGAAAATCCACAAATTTAAAATGGAATAGCATATCCCTTATTTTCG
GCCATTCCTACTTATATATGTTTACAATTTACCAACGGTTTCAATAAAATACTTCTTAAGCTTGAACTCattcatcttaatttgata
caaagtattcaaagtatacagtagctgtattgattttacagaaaatgtgacactttcaacaacactcatacagaataaaacacaaa
aaaaaaaaacaaaaaaaaaaaaaagaaaaattaaaaaaATGGTTTCCAAAAGAGGAAAATCTGTGAAAATAAGAAGAAGGTA
GAAACCACATTTGAGTCCGATCCATATGAGATTAATTTCCATTGCGGAGCAACTCGATCCGTCCTCAATGCCGCGATGAATTCATC
GGCACATTGATCCGGGAGACGAACTTCGGGCCAGTTCCCTCGCCAGATCCAGATTCGGGGCCGCTTCGGAATTCAGGTCATCACA
GGACCTCTCGGATCAGGGGCCGAAAAGGGGCGAGAGGCTATGGTGGTGCACAGTTGGTGAGTCAGCGCAAAAGGTTAAGTCTGCG
GAAGACGAAGGAAGAGATCTTGGAGAACATTAAGTTGCGGTGACCATGATGAATGACCTGAACCTGAAATGCCAGAAGGCGGCCAT
AGAATTCCTGTGCGTTCCGCTGCTAAAGCAGTTGCGCCTCTTTTCGAGTCCCTGGCTGGTGACACTGGGATATCCCTTACAACCT
GTTTCAGCTGGTGCATGGACGACTTCCCTGATGCGCTTGGCAATTAAGCAGGTCTATCTAGACGTCATCCATAGGAGAGAAAGTCCGGA
GGATCTGGACTGCCTCAAGTCTTCAAGGACCTGGGTCAGATCGAATCTTTATCTACGAGATCAGGGAAGACTATCGCAACGATAG
GGATCTATGTCAGGGGAGCATGGAGTTGTTAAGgtaagggattgatttattatgatttttattatatttactatctgatcat
taaattacagAAGTGCCTAATACACATTAACGCACCTTGGGTGAGTACCCTCAAAGATAATCTTGAGAGCATTAGATCCAGTACGT
TAACCGCTAGGCTTTTTGCTCAAAGTAGCGCTTTAACATAGTATTACGTCACCTCATCGCAATGGGAGCCTTCGAAGACGAGTCAG
gtgagtggtgtttactatgagccatatctgggatactcacctccgtccgcagCCAGGATCCGATTGAAATGCGGTACCAAATCAA
CTGGATTAGAAGCTGTACGGATCAGCGTCTCTATCGGATAAACGGAAGGGAGGAGAAGATGAGAAAGGAACTAAATGACCTGGAGGT
ACAAGCATTCAGGATGAAAAGGTGCGCAATTCCTCCGAGCTTATATACTCGTAGAGGTGGGAAAGCTTAGGAAAAGCGTCAGAGT
GTGCAGGAGCGACTTGATACCGATTTGGAGAACGCCGAAGTCACGTGTACCGTATCCAAGCTTGCCTGCAAAAGGTCAAGGACGA
TATTAAGTCTATAAAGAACAGAAGGACATGTATCTCCAGCGAATCGAAGAAGTGCAGGCTATAATTGCTCAGGAACAGGGGgtaag
tctatatgaagtgttactgattgatttgaattaccacaataacacatatgtttagTATTGCTTCCACGCGAACCGGATTGTCCAGGAA
GTCGGTTCGAAATTCGAGAGTAAGTCTGAAAGGCTGTCGAAAAAAGTCCAGAGGAAATCCGAAAATAAGATAGGACGAAAATC
TGAAGGCTTCTGAGAGACGGTCTGAACGGAAGTCCCGAAATTCAAAATGCCTTAGAAGATCTCCGGTTTGGCCTCTATTAATT
TACCTATGTGTTTGAATTTAGCGAAAGATTACATTAAACATTTTTTTTTTAAACGTTA

Fig.9- Sequenza genomica del cluster *mst36F*. Le regioni genomiche sono indicate in lettera minuscole, mentre le sequenze degli mRNA sono riportate in lettera maiuscola. In blu sono indicate le rispettive sequenze di Cavener, mentre le sequenze di poliadenilazione sono sottolineate.

Sono state individuate le triplette di inizio della traduzione (ATG) all'interno della canonica sequenza consenso (Cavener 1993) dell'inizio della traduzione in *Drosophila*. I rispettivi moduli di lettura aperti (ORF) più lunghi codificano per presunti peptidi di 58 kDa e 55kDa. L'allineamento delle sequenze nucleotidiche dei due geni ha rivelato un'elevata identità di sequenza a livello nucleotidico che va dal 55% al 67% e raggiunge il valore più alto nella regione codificante, lasciando ipotizzare che i due geni si siano originati da un fenomeno di duplicazione genica.

La determinazione del fine profilo di espressione ha rivelato che le due unità trascrizionali presentano oltre alla stessa organizzazione molecolare ed identica direzione di trascrizione, anche il medesimo profilo di espressione. Esperimenti di Northern blot ed ibridazione in situ su testicoli di mosche condotti con sonde gene-specifiche hanno rivelato che entrambi i trascritti sono presenti a partire dal terzo stadio di sviluppo larvale del ciclo vitale della *Drosophila* e sono trascritti solo negli spermatociti durante la loro lunga profase meiotica (fig.8).

Durante il mio lavoro di tesi di dottorato di ricerca ho intrapreso una fine caratterizzazione dei meccanismi di regolazione trascrizionali e traduzionali di questi due geni. Il mio lavoro ha permesso di individuare le regioni di regolazione in *cis* responsabili dell'espressione sesso, tessuto e stadio specifica di entrambi i geni, e di determinare la dipendenza del loro profilo di espressione dai fattori trascrizionali testicolare specifici finora caratterizzati. Inoltre, ho intrapreso anche un'analisi funzionale del cluster attraverso l'utilizzo di strategie per la localizzazione subcellulare dei rispettivi prodotti proteici e per l'ottenimento di mutanti per entrambi i geni.

Materiali e Metodi

MATERIALI

2.1 ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI UTILIZZATE

BSA: Albumina da siero Bovino

cb: coppie di basi

DEPC: Dietilpirocarbonato

Dnasi I: deossiribonucleasi I

dNTP: Deossiribonucleoside trifosfato

DTT: Diitiotreitolo

EDTA: Etilendiaminotetra-acetico

g: gravità

gr.: grammi

H₂O dd: acqua bidistillata

IPTG: Isopropil- β-tiogalattopiranoside

Kb: chilobasi

kDa: chiloDalton

mA: milliAmpère

nt: nucleotide

O.D.: Densità Ottiche

ORF: Open Reading Frame

PCR: Reazione a Catena della DNA Polimerasi

pmol: picomole

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoruro

PNK: Polinucleotide Chinasi

RNA_{si} A: ribonucleasi A

rpm: rivoluzioni per minuto

SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase

SDS: Sodio-dodecilsolfato

SDS-Page : Elettroforesi su gel di Poliacrilammide in presenza di SDS

SFM :Serum-Free Medium

T.A.: temperatura ambiente

TLB: Testis lysis buffer

UTR: untranslated region

UV: ultravioletto

V: Volt

X-gal: 5-bromo-4cloro-3indolil- β -galattopiranoside

2.2 ELENCO DEI REAGETI UTILIZZATI

Agarosio	Gibco
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Tryptone	Difco
Bromuro d'Etidio	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat (BCIP, X-Phosphat)	Boehringer
5-Bromo-4 chloro-3-indoxyl- β -D- thiogalactoside (X-Gal)	Roth
CLAMP	Sigma
Digosigenina	Roche
1,4-Dithio-L-threitol (DTT)	Fluka
ECL	Amersham
Eparina	Sigma
Formaldeide	Merck
Formamide	Merck
Glutaraldeide	Sigma
Levamisol	Sigma
Ribonucleotidi	Roche

Triton X-100	Serva
Trasyolol	Sigma
Tween 20	Sigma
TEMED	Sigma

2.3 ELENCO DELLE SOLUZIONI UTILIZZATE

-LB (Luria-Bertani-Broth): 10 gr. NaCl, 10 gr. Triptone, 5 gr. Estratto di Lievito in 1 litro di H₂O

-LB-Agar: 15 gr. Di Bacto Agar per litro di LB

-PBS 1X (pH 7.4) (per 1 litro): 8 gr. Cloruro di Sodio; 0,2 gr. Cloruro di Potassio; 1,44 gr. Sodio Fosfato bibasico; 0,24 gr. Potassio Fosfato monobasico

-PBT 1X (pH 7.4) (per 1 litro): 8 gr. Cloruro di Sodio; 0,2 gr. Cloruro di Potassio; 1,44 gr. Sodio Fosfato bibasico; 0,24 gr. Potassio Fosfato monobasico; 0.1% Tween 20

-SSC 20X (pH 7): Cloruro di Sodio 3 M; Sodio citrato tribasico 0,3 M

-TAE 1X: 40 mM Tris-Acetato, 1.25 mM EDTA pH 8.0

-TE 1X: 10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA pH 8.0

-TL(buffer di lisi testiolare): 20mM Hepes pH 9, 150 mM NaCl, 10% glicerolo, 1% TritonX100, 2mM EDTA, 1Mm PMSF, 1:1000 CLAMPS , 1:1000 Trasyolol, 1 mM DTT.

-TOWIN BUFFER (soluzione di trasferimento per proteine): 3.2 L H₂O, 12,1 gr Tris 7-9, 57,7 gr glicina 800 ml metanolo

-2.4 ANTICORPI E ANTISIERI

Anti-Digoxigenin-Fab-Fragment
Mannheim Roche,

Anti-GFP
Polyclonal made in Rabbit
Cambridge Sigma
1:1000

Anti-Rabbit α -actin Dilution
1:10000 Sigma

Anti-Rabbit anti laminin
Dilution 1:1000 (Margarete
Heck Università di
Edinburgo)

Anti-Rabbit anti poly
Dilution 1:1000 (Margarete
Heck Università di
Edinburgo)

2.5 ENZIMI

Klenow Polymerase Fermantas
Lysozyme Amersham
Proteinase K Roche
Restriction endonucleases Fermantas
RNaseA Fermantas
Taq DNA Polymerase Fermantas

Tfu	Promega
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T3-RNA polymerase	Promega
T7-RNA polymerase	Promega

2.6 REAGENTI E KIT PER BIOLOGIA MOLECOLARE

DIG-RNA-Labeling-Kit	Roche
DNA Midi Kit	Quiagen
DNA Mini Kit	Quiagen
Mass Ruler DNA-Ladder 1kb	Fermentas
Mass Ruler DNA-Ladder 1kb	Biolabs
Protein Molecular Weight Seeblu	Invitrogen
RNA Mini Kit	Qiagen
One-Step RT-PCR Kit	Promega
pGemT Easy VECTOR Cloning-Kit	Promega

2.7 PLASMIDI

pBluescript IKS+	Klonierungsvektor, Stratagene
pCasper β gal e pCasper β galAUG	vettore di trasformazione mediata dall'elemento trasponibile P in <i>Drosophila melanogaster</i> (Thummel et al, 1988)
pGemT easy vector	vettore di clonaggio per prodotti di PCR.(Promega Kit)
p π 25.7wc	plasmide Helper codifica per

l'enzima trasposasi dell'elemento trasponibile P (Karess and Rubin 1984).

pUAST

Vettore di trasformazione che contiene 5 sequenze di lievito UAS a monte del sito di multiclonaggio
(Brand and Perrimon, 1993)

SympUAST

Vettore di trasformazione contiene 5 sequenze di lievito UAS la sequenza del promotore basale hsp70 e il terminatore Sv40 disposti in direzione opposta ad ambo i lati sito di multiclonaggio
(Giordano,2002)

2.8 CEPPI DI *DROSOPHILA MELANOGASTER* USATI

ceppi selvatici

White¹¹¹⁸

CantonS

Cepi di arresto meiotico donati da Hellen White-Cooper

Comr Comr^{Z1340}cn bw/CyO, cn

Aly Aly⁵ red e/TM6C, Sb,e

topi bw; topi^{Z3-2139},st/ TM6b, Hu, D, e, ca

nht nht cn bw/CyO

ceppi del bloomington stock center

1762 bloomington sa[1] red[1]/TM3, Sb[1]

8641 bloomington w[1118]; P{da-GAL4.w[-]}3)

4442 bloomington (w[*]; P{w[+mC]=GAL4-nos.NGT}40)

ceppo usato come bilanciatore

3 w; If/CyO; TM6b/MKRS

2.9 CICLO VITALE DI *DROSOPHILA MELANOGASTER* A 25°C

STADIO	ORE	GIORNI
EMBRIONE	0-24	0-1
LARVA I STADIO	24-48	1-2
LARVA II STADIO	48-72	2-3
LARVA III STADIO	72-120	3-5
PREPUPA	120-132	5-5.5
PUPA	132-216	5.5-9
ADULTO	216	9

2.10 DIETA DI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Preparazione per 1 litro di H₂O

Lievito	100 gr.
Zucchero	100 gr.
Polenta	90 gr.
Agar	4.5 gr.
4-metil idrossibenzoato	2.5 gr.

2.11 CEPPI BATTERICI UTILIZZATI PER CULTURA E TRASFORMAZIONE (*ESCHERICHIA COLI*)

DH5 α supE44, Δ lacU169 ($_80$ lacZ Δ M15),
hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1,
relA1

2.12 OLIGONUCLEOTIDI SINTETICI

Egfp5'(GCTGCAGGAGGCCTGTAAAGGAGAAGAACT),
Egfp3'(CCTGCAGGGAGGCCTCTTTGTATAGTTCATCCAT
Fa1(CGAAAATGCCCCATAAAAAGACG)
Fa3 (AAGTAGAATGGGCCGAAATA)
Fa2(GAATTAGCCGCCTTAAAAC)
a1(CCTGGAGGTACAAGCAGTGCAGGATG)
a2(TTCCATTTTAGAATTGTGGA)
Fb(TCTGTATGAGTGTTGTTTGAAAGT)
fb2 (AGGTAAATTAATAGAGGCCA)
fb3(GTATTTGCTTCCACGCGAACGCGA)
b1(ATGGGAGCCTTCGAAGACGAGTC)

b2(AATGTAATCTTTCGTAAATTCGC)

gfpdown(CGAGATCTGAGCTCAAGCTTAAGAAGT)

M13 Forward(GTAAAACGACGGCCAGT)

M13Reverse(CAGGAAACAGCTATGAC)

mstFR(CGGGATCCTGACGTCTAGATAGACCTGCT)

mst-Fa1-Xba1(TTCTAGAAAGCTTATTTACCTGGTCAC)

mst-Fa2-BamHI(GGGATATTTTTTGTGAGTATCAT)

mst-Fa3-BamHI(GGGATCCAAATGTAGGCTATTTTCGCA)

δleader5'Fa(CGGATCCAAAAATGCCCCATAAAAAGACG)

Rfp5'(GCTCTAGAAATGGCCTCCTCCGAGG)

RFP3'(CGTCTAGATTGGCGCCGGTGGAGTG)

poly1(CTTATTTTCGGCCCCATTCTA)

Metodi

2.13 Estrazione di DNA plasmidico

-Piccoli quantitativi

Quiagen mini Kit

-Grossi quantitativi

Quiagen Midi Kit

2.14 Recupero frammenti gel d'Agarosio

Per poter recuperare uno dei frammenti di DNA ottenuti per digestione enzimatica, la miscela di digestione viene sottoposta a corsa elettroforetica su un gel di agarosio a basso punto di fusione (*low melting agarose*). Al termine della corsa, la banda di interesse viene tagliata dal gel con un bisturi sotto luce UV (ultravioletta), avendo premura di prelevare quanto meno agarosio possibile. Il pezzetto di gel viene posto in un tubo, che viene incubato a 65 °C per 10 minuti per far sì che l'agarosio si sciolga. Si aggiunge 1 µl di Agarase (0.5 u/µl) e si incuba a 42 °C per 30 minuti. Una volta ottenuta l'idrolisi dell'agarosio, il DNA deve essere precipitato: a tale scopo, si aggiungono alla soluzione 1 µl di glicogeno o di tRNA, che funga da "carrier", 1/10 del volume di sodio acetato 5 M e 2.5 volumi di etanolo 96% e si incuba in ghiaccio secco per almeno 1 ora. La soluzione viene poi centrifugata a 14000 rpm per 15 minuti ed il DNA così precipitato viene risospeso nel volume desiderato di TE 1X.

2.15 Recupero con la tecnica del conetto

Un metodo alternativo consiste nel sottoporre la miscela di digestione ad elettroforesi su un gel di agarosio a punto di fusione "standard" e nel sottoporre la banda di gel prelevata agli UV alla tecnica del conetto. Si prepara un conetto di carta da filtro, che viene inserito in un tubo da 0.5 ml, previamente bucato sul fondo

con un ago rovente; questo tubo, a sua volta, viene posto in un tubo da 1.5 ml. La banda di gel prelevata agli UV viene inserita nel conetto ed il tubo viene centrifugato per 3 volte a 14000 rpm per 1 minuto, in modo che il DNA passi nel tubo da 1.5 ml attraversando il conetto ed il fondo bucato del tubo da 0.5 ml, mentre il pezzo di agarosio resta intrappolato nel conetto. Si controlla agli UV che la fluorescenza data dal bromuro d'etidio intercalato tra le basi del DNA sia passata tutta dal conetto al tubo da 1.5 ml, dopodiché il conetto può essere gettato e la soluzione di DNA recuperata viene sottoposta ad un'estrazione con Fenolo/Cloroformio/Alcool Isoamilico (24:24:1) e ad un'estrazione con Cloroformio/Alcool Isoamilico (24:1). Il DNA viene quindi precipitato aggiungendovi 1/10 del volume di sodio acetato 3 M pH5.2 e 2.5 volumi di etanolo 96% ed incubando in ghiaccio secco per almeno 30 minuti, al termine dei quali si centrifuga a 14000 rpm per 15 minuti e si risospende nel volume desiderato di TE 1X.

2.16 Reazione di defosforilazione del DNA

Nelle strategie di clonaggio, per inserire un frammento di DNA in un plasmide, occorre che quest'ultimo venga dapprima linearizzato con uno o più enzimi di restrizione e successivamente purificato per estrazione da un gel di agarosio. Nel caso in cui il plasmide sia stato digerito con un unico enzima di restrizione o con due enzimi che lasciano estremità tronche, bisogna evitare che durante la reazione di ligasi esso si ricircularizzi; a tale scopo, si utilizza l'enzima fosfatasi alcalina, che catalizza la rimozione dei residui di fosfato alle estremità 5'. Nel nostro caso è stata utilizzata la fosfatasi alcalina di gambero SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase della USB), la quale presenta il vantaggio di poter essere completamente disattivata al calore non interferendo con reazioni successive, evitando in questo modo la purificazione del plasmide dopo la reazione di defosforilazione.

Alla soluzione di DNA plasmidico digerito e purificato si aggiungono 0.1 unità dell'enzima SAP diluito nell'opportuno tampone (50 mM Tris-HCl pH 8.0) e si incuba a 37 °C per 1 ora. L'enzima viene poi inattivato a 65 °C per 15 minuti.

2.17 Reazione di ligasi

I frammenti da clonare vengono ligati al vettore mediante l'azione dell'enzima T4 DNA ligasiTM (Fermentas). Generalmente, il volume di reazione è di 15 µl. Si prepara la miscela di reazione contenente il plasmide ed il frammento in H₂O in un

volume di 13.5 µl. Tale miscela è posta a 65 °C per 5 minuti. Si pone in ghiaccio, si centrifuga brevemente e si aggiungono 1.5 µl del tampone di ligasi (300 mM Tris-HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP) e 1 µl dell'enzima T4 DNA ligasi (3 u/µl). La suddetta miscela viene incubata a 16 °C per 12 ore.

Generalmente, il rapporto plasmide/inserto in termini di estremità libere è di circa 1/3, per favorire la reazione di ligasi intermolecolare (tra plasmide ed inserto) piuttosto che quella intramolecolare (chiusura del plasmide).

2.18 Preparazione di ceppi competenti di E. coli con CaCl₂

Uno dei metodi per rendere le cellule batteriche competenti, ovvero transitoriamente permeabili a DNA esogeno, è il trattamento con CaCl₂.

Una singola colonia batterica viene fatta crescere in 5 ml di LB sterile a 37 °C per una notte. Successivamente, la coltura viene diluita 1:100 in LB e lasciata crescere con forte agitazione a 37 °C fino al raggiungimento della fase di crescita logaritmica. Tale fase è raggiunta quando la lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 620 nm è pari a 0.6 OD.

Le cellule sono poi raccolte tramite centrifugazione a 5000 g per 5 minuti a 4 °C, risospese in 1/2 del volume iniziale di una soluzione di CaCl₂ 50 mM ed incubate in ghiaccio per 15 minuti. Al termine di tale incubazione, le cellule

vengono di nuovo centrifugate a 5000 g per 5 minuti a 4 °C, risospese in 1/10 del volume iniziale di CaCl₂ 50 mM e poste in ghiaccio per 1 ora. Infine, le cellule vengono suddivise in aliquote da 200 µl e conservate a -80 °C, previa aggiunta di 30% in volume di glicerolo.

2.19 Trasformazione batterica

Il processo di trasformazione, che permette l'ingresso di DNA esogeno nelle cellule batteriche, viene effettuato aggiungendo a 200 µl di cellule competenti 20-100 ng di DNA plasmidico. Dopo un'incubazione in ghiaccio di 20 minuti, le cellule sono poste a 37 °C per 5 minuti, in modo da sottoporle ad uno "shock" termico che renda la membrana temporaneamente permeabile al DNA. Dopo l'aggiunta di 1 ml di LB, le cellule vengono incubate per 1 ora a 37 °C in continua agitazione, per permettere l'espressione del gene di selezione presente nel plasmide. Infine, le cellule vengono raccolte mediante centrifugazione a 8000 rpm per 5 minuti, risospese in 100 µl del mezzo di crescita e piastrate su LB-agar contenente 50 µg/ml dello specifico antibiotico di selezione, in modo da permettere la crescita dei soli batteri contenenti il plasmide d'interesse. Come controllo, viene piastrata una uguale quantità di cellule batteriche non trasformate. La piastra viene incubata a 37 °C per 12-16 ore, in modo che ogni cellula dia origine ad una colonia, che rappresenta un clone di cellule che hanno inglobato il plasmide.

2.20 Amplificazione di molecole di DNA mediante la reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)

Per l'amplificazione di molecole di DNA mediante la tecnica di PCR (Polymerase Chain Reaction), messa a punta da Saiki et al. (1985), è stato seguito il protocollo classico descritto nel manuale di laboratorio "Molecular Cloning" scritto da *Maniatis*.

2.21 Costruzione di vettori ricombinanti

Per tutti i vettori ricombinanti è stato utilizzato il vettore pCasper (Thummel *et al.*, 1993), e né è stata verificata la correttezza mediante sequenziamento con il metodo di Sanger condotto dal servizio di sequenziamento “seqcore” della Primm. Come cellule ospiti è stato utilizzato il ceppo DH5_ di *E. coli* reso competente con CaCl₂.

Vettore lig4

Il frammento della regione genomica del gene *mst36Fa* posto a 500 nucleotidi a monte e 800 nucleotidi a valle del sito di inizio della trascrizione, è stato ottenuto per amplificazione su un clone di DNA utilizzando gli oligonucleotidi mst-Fa1-XbaI e mst-Fa3-BamHI. Tale prodotto di PCR è stato inserito nel vettore pGem easy vector (Promega). Il frammento lungo 1300 bp è stato poi recuperato per digestione del costrutto pGem/lig4 per digestione con gli enzimi di restrizione XbaI e BamHI per poi essere inserito nel vettore pCasper _-gal, digerito con gli enzimi di restrizione XbaI e BamHI per guidare la trascrizione del gene *lacZ* e ottenere la proteina di fusione MST36Fa-LacZ. Il sequenziamento del vettore ricombinante ottenuto ha permesso di verificare che l'ORF di *mst36Fa* e quella del gene reporter *lacZ* avessero la stessa cornice di lettura.

Vettore 500a

Il frammento della regione genomica del gene *mst36Fa* posto a 500 nucleotidi a monte e 10 nucleotidi a valle del sito di inizio della trascrizione, è stato ottenuto per amplificazione mediante reazione di PCR su un clone di DNA utilizzando gli oligonucleotidi mst-Fa-XbaI e mst-Fa2-BamHI. Tale frammento è stato inserito nel vettore pGem easy vector (Promega). Il clone di pGem contenente il frammento lungo 500 bp è stato digerito con gli enzimi di restrizione XbaI e

BamHI. è stato clonato nel vettore pCasperBgalAUG a guidare la trascrizione del gene *lacZ*.

Vettore 250a

Il frammento della regione genomica del gene *mst36Fa* posto a 250 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione, è stato isolato dal clone di DNA 500a per digestione con gli enzimi di restrizione HincII e BamHI. Il Frammento è stato poi inserito nel vettore pCasper β -gal AUG, digerito con gli enzimi di restrizione EcoRI, estremità resa non coesiva attraverso reazione con il frammento di Klenow, e BamHI, per guidare la trascrizione del gene *lacZ*.

Vettore 100a

Il frammento della regione genomica del gene *mst36Fa* posto a 100 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione, è stato isolato dal clone di DNA 500a per digestione con gli enzimi EcoRI e BamHI. Tale frammento è stato inserito nel vettore pCasper β -gal AUG, digerito con EcoRI e BamHI, per guidare la trascrizione del gene *lacZ*.

Vettore lig4d leader

Il frammento della regione genomica del gene *mst36Fa* comprendente 740 nucleotidi dell'ORF (Open Reading Frame) è stato isolato da un clone di DNA per reazione di amplificazione mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi d leader FA 5' e mst-Fa3-BamHI. Il frammento amplificato è stato clonato nel vettore pGemeasy vector da cui è stato recuperato mediante digestione con l'enzima BamHI e clonato nel vettore ricombinante 500a linearizzato con BamHI, per guidare la trascrizione del gene *lacZ* e ottenere la proteina di fusione MST36Fa-LacZ. Il sequenziamento del vettore ricombinante ottenuto ha permesso di verificare che l'ORF di *mst36Fa* e quella del gene reporter *lacZ* avessero la stessa cornice di lettura.

