



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI AGROBIOLOGIA ED AGROCHIMICA

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE - XXI CICLO.

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA:

**IL RUOLO DELLA METILAZIONE DELL'ISTONE H3 DURANTE
LA FORMAZIONE DELL'ETEROCROMATINA FACOLTATIVA**

(BIO/18)

Coordinatore: Prof. Giorgio Prantera

Firma

Tutor: Prof. Giorgio Prantera

Firma.....

Dottoranda: Dott.ssa Barbara Pasqualini

Firma

Indice

Riassunto	p. 1
Abstract	p. 3
1. Introduzione	p. 5
1.1 Epigenetica	p. 7
1.1.1 Eterocromatina facoltativa	p. 7
1.1.2 Imprinting	p. 14
1.2 Meccanismi molecolari dei fenomeni epigenetici	p. 16
1.2.1 Metilazione del DNA	p. 16
1.2.2 Modificazioni istoniche	p. 20
1.3 Ruolo delle modificazioni istoniche nella formazione dell'eterocromatina facoltativa	p. 22
1.4 SU(VAR)3-9: la metilasi della lisina 9 dell'istone H3	p. 27
1.5 Altre HMTasi K9H3	p. 34
1.5.1 dG9a	p. 34
1.5.2 dSETDB1	p. 35
1.6 Demetilasi istoniche	p. 36
2. Scopo del lavoro	p. 38
3. Materiali e metodi	p. 41
3.1 Materiale animale di studio	p. 41
3.1.1 Allevamento di <i>Planococcus citri</i>	p. 41
3.2 Metodologie molecolari	p. 41
3.2.1 Estrazione DNA da <i>Planococcus citri</i>	p. 41
3.2.2 Amplificazione di frammenti genomici <i>Su(var)3.9-like</i>	p. 42
3.2.3 Clonaggio nel vettore pGEM-T	p. 44
3.2.4 Screening delle colonie trasformanti	p. 45
3.2.5 Sequenziamento	p. 46
3.2.6 PCR di sostituzione	p. 46
3.2.7 Produzione dsRNA	p. 47
3.2.8 RNAi	p. 47
3.2.9 Trattamento con chaetocina	p. 49
3.2.10 Estrazione delle proteine totali da <i>Planococcus citri</i>	p. 50
3.2.11 SDS-PAGE	p. 50
3.2.12 Western blotting	p. 51

3.2.13 Ibridazione su filtro	p. 51
3.3 Metodologie citologiche	p. 51
3.3.1 Preparati citologici	p. 51
3.3.2 Immunolocalizzazione <i>in situ</i>	p. 52
3.3.3 Osservazione al microscopio a fluorescenza	p. 53
4. Risultati	p. 54
4.1 Clonaggio del gene <i>Su(var)3-9-like</i>	p. 54
4.2 Il processo d'eterocromatizzazione facoltativa è regolato dalla proteina SU(VAR)3-9-like	p. 60
4.2.1 Creazione di fenocopie <i>Su(var)3-9</i> knockout	p. 60
4.2.2 Inibizione dell'attività dell'enzima SU(VAR)3-9	p. 75
4.3 Stati di metilazione dell'istone H3 alla lisina 9 che caratterizzano la formazione dell'eterocromatina facoltativa	p. 90
5. Discussione	p. 92
6. Bibliografia	p. 102

RIASSUNTO

Le code istoniche N-terminali protrudono dal nucleosoma e sono soggette a modificazioni posttraduzionali, quali acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e ADP-ribosilazione. Durante gli ultimi anni sono stati identificati molti enzimi che modificano gli istoni e diverse proteine associate alla cromatina, che si legano in maniera specifica a queste modificazioni. Particolari pattern di modificazioni istoniche sono stati associati a stati distinti della cromatina e sembrano rappresentare un meccanismo capace di estendere il potenziale informativo del codice genetico.