Vettore 3kb

Il frammento della regione genomica *mst* lungo 3 kb comprendente i 500 nucleotidi a monte del sito d'inizio, il 5'UTR (UnTranslated Region) la sequenza dell'ORF (Open Reading Frame), la sequenza 3'UTR di *mst36Fa*, i 62 nucleotidi della regione intergenica del cluster ,la regione 5' UTR e 600 cb dell'ORF di *mst36Fb* è stato isolato da un clone di DNA per amplificazione mediante PCR utilizzando gli oligonucleotidi *mst-Fa1-XbaI* e *mstFR*. Tale frammento è stato inserito nel vettore pGem easy vector da cui è stato recuperato mediante digestione con l' enzima XbaI e clonato nel vettore pCAsper βgalAUG, digerito con gli enzimi di restrizione EcoRI e BamHI reso ad estremità non coesive con una reazione di Klenow, per guidare la trascrizione del gene *lacZ* e ottenere la proteina di fusione MST36Fb-LacZ. Il sequenziamento del vettore ricombinante ottenuto ha permesso di verificare che l'ORF di *mst36Fb* e quella del gene reporter *lacZ* avessero la stessa cornice di lettura.

Vettore 2.2 kb

Il frammento della regione genomica *mst* lungo 2,2 kb comprendente la sequenza dell'ORF a partire dal sito di restrizione PstI (Open Reading Frame), la sequenza 3'UTR di *mst36Fa*, i 62 nucleotidi della regione intergenica del cluster ,la regione 5' UTR e 600 cb dell'ORF di *mst36Fb* è stato isolato dal clone di DNA 3 kb per digestione mediante l' enzima PstI e XbaI e purificato su gel di agarosio con la tecnica del conetto e clonato nel vettore pCasperβgal digerito con gli enzimi di restrizione PstI BamHI per guidare la trascrizione del gene *lacZ* e ottenere la proteina di fusione MST36Fb-LacZ. Il sequenziamento del vettore ricombinante ottenuto ha permesso di verificare che l'ORF di *mst36Fb* e quella del gene reporter *lacZ* avessero la stessa cornice di lettura.

Vettore 400b

Il frammento della regione genomica del gene *mst36Fb* comprendente 170 nucleotidi a monte 230 nucleotidi a valle del sito di inizio della trascrizione, è stato isolato da un clone di DNA per amplificazione mediante reazione di PCR. Gli oligonucleotidi utilizzati sono: poly1 e MSTFR Il frammento amplificato è stato clonato nel vettore pGem-easy (Promega) e il costrutto ottenuto digerito con gli enzimi di restrizione EcoRV e BamHI. Il frammento EcoRV-BamHI di 400 nucleotidi, comprendente il, così ottenuto, è stato inserito nel vettore pCasperβgal digerito con gli enzimi di restrizione EcoR, la cui estremità è stata resa non coesiva dal Frammento di Klenow, e BamHI, per guidare la trascrizione del gene *lacZ* e ottenere la proteina di fusione MST36Fb-LacZ. Il sequenziamento del vettore ricombinante ottenuto ha permesso di verificare che l'ORF di *mst36Fb* e quella del gene reporter *lacZ* avessero la stessa cornice di lettura.

Vettore 170b

Il frammento della regione genomica del gene *mst36Fb* lunga 170 nucleotidi e 10 nucleotidi della 5' UTR, è stato isolato da un clone di DNA per amplificazione mediante reazione di PCR. Gli oligonucleotidi utilizzati sono Poly1 ed Fb.

Il frammento di amplificazione ottenuto è stato clonato nel vettore pGem easy vector e il costrutto ottenuto digerito con l' enzima di restrizione EcoRI per isolare lo stesso frammento. Tale frammento è stato poi clonato nel vettore commerciale pBS e il vettore ottenuto digerito con gli enzimi di restrizione KpnI e BamHI. Il frammento da 180 cb KpnI-BamHI, comprendente 170 nucleotidi a monte e 10 nucleotidi a valle del sito d'inizio della trascrizione di *mst36Fb*, è stato purificato su gel di agarosio con la tecnica del conetto e clonato nel vettore pCasperβgalAUG per guidare la trascrizione del gene reporter *lacZ*.

2.22 Preparazione di una sonda lacZ non radioattiva a singolo filamento di RNA marcata con la digossigenina

Per preparare una sonda a RNA è necessario digerire il plasmide contenente il cDNA del gene di interesse con un enzima che taglia una sola volta nel plasmide al 5' dell'inserto di cDNA in modo da ottenere un frammento di DNA lineare. Questo DNA viene purificato mediante estrazione fenolica e poi utilizzato in una reazione di trascrizione in vitro con la polimerasi che riconosce il promotore posto al 3' dell'inserto, in modo da ottenere un trascritto "antisense". Si effettua una reazione di

trascrizione standard (Melton et al., 1985) usando Sp6, T7 o T3 RNA polimerasi, aggiungendo alla miscela di reazione un ribonucleotide sostituito in posizione 11, con digossigenina.

Nel mio caso il gene lacZ è stato inserito nel vettore pBS che presenta i due promotori per le RNA polimerasi fagiche dei fagi T7 e T3. Un frammento inserito in un vettore del genere può essere trascritto alternativamente nei due sensi, permettendo di creare sonde antisense e senso (come controllo).

Il gene *lacZ* è stato isolato dal vettore commerciale pUC18 mediante digestione con gli enzimi di restrizione EcoRI e HindIII, e clonato nel vettore commerciale pBS digerito con gli stessi enzimi, dando così origine ad un costrutto denominato pBS-lacZ. In pBS-lacZ il sub-clone lacZ è orientato in modo che la sonda antisense è generata usando il promotore T7.

Per creare il filamento antisense si è opportunamente linearizzato il plasmide pBS-lacZ con l'enzima di restrizione EcoRI, si è poi disattivato l'enzima di restrizione a 70°C per 15 minuti. Il DNA è stato sottoposto a due estrazioni con Fenolo/Cloroformio e precipitato con due volumi di Etanolo al 95%. Dopo aver conservato la soluzione per 30 minuti a -80°C, si è centrifugato per 20 minuti a 12000 g. Il DNA è stato quindi diluito in acqua ad una concentrazione di 500 ng/μl ed utilizzato per la seguente reazione di trascrizione in vitro:

-2 μl del DNA stampo linearizzato (500 ng/μl)

- 4 μ l tampone di trascrizione 5X (200mM Tris-HCl pH 7.9, 30mM MgCl₂, 10 mM spermidina, 50mM NaCl)
- 4 μ l miscela ribonucleotidi (rNTP_s) e UTP-dig 2.5 mM
- 2 μ l DDT 100 mM
- 0.5 μ l Rnase-Inibitor (40 UE/ μ l)
- 1 μ l T7 RNA Polimerasi 15-20u
- acqua DEPC sterile fino a 20 μ l

La reazione è stata incubata 2.5 ore a 37°C. Si è quindi verificata la presenza della banda di RNA caricando 1 μ l della reazione su gel di agarosio 1%. Per purificare la

sonda trascritta si è proceduti ad una precipitazione alcolica in cui si aggiungono 2 μ l EDTA 0.2M, 2.5 μ l LiCl 4M, 75 μ l Etanolo 100%. Dopo aver mescolato, si è messo il tubo a precipitare a -20 °C, per almeno 4 ore, oppure, a -80°C per 1 ora. A questo punto si è centrifugato a 12000 rpm a 4°C, per 20 minuti; poi, si è eliminato il sovrinatante, si sono aggiunti al pellet 100 μ l di etanolo al 70% pre-raffreddato e si è centrifugato a 12000 rpm a 4°C, per 5-10 min. Si è liberato, infine, il pellet da tutto l'etanolo residuo, lasciandolo evaporare all'aria a temperatura ambiente e si è risospeso in una soluzione d'ibridazione (Buffer d'ibridazione: 50% Formammide, 5X SSC, 50 μ g/ml Eparina, 0.1% Tween 20, 0.3% Triton X100).

La stima della quantità di trascritto ottenuta è stata effettuata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio, servendosi dell'ausilio di tRNA a concentrazione nota, come marcatore di quantità.

Si conserva a -20°C.

2.23 Preparazione di una sonda *mst36Fa* e *mst36Fb* non radioattiva a singolo filamento di RNA marcata con la digossigenina

Il procedimento utilizzato è stato lo steso riportato nel paragrafo precedente per la sonda lacZ, i cloni su sono state effettuate le reazioni sono 80 (per la sonda mst36Fb) e 56 (per la sonda mt36Fa).

2.24 Ibridazione in situ “whole mount” con sonda lacZ non radioattiva su ovari di *Drosophila*

Maschi delle linee transgeniche ottenute sono anestetizzate con etere e dissezionate in PBS 1X pH 7.4 (per un litro: 8 gr Cloruro di sodio; 0.2 gr Cloruro di Potassio; 1.15 gr Sodio Fosfato bibasico; 0.2 gr Potassio Fosfato monobasico). Si prelevano 30-40 coppie di testicoli e si ripongono in tubi “Eppendorf” da 1.5 ml contenenti PBS 1X. Dopo aver rimosso gran parte del tampone i tessuti vengono fissati per circa 30 minuti in 200 µl 4% ParaFormaldeide in PBS 1X a cui sono aggiunti 20 µl di DMSO. Si rimuove il sopranatante e si effettuano alcuni lavaggi con PBT (PBS 1X, 0.1% Tween 20). I campioni vengono trattati inizialmente con una soluzione d’ibridazione (Buffer d’ibridazione: 50% Formammide, 5X SSC, 50 µg/ml Eparina, 0.1% Tween 20, 0.3% Triton X100) e PBT in rapporto 1:1, agitando lentamente su ruota. Successivamente si lava per 5 minuti in soluzione d’ibridazione assoluta.

I tessuti vengono poi sottoposti a pre-ibridazione in 1 ml di soluzione d’ibridazione più 20 µl di DNA carrier a singolo filamento 5 mg/ml (ssDNA) per almeno 1.5 ore a 55°C.

Dopo questo tempo si lascia ad ibridare per una notte a 65°C in 50 µl di soluzione d’ibridazione in cui la sonda, preparata secondo la procedura di marcatura con digossigenina descritta nel paragrafo precedente, è diluita secondo un rapporto che può variare da 1:100 a 1:500; a questa soluzione vengono aggiunti 10 µl di ssDNA 5 mg/ml.

Il giorno dopo si eseguono i seguenti lavaggi per eliminare l’eccesso di sonda:

- 2 lavaggi in soluzione d'ibridazione a 65°C ciascuno per 30 minuti
- un lavaggio di 30 minuti in 1 parte di soluzione d'ibridazione e 1 parte di PBT a 65°C
- 4 lavaggi di 20 minuti ognuno in PBT a 65°C
- un lavaggio di 10 minuti in PBT a temperatura ambiente, agitando su ruota
- un lavaggio in PBT 3% BSA (Albumina da Siero Bovino) per 30 minuti, agitando su ruota
- un lavaggio di 10 minuti in PBT a temperatura ambiente, agitando su ruota

Si incubano i tessuti per 2 ore con anticorpo anti-digossigenina (coniugato con la fosfatasi alcalina) diluito in PBT 1:1000.

Si effettuano 4 lavaggi di 20 minuti ciascuno con PBT per rimuovere l'anticorpo in eccesso.

Si effettua un ultimo lavaggio agitando su ruota per 10 minuti a 18°C con una soluzione NBT preparata fresca (100 mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9.5 e 0.1% Tween 20).

I tessuti sono adesso pronti per la reazione di rivelazione che viene eseguita in 1 ml di soluzione NBT aggiungendo 1.5 µl NBT (100 mg/ml) e 1.5 µl BCIP (50 mg/ml) e incubando a 37°C al buio per un tempo variabile da pochi minuti ad alcune ore.

Come stabilito da visione al microscopio, quando la colorazione è ritenuta ottimale, i tessuti vengono lavati varie volte in PBT per bloccare la reazione di colorazione e conservati in TE 1X a 4°C. Quando i campioni devono essere fotografati vengono montati su di un vetrino in 80% glicerolo.

2.25 Saggio di colorazione X-gal

Maschi al terzo stadio di sviluppo larvale e adulti delle linee transgeniche ottenute sono anestetizzate con etere e dissezionate in PBS 1X pH 7.4 (per un litro: 8 gr Cloruro di sodio; 0.2 gr Cloruro di Potassio; 1.15 gr Sodio Fosfato bibasico; 0.2 gr Potassio Fosfato monobasico). Si prelevano 30-40 coppie di

testicoli e si ripongono in tubi “Eppendorf” da 1.5 ml contenenti PBS 1X. Dopo aver rimosso gran parte del tampone i tessuti vengono fissati per circa 30 minuti in 200 µl 0.5% glutaraldeide in

PBS 1X. Rimuovere il surnatante e lavare i testicoli 2 volte con PBS 1 X. Rimuovere il PBS e aggiungere 200 µl di “Staining solution” (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.2 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ 6H₂O, 3.1mM K₄(FeII(CN)₆), 3.1 mM K₃(FeIII(CN)₆), 0.3% Triton X-100) a cui sono stati aggiunti al momento 12.5 µl di una soluzione di X-gal all’8% in DMSO. Incubare a 37°C per un periodo che varia da 2 a 16 ore.

Come stabilito da visione al microscopio, quando la colorazione è ritenuta ottimale, i tessuti vengono lavati varie volte in PBT per bloccare la reazione di colorazione e conservati in PBT 1X a 4°C. Quando i campioni devono essere fotografati vengono montati su di un vetrino in 80% glicerolo.

2.26 Immagini

I preparati sono stati analizzati con un microscopio *Leica CTR6000*.

Le immagini sono state acquisite con fotocamera *Leica DFC350 FX*.

Le tavole delle figure sono state ottenute impiegando software di grafica tipo Adobe Photoshop cs.

2.27 Costrutto *pUAST/mst36FaGFP*

Il costrutto *pUAST/mst36Fa/GFP* è stato preparato a partire dal clone *pGEM 3kb* dal quale è stato escisso con una digestione enzimatica *Xba I* un frammento genomico di 3 kb che va dalla posizione -500 a +2500 del gene *mst36Fa*. Tale frammento è stato clonato nel vettore plasmidico commerciale *pUC18* modificato nel sito di policlonaggio dove è stato eliminato un sito di restrizione *Pst I*; tale clone è stato nominato *pUC18/3kb*. In contemporanea è stata amplificata per PCR sul clone *pUAST/GFP*, la regione codificante della *GFP*

(*Green Fluorescent Protein*) di *Aquorea Victoria*, utilizzando gli specifici oligonucleotidi: *Egfp5'*, *Egfp3'*.

Questi oligonucleotidi, presentano ad entrambe le estremità il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione *Pst I*. Il prodotto di amplificazione è stato inserito nel vettore di clonaggio *Pgem-T easy* (Promega). Successivamente, questo frammento è stato riesciso con una digestione enzimatica *Pst I* ed è stato inserito nel clone *pUAC18/3kb* precedentemente linearizzato sempre con *Pst I*. Si è ottenuto così il clone *pUAC18/3kb/GFP* che porta la regione codificante la GFP inserita 276 nucleotidi a valle del codone di inizio traduzione di *mst36Fa*. Infine, tale costrutto chimerico è stato digerito con l'enzima *Xba I* ed il frammento è stato clonato nel vettore di trasformazione *pUAST* (Brand and Perrimon, 1993). Tale clone è stato nominato *pUAST/MSt36Fa/GFP*.

2.28 Costrutto *pUAST/mst36Fb/RFP*

Il costrutto *pUAST/mst36Fb/RFP* è stato preparato a partire dal clone di DNA *5b* nel quale è clonato all'interno del vettore commerciale pBS il frammento della regione genomica di *mst36Fb* che va da - 470 a + 1060. Tale clone è stato linearizzato per digestione con l'enzima di restrizione BamHI ed in esso è stato clonato il frammento BamHI-BamHI della regione genomica di *mst36Fb* che va dalla posizione +1061 a +1935 ottenuto per digestione del clone di DNA *mg5*. Il clone ottenuto è stato nominato *pBS/Fb*. In contemporanea è stata amplificata per PCR sul clone *pDSred* Clontech, la regione codificante della *RFP* (*Red Fluorescent Protein*) di *Discosoma striata*, utilizzando gli specifici oligonucleotidi: *Rfp5'*, *Rfp3'*. Questi oligonucleotidi, presentano ad entrambe le estremità il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione *XbaI*. Il prodotto di amplificazione è stato inserito nel vettore di clonaggio *Pgem-T easy* (Promega). Successivamente, questo frammento è stato riesciso con una digestione enzimatica *XbaI* ed è stato inserito nel clone *pBS/Fb*

precedentemente linearizzato sempre con *Xba I*. Si è ottenuto così il clone *pBS/Fb/RFP* che porta la regione codificante la RFP inserita 637 nucleotidi a valle del codone di inizio traduzione di *mst36Fb*. Infine, tale costrutto chimerico è stato digerito con l'enzima *Xba I* ed il frammento è stato clonato nel vettore di trasformazione *pUAST* (Brand and Perrimon, 1993). Tale clone è stato nominato *pUAST/MSt36Fb/RFP*.

2.29 Costrutto *Sym-pUAST/Ia*

Per ottenere questo costrutto si è partiti dal clone *56b* sul quale si è amplificata una regione genomica di circa 0.6kb utilizzando gli oligo: *M13"Reverse"* universale e *mstFa3* gene specifico.

Questo frammento si estende dalla posizione +1210 a +1750 del gene *mst36Fa* e comprende parte degli esoni 3 e 4 e tutto l'introne 3. Il prodotto di amplificazione è stato clonato nel vettore *pGEM-T easy* (Promega). I cloni positivi sono stati digeriti con Eco RI e successivamente inseriti nel vettore di trasformazione *Sym-pUAST* (Giordano, 2002). Il clone così creato è stato nominato *Sym-pUAST/Ia*.

2.30 Costrutto *Sym-pUAST/Ib*

Per ottenere questo costrutto si è partiti dal clone *mg5* sul quale si è amplificata una regione genomica di circa 0.7kb utilizzando gli oligonucleotidi *mstfb2* () gene specifico e *M13"Reverse"* universale. Questo frammento si estende dalla posizione +1146 a +1788 del gene *mst36Fb* e comprende parte degli esoni 3 e 4 e tutto l'introne 3. Il prodotto di amplificazione è stato clonato nel vettore *pGEM-T easy* (Promega). I cloni positivi sono stati digeriti con Eco RI e successivamente inseriti nel vettore di trasformazione *Sym-pUAST* (Giordano, 2002). Il clone così creato è stato nominato *Sym-pUAST/Ib*.

2.31 Trasformazione della linea germinale di *Drosophila*

I vettori ricombinanti, costruiti per lo studio funzionale sui geni *mst36Fa* e *mst36Fb*, sono stati introdotti nella linea germinale di embrioni del ceppo yw1118 di *Drosophila melanogaster*. La trasformazione della linea germinale mediata dall'elemento P (Rubin and Spradling, 1982) è stata ottenuta con la tecnica della microiniezione seguendo il protocollo descritto da Gompel Nicolas (2003) dalla dott.ssa Cavaliere Daniela del nostro laboratorio. L'attività trasposasica è stata fornita dal plasmide "Helper" pUCHs $\pi(\Delta)$ 2-3. I costrutti sono stati iniettati ad una concentrazione di 500 μ g/ml con il plasmide "Helper" ad una concentrazione di 100 μ g/ml.

2.32 Rivelazione della proteina di *mst36Fa* fusa con la GFP nei testicoli di *D. melanogaster*

I testicoli sono dissezionati in PBS 1X e messi in eppendorf da 1.5 ml. Dopodiché si procede a fissarli incubandoli per 20 minuti a temperatura ambiente in PBT 1X (PBS+tween 20) e paraformaldeide 4%. I testicoli sono poi lavati 4 volte in PBT ed alla fine sono pronti per essere osservati al microscopio a fluorescenza.

2.33 Colorazione Dapi

I testicoli fissati in PBS+ PP 4 %s sono stati lavati per 15 minuti in PBS e successivamente incubati per 10 minuti a temperatura ambiente in una soluzione contenente Dapi concentrato 1 microgrammo/ml in PBT. Quindi sono stati fatti 4 sciacqui con PBT (PBS+0.1% tween). Alla fine di questa operazione i preparati sono stati osservati al microscopio a fluorescenza.

2.34 Immagini

I preparati sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza modello AX.70 Provis; Olympus utilizzando un filtro ad epifluorescenza (Chrom technology

corp). Le immagini digitali sono state catturate da una fotocamera (modello Orca II, Hamamatsu) con il programma Smart Capture 3 e processate utilizzando il programma Adobe Photoshop cs.

2.35 Estrazione di proteine da testicoli di maschi adulti

Una decina di testicoli dissezionati da maschi adulti del ceppo mst36Fa/GFP, sono stati immersi in 30 μ l della soluzione di lisi TL in presenza degli inibitori di proteasi PMFS 1 mM, CLAMP 1 μ g/ml, Aprotinina 1 μ g/ml. I testicoli sono quindi sottoposti a 5 cicli di sonicazione con impulsi d'intensità 14000 Hz della durata di 15 secondi intervallati da pause di 20 secondi. Il procedimento tenendo sempre la sospensione in ghiaccio, per contrastare il notevole riscaldamento che si origina durante l'emissione dell'impulso. Il lisato è quindi centrifugato a 15000 rpm per 15' per liberarsi dei detriti cellulari ed il sovranatante viene utilizzato per un esperimento di Western blot.

2.36 SDS-Page

La separazione delle proteine contenute in ciascun lisato proteico è stata eseguita mediante elettroforesi su gel denaturante di poliacrilammide Novex-SDS-Page Gradient 4-12% (Invitrogen). In ciascun "pozzetto" è stato caricato l'equivalente di 3 coppie di testicoli concentrato in un volume di 15 μ l a cui sono stati aggiunti 3 μ l della soluzione di caricamento 6x (18% SDS, 60% glicerolo, 0.3% Blu di Bromofenolo, 30% b-Mercaptoetanol). Il gel è stato fatto correre per 2 ore a voltaggio costante 150 V. Alla fine della corsa un gel è stato colorato con Blue di Comassie e l'altro gel è stato utilizzato per il trasferimento su filtro di nitrocellulose.

2.37 Colorazione del gel di proteine

Per evidenziare le proteine che si sono separate sul gel di poliacrilammide, è necessario sottoporre il gel a metodi di colorazione specifici.

Quello da me utilizzato è la colorazione con Coomassie. Il gel è immerso per 30' in una soluzione di colorante –fissativo contenente 0.1% Coomassie brillant blu R-250 , 40% metanolo, 10% acido acetico.

In seguito il gel è decolorato compiendo diversi cambi con una soluzione costituita da 40% metanolo e 10% acido acetico, fino ad un ottimale visualizzazione delle bande.

2.38 Western blot

Alla fine della corsa il gel è stato trasferito nella camerette dell'elettro-blot della Biorad per il trasferimento delle proteine sulla membr di Nitrocellulosa (Schleicher and Schuell). Il trasferimento è stato condotto a milliamperaggio (400 mA) nel tampone di trasferimento TB (paragrafo 2.3) per 3 ore a 4° C.

Dopo trasferimento la membrana è stata colorata con rosso Ponceau-S (0.2% Ponceau-S in 3% TCA) 5' a T.A. e dopo 2 risciacqui in H₂O sono state visibili le proteine e il marcatore di peso molecolare (See blu Invitrogen)). La membrana allora è stata trattata per l'incubazione con l'anticorpo primario:

- 1 lavaggio in PBT 1%(PBS 1%, Tween20 0,1%)
- 15' in "blocking solution"(PBT 1% "+latte in polvere ad una concentrazione finale del 5%.
- 2 risciacqui in PBT 1%
- 1 Lavaggio 15' in PBT 1%
- 2 lavaggi di 5' ognuno in PBT 1%
-
- Incubazione 16h a 4° C con l'anticorpo primario
- 2 risciacqui in PBT 1%
- 1 lavaggio 15' in PBT 1%

- 2 lavaggi di 5' ognuno in PBT 1%
- Incubazione con l'anticorpo secondario (1:10000 HRP-coniugato anti-rabbit Amersham)
- 2 risciacqui in PBT 1%
- 1 lavaggio 15' in PBT 1%

- 2 lavaggi 5' ognuno PBT 1%

Per sviluppare la chemiluminescenza è stato utilizzato il sistema ECL dell'Amersham. Immediatamente dopo trattamento con ECL la membrana è stata posta in una cassetta autoradiografica ad impressionare la lastra autoradiografica. Il tempo di esposizione varia tra 10" ed 1' ed è stato determinato sperimentalmente.

2.39 Estrazione di RNA totale da mosche adulte

RNA totale è stato estratto da mosche adulte utilizzando il Kit Quiagen RNA mini. Per ogni estrazione sono state utilizzate 20 mosche adulte e la resa ottenuta quantizzata al Nanodrop è stata di 0.5 µg/µl per un volume totale di 40 µl. I campioni sono stati trattati con DNAsi dell' Invitrogen purificata da RNAsi e Proteasi.

2.40 RT-PCR

Gli esperimenti di RT-PCR sono stati condotti utilizzando il Kit RT-PCR System della Promega. Per ogni reazione sono state seguite alla lettera le istruzioni del protocollo del Kit come pure per la scelta del ciclo di reazione

Risultati

3 Risultati

3.1 Caratterizzazione delle sequenze di regolazione in “cis” dei geni *mst36F*

I geni *mst36Fa* ed *mst36Fb* identificano una nuova famiglia genica composta da unità trascrizionali specifiche della linea germinale maschile, con entrambi i trascritti che compaiono nelle cellule allo stadio di spermatocita primario e sono visibili nelle cellule in stadi di sviluppo successivi per poi scomparire negli spermatidi nelle ultime fasi del processo di individualizzazione.

Questi due geni sono separati da una regione intergenica di 62 cb, presentano stessa direzione di trascrizione e identico profilo di espressione e sono trascritti come due messaggeri indipendenti, come dimostrato da un saggio di RT-PCR (Fig.10) che ha escluso la presenza di un unico messaggero precursore. Anche se negli eucarioti non è comune la presenza di messaggeri policistronici, in *Drosophila* fino ad oggi sono state descritte situazioni di trascrizione dicistronica per i geni *stoned* (Andrews *et al*, 1996), *Adh* (Brojna and Ashburner, 1997) ed il locus *mei217/218* (Liu *et al*, 2000), in tutti e tre i casi menzionati, i prodotti proteici sintetizzati dal messaggero dicistronico svolgono funzioni correlate. Pur avendo dimostrato che i geni sono trascritti in due singoli messaggeri nulla si sapeva circa la regione genomica dove mappano le rispettive sequenze promotrici. E soprattutto non era chiaro se i geni, essendo strettamente associati condividessero lo stesso promotore o se usassero elementi regolativi differenti. Il primo obiettivo del mio progetto di tesi di dottorato è stato quello di intraprendere uno studio volto alla determinazione delle regioni di regolazione responsabili del profilo di espressione dei geni maschio-specifici *mst36Fa* ed *mst36Fb*.

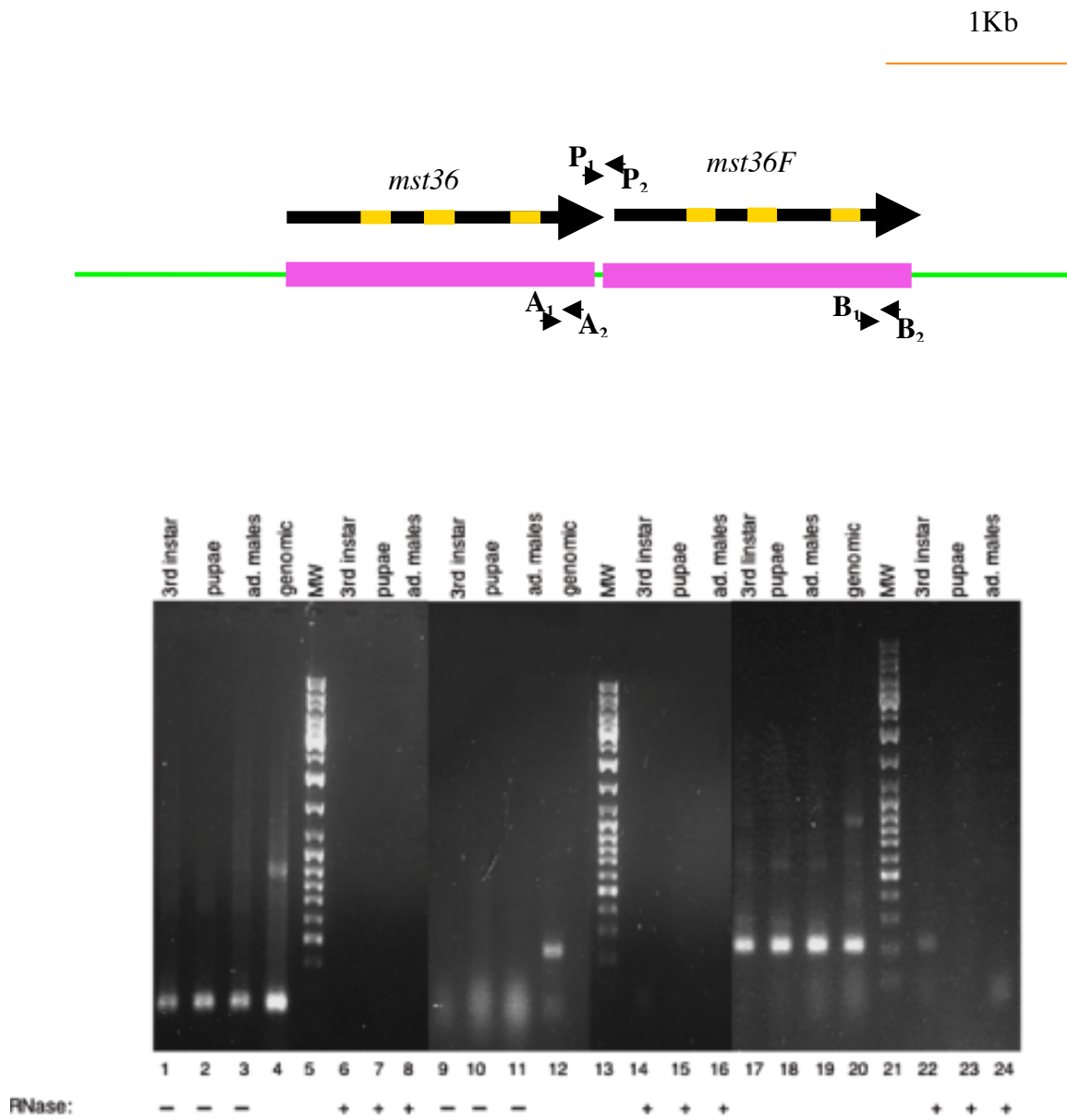


Fig.10- Esperimento di RT-PCR condotto su RNA totale estratto da larve di III Instar (stadio in cui compare il trascritto), pupae e adulti con coppie di oligonucleotidi in grado di rilevare l'mRNA di *mst36Fa* (*mstfa*₂ & *mstfa*₃) l'mRNA di *mst36Fb* (*mstfb*₂ & *mstfb*₃) e il putativo precursore policistronico (*poly1* & *poly2*). Gli stessi esperimenti sono stati condotti in presenza di RNasi. Il marcatore di peso molecolare è il Marker VI Roche.

3.1.1 Identificazione delle sequenze di regolazione del profilo d'espressione dei geni *mst36F*

L'identificazione del sito di inizio della trascrizione di un gene costituisce un passo fondamentale per la determinazione delle regioni promotrici, perché generalmente le sequenze che costituiscono il promotore di un gene sono localizzate vicino a tale sito e sono essenziali per l'inizio stesso del processo trascrizionale. Le sequenze intensificatrici (enhancer) invece sono necessarie per stimolarne l'inizio, costituiscono il sito bersaglio per complessi nucleoproteici che modificano la struttura della cromatina e interagiscono con il meccanismo basale della trascrizione; possono trovarsi anche a grandi distanze dal sito di inizio della trascrizione (nell'ordine delle chilobasi) e sono il bersaglio per la regolazione dell'espressione tessuto-specifica e temporale di un gene. Negli insetti, ed in particolare in *Drosophila*, studi dettagliati hanno rivelato che, in accordo con quanto osservato in altri metazoi, i promotori dei geni sono costituiti da un elemento definito promotore basale che è collocato più o meno entro un centinaio di coppie di basi dal sito di inizio della trascrizione, un elemento intensificatore che è stato trovato in alcuni casi a grandi distanze dal sito di inizio della trascrizione ed in altri casi a brevi distanze dallo stesso (da decine a poche centinaia di coppie di basi), e talvolta da elementi isolatori (insulator o boundary element) (Anrostri, 2003). In generale, il promotore classico in *Drosophila* è costituito da una regione contenente la classica sequenza TATA (consensus TATAAA) localizzata a -30, la sequenza iniziatrice (INR) in posizione +1 (consensus TCAGT) e il DPE (downstream promoter element) a +30 (consensus a/gGa/tc/tGT), anche se non tutti i promotori contengono tutti e tre gli elementi. È stato infatti osservato che dei circa 300 geni, di cui è stato mappato il sito d'inizio della trascrizione, la metà presentano una sequenza TATA canonica, circa la metà hanno il DPE e circa un terzo non presentano né l'uno e né l'altro; mentre l'INR è presente in un quarto di tali geni. In alcuni promotori privi di sequenza TATA, l'INR sembra svolgere una

funzione fondamentale per il legame dei fattori che attivano il meccanismo di base di inizio della trascrizione, mentre in altri è il DPE che lega i fattori TAF (Arnosti, 2002). Sono stati caratterizzati particolari fattori TAF tessuto specifici che interagiscono con strutture del promotore basale anche esso tessuto specifico. A questa categoria appartengono i promotori dei geni specifici della linea germinale maschile (Santel, 2001; Blumer, 2002) alcuni privi di sequenza TATA ma guidati da DPE e INR, altri regolati da una TATA canonica, e tutti con la caratteristica comune di concentrare in meno di 100 cb tutte le sequenze necessarie alla trascrizione tessuto e stadio specifica del gene che guidano. Con l'intento di identificare le regioni genomiche responsabili del corretto profilo di espressione maschio-specifico dei geni *mst36F* nei testicoli della *Drosophila*, ho intrapreso una serie di analisi in vivo su linee transgeniche che hanno inseriti stabilmente nel proprio genoma vettori ricombinanti in cui le sequenze genomiche da analizzare, sono state clonate a monte della regione codificante per il gene reporter *lacZ* all'interno dei vettori della linea pCasper (cap.2) .

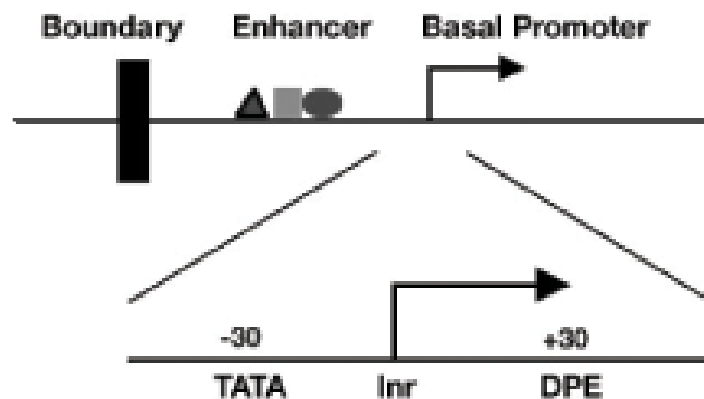


Fig.11-Elementi di regolazione della trascrizione agenti in “cis”. Il promotore basale comprende la sequenza lunga 100 cb confinante con il sito d’inizio della trascrizione, alla quale si legano i fattori basali che regolano l’inizio della trascrizione. Le sequenze enhancer sono localizzate a distanze differenti rispetto al sito d’inizio della trascrizione che variano da 50 cb fino a diverse centinaia di coppie di basi; queste sequenze sono legate da fattori di trascrizione tessuto e stadio specifici che modulano l’attività dei promotori. L’elemento boundary trovato vicino ad alcuni geni, isola il gene dal contesto cromatinico che lo circonda, e può schermare il gene dall’effetto di enhancer lontani. Gli insetti di solito hanno un promotore basale costituito da tre elementi: TATA, Inr e DPE.

3.1.2 Isolamento delle sequenze regolatrici del gene *mst36Fa*

Le analisi di caratterizzazione molecolare del gene *mst36Fa*, effettuate in precedenza nel laboratorio della dottoressa Digilio, avevano consentito di identificare il sito di inizio della trascrizione.

Sulla base dei dati della caratterizzazione molecolare di *mst36Fa*, ho realizzato costrutti ricombinanti per fusione tra delezioni successive della regione genomica confinante con il sito d'inizio della trascrizione di *mst36Fa* ed il gene reporter *lacZ* di *E. coli*, utilizzando vettori della linea pCasper (Thummel, 1993) (cap.2).

Questi costrutti sono stati introdotti nel genoma di *Drosophila* utilizzando il sistema della trasformazione della linea germinale mediata dall'elemento trasponibile P (Rubin and Spradling, 1982), e la loro espressione è stata seguita attraverso l'analisi del profilo dell'attività della β galattosidasi e mediante saggi di ibridazione in situ, utilizzando come sonda il trascritto del gene reporter *lacZ*, marcato con Digossigenina. In figura 12 ho riportato lo schema dell'unità trascrizionale del gene *mst36Fa* e la struttura dei costrutti utilizzati negli esperimenti di trasformazione, con le varie porzioni di sequenza inserite in ciascun vettore sono allineate con la corrispondente regione del gene in esame. Per ciascun costrutto ho analizzato i profili di espressione del gene reporter in almeno tre linee transgeniche indipendenti.

Il costrutto lig4 porta a monte della sequenza codificante del gene reporter *lacZ* di *E. coli* e in frame con questa regione genomica lunga 1,3 kb che comprende la sequenza del primo esone di *mst36Fa*, la sua regione 5' non tradotta e la sequenza genomica lunga 500 cb a monte del sito di inizio della trascrizione tss (transcription start site) di *mst36Fa*. Gli altri costrutti derivano da delezioni seriali di tale regione genomica, in particolare nel costrutto 500a è clonata la regione genomica lunga 500 cb che si trova a monte del sito di inizio della trascrizione di *mst36Fa* e le prime 10 cb della regione 5' non tradotta; nel costrutto 250a sono clonate 250 cb a monte del sito di inizio della trascrizione e

10 cb della regione 5' non tradotta; nel costrutto 100a sono clonate 60cb a monte del tss di *mst36Fa* e le prime 10 cb della regione 5' non tradotta; infine il costrutto lig4dleader è ricavato da lig4 con l'eliminazione della sequenza leader per cui le 500 cb a monte del tss sono immediatamente seguite dalla sequenza del primo esone del gene in frame con *lacZ*.

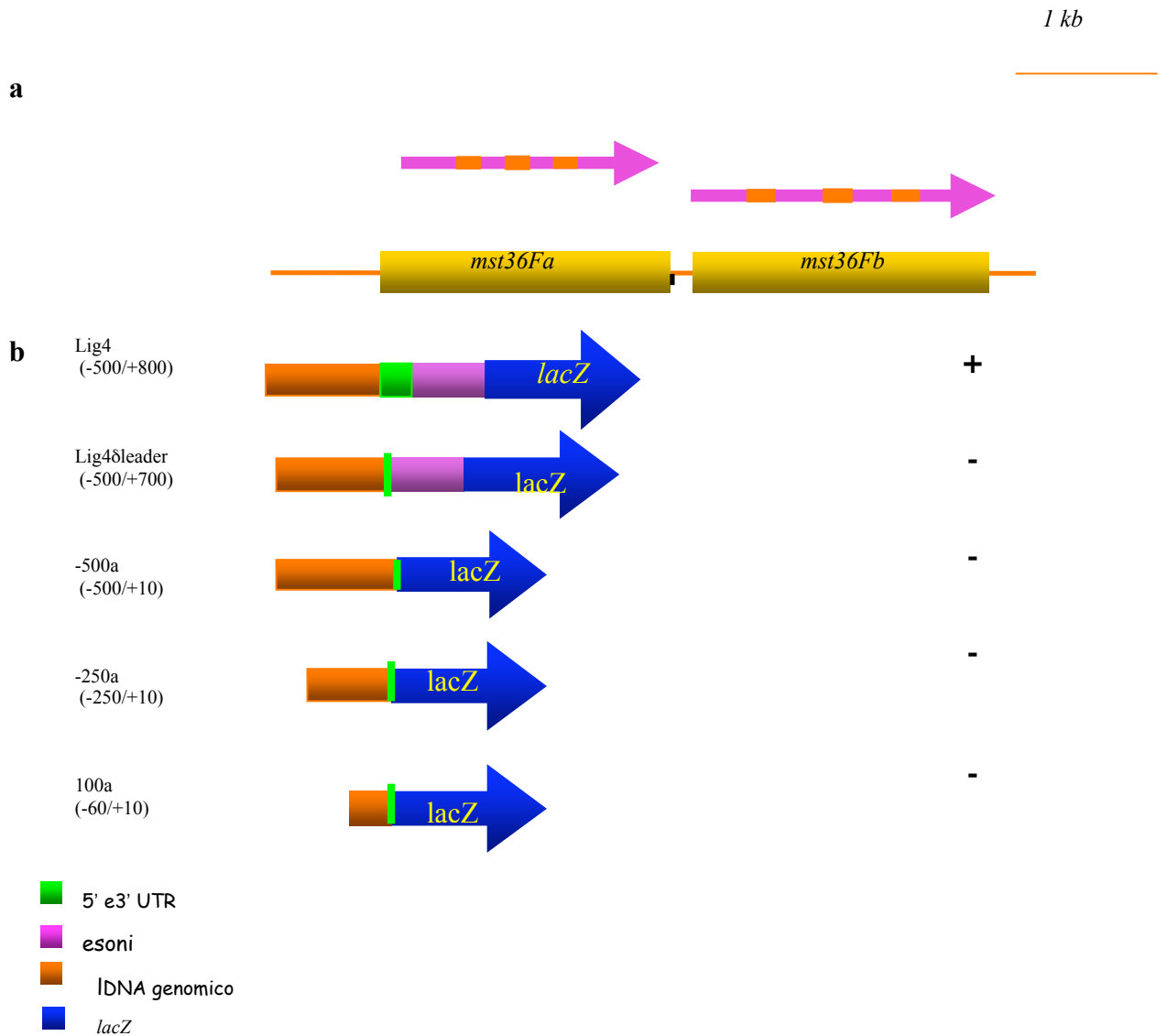


Fig.12-Rappresentazione schematica dei costrutti chimerici utilizzati per la caratterizzazione del promotore del gene *mst36Fa*. In a) è rappresentata la regione genomica dei geni del cluster *mst36F*. In b), sono schematizzati i costrutti ricombinanti, utilizzati per la caratterizzazione delle regioni responsabili dell'espressione sesso, stadio e tessuto-specifica del gene *mst36Fa* in cui delezioni successive della regione genomica in esame sono messe a guidare l'espressione del gene reporter *lacZ* di *E. coli* in linee transgeniche ottenute in seguito a trasformazione embrionale mediante la tecnologia dell'elemento trasponibile P.

I risultati delle ibridazioni su testicoli dissezionati da mosche delle linee transgeniche *lig4* mostrano un profilo di espressione del gene reporter paragonabile a quello osservato per il gene *mst36Fa* endogeno: il trascritto del gene *lacZ* compare nel citoplasma delle cellule allo stadio di spermatocita primario, persiste nelle cellule germinali ai successivi stadi di sviluppo per poi scomparire dagli spermatidi nelle fasi finali del processo di individualizzazione (Fig.13). Nessun segnale di ibridazione è identificabile in femmine o in altri tessuti dei maschi.

Il trascritto del gene *lacZ* nei testicoli delle mosche delle linee transgeniche 500a, 250a, 100a e *lig4dleader* non è presente, in quanto non si osserva alcun segnale di ibridazione. Questo risultato suggerisce che le regioni genomiche presenti nei suddetti costrutti non sono in grado di attivare la trascrizione del gene reporter *lacZ*.

Sulla base delle considerazioni che la regione 5' non tradotta *mst36Fa* è presente nel costrutto *lig4* ed è stata deleta nei costrutti 500a, 250a, 100a e *lig4dleader*, possiamo concludere che in tale regione genomica sono presenti gli elementi necessari e sufficienti a guidare la trascrizione tessuto e stadio specifica del gene *mst36Fa*.

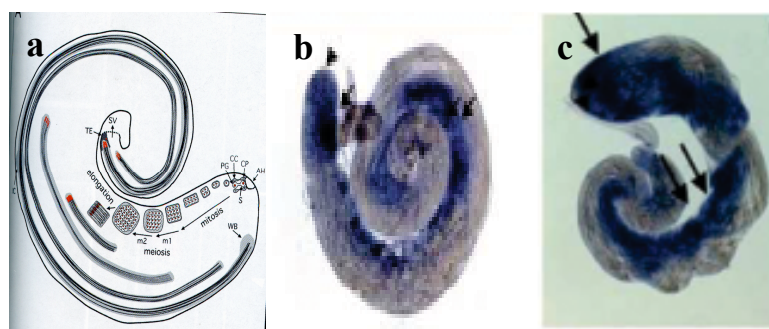


Fig.13-Ibridazione in situ su testicoli dissezionati da mosche selvatiche e transgeniche della linea *lig4* con sonde marcate con digossigenina specifiche per rappresentare rispettivamente *mst36Fa* (b) e per il gene reporter di *E.coli lacz* (c). In (a) è diagrammato un testicolo adulto della *Drosophila melanogaster* in cui sono schematizzate le cellule germinali nei vari stadi di sviluppo.

rispettivamente sui testicoli dissezionati da mosche selvatiche (b) e dalle linee del ceppo transgenico *lig4* mostrano che il profilo di espressione per il gene reporter *lacZ* (b) risulta paragonabile al trascritto del gene *mst36Fa* (a) nel selvatico: Il trascritto compare allo stadio di spermatocita primario cellule pre-meiotiche (freccia) si accumula durante la lunga profase meiotica (doppia freccia) e scompare a stadi avanzati del differenziamento degli spermatidi (cellule post-meiotiche).

3.1.3 Determinazione delle sequenze di regolazione post trascrizionali di *mst36Fa*

Il processo di gametogenesi maschile è regolato da un fine meccanismo di regolazione che opera sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. In particolare dato che il fenomeno trascrizionale è praticamente nullo dopo la meiosi tutti i geni che interverranno nelle fasi del differenziamento degli spermatidi devono essere trascritti dalle cellule allo stadio di spermatocita primario per essere poi tradotti anche tre giorni dopo la comparsa dei trascritti. Dato che la trascrizione del gene *mst36Fa* si accende negli spermatociti primari, sono andata a verificare se i meccanismi di trascrizione e traduzione del suo messaggero avvengono in rapida successione o se anche il trascritto *mst36Fa* è sottoposto al controllo della traduzione che consente la comparsa della proteina in una finestra temporale differente rispetto alla comparsa del trascritto.

Sono andata quindi a determinare la comparsa della proteina MST36Fa, studiando il profilo di espressione della β galattosidasi nei testicoli larvali ed adulti delle mosche transgeniche *lig4* (fig.12) che esprimono sotto il controllo del promotore *mst36Fa* la proteina ricombinante MST36Fa/ β gal. Il profilo di espressione della proteina è stato monitorato attraverso un saggio enzimatico della β galattosidasi in presenza del substrato cromoforo X-gal. Il risultato del saggio condotto su testicoli adulti del ceppo *lig4*, mi ha rivelato che la proteina ricombinante è presente nelle cellule post meiotiche, in particolare negli spermatidi in allungamento dove è possibile osservare una intensa colorazione blu. Non è stato possibile osservare colorazione a livello degli spermatociti e degli spermatidi precoci (fig. 14 a).

Per essere sicura che non vi fosse produzione di proteina ricombinante negli spermatociti primari, ho ripetuto il saggio X-gal che su testicoli dissezionati da larve al terzo stadio di sviluppo delle linee *lig4*. Durante il questo stadio di sviluppo larvale ha inizio la spermatogenesi, e nel disco testicolare sono presenti solo cellule germinali allo stadio di spermatogonio e spermatocita primario.

Come illustrato in figura 14 b non è stato possibile osservare alcuna colorazione in questi tessuti, confermando che il trascritto è tradotto solo nelle cellule germinali dopo la meiosi.

Questo dato mi consente di affermare che, pur essendo presente il trascritto negli spermatociti non si ha la produzione della proteina poiché il messaggero è sottoposto a blocco traduzionale. Dato che nel costrutto ricombinante lig4 (fig.12b) alla sequenza codificante per la β galattosidasi è fuso solo il primo esone e la regione 5' non tradotta del messaggero *mst36Fa*, possiamo concludere che la sequenza in *cis* responsabile del blocco della traduzione del messaggero in esame "mappa" nel primo esone o nella regione 5' non tradotta del trascritto *mst36Fa*. Ciò risulta in accordo con quanto osservato in altri trascritti specifici della linea germinale maschile fino ad ora caratterizzati (Schafer, 1991; Gigliotti, 1994; Blumer, 2002) in cui le regioni in *cis* deputate ad un controllo traduzionale sono localizzate nel leader. Un'analisi bioinformatica della regione in esame non mi ha permesso di evidenziare al suo interno elementi di regolazione post trascrizionali già caratterizzati.

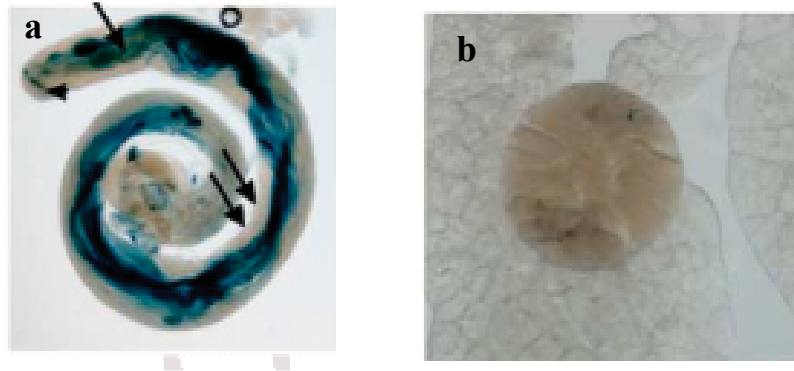


Fig.14-Localizzazione della proteina ricombinante *mstFa/Bgal*. La proteina ricombinante *Mst36Fa/Bgal* nei testicoli adulti delle linee transgeniche *lig4* compare negli spermatidi e si accumula durante il differenziamento fino agli stadi tardivi della spermiogenesi(a),(doppia freccia) mentre non è presente negli spermatociti nè nelle cellule in meiosi (freccia) dove è già presente il trascritto come confermato dal risultato del saggio su testicoli di larve dei ceppi *lig4* al terzo stadio di sviluppo (b) .

La traduzione della proteina di fusione è stata determinata per colorazione istochimica andando a saggiare l'attività enzimatica della β galattosidasi.

3.1.4 Determinazione della regione di regolazione della trascrizione del gene *mst36Fb*

Dopo aver identificato le regioni genomiche dove mappano le sequenze di regolazione responsabili dell'espressione di *mst36Fa*, ho effettuato la stessa analisi per verificare se le regioni che guidano il profilo di espressione di *mst36Fa* sono responsabili anche della trascrizione di *mst36Fb* o se l'espressione di *mst36Fb* è guidata da sequenze indipendenti. Analisi di caratterizzazione molecolare del trascritto *mst36Fb* avevano consentito di determinare l'estremità 5' di *mst36Fb*, passo fondamentale prima di iniziare la caratterizzazione delle regioni di regolazione di un gene.

Sono andata a costruire una serie di vettori ricombinanti in cui regioni genomiche, che “mappano” a monte di *mst36Fb*, sono state clonate nei vettori della linea pCasper (*pCasperβgal* e *pCasperβgalAUG* cap.2) a guidare l'espressione del gene *reporter lacZ* di *Escherichia coli*. Nel costrutto 3kb (fig.15 b) è stata clonata la regione genomica lunga 500 cb che mappa a monte del gene *mst36Fa*, l'intera regione genomica di *mst36Fa*, la regione intergenica del cluster *mst36F* lunga 62 cb, la regione 5' non tradotta di *mst36Fb* e il primo esone di *mst36Fb*. Gli altri costrutti costituiscono delezioni seriali del vettore 3kb. I vettori ricombinanti realizzati, schematizzati in fig.14, sono stati utilizzati per trasformare embrioni del ceppo w^{1118} di *Drosophila melanogaster* utilizzando la tecnologia dell'elemento trasponibile *P* (Rubin and Spradling, 1982). Per ciascun costrutto sono state ottenute ed analizzate almeno 4 linee transgeniche attraverso esperimenti di ibridazione in situ su testicoli interi utilizzando una sonda marcata con digossigenina specifica per il gene *lacZ* e con saggi di colorazione X-gal. I risultati ottenuti rivelano che nei testicoli adulti delle mosche di tutte le linee transgeniche analizzate il trascritto *lacZ* presenta il medesimo profilo di espressione del trascritto *mst36Fb* endogeno. Il trascritto *lacZ* compare nelle cellule germinali allo stadio di spermatocita primario ed è visibile nel citoplasma delle cellule germinali nei successivi stadi di sviluppo per

poi scomparire nelle ultime fasi del differenziamento degli spermatidi. Nessun segnale è stato riscontrato in femmine ed in altri tessuti dei maschi. Il fatto che tutte le linee transgeniche mostrino lo stesso profilo di espressione mi porta a dedurre che la regione genomica presente nel costrutto 100b, che comprende 170 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione del gene *mst36Fb* e 10 nucleotidi della sua regione 5' non tradotta, contiene tutti gli elementi necessari e sufficienti a guidare la trascrizione tessuto e stadio specifica di *mst36Fb*.