Negli eucarioti, la metilazione della lisina 9 dell'istone H3 (K9H3m3) controlla il silenziamento genico e assolve un ruolo centrale nella formazione dell'eterocromatina costitutiva. La metilazione selettiva della K9 H3 avviene ad opera di una specifica metiltransferasi istonica (HMTase) codificata dal gene *Su(var)3-9*. Il chromo dominio di HP1, una proteina dell'eterocromatina, si lega alla lisina 9 metilata dell'istone H3 per propagare lo stato eterocromatico. Un'altra modificazione istonica presente sull'eterocromatina pericentromerica è la trimetilazione della K20 H4. La K9H3m3 e la K20H4m3 sembrano, quindi, essere componenti importanti del pathway coinvolto nella formazione dell'eterocromatina pericentromerica.

Il possibile ruolo della proteina SU(VAR)3-9 nell'instaurazione dell'eterocromatina facoltativa resta da chiarire.

Il sistema cromosomico dei Coccidi fornisce un eccezionale esempio di eterocromatizzazione facoltativa, rappresentando quindi un sistema modello ideale per studiare tale fenomeno. Negli embrioni maschili dei Coccidi, l'intero assetto cromosomico aploide di origine paterna diventa eterocromatico allo stadio di blastula, mentre negli embrioni femminili sia il complemento paterno sia il materno restano eucromatici durante lo sviluppo. Nel Coccide *Planococcus citri*, abbiamo precedentemente identificato PCHET2, una proteina HP1-like che è preferenzialmente associata con l'eterocromatina facoltativa maschio-specifica.

In questo lavoro di tesi mi sono occupata di caratterizzare il ruolo dell'ortologo di *Su(var)3-9* nei Coccidi. A questo scopo, ho identificato e clonato la HMTase *Su(var)3-9-like* tramite amplificazione per PCR del DNA genomico. La sequenza nucleotidica ottenuta presenta un elevato grado di identità (98%) con la sequenza omologa di *Drosophila melanogaster*.

Ho allestito esperimenti di RNAi con il dsRNA del *set-dominio* e ho verificato che l'inibizione dell'espressione della HMTase K9 H3 negli embrioni porta a quasi totale assenza di immunocolorazione con l'anticorpo contro la K9H3m3, in concomitanza con la perdita di segnale per PCHET2 (HP1-like), per la K9H3m2, per la K20H4m3, e la comparsa di morfologie citologiche anomale dell'eterocromatina e dei cromosomi, che avevo già osservato abolendo l'espressione di

pchet2 negli embrioni trattati con RNAi. Questi dati suggeriscono, quindi, che il pathway K9H3m3/HP1/K20H4m3 sia coinvolto nell'eterocromatizzazione facoltativa dei Coccidi. Inoltre, l'analisi della mitosi ha evidenziato difetti nella segregazione cromosomica.

Ho anche attuato un diverso approccio per caratterizzare *Su(var)3-9* a livello funzionale, impiegando la chaetocina, un metabolita fungino scoperto come il primo inibitore della metiltransferasi istonica specifica della lisina. La chaetocina è specifica per la metiltransferasi SU(VAR)3-9 sia *in vitro* sia *in vivo*, e può quindi essere usata per studiare la repressione genica mediata dall'eterocromatina. Gli embrioni trattati hanno mostrato quasi totale assenza d'immunocolorazione con l'anticorpo contro la K9H3m3, in concomitanza con la perdita di segnale per PCHET2 (HP1-like), per la K9H3m2, per la K20H4m3, e la comparsa di morfologie citologiche anomale dell'eterocromatina e dei cromosomi, che avevo già osservato abolendo l'espressione di *Su(var)3-9-like* negli embrioni trattati con RNAi. Le implicazioni di questi risultati saranno discusse.

ABSTRACT

The N-termini histone tails protrude from the nucleosome and are subject to posttranslational modifications, including acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitination, and ADP-ribosylation. During recent years, many histone modifying enzymes and several chromatin-associated proteins that specifically bind to these modifications have been identified. Particular histone modification patterns have been associated with distinct chromatin states and are proposed to represent an indexing mechanism that could extend the information potential of the genetic code.

In eukaryotes, histone H3 lysine 9 tri-methylation (K9H3m3) controls gene silencing and plays a central role for the establishment of constitutive heterochromatin. Histone H3 is selectively methylated at lysine 9 by a specific histone methyltransferase (HMTase) codified by *Su(var)3-9* gene. The heterochromatin protein HP1 binds by its chromodomain to methylated lysine 9 of histone H3 to propagate the heterochromatic state. H4 trimethylation at lysine 20 (K20H4m3) is also enriched at pericentric heterochromatin. K9H3 and K20H4 trimethylation seems to be important components of a repressive pathway that can index pericentric heterochromatin.