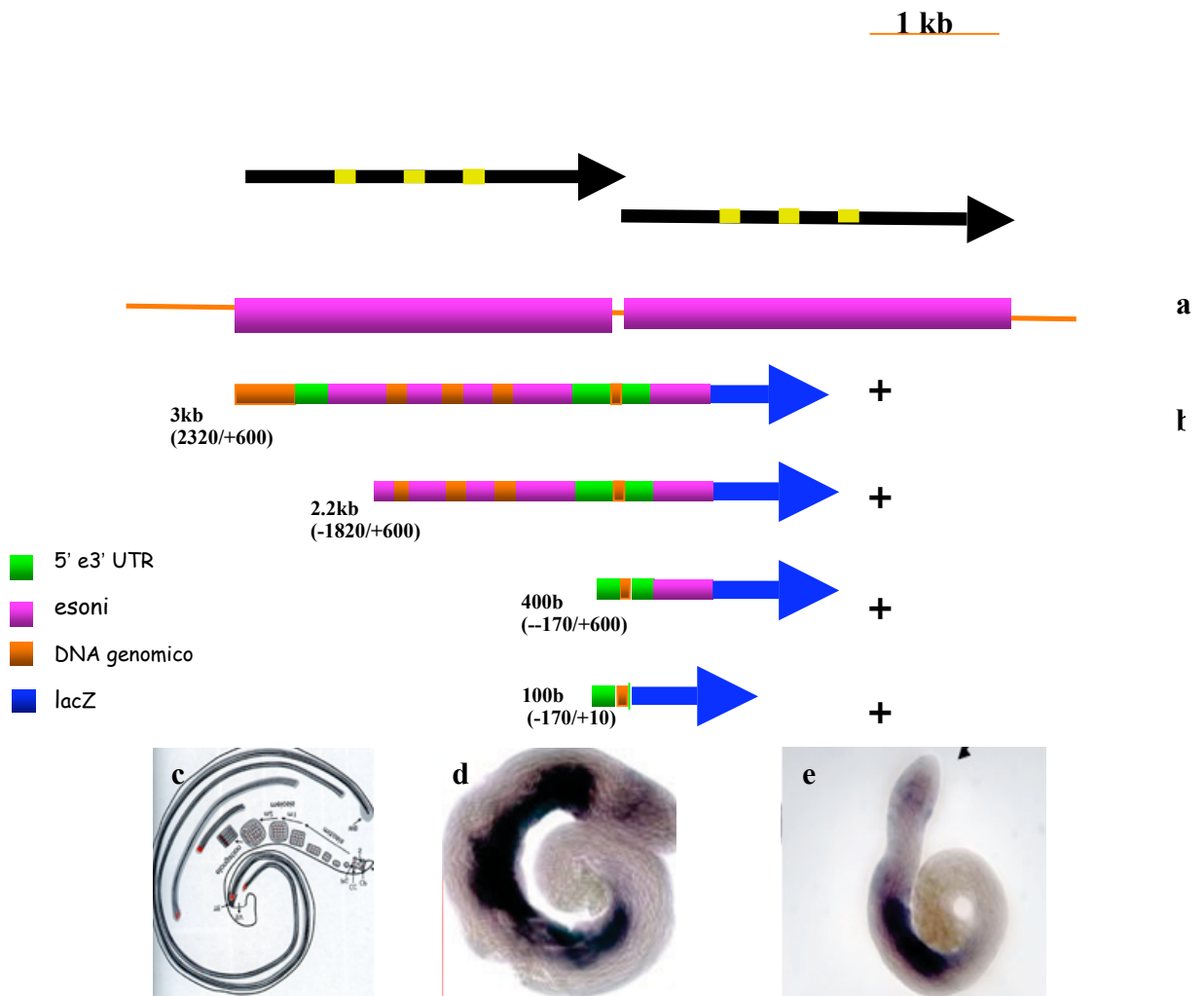


Fig.15-Rappresentazione schematica dei costrutti ricombinanti *mst36Fb/lacZ*. In a) è schematizzata la regione genomica del cluster *mst36F*. In b) sono rappresentati i costrutti ricombinanti analizzati in cui delezioni seriali della putativa regione genomica promotrice sono state fuse al gene reporter *lacZ* di *E. coli* per guidarne l'espressione nelle linee transgeniche ottenute mediante trasformazione della linea germinale utilizzando la tecnologia dell'elemento trasponibile P.

(c-e) Analisi di ibridazioni in situ condotti sui testicoli dissezionati da mosche selvatiche e del ceppo transgenico rispettivamente con il gene *mst36ba* e il gene *lacZ* marcati con Dig usati come sonde (d-e). Il profilo d'espressione del reporter *lacZ* identico in tutte le linee esaminate, risulta paragonabile a quello di *mst36Fb* osservato nei testicoli del selvatico(d): Il trascritto *lacZ* compare allo stadio di spermatocita primario (cellule pre-meiotiche) si accumula durante la lunga profase meiotica e scompare a stadi avanzati del differenziamento degli spermatidi (cellule post-meiotiche). f) vi è la rappresentazione schematica di un testicolo con cellule germinali a vari stadi di sviluppo.

3.1.5 Determinazione delle regioni di regolazione post trascrizionale di *mst36Fb*

Per verificare se anche il trascritto *mst36Fb* è sottoposto al meccanismo di controllo della traduzione sono andata a monitorare la localizzazione della proteina ricombinante MST36Fb/ β gal. Ho effettuato il saggio enzimatico della β gal in presenza del substrato X-gal nei testicoli adulti delle mosche transgeniche ottenute, ma purtroppo ho avuto risultato positivo solo con la linea 100b, in cui la regione di regolazione a monte del tss di *mst36Fb* guida il gene reporter *lacZ*. Le altre linee non presentano colorazione X-gal a causa di un errore di sequenza probabilmente introdotto dalla Taq polimerasi durante la reazione di amplificazione che interrompe il frame della proteina di fusione MST36 β Fb/ β gal.

Per la linea 100b che comprende solo la regione genomica lunga 170 cb a monte del sito di inizio della trascrizione di *mst36Fb* e 10 cb della regione 5' non tradotta, il risultato ottenuto ha mostrato un'intensa colorazione blu degli spermatociti primari e delle cellule ai successivi stadi di sviluppo fino alla fase di spermatide in individualizzazione. Questo vuol dire che la proteina è presente dove è presente il trascritto e lascia intendere che trascrizione e traduzione di *mst36Fb* nei testicoli della linea transgenica in esame sono eventi contemporanei.

Per meglio verificare se la proteina fosse presente nelle cellule germinali allo stadio di spermatocita primario, sono andata ad effettuare il saggio della β galattosidasi su testicoli larvali della linea transgenica 100b. Come mostrato in fig. 15 il risultato ottenuto mostra un'intensa colorazione blu nella porzione del testicolo dove sono presenti gli spermatociti primari.

Dato che nei testicoli larvali sono presenti solo cellule germinali a stadi di sviluppo pre-meiotici posso confermare che la proteina ricombinante MST36Fb/ β gal è espressa subito dopo la comparsa del trascritto nelle cellule allo stadio di spermatocita primario nei testicoli larvali e adulti delle mosche

delle linee transgeniche 100b. Per analogia con quanto accade per *mst36Fa* e per i geni della spermatogenesi, posso immaginare che: la sequenza del leader risulta coinvolta nella regolazione della traduzione. È chiaro che per avere una conferma sarà necessario testare un costrutto che contiene, oltre alle 170 cb di sequenza in 5' tss, anche la sequenza leader per verificare, se la proteina ricombinante varia il suo profilo di espressione. In caso contrario si dovrebbero costruire ulteriori vettori ricombinanti in cui la sequenza codificante per la β galattosidasi è fusa all'intera regione genomica di *mst36Fb* per individuare se vi sono regioni che regolano a livello post trascrizionale l'espressione di *mst36Fb* nei testicoli di tali mosche transgeniche.

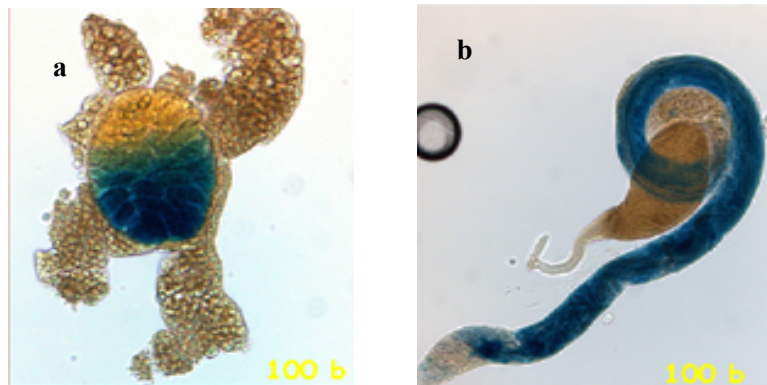


Fig.16- Localizzazione della proteina ricombinante mstFas/Bgal. La proteina ricombinante Mst36Fa/Bgal nei testicoli delle linee transgeniche 100b (-170/+10) compare sia negli spermatociti sia negli spermatidi e si accumula durante il differenziamento (b) fino agli stadi tardivi della spermiogenesi. Trascrizione e traduzione della proteina di fusione sembrano avvenire nella stesa finestra temporale ovvero allo stadio di spermatocita, come confermato dalla localizzazione nei testicoli delle larve al terzo stadio di sviluppo (b). La traduzione della proteina di fusione è stata determinata per colorazione istochimica andando a saggiare l'attività enzimatica della β galattosidasi.

3.1.6 Analisi delle sequenze di regolazione degli *mst36F*

I risultati ottenuti dalle analisi molecolari volte alla caratterizzazione delle regioni di regolazione dell'espressione genica dei geni del cluster *mst36F* mi hanno consentito di individuare le regioni genomiche dove mappano gli elementi responsabili della trascrizione, ma non le loro sequenze consenso.

Ho quindi intrapreso studi volti ad estrapolare le sequenze in "cis" dei due promotori maschio specifici dei geni in esame. Per prima cosa ho effettuato analisi di allineamenti nucleotidici tra le sequenze promotrici dei geni *mst36Fa* ed *mst36Fb* al fine di estrapolare un consenso comune nei due promotori. I risultati degli allineamenti, effettuati utilizzando il programma ClustalW e Macaw (Lawrence et al, 1993) non hanno identificato regioni di significativa identità nucleotidica in tali sequenze. Questo indica che i due geni del cluster nonostante condividano un' elevata identità in sequenza nucleotidica non la conservano nelle regioni genomiche contenenti gli elementi del promotore. I dati ottenuti con le linee transgeniche indicano che le rispettive sequenze promotrici conservano la comune caratteristica dei promotori testicolo specifici, nel senso che gli elementi necessari alla trascrizione maschio specifica sono confinati in regioni genomiche lunghe meno di 200 cb; questi promotori mappano in regioni genomiche differenti e hanno evoluto differenti consensi nucleotidici. Per verificare se nelle regioni promotrici dei geni *mst36F* sono presenti sequenze consenso già caratterizzate e comuni ad altri geni specifici della linea germinale maschile (Schafer, 1989; Blümer, 2003; Kulathinal, 2003), ho effettuato allineamenti tra queste ultime e le regioni promotrici dei geni in esame utilizzando sempre i programmi ClustalW e Macaw.

Per quanto riguarda il gene *mst36Fa*, questo è regolato da un promotore TATAless, in quanto non ho trovato una canonica sequenza TATA (T A T A T/A A T/A). Inoltre nella sua regione 5' non tradotta, non ho identificato elementi in *cis*, già caratterizzati, quali il DPE (G A/T C G) e l'INR (T C A G/T T T/C) presenti nei promotori basali di altri geni TATA less espressi in

Drosophila. Questo lascia ipotizzare che *mst36Fa* è regolato da differenti sequenze di regolazione della trascrizione che sfruttano differenti elementi di regolazione in *cis* e probabilmente differenti fattori trascrizionali rispetto a quelli finora descritti.

Lo stesso risultato è stato ottenuto dall'analisi della regione promotrice del gene *mst36Fb*. Anche per il gene *mst36Fb* non è stato possibile identificare una canonica sequenza TATA, inoltre, allineamenti nucleotidici tra la sequenza della regione promotrice di *mst36Fb* e le sequenze consenso caratterizzate in altri promotori spermatogenesi specifici e non, non hanno rilevato la presenza di sequenze consenso finora descritte in *Drosophila*.

3.2 Profilo di espressione dei geni del cluster *mst36F* nei testicoli dei mutanti di arresto meiotico della classe *aly* e *can*

Gli eventi che guidano il differenziamento cellulare durante la spermiogenesi necessitano della presenza di numerosi prodotti genici non richiesti in altri processi.

Come è stato descritto in dettaglio nel paragrafo 1.7, una caratteristica fondamentale della spermatogenesi è che il programma di trascrizione dei geni richiesti nel processo è ristretto ad una particolare finestra temporale che coincide con la profase meiotica degli spermatociti primari. Quindi l'attivazione della trascrizione negli spermatociti primari è necessaria per fornire i prodotti genici necessari alla progressione del ciclo cellulare e al differenziamento dei gameti in sviluppo. Il corretto progredire del programma meiosi/differenziamento è guidato da proteine regolatrici della trascrizione codificate da geni indicati come geni di arresto meiotico. Questi geni sono suddivisi in due classi in base al meccanismo con cui regolano la ciclina *twine*: *aly* class e *can*-class (paragrafo 1.7). Alla classe dei geni *aly* (*aly*, *comr*, *ping pong* e *topi*) appartengono geni che codificano per le subunità di un ipotetico complesso proteico che riconosce e apre i domini cromatinici dove mappano i

geni che devono essere trascritti in quel momento. Alla classe dei geni *can* (*can*, *mia*, *sa* e *nht*) appartiene un gruppo di geni che codificano per le subunità della isoforma testicolo specifica di TFIID che è coinvolta nella fase di inizio della trascrizione come parte del complesso di pre-inizio, e probabilmente partecipa all'allontanamento del complesso repressore Pc dai promotori dei geni testicolo specifici.

Le informazioni che si hanno circa i geni di arresto meiotico sono state accumulate negli ultimi dieci anni e hanno consentito di ipotizzare alcuni modelli circa i meccanismi con cui agiscono tali geni. Il prodotto del gene *aly* interagisce con il prodotto del gene *cmr* e va a regolare i promotori dei geni bersaglio interagendo non direttamente con domini cromatinici ma con fattori proteici del complesso iniziatore della trascrizione quali *Matotopetli* (Topi) e *Achintya/Vismay* (Ping Pong) o con *Achintya/Vismay* associato alle proteine della classe Can ed ad altre Taf non ancora caratterizzate (fig.17). La maggior parte dei geni regolatori del ciclo cellulare meiotico, come *twine*, *boule* e *la ciclinaB*, e dei geni coinvolti nel processo di differenziamento degli spermatidi sono regolati dai geni di arresto meiotico.

Maschi mutanti per ciascuno dei suddetti geni sono vitali ma sterili e mostrano testicoli con cellule morfologicamente non alterate fino allo stadio di spermatocita maturo; dopo di che tali cellule non sono in grado di portare a termine la meiosi e il differenziamento degli spermatidi.

Siccome non tutti i geni trascritti negli spermatociti primari sono controllati dagli stessi geni di arresto meiotico finora caratterizzati, sono andata a verificare se i geni *mst36Fa* e *mst36Fb*, fossero regolati dai prodotti di tali geni. Inoltre poiché i miei geni in esame, nonostante un'espressione coordinata, non presentano identità di sequenza nucleotidica nelle rispettive regioni di regolazione, ho ritenuto interessante andare a determinare il loro profilo di espressione nei testicoli dei vari mutanti di arresto meiotico al fine di determinare se la loro espressione è dipendente dagli stessi fattori trascrizionali.

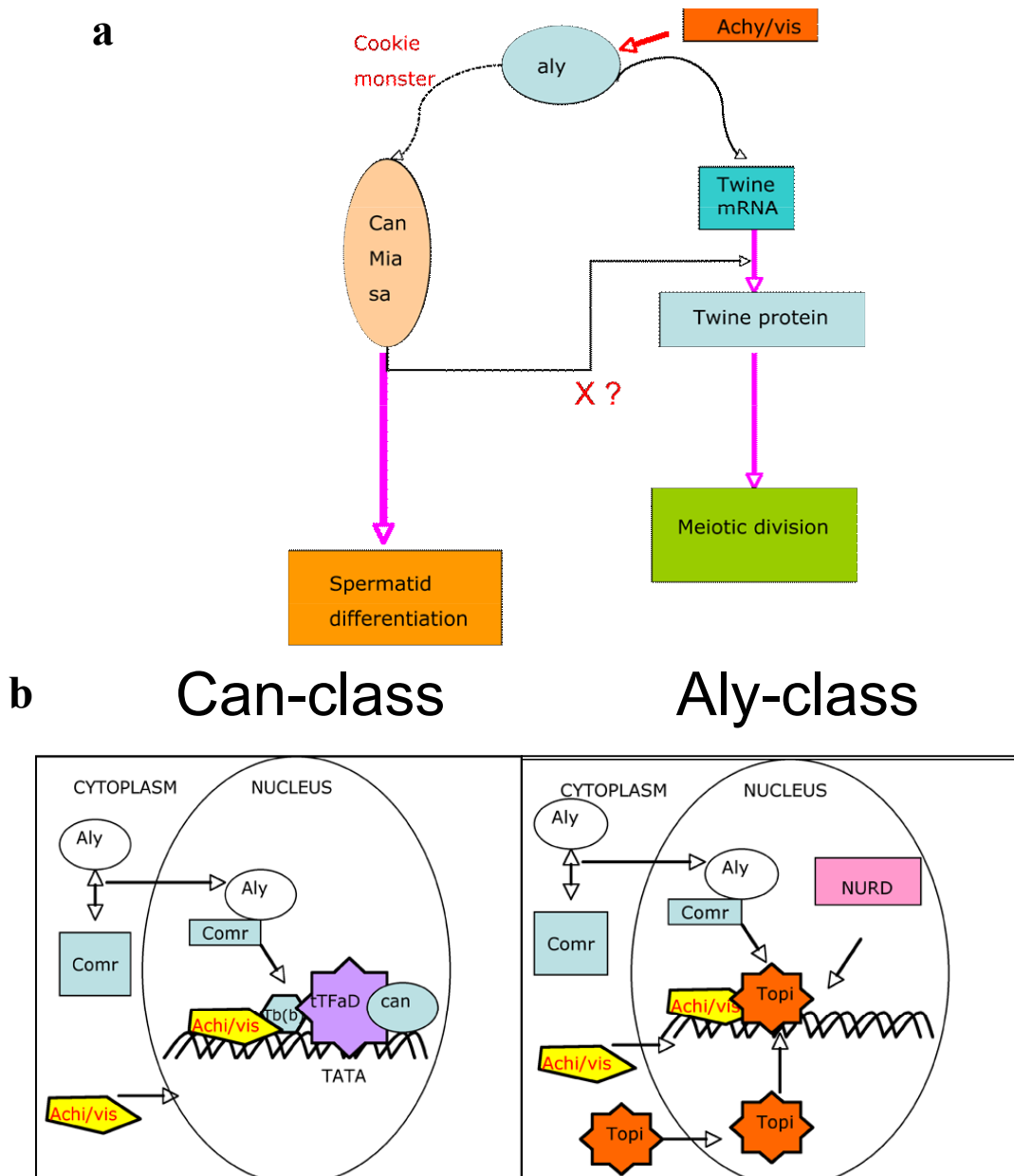


Fig.17- In (a) è rappresentato il modello che spiega il ruolo dei geni di arresto meiotico nel coordinare la meiosi e il differenziamento degli spermatidi. I geni *can*, *mia* e *sa* interagiscono nella stessa via biologica per attivare la trascrizione di una serie di geni richiesti per il differenziamento degli spermatidi. Uno o più geni di questo gruppo intervengono nella traduzione o nella stabilizzazione della proteina Twine, per assicurare che la divisione meiotica non inizi fin quando i geni richiesti per il differenziamento degli spermatidi non vengono espressi. Il gene *aly* agisce a monte, probabilmente attraverso *can*, *mia* o *sa* che controllano i geni coinvolti per il differenziamento degli spermatidi; inoltre *aly* controlla la progressione del ciclo cellulare meiotico regolando la trascrizione di *twine* (tratto da H. White-Cooper, 1998). In (b) è rappresentato il modello d'azione dei prodotti dei geni d'arresto meiotico sui promotori dei geni bersaglio. L'attivazione dei promotori può dipendere esclusivamente dai geni della classe *aly*, inclusi *aly* e *cmr*, o possono richiedere l'intervento dei prodotti dei geni della classe *can*. In entrambi i casi i prodotti dei geni *aly* e *cmr* potrebbero interagire e lavorare insieme per promuovere il rimodellamento della cromatina sul promotore e i geni bersaglio seguito dal legame di specifici fattori trascrizionali agli elementi enhancer. Il legame di questi TAF porta all'inizio della trascrizione dopo che vengono reclutati fattori TFIID ubiquitari (nel caso della trascrizione dei geni *can* indipendenti o fattori TFIID testicolare specifici, incluso *can*, per la trascrizione dei geni dipendenti dalla classe *can*. (Tratto e modificato da White-Cooper, 2003)

3.2.1 Profilo di espressione di *mst36Fa* nei testicoli dei mutanti della classe *aly*

La trascrizione del gene *mst36Fa* è attivata negli spermatociti primari. Per verificare se l'attivazione della trascrizione di *mst36Fa* dipenda dai geni della classe *aly*, ho effettuato esperimenti di ibridazioni in situ con sonda marcata con digossigenina specifica per il gene *mst36Fa* su testicoli interi dissezionati da mosche omozigote mutanti per i geni di arresto meiotico della classe *aly*: *aly*, *cmr*, *ping pong* e *topi*. I risultati ottenuti (fig.18) mostrano che il trascritto *mst36Fa* è presente in quantità paragonabile al selvatico nei testicoli del ceppo mutante *topi*, al contrario, è presente in quantità drasticamente ridotta nei testicoli dei mutanti *aly* e *cmr* ed è completamente assente nei testicoli del ceppo mutante *ping pong*. Questo mi lascia dedurre che la trascrizione di *mst36Fa* è dipendente da Ping Pong (complesso formato dai fattori Achynta e Vismay) che riconosce il dominio cromatinico sul promotore di *mst36Fa* e recluta il complesso Aly/Cmr necessario per l'inizio della trascrizione del gene in esame.

3.2.2 Profilo di espressione di *mst36Fa* nei testicoli dei mutanti della classe *can*

L'attivazione di alcuni geni della spermatogenesi, come descritto nel paragrafo 3.2 necessita dell'interazione tra i fattori trascrizionali della classe *aly* e quelli della classe *can*. Per verificare se il meccanismo trascrizionale che accende la trascrizione di *mst36Fa* coinvolge fattori trascrizionali appartenenti ad entrambe le classi dei geni di arresto meiotico, ho effettuato esperimenti di ibridazione *in situ* con sonda marcata con digossigenina specifica per *mst36Fa* su testicoli dissezionati da mosche mutanti omozigoti per i geni della classe *can*: *cannonball*, *meiotic I arrest*, e *spermatocyte arrest*.

I risultati ottenuti rappresentati in fig.18, mostrano che il trascritto *mst36Fa* è presente, in quantità paragonabili al selvatico, nei testicoli delle mosche dei ceppi mutanti *sa* e *nht*, mentre nel mutante *mia* è espresso in quantità inferiore

rispetto alla quantità di trascritto presente nei testicoli del ceppo selvatico. Questo risultato lascia ipotizzare che il prodotto del gene *mia* funge da modulatore trascrizionale per *mst36Fa*.

3.2.3 Profilo di espressione di *mst36Fb* nei testicoli dei mutanti della classe *aly*

La regione genomica che guida la trascrizione del gene *mst36Fb* mappa nella sequenza di 180 cb (-170/+10) intorno al sito di inizio della trascrizione del gene come descritto nel paragrafo 3.1.4 . Anche in questo caso ho voluto investigare circa i fattori trascrizionali che riconoscono direttamente ed indirettamente il promotore di *mst36Fb* promotore e ne accendono l'espressione in una determinata finestra temporale. Di nuovo l'approccio che ho seguito è stato quello di verificare attraverso studi di interazione genica se la trascrizione di *mst36Fb* durante il processo di maturazione dei gameti maschili risponde ai fattori di regolazione genica spermatogenesi specifici finora caratterizzati. Ho effettuato esperimenti di ibridazione *in situ* con sonda marcata con digossigenina specifica per il gene *mst36Fb* su testicoli interi dissezionati da mosche mutanti per geni della classe *aly* (*aly*⁵, *cmr* , *topi* e *ping pong*), stranamente i nostri dati indicano che il trascritto *mst36Fb* è rilevabile in quantità paragonabili al selvatico in tutti i ceppi mutanti della classe *aly* sopra citati (fig.19). Questo suggerisce che la trascrizione del gene *mst36Fb* risponde a meccanismi molecolari che coinvolgono fattori trascrizionali della classe *aly* non ancora caratterizzati.

3.2.4 Profilo di espressione di *mst36Fb* nei testicoli dei mutanti della classe *can*

I fattori trascrizionali appartenenti alle due classi di arresto meiotico *aly* e *can*, finora caratterizzate, possono interagire per modulare l'espressione dei geni

bersaglio o agire in maniera indipendente interloquendo con altri fattori non ancora caratterizzati.

L'attivazione della trascrizione del gene *mst36Fb* è risultata indipendente dai fattori della classe *aly* finora caratterizzati. Sono andata quindi a constatare se i fattori codificati dai geni della classe *can* finora caratterizzati (*mia*, *sa*, *nht*) intervengano nell'espressione del gene *mst36Fb*. Ho effettuato esperimenti di ibridazione in situ con sonda specifica per *mst36Fb* sui testicoli dissezionati da mosche dei ceppi mutanti *can*, *mia* ed *nht*. I risultati delle ibridazioni (fig. 19) rivelano che il trascritto *mst36fb* è presente in quantità paragonabili al selvatico in tutti i mutanti e quindi la sua trascrizione non risulta dipendente dai fattori della classe Can finora caratterizzati a differenza di quanto accade per *mst36Fa*.

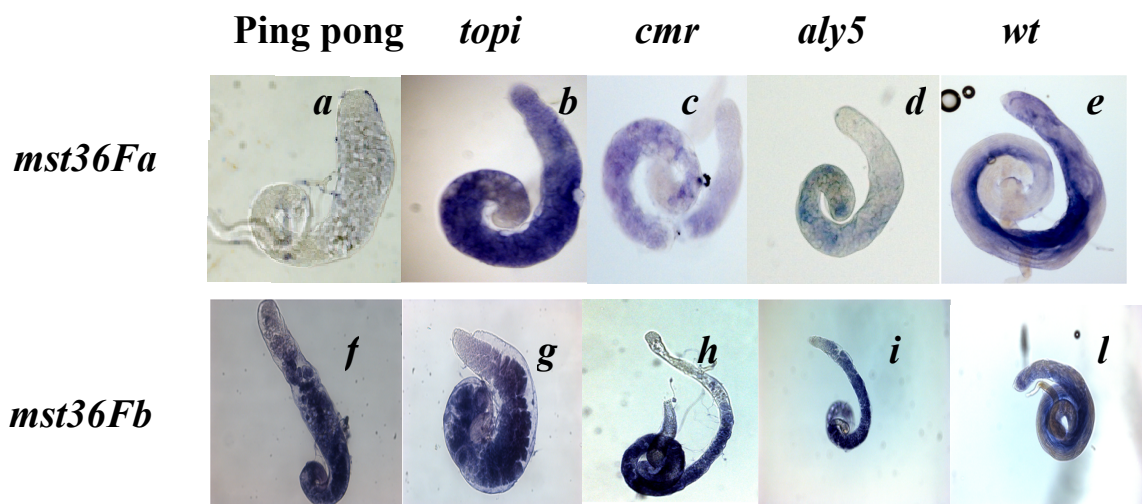


Fig.18- Ibridazione in situ su testicoli interi dissezionati da ceppi selvatici w^{1118} e dai ceppi mutanti per i geni di arresto meiotico della classe *aly*: *ping pong*, *topi*, *cmr* e *aly5* Le sonde utilizzate sono ribosonde specifiche per da *mst36Fa* (a,b,c,d,e) ed *mst36Fb* (f,g,h,i,l), rispettivamente.

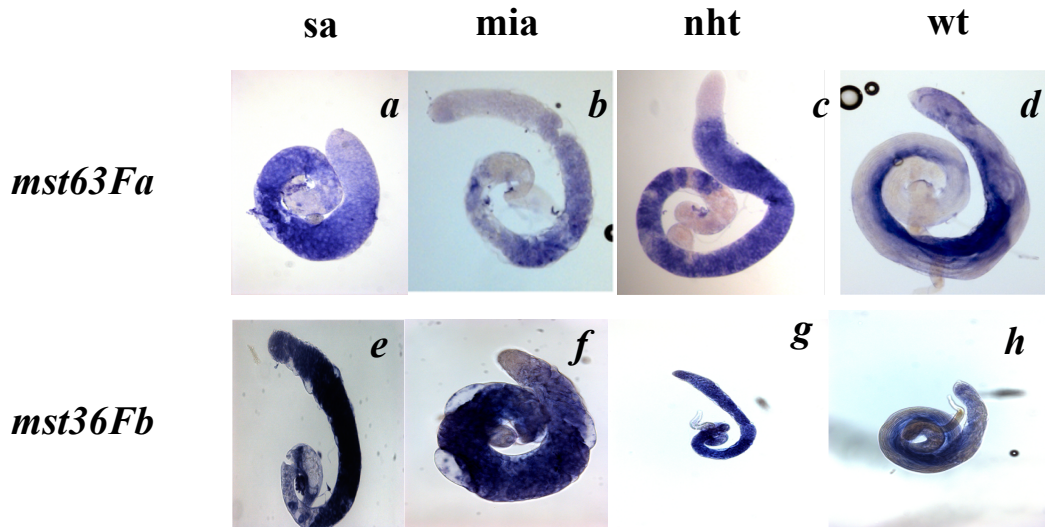


Fig.19- Ibridazione in situ su testicoli interi dissezionati da ceppi selvatici w^{1118} e dai ceppi mutanti per i geni di arresto meiotico della classe *can*: *sa*, *mia* e *nht*. Le sonde utilizzate sono ribosonde specifiche per *mstFa* (a,b,c,d) ed *mst36Fb* (e,f,g,h), rispettivamente.

3.3 Analisi funzionale del cluster *mst36F*

Le complesse vie del differenziamento cellulare che hanno luogo durante la gametogenesi nei maschi di *Drosophila melanogaster* sono ancora poco conosciute rispetto a quelle che guidano altri eventi dello sviluppo quali l'embriogenesi o l'oogenesi. L'isolamento e la caratterizzazione di geni specifici della linea germinale maschile aiuta a far luce sui complessi meccanismi molecolari coinvolti nel differenziamento cellulare durante il processo di spermatogenesi e a dissezionare le vie geniche e metaboliche alla base del processo. Contemporaneamente alla caratterizzazione dell'espressione genica del cluster *mst36F*, ho così intrapreso uno studio funzionale dei geni, al fine non solo di individuare una loro funzione nelle vie metaboliche che guidano il differenziamento dei gameti ma anche per analizzare come stanno evolvendo

l'uno rispetto all'altro i geni del cluster. Per fare ciò ho intrapreso lo stesso percorso sperimentale per entrambi i geni. Per prima cosa ho effettuato un'analisi bioinformatica delle sequenze amminoacidiche di entrambi i prodotti genici al fine di individuare la presenza di domini o motivi strutturali conservati nell'evoluzione e che potessero darmi indicazione sulla funzione delle proteine; successivamente ho intrapreso un'analisi molecolare funzionale utilizzando due differenti approcci sperimentali: uno studio volto alla determinazione della localizzazione sub-cellulare di entrambi i prodotti genici e l'analisi di mutanti per ciascuno dei due geni in esame. I risultati ottenuti sono riportati nei paragrafi seguenti separatamente per *mst36Fa* e *mst36Fb*.

3.3.1 Analisi bioinformatica del gene *mst36Fa*

Il gene *mst36Fa* codifica per una presunta catena peptidica con un peso molecolare di circa 58 kDa e un punto isoelettrico di 8.94.

L'interrogazione della banca dati Blastp attribuisce alla catena peptidica analizzata un'identità che va dal 20 al 25% e una similarità del 40-50% con le sequenze amminoacidiche della Miosina I e della Paramiosina (distribuita su un frammento amminoacidico lungo 310/190) appartenenti a specie differenti nella scala evolutiva, compreso l'uomo. Analisi della sequenza amminoacidica utilizzando il programma Psort hanno consentito di individuare due putativi segnali di localizzazione nucleare bipartitica, mentre non sono stati predetti domini transmembrana e mitocondriali (tab 3.1). In seguito ad analisi di predizione della struttura secondaria della proteina il programma Coil ha individuato due motivi coiled coil in posizione 303-335 e 370-411. Inoltre mentre una analisi effettuata interrogando le banche dati proteiche Prosite e Pfam non ha rivelato la presenza di elementi strutturali ben caratterizzati e conservati nell'evoluzione la banca dati proteica Smart ha identificato lungo la sequenza a.a di MST36Fa differenti motivi strutturali presenti in altrettante differenti famiglie proteiche. Di tutti i motivi identificati nella catena

amminoacidica quello che a mio parere merita attenzione è il cosiddetto dominio proteico Bar (tab.3.3) presente nel tratto di sequenza amminoacidica 39-239, e presente anche nelle sequenze a.a della Paramiosina e della Miosina I con cui MST36Fa presenta identità. La presenza del dominio Bar, caratteristico di molte proteine coinvolte nei meccanismi di trasporto intracellulare che interviene in numerosi processi, lascia ipotizzare un coinvolgimento della proteina nei meccanismi di trasporto intracellulare che intervengono durante l'allungamento e l'individualizzazione degli spermatidi.

Nella porzione C-terminale della catena a.a. ho identificato un tratto ricco in lisina caratterizzato dalla ripetizione di 10 residui di lisina ogni 4 posizioni, non riscontrato in altre proteine oltre queste del cluster *mst36F*. L'analisi bioinformatica mi ha fornito solo deboli indicazioni riguardo una ipotetica funzione della proteina MST36Fa per cui ho intrapreso studi molecolari volti a determinare la localizzazione subcellulare di MST36Fa.

a)

MPHKKTTKHLKA>VVPGMVSLEGEQFDSWEIPFPLPEQEDPSMCRDEFLKDLIREHES
RVASLVVRSTVRDVSIVKRPVELQDTDVKEAEAMVVLQMAQKRQRTSVRRTME
EVIASIRLRSTIIADLIRQVQKAAIEFLSVRLRLQRLFSMPWPGDLEETPNNLFS
WSLDDFLLRLDVKQIYLDVLNRRERSVKDLDCVKFCKDLSEIEHLIHEIRDRDD
VDLCENSLHLLKNAQYHMNAPWVKSLNDNIENLASSASVALLNEQSGSLTSLRRNS
 SAMIVFERKSALNPIETRYQINWFKSCTDQRLTRMNERNVEIKRELQDLEVQAVQ
DEKVQYSSGLMYELEVGKLRRESIRNWQDRLDTDLEHADVMCTVSRLALQKVKDDL
KFYMEQKDMYLQRIKEVQALIDQERMIREERELAALKRMSRGSLRKSVPKSTKNE
QKSKGKSEKKSELKSEIKSDTKPEMKTERKSDLKAERKSKTMAEKSQRKSTNSKM
 E

b)

```

Mst36Fa  SIVKR...--- --PVELQDTD --VKEAE--A MVVLQMAQ-- KRQRTSVRRT MEEVIASIRL R...STIIAD LIRQV--
QKA
SH31_MOUSEGLKKQ...-FY KASQLVSEKV GGAEGTK-LD DDFKMEKKV DVTSKAVAEV LVRTIEYLQP N...PASRAK
LTMLNTVSKI
Q9DDR3   GFKKQ...-FY KASQFVSEKV GGAEGTK-LD DDFTEMEKKY DTTNKAVMDI ITKTQEYLQP N...PASRAK
LGMLNTMSKI
SH32_MOUSEGLKKQ...-FH KATQKVSEKV GGAEGTK-LD DDFKEMERKV DVTSRAVMEI MTKTIEYLQP N...PASRAK
LSMINTMSKI

Mst36Fa  AIEFLSV--- ----- ----RLLRQL RLFSPMPWPGD LEETPNNLFS ----- -WSLDDFLLR L---
DVKQIYL
SH31_MOUSE RGQVKNPGY P QSEGLLGECM VRHGKELGGE SN-FGDALLD AGESMKRLAE VKDSL DIEVK QNFIDPLQNL
CDKDLKEIQH
Q9DDR3   RGQVKSTGY P QPEGLLGEAM AKYGKDMGTE SC-FGLALAD VGESMKQMAE IKDSL DIDVK QNFLDPMQAL
QDKELKEIGH
SH32_MOUSE RGQEKPGYP Q QAEALLAEAM LKFGRELGD CN-FGPALGE VGEAMRELSE VKDSL DMEVK QNFIDPLQNL
HDKDLREIQH

mst36Fa  DVLNRERSVK DLDCVK---- FCKDLSEI-- --EHLIHE.. ..IRDRDD VDLCE.N.SLH LLKNAQYHMN
APWVKSLNDN
SH31_MOUSE HLKKLEGRR L DFDYK----- --KRQKIP- -----.. ..-DEELRQA LEKFEE.SKE VAETSMHNL ETDIE-
QVSQ
Q9DDR3   HLKKLEGRR L DFDYK----- --KRLGKIP- -----.. ..-DEEIRQA EEKFEE.SRE VAASSMHNLV ESEIE-
QVSQ
SH32_MOUSE HLKKLEGRR L DFGYK----- --KRQKIP- -----.. ..-DEELRQA LEKFDE.SKE IAESSMFNL EMDIE-
QVSQ

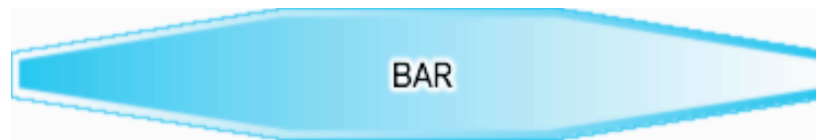
Mst36Fa  IENLAS---- --SASVALLN EQSGSLTS
SH31_MouseLSALVDAQLD YHRQAVQILE ELADKLR
Q9DDR3   LAALVDAQLE YHQRSAVLQ DLQAALHE
SH32_MOUSESALVQAQLE YHKQAVQILQ QVTVRL EE
    
```

Tab.3.1- In a) è riportata la sequenza amminoacidica di MST36Fa. Sono evidenziati: la sequenza peptidica in cui il programma Smart protein ha riconosciuto un dominio Bar (in arancione), i dieci residui di lisina individuati nella regione C terminale (in rosso), le sequenze dei due domini α -elica predette dal programma Coils (in grassetto nero), le due sequenze bipartitiche di localizzazione nucleare individuate dal programma Psort (sottolineate). In b) è mostrato l'allineamento tra la sequenza peptidica di MSAT36Fa contenente il dominio Bar e le sequenze dei domini Bar presente in altre proteine .

The domain within your query sequence starts at position 39 and ends at position 239; the [E-value](#) for the BAR domain shown below is 5152.47983.

SIVKRPVELQDTDVKEAEAMVVLQMAQKRQRTSVRRTMEEVIASIRLRSTIIADLRQVO
 KAAIEFLSVRLRLRQLRFLSMPWPGDLEETPNLFSWLDLDFLLRLDVKQIYLDVLRNRS
 VKDLDCVKFKDLSEIEHLIHEIRRDVDFRDDVLDLCELSLHLLKNAQYHMNAPWVKSLNDNI
 ENLASSASVALLNEQSGSLTS

BAR



SMART accession number:

SM00721

Description:

Endocytosis and intracellular transport involve several mechanistic steps:

- (1) for the internalisation of cargo molecules, the membrane needs to bend to form a vesicular structure, which requires membrane curvature and a rearrangement of the cytoskeleton;
- (2) following its formation, the vesicle has to be pinched off the membrane;
- (3) the cargo has to be subsequently transported through the cell and the vesicle must fuse with the correct cellular compartment.

Interpro abstract ([IPR004148](#)):

Members of the Amphiphysin protein family are key regulators in the early steps of endocytosis, involved in the formation of clathrin-coated vesicles by promoting the assembly of a protein complex at the plasma membrane and directly assist in the induction of the high curvature of the membrane at the neck of the vesicle. Amphiphysins contain a characteristic domain, known as the BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs)-domain, which is required for their *in vivo* function and their ability to tubulate membranes. The crystal structure of these proteins suggest the domain forms a crescent-shaped dimer of a three-helix coiled coil with a characteristic set of conserved hydrophobic, aromatic and hydrophilic amino acids. Proteins containing this domain have been shown to homo dimerise, heterodimerise or, in a few cases, interact with small GTPases.

GO process:

endocytosis ([GO:0006897](#))

GO component:

cytoplasm ([GO:0005737](#))

GO function:

protein binding ([GO:0005515](#))

Family alignment:

View or [CHROMA format](#) [CLUSTALW format](#) [MSF format](#) [FASTA format](#) [PIR format](#)

There are [364](#) BAR domains in 364 proteins in [SMART's nrdb](#) database.

Tab.3.2- In tabella è riportata la scheda informativa ottenuta dall'interrogazione della banca proteica Smart protein circa il dominio Bar presente nella sequenza amminoacidica di MST36Fa.

3.3.2 Studio della localizzazione subcellulare della proteina MST36Fa

Lo studio della localizzazione subcellulare di un prodotto proteico rappresenta il passo preliminare per la determinazione della funzione genica. Per poter determinare la localizzazione della proteina MST36Fa ho deciso di realizzare una linea transgenica esprime la proteina di fusione MST36Fa/GFP.

La linea transgenica è stata realizzata trasformando embrioni del ceppo di *Drosophila* w¹¹¹⁸ con un vettore ricombinante costruito utilizzando il vettore pUAST (Brand and Parrimon, 1993) (cap.2) che si inserisce stabilmente nel genoma della *Drosophila melanogaster* sfruttando la tecnologia dell'elemento trasponibile P, come descritto in Materiali e Metodi. Il costrutto utilizzato ha la regione codificante per la GFP in frame con la regione codificante per MST36Fa nella sua regione amminica-terminale, sotto il controllo di cinque sequenze intensificatrici di lievito, *UAS* di *Saccharomyces cerevisiae* che possono essere riconosciute dall'attivatore trascrizionale *Gal4* (Brand and Perrimon, 1993) (fig.20.b). I risultati riportati sono stati ottenuti su tre linee transgeniche indipendenti, ma per comodità mi riferirò solo ad un ceppo transgenico, il 193. Questo ceppo l'ho incrociato con i ceppi 8641 bloomington (w[1118]; P{da-GAL4.w[-]}3), 4442 bloomington (w[*]; P{w[+mC]=GAL4-nos.NGT}40) che esprimono il transattivatore di lievito Gal4 rispettivamente sotto i promotori dei geni *daughterless* e *nanos*, entrambi espressi nella linea germinale. Quindi il prodotto del gene *gal4* presente nella linea germinale, nelle fasi precoci della gametogenesi, permette di transattivare ad alti livelli il gene di interesse, che è sotto il controllo delle sequenze UAS, nella linea germinale della progenie F1. (Fig, 20 a-b). I maschi della F1 di tali incroci sono stati raccolti ad un giorno dalla nascita e dissezionati; i testicoli dissezionati, sia freschi e sia fissati in paraformaldeide, sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza (fig.21).

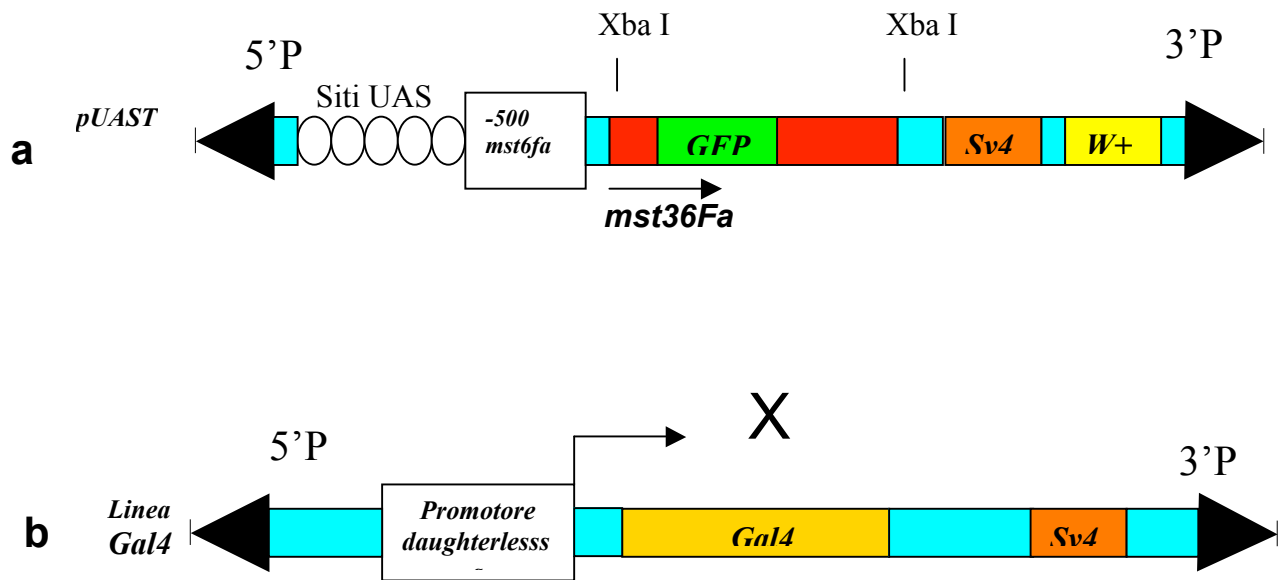
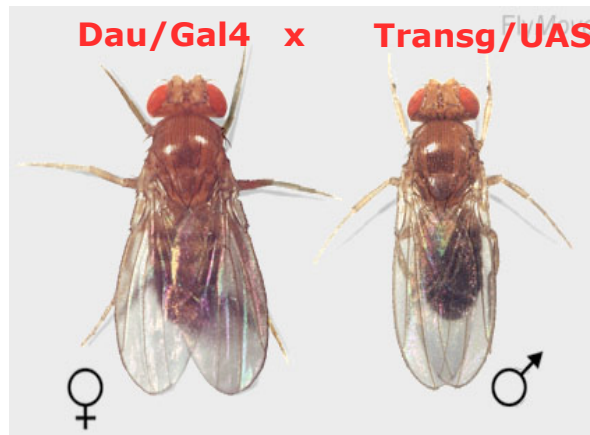


Fig.20-Rappresentazione schematica dell'incrocio utilizzato per attivare la trascrizione del costrutto ricombinante pUAST/MST36Fa/GFP attraverso il sistema Gal4/UAS di *Saccharomyces cerevisiae*. Le linee transgeniche generate dalla F1 esprimono nella linea germinale il transattivatore di lievito Gal4 sotto la guida del gene *daughterless* di *D. melanogaster* e il gene bersaglio *mst36Fa/gfp* sotto la guida delle 5 sequenze intensificatrici UAS. In (a) è schematizzato il costrutto inserito nel vettore pUAST codificante per la proteina ricombinante MST36Fa/GFP, mentre in (b) è rappresentato il costrutto inserito nella linea transgenica transattivatrice 8641 bloomington (w[1118]; P{da-GAL4.w[-]}3) in cui il promotore del gene *daughterless* regola l'espressione del transattivatore di lievito Gal4.

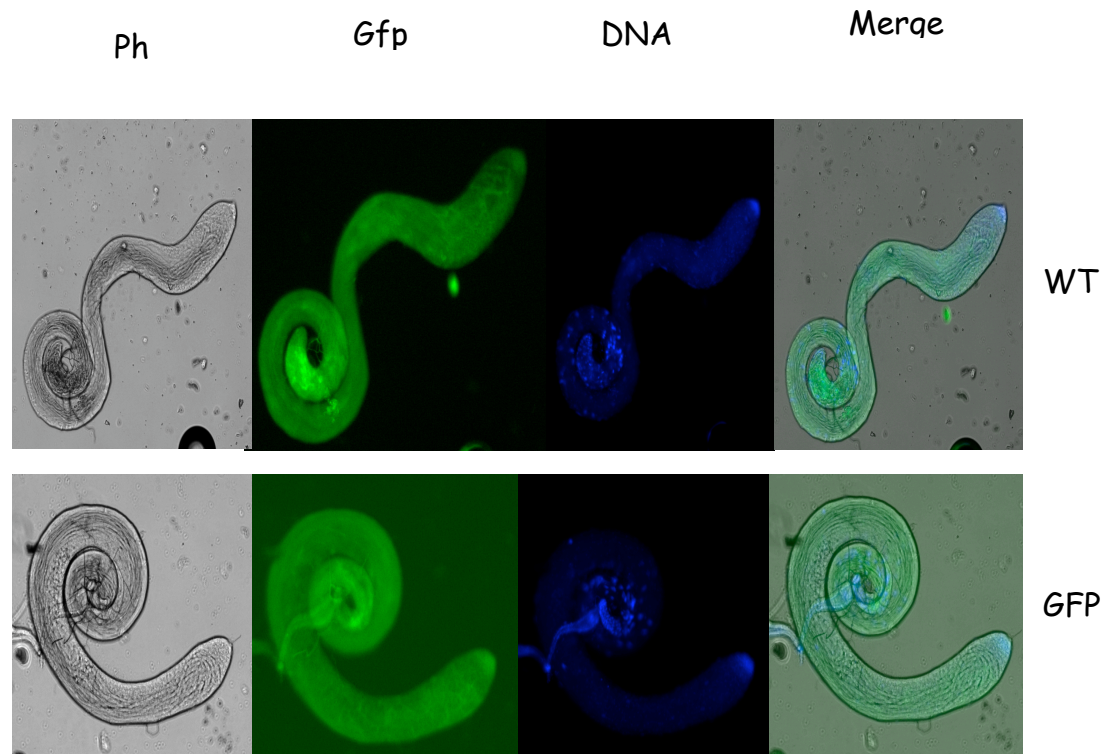


Fig.21- Testicoli interi, dissezionati dai maschi della F1 nati dall'incrocio schematizzato in fig.20 e da mosche selvatiche, sono stati osservati al microscopio a fluorescenza. Non è possibile effettuare localizzazione della proteina ricombinante MST36Fa/GFP attraverso il monitoraggio della GFP nei testicoli della linea transgenica(GFP) e il segnale di fluorescenza rilevato è paragonabile a quello osservato nel tessuto selvatico (WT).

Come si può vedere in figura 21 nei testicoli dissezionati dai maschi della F1 nati dagli incroci della linea transgenica MST36Fa/GFP con i rispettivi ceppi transattivatori non è possibile identificare alcun segnale di fluorescenza localizzato, ma si osserva solo un forte segnale di autofluorescenza paragonabile al selvatico.