The possible role of the K9H3 trimethylation by SU(VAR)3-9 in the establishment of facultative heterochromatin has been poorly studied.

The chromosome system of mealybugs provides a dramatic example of facultative heterochromatinization, thus representing an ideal model system to investigate such a phenomenon. In male mealybug embryos, the entire paternally-derived, haploid chromosome set becomes heterochromatic at mid-cleavage, while in female embryos both the paternal plus the maternal complements remain euchromatic throughout ontogeny. In the mealybug *Planococcus citri*, PCHET2, an HP1-like protein which is preferentially associated with the male-specific facultative heterochromatin was previously identified.

In this work explored the role of a *Su(var)3-9* ortholog in mealybugs. To this aim, I identified and cloned the *Su(var)3-9-like* HMTase by PCR amplification from genomic DNA. The nucleotide sequence obtained has an high degree of identity (98%) with *Drosophila melanogaster*'s homolog sequence.

I made RNAi experiments with *Su(var)3-9-like* dsRNA and I showed that the quenching of K9H3-specific HMTase expression in embryos leads to loss K9H3m3 staining concomitant with a loss of staining for PCHET2 (HP1-like), for K9H3m2, for K20H4m3, and the generation of abnormal cytological morphologies of chromatin and chromosomes which are very similar to those observed extinguishing *pchet2* expression in embryos by RNAi. Then these data suggest us that the K9H3m3/HP1/K20H4m3 pathway is involved in facultative heterochromatinisation in mealybugs.

I also approached to this functional characterization of *Su(var)3-9* using the chaetocin, a fungal metabolite discovered as the first inhibitor of a lysine-specific histone methyltransferase. Chaetocin is specific for the methyltransferase SU(VAR)3-9 both in vitro and in vivo and may therefore be used to study heterochromatin-mediated gene repression. Treated embryos showed a loss of K9H3m3 staining concomitant with a loss of staining for PCHET2, for K9H3m2, for K20H4m3, and the generation of abnormal cytological morphologies of heterochromatin and chromosomes, as I have already observed extinguishing *Su(var)3-9-like* expression in embryos by RNAi. The implications of these results will be discussed.

1. INTRODUZIONE

La Cromatina

Nel nucleo delle cellule eucariotiche il DNA, in associazione a specifiche proteine, forma un complesso definito cromatina. Con il termine cromatina s'intende, quindi, il DNA associato alle proteine nucleari. Quest'ultime sono di due tipi: gli istoni e le proteine non istoniche.

La maggior parte delle proteine cromosomali è rappresentata da proteine basiche, dette istoni; la rimanente componente proteica è detta non istonica ed è composta da proteine che hanno un punto isoelettrico più basso di quello istonico.

Gli istoni sono delle proteine che, legando il DNA, formano la struttura fondamentale della cromatina, il nucleosoma. Sono di 5 tipi: H1, H2A, H2B, H3 ed H4 e si trovano su tutte le cellule eucariotiche. Gli istoni H3 e H4 sono tra le proteine più conservate a livello di sequenza amminoacidica, un po' meno gli istoni H2A ed H2B. L'istone H1 varia molto tra organismi diversi, fino ad arrivare ai gruppi tassonomici di pesci, uccelli e rettili dove viene completamente sostituito da un altro tipo di istone chiamato H5.

Gli istoni sono proteine basiche, ricche di amminoacidi basici, con elevato contenuto di residui di lisina, come l'istone H1. Anche H2A ed H2B sono ricchi in lisina, mentre H3 ed H4 contengono prevalentemente residui di arginina.

Strutturalmente, ogni istone presenta un corpo globulare ed, alla sua estremità N-terminale, una coda flessibile. La somiglianza tra loro suggerisce una possibile derivazione da un antenato comune per duplicazione genica e successiva divergenza.