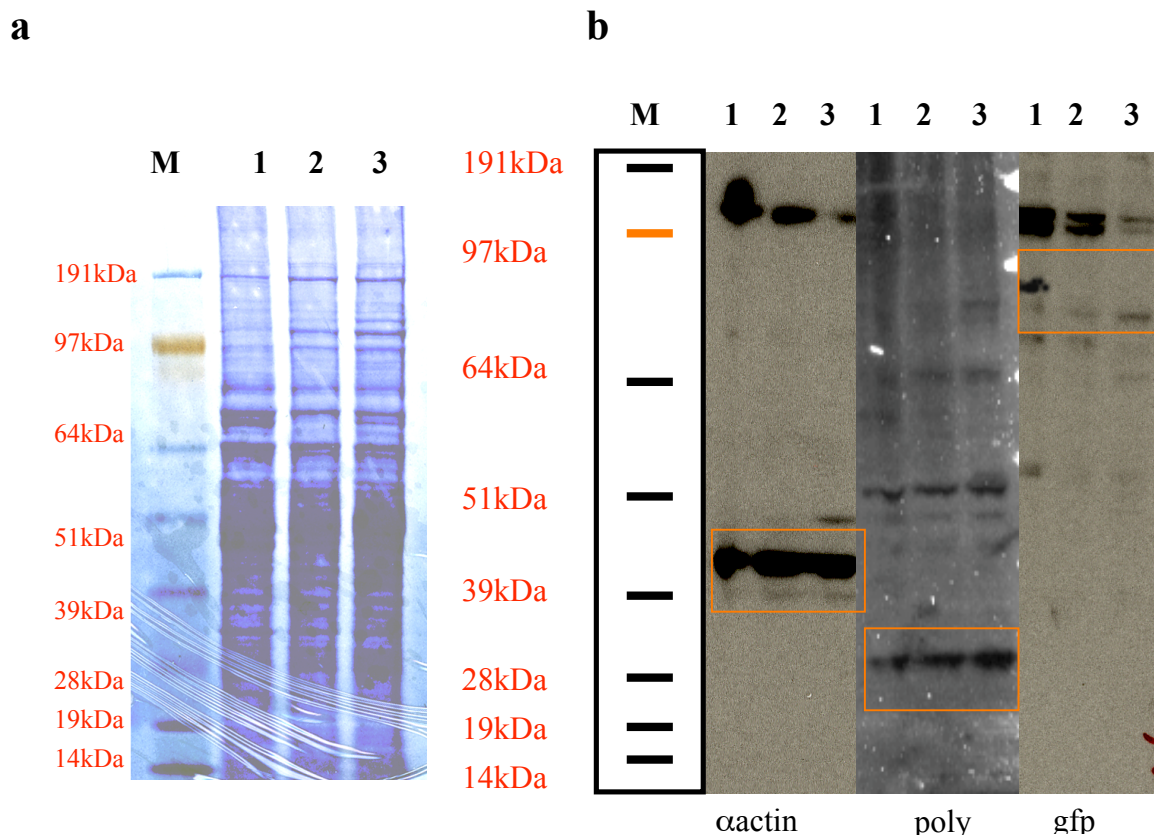


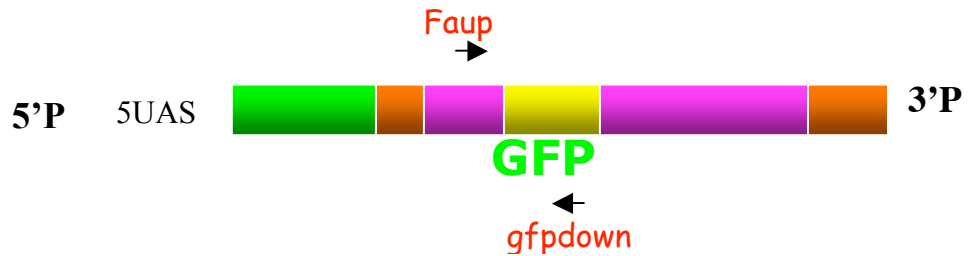
Fig.22- L'esperimento di Western blot è stato condotto su estratto proteico di testicoli dei ceppi Lamin/GFP(1) utilizzato come controllo positivo, w^{1118} (2) utilizzato come controllo negativo e MST36Fa/GFP (3); l'integrità degli estratti è stata verificata mediante corsa elettroforica su SDS PAGE 4-12% in condizioni denaturanti e successiva colorazione con Comassie blu(a). In (b) è riportato il risultato dell'esperimento di western blot che rivela la presenza della GFP nell'estratto proteico dei testicoli del ceppo di controllo Lamin/GFP ma non nell'estratto proteico dei testicoli MST36Fa/GFP. Come controllo interno dell'esperimento il trasferimento è stato effettuato contemporaneamente su 3 filtri che sono stati ibridati separatamente con anti α actina e anti poly. Lo sviluppo di tali films mostra segnale per actina e poly negli estratti di tutti e tre i ceppi(b).

Per capire se questa mancanza di fluorescenza specifica fosse dovuta ad un errato folding della proteina ricombinante o alla sua assenza, ho effettuato esperimenti di Western blot su estratti proteici di testicoli dissezionati da mosche ad un giorno dalla nascita, dei ceppi MST36Fa/GFP transattivati,

usando w^{1118} come controllo negativo, e Lamin/GFP come controllo positivo. L'esperimento di Western blot è stato effettuato utilizzando anticorpi anti-GFP per rilevare la presenza della proteina di fusione mentre, come controllo dell'integrità dell'estratto proteico con cui ho lavorato, ho utilizzato anticorpi contro α -actina, e contro poly, che sono due proteine espresse ubiquitariamente nei tessuti della mosca adulta. Come si può vedere in fig. 22, non è stata rilevata presenza della GFP nell'estratto proteico dei testicoli del ceppo MST36Fa/GFP transattivato, mentre è stata rilevata GFP nell'estratto proteico del ceppo Lamin/GFP (gentilmente donato dalla dottoressa Margarete Heck dell'Università di Edinburgo). Tale risultato mi ha suggerito che nei miei ceppi transgenici, vi sono problemi con la proteina ricombinante, o a livello della sua stabilità o a livello della traduzione del messaggero oppure a livello della trascrizione e della stabilità del costrutto ricombinante. Per verificare se il costrutto ricombinante è trascritto, sono andata ad effettuare un esperimento di RT-PCR su RNA totale estratto da maschi adulti del ceppo transgenico Mst36Fa/GFP transattivato, utilizzando la coppia di oligonucleotidi "fa1up" e "gfpdown" diagrammati in figura 23. Come si può vedere dalla fig. 23 (linea 3) il prodotto di amplificazione atteso, lungo 400 cb, e indice della presenza del trascritto ricombinante, non è stato identificato; invece, come controllo è stato possibile osservare la banda di 550 cb che rivela la presenza del trascritto del gene poly ubiquitariamente espresso nella mosca adulta. Questo risultato mi suggerisce che l'assenza della proteina ricombinante nei testicoli dei maschi MST36Fa/GFP transattivati è dovuta a problemi nella produzione del suo messaggero. Questo può essere probabilmente dovuto ad un'interferenza del processo di trascrizione causato dalla regione di 500 cb interposta tra il promotore del gene *mst36Fa* localizzato nella sua regione 5' nontradotta e le 5 sequenze UAS di lievito. Sulla base di tali considerazioni ho preparato un altro costrutto ricombinante in cui la sequenza genomica del gene *mst36Fa* a partire dal suo sito d'inizio della trascrizione è stata clonata nel sito di multi clonaggio

del vettore pUAST immediatamente a valle delle 5 sequenze UAS. Tale vettore è stato utilizzato per trasformare embrioni del ceppo w^{1118} , portando ad ottenere diverse linee transgeniche che sono attualmente sotto analisi.

a



b

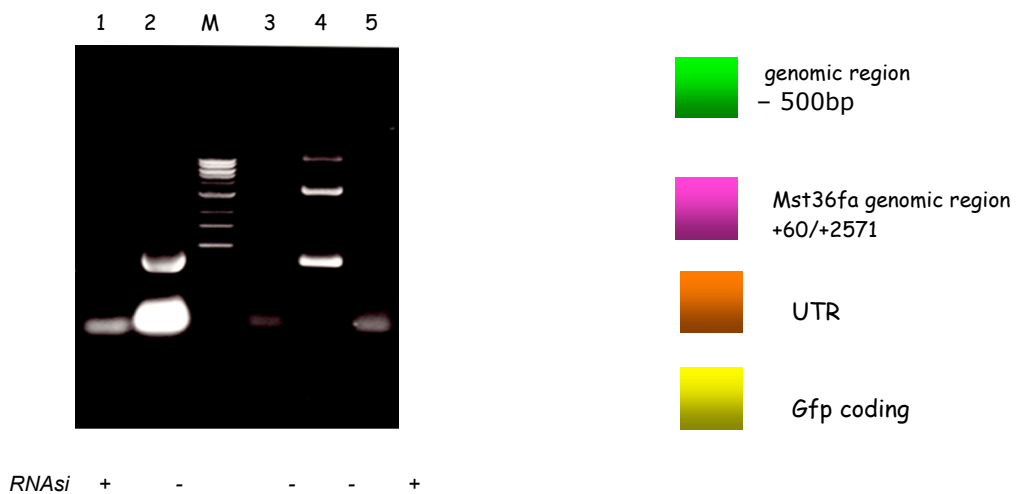


Fig.23- Saggio di RT-PCR. In (a) è diagrammata la coppia di oligo utilizzata per l'esperimento di RT-PCR. In (b) è riportato il risultato dell'esperimento di RT-PCR condotto su RNA totale estratto dal ceppo MST36Fa/GFP. I prodotti di RT-PCR analizzati su gel agarosio 0.8% hanno rilevato l'assenza del trascritto ricombinante (fig. b, linea 3) che doveva essere indicata dalla presenza di un prodotto di amplificazione di 0.4 Kb come dimostrato dalla grandezza della banda ottenuta dalla reazione di amplificazione effettuata sul DNA ricombinante (fig.b, linea 4). L'integrità dell'RNA usato è dimostrato dalla presenza della banda delle dimensioni attese, 0.470 kb, ottenuta dal saggio di RT-PCR effettuato utilizzando una coppia di oligo specifici per il trascritto del gene poly ubiquitariamente espresso nei testicoli della mosca adulta (fig. b, linea 2).Gli esperimenti sono stati condotti dopo trattamento con RNAsi A(fig. b linea 1 e 5).Il marcatore di peso molecolare (M) utilizzato è 1 Kb Biolabs.

3.3.3 Studio del “mutante” di *mst36Fa* ottenuto per interferenza genica

L'analisi di mutanti risulta di grande aiuto per intraprendere studi funzionali e talvolta costituisce il passo fondamentale per la determinazione di una funzione genica.

Non avendo a disposizione mutanti ottenuti per mutagenesi chimica, inserzione o delezione ad opera degli elementi trasponibili P, ho deciso di ingegnerizzare un ceppo selvatico per ottenere mutanti gene specifici per il gene *mst36Fa*. La strategia sperimentale da me seguita è stata quella di creare una linea mutante per silenziamento genico utilizzando la tecnologia dell'interferenza genica mediata da molecole di RNA doppio filamento. Per ottenere questo mutante ho costruito un vettore ricombinante utilizzando il plasmide ingegnerizzato SympUAST (paragrafo- cap.2). Tale vettore porta ad ambo i lati del sito di multiclonaggio 5 sequenze intensificatrici di lievito UAS, la sequenza del promotore basale del gene heat shock *hsp70* e il terminatore del virus *Sv40* disposti simmetricamente (fig.24). Nel sito di multiclonaggio è stata clonata la sequenza genomica di *mst36Fa* che comprende metà del terzo esone del gene, il terzo introne e quasi tutto il quarto esone, regione che presenta la minore percentuale di identità nucleotidica (36%) con il secondo gene del cluster, *mst36Fb*. Tale vettore ricombinante è stato utilizzato per trasformare embrioni del ceppo w¹¹¹⁸. Le linee transgeniche ottenute sono state incrociate con il ceppo 8641 che esprime il transattivatore di lievito Gal4 nella linea germinale. La sequenza genomica clonata nel vettore viene trascritta su entrambi i filamenti grazie alla presenza del promotore basale di *hsp70* e delle 5 sequenze UAS di lievito disposte con polarità invertita ad ambo i lati del sito di multiclonaggio. In questo modo si ottiene la formazione di una molecola di RNA a doppio filamento in grado di richiamare il complesso proteico della Dicer e di attivare il meccanismo di interferenza genica che porta al silenziamento del gene bersaglio (Giordano et al, 2002).

3.3.4 Analisi molecolare del “mutante” *mst36Fa*

Una volta ottenuto il ceppo ingegnerizzato sono andata a verificare se l'interferenza funziona a livello molecolare. Per verificare ciò ho eseguito un saggio di RT-PCR su RNA totale estratto da maschi del ceppo interferito che esprimono sia il costrutto dell'interferenza, sia il transattivatore di lievito Gal4. L'esperimento di RT-PCR è stato condotto utilizzando gli oligonucleotidi diagrammati in figura 24a specifici per verificare la presenza del trascritto *mst36fa* nella popolazione di RNA estratta dall'interferito e dal selvatico. Gli esperimenti sono stati condotti in presenza e assenza di RNAsi per verificare che le bande osservate siano il risultato di amplificazioni sull'RNA e non su contaminazioni di DNA genomico. Inoltre l'integrità dell'RNA utilizzato è stata testata conducendo l'esperimento utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifici per il gene *poly*. Come è mostrato in figura 24 b non è stata rilevata la presenza del trascritto *mst36Fa* nella popolazione di RNA estratto dal ceppo interferito mentre tale trascritto è stato individuato nell'RNA estratto dal ceppo selvatico. Questo dimostra che il meccanismo di interferenza genica viene attivato nel ceppo da me ingegnerizzato ed è in grado di degradare completamente il trascritto *mst36Fa*. Risultato interessante è stato riscontrare l'assenza anche del trascritto di *mst36Fb* nella popolazione di RNA totale estratta dal ceppo interferito per *mst36Fa*. Questo dato mi fa dedurre che la sequenza presente nel costrutto ricombinante *interFa* è in grado di silenziare anche il secondo gene del cluster *mst36F*. In conclusione, i risultati ottenuti dall'analisi molecolare dell'interferenza mi consentono di affermare che il mutante per interferenza, *interFa*, in condizioni di transattivazione, presenta il silenziamento di entrambi i geni del cluster *mst36F*.

3.3.5 Analisi funzionale del mutante per interferenza genica *mst36Fa*

Una volta accertata l'efficienza della tecnologia del silenziamento genico a livello molecolare, sono andata a verificare gli effetti fenotipici del silenziamento. La cosa più semplice da fare mi è sembrata quella di testare il mutante in un test di fertilità per verificare se lo spegnimento dei geni del cluster *mst36F* ha effetti su di essa.

Il test è stato condotto andando ad effettuare trenta incroci singoli in cui un maschio del ceppo *interFa* transattivato, vecchio di un giorno, è stato accoppiato con tre femmine vergini del ceppo w^{1118} . Allo stesso tempo sono stati effettuati anche trenta incroci singoli di controllo dove un maschio del ceppo selvatico $w^{1118}/daGal4$, è stato accoppiato con tre vergini dello stesso ceppo. Gli incroci sono stati portati avanti a 25°C. I barattoli sono stati svuotati dei genitori dopo tre giorni dall'inizio del test. A partire dal decimo giorno fino al quindicesimo ho contato il numero della progenie nata viva dagli incroci con i maschi del ceppo *interFa* e con il ceppo selvatico. Come si può vedere dall'istogramma in Tab. 3.4, la progenie nata dagli incroci $\bigcirc \rightarrow$ (*interfa*) X $\bigcirc \times$ (w^{1118}) risulta del 30% inferiore in numero rispetto a quella nata dagli incroci di controllo $\bigcirc \rightarrow$ ($w^{1118}/daGal4$) X $\bigcirc \times$ (w^{1118}).

Questo risultato suggerisce che il gene *mst36Fa*, se silenziato determina un significativo abbassamento della fertilità.

Un' analisi a livello citologico di questi maschi "interferiti" non ha tuttavia evidenziato grossolane alterazioni morfologiche. Sono quindi in corso analisi ultrastrutturali che si avvalgono di marcatori cellulari e dell'utilizzo della microscopia confocale.

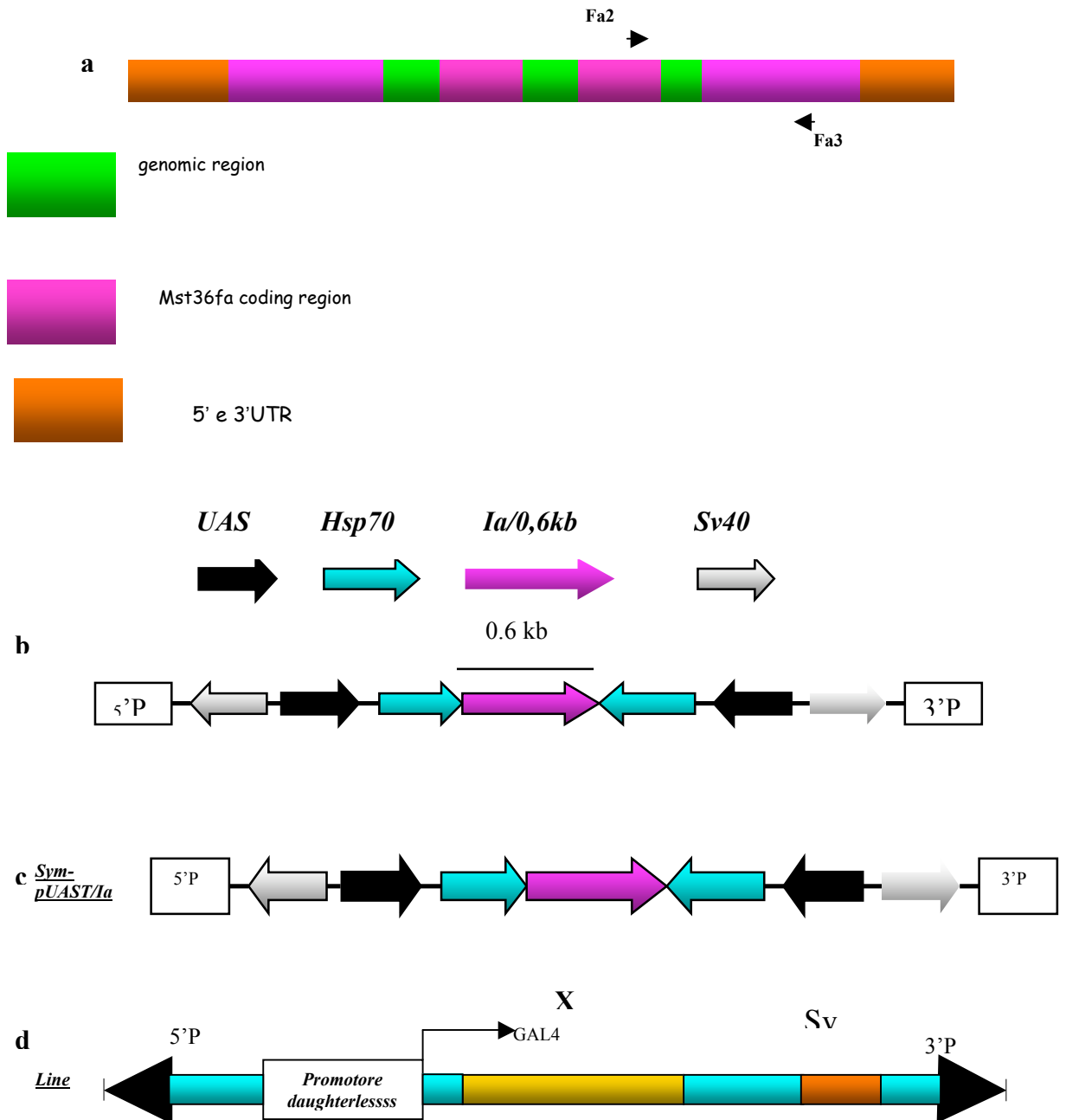


Fig.24-Rappresentazione schematica della regione genomica di *mst36Fa* amplificata con gli aligo Fa2 ed Fa3 diagrammati in (a). Il prodotto di amplificazione è stato clonato nel vettore *SympUAST* (b). Tale regione (freccia fucsia) è stata inserita nel sito di multiclonaggio del vettore a valle del promotore di *hsp70* guidato da 5 sequenze intensificatrici di lievito e stabilizzata dal terminatore di SV40. Tali sequenze regolatrici sono disposte da ambo i lati del sito di multiclonaggio ma con orientamento invertito in modo da consentire la trascrizione di entrambi i filamenti dell'inserto (b). Maschi che portano inserito stabilmente nel proprio genoma il transgene *Sym-pUAST/Ia*, diagrammato in (c), sono stati incrociati con femmine vergini 8641 bloomington (*w[1118]; P{da-GAL4,w[-]}3*) che esprimono il transattivatore di lievito Gal4 sotto la guida del gene *daughterless* specifico della linea germinale (d).. In tal modo nella F1 il transgene *Ia* sarà trascritto su entrambi i filamenti nella linea germinale.

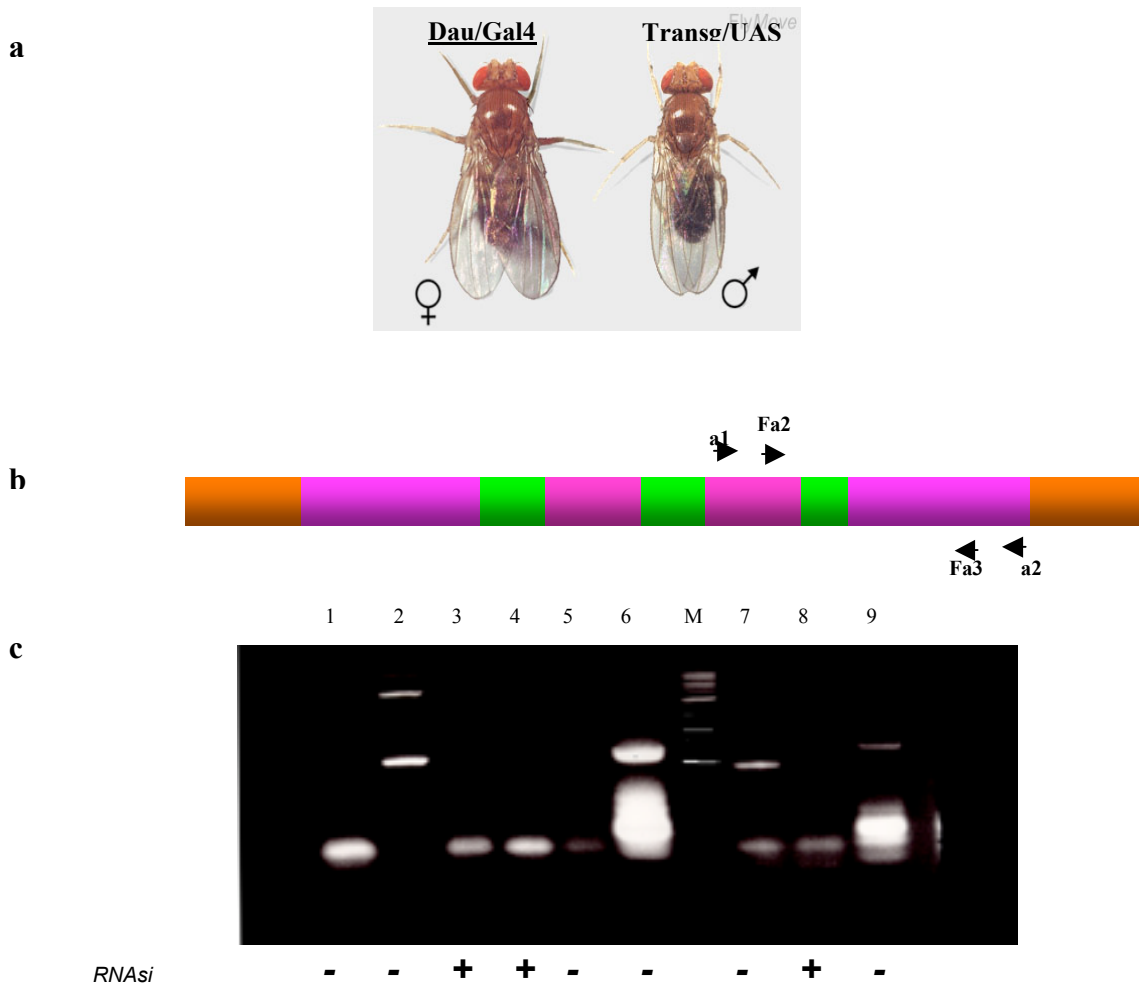


Fig.25-L'attivazione trascrizionale del transgene Ia guida il silenziamento molecolare di entrambi i geni del cluster *mst36F*. In (a) è diagrammato l'incrocio effettuato per ottenere il silenziamento del gene *mst36Fa*. Dai maschi della F1 è stato estratto RNA totale si è effettuato un esperimento di RT-PCR per verificare se il transgene è in grado di condurre il silenziamento genico di *mst36Fa* in tali maschi. Come è rappresentato in (c) *mst36Fa* è completamente silenziato dal transgene (linea1), in quanto non è stato osservato il prodotto di amplificazione atteso di 0,6 kb, utilizzando la coppia di oligonucleotidi gene specifici a₁ ed a₂,(b) prodotto che è invece amplificato da reazione di PCR effettuata con la stessa coppia di oligo sul clone di DNA 5b (linea2). Allo stesso tempo non è stato possibile rilevare la presenza del trascritto *mst36Fb* (linea 5) nella stessa popolazione utilizzando gli oligo specifici b1 e b2 (fig.28 b). Al contrario il prodotto di amplificazione di *mst36Fa* (0.6 kb) delle dimensioni attese è stato identificato nella popolazione di RNA estratta dal ceppo selvatico w¹¹¹⁸ (linea7). Le reazioni sono state condotte anche in presenza RNasiA per verificare che non ci siano contaminazioni di DNA genomico (linea 3,4,8). L'integrità degli RNA utilizzati è stata dimostrando effettuando una reazione con una coppia di oligonucleotidi specifici per il trascritto del gene ubiquitario *poly* (linea 6, 9). Il marcatore di peso molecolare utilizzato è 1 kb Biolabs.

3.3.6 Analisi bioinformatica del gene *mst36Fb*

Il gene *mst36Fb* codifica per una catena peptidica con un peso molecolare di 55kDa ed un punto isoelettrico pari a 9. Analisi della sequenza amminoacidica in banca dati hanno rivelato che MST36Fb presenta un'identità di sequenza del 20% e una similarità del 45-50% con le sequenze di proteine della membrana periferica del Golgi e della Gamma-taxilina presenti in varie specie nella scala evolutiva, compreso l'uomo, sebbene al di fuori dei domini funzionali come suggerito dalla banca dati Smart.

Studi effettuati utilizzando i programmi Prosite e Pfam non hanno individuato domini funzionali che permettono di inserire la proteina in nessuna delle famiglie proteiche caratterizzate. Un'analisi utilizzando il programma Psort ha identificato tre segnali di localizzazione nucleare bipartitica mentre mancano segnali di localizzazione mitocondriale e sono assenti domini transmembrana. Un dominio coiled-coil è stato identificato in posizione 375-410 nella sequenza amminoacidica utilizzando il programma Coils (Lupas et al, 1991). Anche in questo caso nella regione C-terminale della proteina MST36Fb, ho identificato lo stesso motivo strutturale localizzato nella stessa regione in MST36Fa, ovvero la presenza di ripetizioni di quattro residui di lisina ogni quattro posizioni.

Per poter definire una funzione genica per il prodotto di *mst36Fb* ho intrapreso uno studio funzionale del gene attraverso la determinazione della sua localizzazione cellulare e l'analisi di un mutante.

MVSKKRKNSD ENKKKVETTF ESDPYEIKFP LPEQLDPSQC
RDEFIGTFIR
EHELRASSLR PRSTFRAASE FRSSQDLSDQ GPEKGAEAMV
VRQLVSQRKR
LSLRKTKEEI LENIKLRSTM MNDLNLKCQK AAIEFLSVRL
LKQLRLFSSP
WPGDTGDIPY NLFSWSMDDF LMRLAIKQVY LDVIHRERSA
EDLDCLKFCK
DLGQIELLIY EIREDYRNDR DLCQGSMELL RSAQYNINAP
WVSTLKDNLE
SIRSSTLTAR LFAQSSAFNI VLRHSSAMGA FEDESAQDPI
EMRYQINWIR
SCTDQRLYRI NGREEKMRKE LNDLEVQALQ DEKVRNSSEL
IYSLEVGKLR
ESVRVWQERL DTDLENAEVT CTVS**KLALQK** **VKDDIKFYKE**
QKDMYLQRIE
EVQAIIAQEQ GVFASTRTRL SRKSVRNSES KSERLSEKKS
ERKSENKIGR
KSERLSERRS ERKSRNSKMP

Tab. 3.3-Sequenza amminoacidica di MST36Fb. In figura sono evidenziati: i quattro residui di lisina individuati nella regione C terminale (in rosso), le sequenze del dominio α -elica predette dal programma Coils (in grassetto nero), le tre sequenze bipartitiche di localizzazione nucleare individuate dal programma Psort (sottolineate).