Tutti gli istoni tranne l'H1 fanno parte delle strutture ottameriche chiamate nucleosomi, attorno alle quali si avvolge la doppia elica di DNA. Ciascun ottamero contiene due molecole di ogni istone. L'istone H1 si trova all'esterno del nucleosoma, sul DNA linker -tratto di DNA che unisce nucleosomi adiacenti- aiutando così al compattamento della cromatina interfascia in strutture di ordine superiore (solenioide o fibra di 30nm).

La parte istonica aminotermine, protrudendo dalla struttura nucleosomale, è la sede di modificazioni covalenti importanti per la funzione della cromatina. Queste modificazioni comprendono l'aggiunta o la rimozione di gruppi chimici dalle catene laterali di specifici residui amminoacidici.

Le proteine istoniche sono la maggioranza delle proteine cromatiniche. La parte restante è composta dalle cosiddette proteine non istoniche. Si tratta di proteine che hanno un punto isoelettrico più basso di quello istonico, essendo più acide. Sono coinvolte nella formazione di strutture di ordine superiore, come l'eterocromatina, e nei processi di regolazione genica. Alla categoria delle proteine non istoniche appartengono le proteine HMG (High Mobility Group). Sono

proteine che si legano al solco minore del DNA incurvandolo, permettendo così alla cromatina un maggior grado di compattazione. Anche le proteine non istoniche che presentano un dominio amminoacidico detto “chromo domain” -dove chromo sta per *chromosome organization modifier*- (Singh *et al.*, 1991), sono implicate nella regolazione della struttura del cromosoma e delle regioni eterocromatiche. Il rappresentante più conosciuto e meglio studiato di questa classe è la proteina HP1 (Heterocromatin Protein 1), scoperta in *Drosophila melanogaster* (James and Elgin, 1986). HP1 si lega preferenzialmente alle regioni eterocromatiche sui cromosomi politenici (James *et al.*, 1989). HP1 è una proteina molto conservata sia a livello di sequenza nucleotidica che a livello di sequenza genica. Sono state identificate proteine ad essa omologhe dal lievito fino ai mammiferi (Hamvas *et al.*, 1992; Chevillard *et al.*, 1993).

Strutturalmente HP1 si presenta con due domini distinti, il cosiddetto cromodominio (“chromo-domain”) alla porzione amminotermale ed il “chromo shadow domain” al C-terminale, uniti da una regione intermedia chiamata “hinge region” (Eissenberg and Elgin, 2000). Il cromodominio è deputato alla localizzazione nucleare e al legame con l’eterocromatina (Powers and Eissenberg, 1993). Il cromodominio di HP1 interagisce con la lisina 9 metilata dell’istone H3, un’interazione chiave nella formazione di un dominio eterocromatico (questo argomento sarà ripreso in dettaglio nei paragrafi 1.2.2 ed 1.3). Il dominio chromo shadow è invece responsabile per il legame della HP1 con altre proteine oppure con sé stessa a formare omodimeri.

Eterocromatina ed Eucromatina

Già dal 1928 Heitz individuò in nuclei interfasicci certe regioni addensate vicine al nucleolo ed alle pareti nucleari. Le stesse regioni, quando la cellula entrava in mitosi, facevano parte dei cromosomi. Definì allora con il termine eterocromatina le regioni di cromatina strettamente condensate che attraversano le varie fasi del ciclo cellulare senza andare incontro a sostanziali cambiamenti nel loro stato di condensazione. La restante parte della cromatina è costituita dalla eucromatina, quella cromatina che va incontro a condensazione durante la mitosi e decondensazione nell’interfase.

L’eterocromatina, rispetto all’eucromatina, presenta il fenomeno dell’allociclia (mantiene cioè sempre uno stato condensato), replica tardivamente nella seconda metà della fase S del ciclo cellulare, e presenta una densità minore di geni, il che si traduce in un livello trascrizionale più basso. Esiste, infatti, una correlazione tra lo stato di condensazione della cromatina e la sua attività: quando la cromatina è più condensata, non c’è espressione genica.