3.3.7 Studio della localizzazione sub-cellulare della proteina MST36Fb

Come riportato nel paragrafo 3.5.2, per comprendere una funzione genica è di grande aiuto andare a determinare dove è indirizzato il prodotto proteico da esso codificato, prima a livello cellulare ed in seguito a livello sub-cellulare scendendo nei dettagli dell'analisi ultrastrutturale.

Per ottenere maggiori informazioni circa la funzione di MST36Fb durante il processo di spermatogenesi ho ritenuto necessario utilizzare una via sperimentale che mi permettesse di determinarne in dettaglio la sua localizzazione all'interno della linea germinale maschile. La tecnologia da me adottata è stata quella di andare a creare una linea transgenica che esprimesse la proteina di fusione MST36Fb/RFP, ottenuta inserendo all'interno della cornice di lettura del primo esone del gene *mst36Fb* la sequenza codificante per la proteina fluorescente RFP (Red fluorescent protein) estratta dallo cnidario *Discosoma striata* (fig. 26). Nel sito di multiclonaggio del vettore della linea pUAST utilizzato, è stata clonata l'intera sequenza genomica di *mst36Fb*, comprensiva di una sequenza di 500 cb a monte del sito di inizio della trascrizione del gene in esame, immediatamente a valle delle 5 sequenze intensificatrici di lievito UAS (fig.26). Il vettore non è stato utilizzato per la realizzazione delle linee transgeniche poichè in seguito ai problemi di espressione osservati per la proteina di fusione MST36Fa/GFP ho preferito ottimizzare la tecnologia utilizzata. Solo dopo aver ottenuto risultati soddisfacenti nella localizzazione del prodotto MST36Fa/GFP procederò alla realizzazione della linea transgenica MST36Fb/RFP.

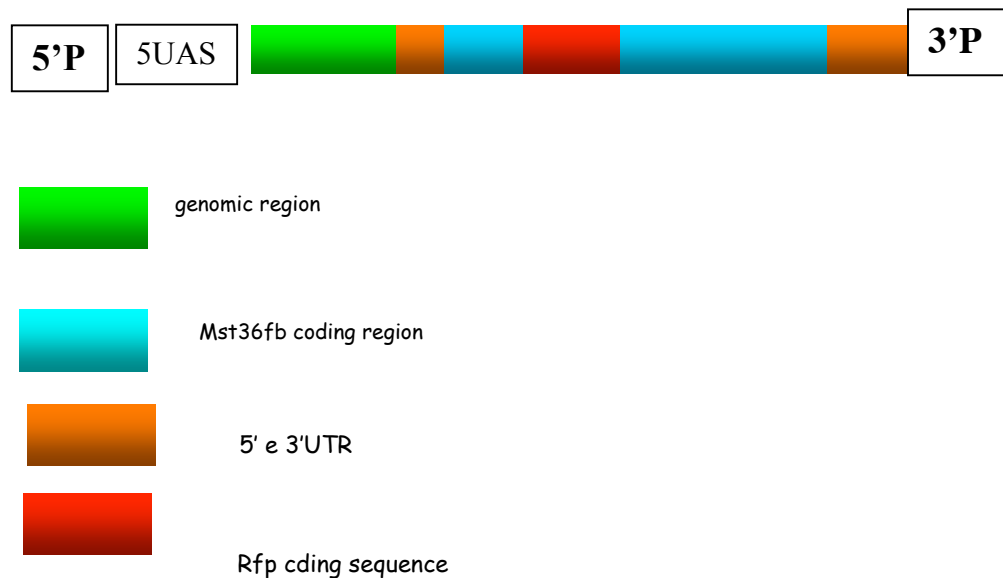


Fig.26-Rappresentazione schematica del costrutto ricombinante progettato per esprimere la proteina di fusione MST36Fb/Rfp.

3.3.8 Realizzazione del “mutante “ *mst36Fb* mediante RNAi

La determinazione della funzione genica di *mst36Fb* risulterebbe fortemente facilitata dall'analisi fenotipica di un mutante del gene in esame. Dato che, come precedentemente affermato per *mst36Fa*, non sono disponibili mutazioni chimiche, da inserzione o da delezione che disturbano la regione dove mappano i geni del cluster *mst36F*, anche in questo caso sono andata ad ingegnerizzare un ceppo al fine di ottenere una linea transgenica mutante per *mst36Fb* sfruttando la tecnologia l'interferenza genica.

Come per il gene *mst36Fa* (paragr.3.5.3) anche in questo caso per realizzare il silenziamento in maniera stabile del gene in esame, ho realizzato linee transgeniche che portano inserite nel proprio genoma il vettore ricombinante realizzato utilizzando il plasmide SympUAST (Cap. 2). All'interno del sito di multiclonaggio ho inserito la sequenza genomica comprensiva di metà del terzo esone, il terzo introne e il quarto

esone del gene in esame (fig.27), sequenza che presenta il minore grado di identità (36%) nucleotidica tra i geni del cluster. Tale regione viene trascritta su entrambi i filamenti sotto la guida della sequenza del promotore minimo del gene heat shock *hsp70* preceduto da 5 sequenze intensificatrici di lievito UAS disposte con orientamento simmetrico rispetto al sito di multiclonaggio. La molecola di RNA a doppio filamento trascritta dalla sequenza genomica illustrata in fig.27 può essere in grado di attivare il complesso proteico della Dicer e innescare il processo dell'interferenza genica specifica per *mst36Fb*. Le linee transgeniche ottenute dalla trasformazione con il costrutto sopra schematizzato sono state incrociate con il ceppo di *Drosophila melanogaster* 8641 (w[1118]; P{da-GAL4.w[-]}3). I maschi della f1 così ottenuti sono stati sottoposti alle varie analisi.

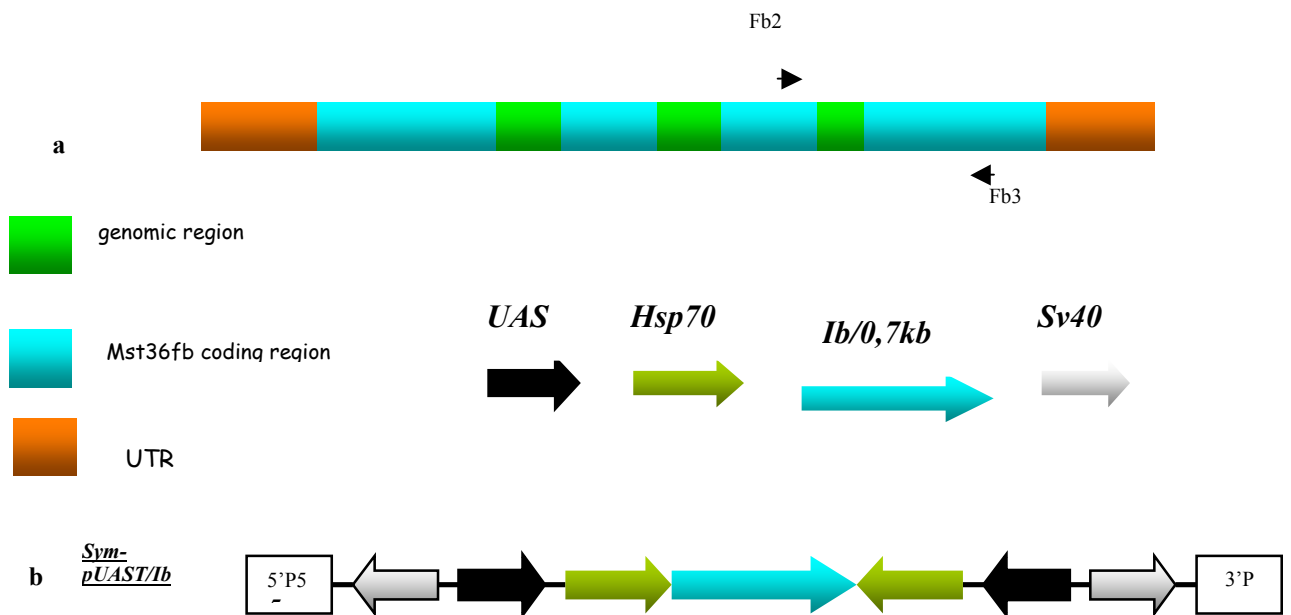


Fig.27-Rappresentazione schematica della regione genomica di *mst36Fb* amplificata con gli aligo Fb2 ed Fb3 diagrammati in (a).Il prodotto di amplificazione è stato clonato nel vettore SympUAST(cap.2). Tale regione (freccia celeste) è stata inserita nel sito di multiclonaggio del vettore a valle del promotore di *hsp70* guidato da 5 sequenze intensificatrici di lievito e stabilizzata dal terminatore di *sv40*. Tali sequenze regolatrici sono disposte da ambo i lati del sito di multiclonaggio ma con orientamento invertito in modo da consentire la trascrizione di entrambi i filamenti dell'inserto (b) .

3.3.9 Analisi molecolare del “mutante” ottenuto per interferenza genica di *mst36Fb*

Prima di andare a ricercare alterazioni a livello morfologico e funzionale nei testicoli del presunto mutante “interFb”, sono andata a verificare se la tecnologia utilizzata porta effettivamente ad una riduzione del trascritto *mst36Fb*. Per verificare ciò, ho effettuato un saggio di RT-PCR (cap.2) su RNA totale estratto da maschi adulti del ceppo interFb transattivato e come controllo su RNA totale estratto da maschi adulti del ceppo w¹¹¹⁸. Per identificare la presenza del trascritto *mst36Fb* nelle due popolazioni di RNA estratte, ho utilizzato la coppia di oligonucleotidi specifici diagrammati in fig.28 a. Inoltre sono stati condotti anche esperimenti utilizzando una coppia di nucleotidi specifici per il trascritto del gene *poly* ubiquitariamente espresso nei tessuti della mosca adulta come verifica dell'integrità dell'RNA utilizzato negli esperimenti. Data l'elevata identità in sequenza nucleotidica dei due trascritti *mst36F* ho condotto esperimenti di RT-PCR anche utilizzando una coppia di oligonucleotidi specifici per *mst36fa*, nella reazione su RNA estratto dal ceppo interFb, per verificare se l'interferenza opera in maniera gene specifica o se, anche in questo caso, è in grado di agire su tutto il cluster. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su un gel di agarosio 0.8% riportato in fig.28 c. Come si può vedere il trascritto *mst36fb* è assente nella popolazione di RNA totale estratto dai maschi adulti interfb transattivati, dove sono invece presenti i trascritti *poly* e *mst36Fa*, ed è invece identificato nell'RNA totale estratto dal ceppo di controllo. Questo mi consente di affermare che la tecnologia utilizzata porta alla completa scomparsa del trascritto *mst36Fb* nei maschi delle linee transgeniche transattivate interFb.

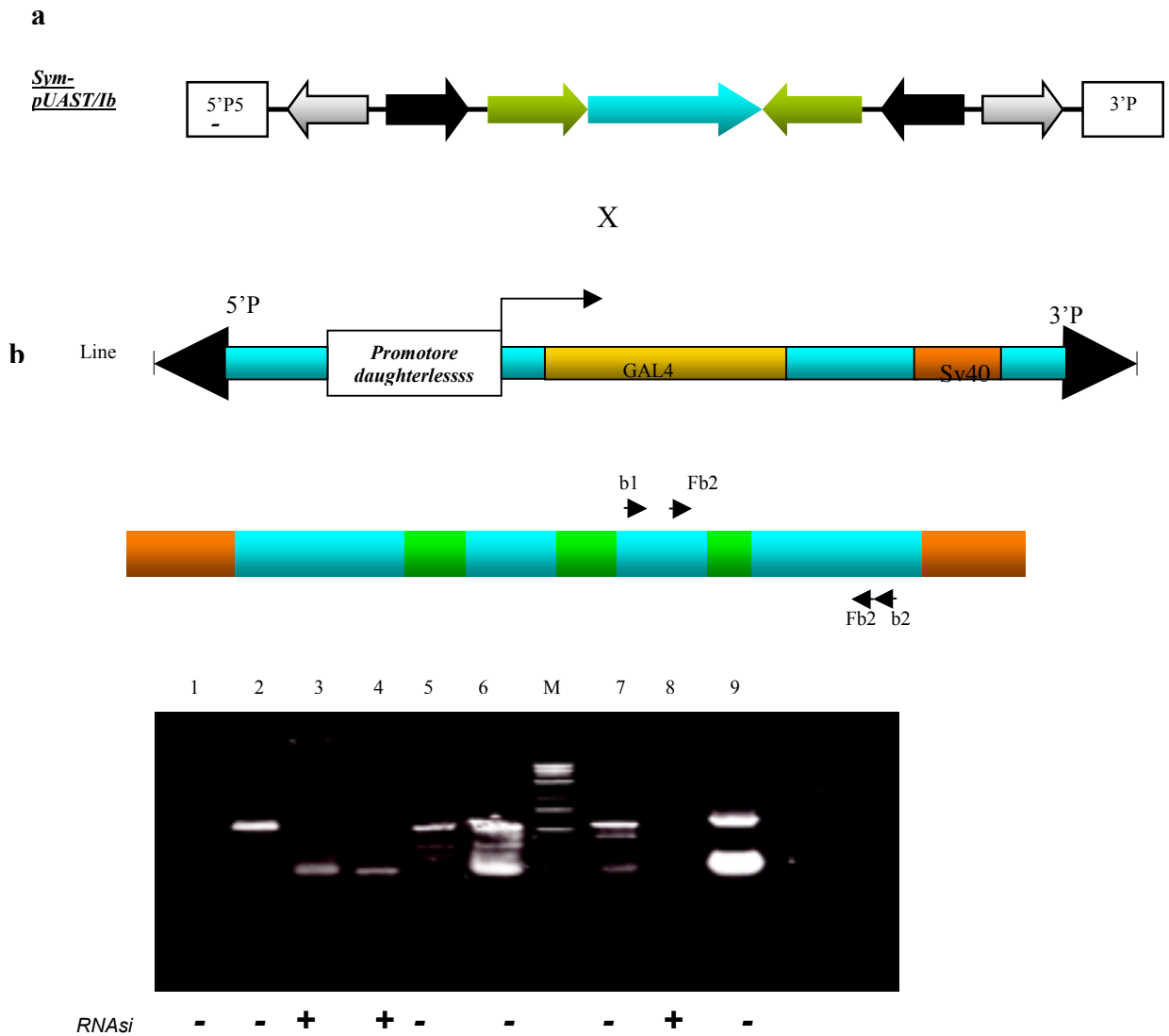


Fig.28- L'attivazione trascrizionale del transgene Ib guida il silenziamento molecolare del gene *mst36Fb*. In (a) è diagrammato l'incrocio effettuato per ottenere il silenziamento del gene *mst36Fb*. Maschi che portano inserito stabilmente nel proprio genoma il costrutto *Sym-pUAST/Ib*, diagrammato in (a), sono stati incrociati con femmine vergini 8641 (*w*[1118]; *P*{*da-GAL4.w*[-]}3) che esprimono il transattivatore di lievito Gal4 sotto la guida del gene *daughterless* specifico della linea germinale. b) In tal modo nella F1 il transgene Ib sarà trascritto su entrambi i filamenti nella linea germinale. Dai maschi della F1 è stato estratto RNA totale e si è effettuato un esperimento di RT-PCR per verificare se il costrutto *SympUAST/Ib*, contenente il III esone, il III introne e il IV esone del gene *mst36Fb*, è in grado di condurre il silenziamento genico del gene in esame in tali maschi. Come è rappresentato in (c) *mst36Fb* è completamente silenziato (linea1). Infatti non è stato osservato il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese, 0.6 Kb (ottenuto invece da amplificazione con la stessa coppia di oligo specifici sul clone di DNA 5b, (linea2), nella popolazione di RNA analizzata, con la coppia di oligo specifici per *mst36Fb*, b₁ e b₂, diagrammati in (c). mentre è stata rivelata la presenza del trascritto *mst36Fa* (linea 5) nella stessa popolazione utilizzando gli oligo specifici a₁ e a₂ (fig.25 c). Al contrario il prodotto di amplificazione di *mst36Fb* (0.6 Kb) delle dimensioni attese è stato identificato nella popolazione di RNA estratta dal ceppo selvatico *w*¹¹¹⁸ (linea7). Le reazioni sono state condotte anche in presenza *RNAsiA* per verificare che non ci siano contaminazioni di DNA genomico (linea 3,4,8). L'integrità degli RNA utilizzati è stata dimostrata effettuando l'esperimento con una coppia di oligonucleotidi specifici per il trascritto del gene ubiquitario *poly* (linea 6, 9). Il marcatore di peso molecolare utilizzato è 1 Kb

3.3.10 Analisi funzionale del “mutante” ottenuto per interferenza genica di *mst36fFb*

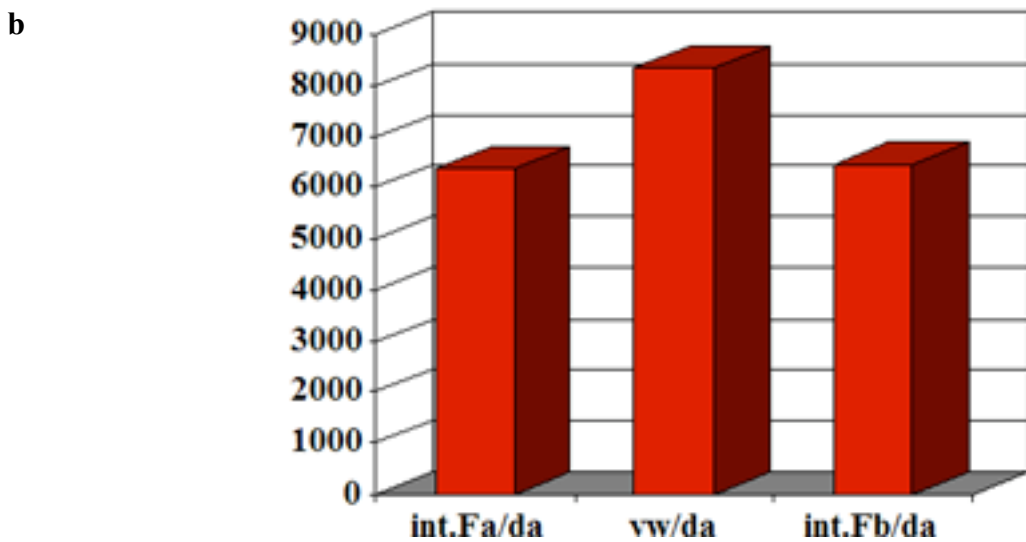
Per analizzare gli effetti fenotipici del silenziamento del gene in esame sono andati a controllare la fertilità dei maschi *interfb* transattivati in cui non vi è trascritto *mst36Fb*.

Il test è stato portato avanti effettuando trenta incroci singoli in cui un maschio del ceppo *interfb* transattivato, ad un giorno dalla nascita, viene incrociato con tre femmine vergini del ceppo *w¹¹¹⁸*. Gli incroci sono stati incubati a 25°C e dopo tre giorni i barattoli sono stati svuotati dei genitori, mentre dal decimo al quindicesimo giorno è stato contato il numero della progenie nata viva. Lo stesso esperimento è stato portato avanti per analizzare la fertilità di un ceppo selvatico *w¹¹¹⁸/Gal4* utilizzato come controllo interno dell'esperimento.

Come si può vedere in tab. 3-4, i maschi del ceppo *interfb* mostrano una fertilità ridotta del 30% rispetto al ceppo selvatico. Questo mi consente di affermare che il silenziamento del solo gene *mst36Fb* provoca una riduzione della fertilità maschile del 30% precedentemente osservata in un ceppo silenziato per entrambi i geni del cluster *mst36F* (parr. 3.5.4).

a

Ceppo del Maschio incrocio	Ceppo delle vergini incrocio	Numero incroci	Numero progenie viva
Int./Fa-daGal4	w ¹¹¹⁸	30	6400
Int./Fb-daGal4	W ¹¹¹⁸	30	6445
w ¹¹¹⁸ -Da/Gal4	w ¹¹¹⁸	30	8320



Tab.3.4- In tabella (a) sono riportati i risultati dei test di fertilita' condotti sugli interferiti per *mst36Fa* e *mst36Fb*. w¹¹¹⁸:femmine vergini w¹¹¹⁸, Inter.fa/daGal4: maschi interferiti per *mst36Fa*, Inter.fb/daGal4: maschi interferiti per *mst36Fb*, w¹¹¹⁸/da,Gal4 maschi selvatici per il controllo. In (b) sono riportati in un grafico i valori numerici del test di fertilita'

Discussione

4.1 I geni di cluster *mst36F* identificano una nuova famiglia genica

La spermatogenesi in *Drosophila melanogaster* è stata per anni un processo poco conosciuto a livello genetico e molecolare, ma negli ultimi venti anni l'isolamento e la caratterizzazione di geni espressi nelle cellule germinali in maturazione ha consentito di far luce su alcuni aspetti di questo complesso meccanismo.

Durante il mio lavoro di tesi di dottorato ho intrapreso la caratterizzazione dei geni *mt36Fa* e *mst36Fb* specifici della linea germinale maschile. Le due unità trascrizionali individuano una nuova famiglia genica formata da due geni paraloghi, essi presentano un'elevata identità nucleotidica che si riflette in un'altrettanta identità a livello amminoacidico che lascia ipotizzare la loro origine legata ad un recente evento di duplicazione genica. I due geni risultano strettamente associati come descritto in numerose famiglie geniche, (Kuhn et al., 1991; Boutanaev et al., 2002; Jayaramaiah Raja & Renkawitz-Pohl, 2005; Hempel et al., 2006), distano infatti solo 62 cb, e questa organizzazione è in accordo con i dati di Spellmann e Rubin (2002) che indicano che oltre il 20% dei geni di *Drosophila* sono raggruppati in base ai loro profili di espressione. In realtà, dati riportati recentemente suggeriscono che un terzo dei geni tessuto specifici nel genoma di *Drosophila* è organizzato in cluster di geni paraloghi (45%) e non paraloghi (55%) dove tutti i membri del cluster sembrano coinvolti nello stesso processo biologico. Questo suggerisce che i geni possono essere regolati contemporaneamente grazie all'organizzazione della cromatina in domini che vengono riconosciuti da un complesso proteico di rimodellamento della stessa con la conseguenza di rendere accessibile le sequenze dei promotori ai fattori trascrizionali. Tale meccanismo di regolazione dell'espressione genica è stato descritto dal lievito agli eucarioti superiori. In *Drosophila melanogaster* un terzo dei 1661 trascritti testicolo specifici sono organizzati in cluster (Boutanaev et al. 2002 Kalmykova et al., 2005) di cui alcuni composti da tre o più geni: si è visto che maggiore è il numero dei geni del cluster maggiore è il

grado di differenziamento tra i componenti. È descritto infatti che l'origine di un cluster è legata ad uno o più eventi di duplicazione genica avvenuti nella regione genomica dove mappa il cluster. Con il tempo poi nelle varie copie del gene duplicato sotto spinta della pressione evolutiva, si accumulano polimorfismi ed eventi di fusione genica nelle sequenze del promotore basale e nelle sequenze codificanti, che portano alla comparsa di nuove funzioni geniche (es. *sdc1* e *odysseus*). Tale processo sembra essere più rapido per quei geni che assumono un bias testicolare specifico (Parisi et al, 2003) e quindi i geni specifici della linea germinale maschile hanno un rapido “turn over “ nelle funzioni geniche. Il processo di duplicazione genica e in particolare di duplicazione seguito dalla comparsa di nuovi geni coinvolti nei meccanismi della spermatogenesi è considerato una rapida strategia dell'evoluzione che favorisce la comparsa di nuove funzioni geniche che alla fine portano alla creazione degli ibridi e all'isolamento di nuove specie (Civetta et al, 1995). I geni del cluster *mst36F* costituiscono una famiglia genica di recente origine evolutiva composta da sole due unità trascrizionali paraloghe, conservate esclusivamente nella maggior parte delle specie del gruppo *melanogaster*.

4.2 Evoluzione delle regioni di regolazione della trascrizione

I geni del cluster *mst36F* condividono la stessa direzione di trascrizione e lo stesso profilo di espressione sesso stadio e tessuto specifico che lascia ipotizzare l'utilizzo della medesima sequenza nucleotidica deputata a guidarne l'espressione testicolare-specifica. I miei dati, ottenuti grazie ad esperimenti di fusione genica tra le presunte regioni promotrici e il gene reporter *lacZ* condotti in diverse linee transgeniche, hanno invece rivelato che le due unità trascrizionali se pur separate da appena 62 bp sono sotto il controllo trascrizionale di regioni di regolazione in *cis* distinte. La trascrizione di *mst36Fa* è regolata da una sequenza lunga 50 bp (+10/+60) che mappa nella sua regione 5' non tradotta in accordo con quanto riportato per i geni TATA less di

Drosophila melanogaster (K. Kutach et al,2000) suggerendo l' esistenza di un nuovo dominio funzionale che sarà interessante andare meglio a definire. La trascrizione del gene *mst36Fb* è invece sotto la guida della regione genomica (-70/+10) che mappa nella regione intergenica dei due membri della famiglia. Per entrambi i geni le regioni deputate alla regolazione trascrizionale stadio e tessuto specifica risiedono in una regione lunga 100 bp. Tale dato è in accordo con quanto riportato in letteratura circa i promotori dei geni ad espressione testicolo-specifica che presentano tutti gli elementi in grado di guidare la trascrizione del gene in meno di 200 cb (Kuhn et al., 1998; Michiels et al.,1989; Blumer et al.,2002). Per entrambi i geni non è stata identificata una sequenza canonica TATA nè nessuna delle sequenze consenso caratterizzate, ritrovate nei promotori TATAless (David N. Arrosti, 2003, Michiels et al., 1989; Santel et al., 1997) in *Drosophila* e negli insetti in generale. Inoltre anche un allineamento nucleotidica tra le sequenze genomiche dove mappano i promotori basali di *mst36Fa* ed *mst36Fb* non presenta identità di sequenza a conferma della divergenza evolutiva che sta operando sui geni del cluster tessuto-specifico.