L’eterocromatina viene suddivisa in eterocromatina costitutiva e facoltativa. L’eterocromatina costitutiva si trova in regioni del genoma costantemente eterocromatiche, presenti

su ambedue i cromosomi omologhi, in tutte le cellule di organismi della stessa specie. È inoltre costituita da DNA altamente ripetuto come le regioni centromeriche e telomeriche.

L'eterocromatina facoltativa si forma solo in alcuni tessuti o momenti dello sviluppo, in genere a carico di uno solo dei due cromosomi omologhi, o di una sua regione, e può, in altri momenti del ciclo vitale, ritornare ad assumere le caratteristiche di eucromatina (vedi sotto).

Dell'eterocromatina facoltativa si tornerà a parlare in seguito.

1.1 Epigenetica

Il termine epigenetica indica quei fenomeni genetici (cioè ereditari) che modulano le potenzialità dell'espressione fenotipica senza dipendere da alterazioni della sequenza genica. Ciò, apparentemente, rappresenta un paradosso della genetica convenzionale, in quanto implica che due alleli, anche con la stessa sequenza genica, possano mostrare stati di espressione differenti ed ereditabili. Questo fenomeno può essere spiegato se si ammette l'esistenza di due stati discontinui della cromatina, quello nativo, che è dato dalla somma dei suoi componenti, e quello determinato o epigenetico, con proprietà che consentono di distinguere le relative componenti, o il loro assemblaggio macromolecolare, da quelle dello stato nativo (Lewin, 1998).

Alcuni fenomeni epigenetici presenti in natura, e oggetto di studio in questo lavoro di tesi, sono l'eterocromatina facoltativa e l'imprinting.

1.1.1 Eterocromatina facoltativa

L'eterocromatina facoltativa è cromatina che assume tale stato solo in particolari tessuti o momenti dello sviluppo, e che può, in altri momenti del ciclo vitale, ritornare ad assumere le caratteristiche di eucromatina.

Esistono tre principali esempi di questa condizione: l'inattivazione di uno dei due cromosomi X nelle femmine di mammifero; l'inattivazione della coppia di cromosomi sessuali X ed Y, durante la spermatogenesi dei mammiferi; l'inattivazione di un intero assetto cromosomico aploide nei maschi dei Coccidi. Tra questi, il più conosciuto è l'inattivazione del cromosoma X nelle femmine di mammifero.

Inattivazione del cromosoma X nelle femmine di mammifero

Nei mammiferi si è evoluto un meccanismo di compensazione di dosaggio genico per il cromosoma X. I cromosomi sessuali dei mammiferi sono X e Y; le cellule femminili contengono due cromosomi X, le maschili un cromosoma X e un cromosoma Y. Presumibilmente una dose doppia di prodotti genici del cromosoma X sarebbe letale; per questo motivo le cellule femminili ne

inattivano uno dei due. Il cambiamento non è permanente poiché il cromosoma X eterocromatico è riattivato durante la formazione delle cellule germinali della femmina.

Il cromosoma X inattivo è visibile in interfase al microscopio ottico; i nuclei delle cellule femminili presentano infatti una massa di cromatina molto condensata, chiamata corpo di Barr in onore del suo scopritore, che osservò tale massa per la prima volta in cellule neuronali di ratto verso la fine degli anni '50 (Barr, 1960; Ballabio and Willard, 1992). Il corpo di Barr è costituito dal cromosoma X eterocromatizzato, che forma una struttura distinta posta vicino alla membrana nucleare e si replica alla fine della fase S.

In individui con cromosomi X sovrannumerari (ad esempio femmine con triplo X o maschi affetti da sindrome di Klinefelter (XXY)), si inattivano tutti i cromosomi X tranne uno e si formano quindi un corrispondente numero di corpi di Barr. Questo spiega perché, mentre variazioni nell'assetto degli autosomi risultano generalmente letali, le anomalie nel numero dei cromosomi X risultano abbastanza tollerate, proprio perché l'inattivazione minimizza gli effetti di copie multiple di geni legati al cromosoma X.

Nell'uomo non tutti i geni associati all'X sono inattivati come avviene invece nel topo. Ciò avviene perché il cromosoma X umano ha una regione omologa sull'Y, detta regione pseudoautosomale, per cui le sequenze localizzate in questa regione sono presenti in duplice copia anche nel maschio e non è necessario compensare il dosaggio genico. In questo modo si spiega perché nella femmina di topo i genotipi XX e XO siano equivalenti dal punto di vista del fenotipo "letalità", mentre nell'uomo il genotipo XO sia letale nel 99% dei casi e sterile nell'1% (Ballabio and Willard, 1992).