La complessità e la varietà degli eventi differenziativi del processo di spermatogenesi è guidata da meccanismi di regolazione genica finemente modulati che richiedono la presenza di numerose sequenze in *cis* responsabili della trascrizione dei geni coinvolti e altrettanti fattori trascrizionali agenti in *trans* che ne modulano l'attivazione (Twine White-Cooper et l, 1998). Alcuni di questi sono fattori trascrizionali che regolano sia geni responsabili dell'avanzamento del ciclo cellulare meiotico e sia della trascrizione dei geni deputati al differenziamento degli spermatidi. L'analisi del profilo di espressione dei geni *mst36F* nei testicoli dei mutanti di alcuni di questi fattori trascrizionali (cap. 3) ha confermato che i geni del cluster non rispondono ai medesimi meccanismi di regolazione trascrizionale. Infatti la trascrizione del gene *mst36Fa* è dipendente dalla presenza del complesso proteico PingPong

(Achy/Vis), che riconosce i domini cromatinici sul promotore di *mst36Fa*, e interagisce con il meccanismo basale di inizio della trascrizione modulato dall'interazione, diretta o indiretta, con Aly/Cmr del fattore TFIID testicolo-specifico, Mia. Al contrario la trascrizione dell'altro gene del cluster, *mst36Fb*, non sembra alterata nei mutanti dei cosiddetti geni d'arresto meiotico *aly*⁵, *ping pong*, *topi*, *cmr*, *mia*, *sa* e *nht* suggerendo che i due geni pur condividendo lo stesso profilo di espressione hanno differente struttura del promotore e rispondono a fattori trascrizionali differenti evidenziando l'esistenza di numerosi e fini meccanismi di regolazione dell'espressione genica durante il processo della spermatogenesi.

4.3 Regolazione post-trascrizionale del cluster *mst36F*

Durante il processo di spermatogenesi la trascrizione dei geni coinvolti nei meccanismi che porteranno alla formazione dei gameti maturi è ristretta ad una breve finestra temporale che coincide con la lunga profase meiotica degli spermatociti primari; dopo questo periodo infatti, il processo di trascrizione cessa per non riprendere più fino alla fine della spermatogenesi mentre la traduzione continua per l'intera durata del processo di spermatogenesi (Fuller, 1993). I trascritti dei geni maschio specifici finora caratterizzati sono estremamente stabili e vengono finemente regolati a livello post-trascrizionale (Schafer et al., 1995) per consentirne la traduzione. Se noto è il meccanismo generale che opera a livello post-trascrizionale poco si sa sulle sequenze in *cis* e sui vari fattori che entrano in gioco nel guidare questa espressione finemente modulata. Il blocco della traduzione è il meccanismo di regolazione più frequente che ricorre durante la spermatogenesi e le sequenze di regolazione responsabili di tale fenomeno in *Drosophila* sono di solito localizzate nelle regioni 5' non tradotte (Kuhn et al.; 1988; Blumer et al., 2002; Hempel et al., 2006). I miei dati ottenuti dagli studi di localizzazione della proteina ricombinante MST36Fa-Bgal nei testicoli dissezionati dalle linee transgeniche

lig4 mostrano che la proteina ricombinante compare solo nelle cellule post-meiotiche ovvero negli spermatidi in allungamento, ed è assente negli spermatociti (cap.3) dove è invece possibile identificare il trascritto del gene in esame. La regione dove mappano gli elementi responsabili di tale blocco traduzionale sembra essere proprio la sequenza +1/+800 che comprende la sequenza 5' non tradotta del gene in esame. Ulteriori studi devono essere condotti per identificare il consenso responsabile del blocco della traduzione; l'unica cosa certa è che non sono state identificate nella regione consensus (es. la sequenza TRE: Translational repressor element), finora caratterizzati. (Blumer et al., 2002) In realtà, vorrei sottolineare che i geni specifici della linea germinale maschile finora caratterizzati a livello molecolare sono veramente pochi e ancor meno le sequenze consenso che ne regolano l'espressione genica durante il processo. E' facile pensare che un tal complesso processo biologico che coinvolge un gran numero di prodotti genici risponda ad un meccanismo di regolazione che utilizza diverse sequenze in *cis* sia a livello trascrizionale che post trascrizionale.

La localizzazione della proteina ricombinante *mst36Fb-Bgal* invece nei testicoli delle mosche delle linee transgeniche 100b rivela che la proteina è presente già negli spermatociti primari dove compare il trascritto ed è presente negli stadi post-meiotici di spermatidi in allungamento. I dati in mio possesso suggeriscono che la traduzione premeiotica, in omologia a quanto accade per *mst36Fa* e per gli altri trascritti della spermiogenesi, ha luogo perché nel costrutto utilizzato non è presente la regione 5' non tradotta, comune sede delle sequenze consenso deputate alla regolazione della stabilità del messaggero e del blocco della traduzione dei geni maschio-specifici. Tuttavia la presenza della proteina negli spermatidi in allungamento, cellule in cui non rilevo la presenza del rispettivo trascritto, può indirettamente suggerire che anche questo messaggero sia sottoposto a rilascio del blocco traduzionale come *mst36Fa*. Sono necessari ulteriori studi per verificare la presenza di un consenso responsabile del blocco

della traduzione di *mst36Fb*.

4.4 Studio funzionale del cluster *mst36F*

La spermatogenesi è un processo continuo durante il quale le cellule staminali germinali tonde, indifferenziate ed immobili daranno origine attraverso complessi meccanismi differenziativi a cellule altamente specializzate, aploidi e motili, i gameti maschili maturi. Il processo di spermatogenesi in *Drosophila* è stato descritto in dettaglio a livello morfologico ed ultrastrutturale facilitando in tal modo l'isolamento di mutanti che presentano alterazioni in fasi specifiche del processo che causano alterazioni nella fertilità. (Tates 1971; Tokuyasu 1974a,b, 1975a,b; Tokuyasu et al. 1972, 1977; Lindsley and Tokuyasu 1980; Fuller 1993). Il programma di sviluppo dei gameti maschili sembra essere alquanto conservato da un punto di vista filogenetico in diversi animali e scoperte fatte nella mosca possono risultare utili perché riportati ad altre specie compreso l'uomo (Hackstein et al., 2000). In *Drosophila*, non è facile dissezionare le vie genetiche e metaboliche del processo attraverso studi di genetica inversa, questo sia perché durante la spermatogenesi la trascrizione di tutti i geni coinvolti nei meccanismi che guidano il differenziamento degli spermatidi avviene nella stessa breve finestra temporale e il controllo post-trascrizionale trasferisce l'effetto fenotipico di mutazioni a carico di eventuali geni regolativi solo in stadi più avanzati, sia perché la maggior parte delle mutazioni maschio-sterile è dovuta ad alleli deboli di geni vitali (Castrillon et al., 1993, Wakimoto et al, 2004). Questi limiti dell'analisi genetica inversa possono essere superati utilizzando strade alternative. Una di queste è quella di clonare e caratterizzare da un punto di vista funzionale geni specifici della linea germinale maschile. La caratterizzazione a livello funzionale del cluster *mst36F* può contribuire a far luce sui meccanismi che guidano la fertilità maschile in *Drosophila*. Per identificare le funzione del cluster un aiuto può venire dall'individuazione dell'esatta localizzazione cellulare e subcellulare dei rispettivi prodotti proteici.

Purtroppo, la strategia adottata per studiare la localizzazione della proteina ricombinante MST36Fa/GFP non ha avuto esito positivo a causa di problemi nella trascrizione del costrutto ricombinante. È possibile infatti che la presenza della regione di 500 cb a monte del sito di inizio della trascrizione preceduta dalle cinque sequenze intensificatrici di lievito UAS che richiamano il fattore trascrizionale Gal4, possa interferire con il promotore basale del gene andando a creare un ingombro sterico che impedisce il richiamo della RNA polimerasi II e l'inizio del processo trascrizionale. Per risolvere questo inconveniente tecnico, ho ripreparato il costrutto privato di tale regione genomica e ho ottenuto nuove linee transgeniche. L'analisi dei testicoli dei maschi della F1 nati dall'incrocio delle nuove linee transgeniche MST36Fa/GFP con il ceppo transattivatore *da/GAL* potrà consentire la localizzazione della proteina ricombinante e fornire informazioni circa la fusione di *mst36Fa* durante la spermatogenesi. Inoltre si potrà procedere a realizzare la linea MST36Fb/RFP per ottenere informazioni sulla funzione del secondo gene del cluster e studiando anche la localizzazione di entrambi. Tali dati farebbero luce sul ruolo funzionale dell'intero cluster suggerendo attraverso studi di colocalizzazione delle due proteine di fusione se i due geni entrano in gioco nello stesso processo o se partecipano ad eventi differenziativi differenti. La realizzazione di linee mutanti attraverso la tecnologia del silenziamento genico mediato dall'interferenza stabile, utilizzando il vettore plasmidico Sym pUAST (Giordano, 2002) è risultato un ottimo approccio per ottenere il completo silenziamento del cluster. Infatti, la strategia ha consentito di ottenere un mutante in cui sono degradati entrambi i trascritti del cluster. Tale mutante mostra una fertilità del 30% inferiore rispetto al ceppo selvatico, suggerendo una diretta funzione del cluster nei meccanismi che regolano la fertilità maschile. Tuttavia una ricerca di alterazioni citologiche al microscopio a contrasto di fase non ci ha permesso finora di notare alterazioni significative. Saranno quindi necessarie analisi ultrastrutturali da eseguire utilizzando diversi marcatori cellulari e microscopia confocale. Inoltre, in

manca di alterazioni morfologiche evidenti delle cellule germinali in sviluppo si potrebbe ricercare la causa della semi-sterilità negli spermatozoi maturi andando a investigare sulla loro motilità, la capacità di interagire con l'uovo e di fecondarlo e sulla capacità del pronucleo maschile di contribuire alla formazione del nucleo dello zigote.

Bibliografia

Andrews, J., Smith, M., Merakovsky, J., Coulson, M., Hannan, F. and Kelly, L.E. (1996) The stoned locus of *Drosophila melanogaster* produces a dicistronic transcript and encodes two distinct polypeptides. *Genetics* **143**: 1699–1711.

Armbrust, E. V., and H. M. Galindo, (2001) Rapid evolution of a sexual reproduction gene in centric diatoms of the genus *Thalassiosira*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3501–3513.

David N. Arnosti (2003) Analysis and function of transcriptional regulatory elements: Insights from *Drosophila*. *Annu. Rev. Entomol.* **48**:579–602

Arama, E., Agapite, J. and Steller, H. (2003). Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* **4**, 687–697.

Ayyar S, Jiang J., Collu A., White-Cooper H. and White R. (2003) *Drosophila* TGIF is essential for developmentally regulated transcription in Spermatogenesis *Development* **130**, 2841-2852 2003

Bendena, W.G., Ayme-Southgate, A., Garbe, J.C., Pardue, M.L., 1991. Expression of heat-shock locus *hsr-omega* in nonstressed cells during development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **144**, 65–77.

Bairati, A. (1967). The structure and ultrastructure of the male genital apparatus of the *Drosophila melanogaster* Meig. 1. The testis. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **76**, 56-99.

Blumer, N., Schreiter, K., Hempel, L., Santel, A., Hollman, M., Schäfer, M. A., Renkawitz-Pohl, R., (2002). A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of *don juan* during *Drosophila* spermatogenesis. *Mec. Dev.* **110**, 97-112.

Boutanaev, A.M., Kalmykova, A.I., Shevelyov, Y.Y. and Nurminsky, D.I. (2002) Large clusters of co-expressed genes in the *Drosophila* genome. *Nature* **420**: 666–669.

Brand Andrea H. and Perrimon Nobert, (1993) Target gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415

Braun, R.E, (2001) Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.* **28**: 10-12

Brognia, S. and Ashburner, M. (1997) The Adh-related gene of *Drosophila melanogaster* is expressed as a functional dicistronic messenger RNA: multigenic transcription in higher organisms. *EMBO J* **16**: 2023–2031.

Castrillon, D.H., P. Gonczy, S. Alexander, R. Rowson, C.G. Eberhart, S. Viswanathan, S. DiNardo, and S.A. Wasserman. (1993). Towards a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. Characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics*

Cavener, D.R.(1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start site in *Drosophila* and vertebrates. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1353-1361.

Civetta, A., and R. S. Singh, (1995) High divergence of reproductive tract proteins and their association with postzygotic reproductive isolation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* group species. *J. Mol. Evol.* **41**: 1085–1095.

Coulthart, M. B., and R. S. Singh, (1988) High level of divergence of male-reproductive-tract proteins, between *Drosophila melanogaster* and its sibling species, *D. simulans*. *Mol. Biol. Evol.* **5**: 182–191.

Das, C.C., B.P. Kaufmann, and H. Gay. (1964) Histone-protein transition in *Drosophila melanogaster*. I. Changes during spermatogenesis. *Exptl. Cell Res.* **35**: 507-514.

Digilio, F. A., Pannuti,A., Lucchesi, J. C., Furia, M. and Polito, L. C. (1996). *Tosca*: a *Drosophila* gene encoding a nuclease specifically expressed in the female germline *Developmental Biology* **178**, 90-100

Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA (1996) Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia see comments . *Nature* **381**:783 785

Edgar BA, O' Farrell PH (1989) Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**:177 187

Erickson, R. P. (1990) Post meiotic gene expression. *Trends Genet.* **6**, 264-269

Fuller M.T. (1993) Spermatogenesis. In: *The development of Drosophila* (eds. M. Bate and Martinez-Arias), **1**: 71-147. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring

Harbor, NY.

Fuller M.T. (1998) Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis seminars in *Cell & Developmental Biology*, Vol **9**, 1998: pp 433-444

Gigliotti, S., Balz, V., Malva, C., Schfer, M. A. (1997) Organisation of regulatory elements in two closely spaced *Drosophila melanogaster* genes with common expression characteristics. *Mech. Dev.* 101-113

Giordano E., Rendina R., Pelso, I. and Furia, M. (2002) RNAi Triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **160**, 637-648

Gould-Somero, M., Holland, L., (1974). The timing of RNA-synthesis for spermiogenesis in organ cultures of *Drosophila melanogaster* testes. *Wilh. Roux Arch.* **174**, 133-148

Hardy, R. W., Tokuyasu, K. T., Lindsley D. L and Garavito, M. (1979). The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.* **69**, 180-190

Hecht, N. (1998) Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* **20**: 555-561

Hellberg, M. E., G. W. Moy and V. D. Vacquier, (2000) Positive selection and propeptide repeats promote rapid interspecific divergence of a gastropod sperm protein. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 458–466.

Hempel, L.U., Rathke, C., Raja, S.J. and Renkawitz-Pohl, R. (2006) In: *Drosophila*, don juan and don juan like encode proteins of the spermatid nucleus and the flagellum and both are regulated at the transcriptional level by the TAF II80 cannonball while translational repression is achieved by distinct elements. *Dev Dyn* **235**: 1053–1064.

Hennig, W. (1990). Investigation of the structure and function of lampbrush-Y-chromosome in spermatogenesis in *Drosophila*. *Chromosoma* **22**, 294-357.

Hennig, W. (2003) Chromosomal proteins in the spermatogenesis of *Drosophila*. *Chromosoma* **111**: 489-494.

Hiller M.A., Lin T.-Y, Wood C. and Fuller M.T. (2001) Developmental

regulation of transcription by a tissue specific TAF homolog. *Genes Dev.* **15**: 1021-1030

Jianqiao Jiang and Helen White-Coope (2002). Transcriptional activation in *Drosophila* spermatogenesis involves the mutually dependent function of *alyand* and a novel meiotic arrest gene *cookie monster*. *Development* **130**, 563-573

Kalmykova, A.I., Nurminsky, D.I., Ryzhov, D.V. and Shevelyov, Y.Y. (2005) Regulated chromatin domain comprising cluster of co-expressed genes in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **33**: 1435–1444.

Karess, R.E., Rubin, G.N. (1984) Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* **38**: 135-146

Kuhn, R., Schäfer, U., and Schäfer, M. (1988). Cis acting region sufficient for spermatocyte-specific transcriptional and spermatid-specific translational control of *Drosophila melanogaster* gene *mst(3)gl-9*. *EMBO J.* **7**, 447-454.

Kuhn, R., Kuhn, C., Borsch, D., Glatzer, K.H., Schäfer U. and Schäfer, M.(1991). A cluster of four genes selectively expressed in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev* **35**, 143-151.

Lawrence, C.E., Altschul, S.F., Boguski, M.S., Liu, J.S., Neuwald, A.F., Wootton, J. and C. (1993) Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiple alignment. *Science* **262**: 208–214.

Lin T-Y, Viswanathan S, Wood C, Wilson PG, Wolf N, Fuller .MT (1996) Coordinate developmental control of the meiotic cell cycle and spermatid differentiation in *Drosophila* males. *Development* **122**:1331-1341

Lindsley, D., and Tokuyasu, K. T. (1980). Spermatogenesis. In *genetics and biology of Drosophila*, 2nd. Edition (ed. M; Ashburner and T.R. Wright), pp. 225-294. Academic Press, New York.

Liu, H., Jang, J.K., Graham, J., Nycz, K. and McKim, K.S. (2000) Two genes required for meiotic recombination in *Drosophila* are expressed from a dicistronic message. *Genetics* **154**: 1735–1746.

Lupas, A., Van Dyke, M. and Stock, J. (1991) Predicting coiled coil from protein sequences. *Science* **252**: 1162-1164

Maines, J. and Wasserman, S. (1998). Regulation and execution of meiosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **337**, 301-332

Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**: 483-488

Meyer, G. F., (1967). Spermiogenese in normalen und Y-defizienten Männchen von *Drosophila melanogaster* und *Drosophila hydei*. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* **84**, 141-175

Michiels, F., Gasch, A., Kaltschmidt, B., and Renkawitz-Pohl. (1989). A 14 bp promoter element directs the testis specificity of the *Drosophila* β 2-tubulin gene. *EMBO J.* **8**, 1559-1565.

Mikhaylova L., Boutanaev A. B. and Nurminsky D. I (2006) Transcriptional regulation by Modulo integrates meiosis and spermatid differentiation in male germ line. *NAS* August 8, vol. **103** no. 32 11975–11980

Miller, A.(1965). The international anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. In *Biology of Drosophila* (ed. M. Demerec , pp. 420-534. Hafner Publishing , New York.

Noguchi T. and Kathryn G. Miller. (2003) A role for actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* **130**, 1805-1816

Olivieri, G. and Olivieri, A. (1965). Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *KK Mutat Res.* **2**, 366-380.

Palmer, M. J., Mergner, V.A., Richman, R., Manning, J. E., Kuroda, M. I., and Lucchesi, J.C. (1993). The male-specific lethal-one (*msh-1*) gene of *Drosophila melanogaster* encodes a novel protein that associates with the X-chromosome in males. *Genetics* **134**, 545-557.

Perezgasga Lucia, JianQiao Jiang, Benjamin Bolival, Jr1, Mark Hiller, Elizabeth Benson, Margaret T. Fuller and Helen White-Cooper (2004) Regulation of transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes by the testis-specific Zn-finger protein matotopetli *Development* **131**, 1691-1702

Ray-Gallet, D., J.P. Quivy, C. Scamps, E.M. Martini, M. Lipinski, and G. Almouzni. (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell.* **9**(5): 1091-1100

Renkawitz-Pohl, R., M. Hollmann, L. Hempel, and M.A. Schäfer. (2005) Spermatogenesis. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry,*

Pharmacology and Molecular Biology, Eds: Lawrence Kostas Iatrou, Sarjeet Gill. (1): 157-177

Rouault, T.A., Harford, J.B.,1996. Translational control of Ferritin. In: Hershey, J. W. B., Mathews, M.B. Sonenberg (Eds.) Translational Control, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, pp. 335-362.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Santel, A., Winhauer, T., Blümer, N. and Renkawitz-Pohl, R.; (1997). The Drosophila don juan gene (dj) encodes a novel sperm specific protein component characterized by unusual domain of a repetitive amino acid motif. Mech. Dev. **64**, 19-30.

Santel, A., Blümer, N., Kampfer, M., and Renkawitz-Pohl, R. (1998). Flagellar mitochondrial association of the male-specific Don Juan protein in Drosophila spermatozoa. J. Of Cell Science **111**, 3299-3309.

Santel, A.; Kaufman J.; Hyland R. Renkawitz-Pohl R. (2001) The initiator element of the Drosophila $\beta 2$ *tubulin* gene core promoter contributes to gene expression in vivo but is not required for male germ-cell specific expression. Nucleic Acid Research vol 28 No **6** 1439-1446.

Sassone-Corsi P. (2002) Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. Science **296**: 2176-2178

Sautiere P. (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. Biochim Biophys Acta **80**: 117-128

Schäfer, M., Kuhn, R., Bosse, F., and Schäfer U. (1990). A conserved element in the leader mediates post-meiotic translation as well as cytoplasmic polyadenylation of Drosophila spermatocyte RNA. EMBO J. **9**, 4519-4525

Schäfer, M., Borsch. D., Hulster, A., Schäfer, U. (1993). Expression of a gene duplication encoding conserved sperm tail protein is translationally regulated in Drosophila melanogaster. Mol. Cell. Biol. **13**, 1708-1718.

Schäfer, M., Nayernia, K., Engel, W., Schäfer, U.,(1995) Translational control in spermatogenesis. Dev. Biol. **172**, 344-352.

Swanson, W. J., and V. D. Vacquier, (1995) Extraordinary divergence and positive Darwinian selection in a fusogenic

protein coating the acrosomal process of abalone spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 4957–4961.

Tates, A.D. (1971). “Citodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* : An electron microscope study.” Ph.D. thesis, Rijksuniversiteit, Leiden.

Thummel, C. S., Boulet, A.M. and Lipshitz, H.D. (1993) Vector for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection *Gene* **2796** 444-456

Torgerson, D. G., R. J. Kulathinal and R. S. Singh (2002)Mamma- Yuan, X., M. Miller and J. M. Belote, 1996 Mammalian sperm proteins are rapidly evolving: evidence of positive selection in functionally diverse genes. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1973– 1980.

Wang Z and Mann R. (2003) Requirement for two nearly identical TGIF-related homeobox genes in *Drosophila* spermatogenesis *Development* **130**, 2853-2865

Wakimoto B., Lindsley D. L. and Herrera C. (2004) Toward a Comprehensive Genetic Analysis of Male Fertility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**: 207–216

Wyckoff, G. J., W. Wang and C.-I Wu, (2000) Rapid evolution of male reproductive genes in the descent of man. *Nature* **403**: 304–309.

White-Cooper, H., Schäfer, M. A., Alphey, L.S., and Fuller, M. T. (1998) Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development* **125**, 123-134.

White-Cooper H, Leroy D, MacQueen A, Fuller MT. (2000). Transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes depends on a conserved chromatin associated protein, whose nuclear localisation is regulated. *Development*. 2000 Dec; **127**(24):5463-73.

Yanicostas, C., Lepesant, J.A., (1990). Transcriptional and translational cis-regulatory sequences of the spermatocyte-specific *Drosophila* janusB gene are located in the 3' exonic region of the overlapping janusA gene. *Mol; Gen. Genet.* **224**, 450-458.

Comunicazioni a congresso

Morra R., Di Cara F., Digilio F.A. “Analisi dell’espressione della Tioredossina di *Alicyclobacillus acidocaldarius* in *Pichia pastoris* e *Bacillus subtilis*”, Atti 4° convegno FISV Riva Del Garda 2002, pg 76.

Morra R., Di Cara F., Calise S., Cavaliere D., Polito L.C., Digilio F.A. “*Drosophila melanogaster* as model system to study male-specific genes”, Atti Fourth International Workshop on Transgenesis and Genomics of Invertebrate Organisms Asilomar 2003, pg 72.

Morra R., **Di Cara F.**, Filardo V., Polito C. L. e Digilio F. A. “Analisi delle regioni di regolazione di geni ad espressione sesso-specifica in *D. melanogaster*”. Atti 5° Convegno FISV Rimini 2003, pg 19.

Di Cara F. Morra R., Sorrentino A., Polito L., Digilio F.A. “Regolazione dell’espressione genica durante la gametogenesi in *Drosophila melanogaster*” II Retreat Igb “ABT” CNR .Castellamare di Stabia 2005

Di Cara F., Cavaliere D., Polito C.L., Digilio F. A. "Towards a comprehensive analysis of two genes specifically expressed during the *D. melanogaster* spermatogenesis" 19th European *Drosophila* Research Conference 2005 pg 178.

Di Cara F., Sorrentino A., Esposito N., Digilio F.A. and Polito C.L. "Towards a comprehensive analysis of gene regulation during male and female gametogenesis in *Drosophila melanogaster*." VI Convegno FISV Riva Del Garda (TN) 2005.

Di Cara F., Cavaliere D., Polito C.L. and Digilio F. A. “*Drosophila melanogaster* as model system to study sex-specific genes”, Nottingham meeting 12-13 May 2006, Hortus Haren, The Netherlands.

De Simone Anna Maria, Sorrentino Angela, **Di Cara Francesca**, Polito Lino and Digilio F. Anna. “Approaches to identify sex determining genes in the lepidopteron *Morua vitrata*” 7° International workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera Orthodox Academy of Crete, Greece, August 20-26, 2006

Di Cara F., Cavaliere D., Sorrentino A., De Simone A., Polito L.C. and Digilio F.A.

“Transcriptional regulation of *mst36Fa* and *mst36fb* genes by the meiotic arrest genes in *Drosophila* spermatogenesis” /° Convegno FISV, 28 settembre -1 ottobre 2006

Publicazioni

Structure and expression of a novel gene family showing male germline specific expression *Drosophila melanogaster*. **Di Cara Francesca**, Morra Rosa, Cavaliere Daniela, Polito Lino C., Digilio Filomena Anna*, IMB, 17-Oct-2006
doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00688.x

Stage

Stage estivo per l' apprendimento di tecniche di microscopia a fluorescenza su tessuti freschi e fissati, presso il laboratorio della dottoressa Margaret Heck, Università di Edinburgo, Scozia.

Ringraziamenti

Ringrazio di vero cuore la Dottoressa F. Anna Digilio che mi ha seguita intensamente e quotidianamente durante l'intero corso di dottorato e precedentemente durante il mio lavoro di tesi sperimentale. I suoi insegnamenti, i suoi consigli, il continuo dibattito scientifico e la sua amicizia mi hanno consentito in questi 3 anni di dottorato di crescere come scienziato e come donna.

Ringrazio vivamente e affettuosamente il Professore Polito per aver creduto in me, il dottore Giuseppe Saccone, mio tutor di dottorato, per avermi seguito costantemente; e tutti i componenti del gruppo Digilio per il loro sostegno e la loro leale amicizia; un particolare grazie va alla dottoressa Daniela Cavaliere, alla dottoressa Rosa Morra nonché agli assistenti di laboratorio, il Signor Giovanni Imperato e la Signora Concetta Sole per l'affetto e il costante aiuto offerto.