Generalmente, nelle femmine dei mammiferi, uno dei due cromosomi X di ciascuna cellula, a caso, viene condensato in eterocromatina, formando quella struttura distinta, nota come corpo di Barr, precedentemente descritta; nei topi ciò avviene tra il terzo e il sesto giorno di sviluppo. Il cromosoma X inattivo si perpetua allo stato eterocromatico, quello attivo è invece una componente dell'eucromatina. Quando un cromosoma X paterno o materno viene inattivato in una cellula, tutti i discendenti di quella cellula ereditano fedelmente lo stesso tipo di inattivazione. Se l'inattivazione è casuale, l'embrione avrà dei gruppi clonali di cellule in cui è inattivo il cromosoma X di origine paterna e gruppi clonali in cui è inattivo quello di origine materna (Lyon, 1962; per una review: Brockdorff *et al.*, 2002, Plath *et al.*, 2002).

Tuttavia, l'inattivazione del cromosoma X non è sempre casuale; nei mammiferi marsupiali l'inattivazione avviene sempre a carico del cromosoma X paterno, sia nei tessuti embrionali che extraembrionali, nei placentali roditori, invece, viene preferenzialmente inattivato l'X paterno nei

tessuti extraembrionali, mentre nel corpo dell'embrione l'inattivazione è, come abbiamo visto, casuale.

Sono state formulate delle ipotesi circa le differenze esistenti tra il cromosoma X di origine paterna e quello materno; probabilmente riflettono le differenze esistenti tra i cromosomi dello spermatozoo e quelli della cellula uovo al momento della fecondazione (imprinting). Il genoma dello spermatozoo va incontro ad un processo di condensazione del DNA che comporta la sostituzione degli istoni con le protammine, le quali vengono rilasciate immediatamente dopo la fecondazione per essere rimpiazzate dagli istoni della cellula uovo. Inoltre, la replicazione asincrona dei cromosomi X nei primi stadi dell'embriogenesi suggerisce che esistano differenze nella composizione della cromatina tra i due (Grant and Chapman, 1988).

Un possibile meccanismo molecolare della coordinata inattivazione di quasi tutti i geni situati sul cromosoma X inattivo, potrebbe essere rappresentato dal loro differente livello di metilazione del DNA. Nel cromosoma X inattivo le isole CpG del promotore al 5' dei geni ad esso associati sono metilate; nell'X attivo invece tali regioni sono ipometilate o non metilate (Grant and Chapman, 1988). Tuttavia, a livello temporale, la metilazione del DNA segue l'inattivazione genica (Lock *et al.*, 1987), per cui è probabile che la metilazione del DNA renda irrevocabilmente silenti le regioni del DNA precedentemente inattivate (Bird, 2002).

Il processo di inattivazione dell'X inizia a livello di una specifica regione del cromosoma X, che prende il nome di centro di inattivazione (XIC nell'uomo; Xic nel topo) e si diffonde in entrambe le direzioni.

Il primo gene identificato entro la regione XIC dell'uomo manifestava caratteristiche che ne rendevano probabile l'implicazione nel processo di inattivazione dell'X. Questo gene, *XIST* (nell'uomo; *Xist* nel topo) (acronimo per *X inactive specific transcripts*), è espresso dall'X inattivo ma non da quello attivo, l'esatto contrario di ciò che avviene per gli altri geni associati all'X. Il gene *XIST* codifica per una molecola di RNA di 15 kb, che non viene tradotta in proteina (Brockdorff *et al.*, 1992).

Sono stati formulati due modelli circa le modalità d'azione di *Xist*.

Il primo modello è basato sull'ipotesi che il trascritto di *XIST* sia un RNA funzionale in grado di rimanere associato al *locus XIST*; l'associazione dell'RNA con la cromatina richiama proteine che promuovono l'inattivazione (Brockdorff, 1992, 2002; Plath *et al.*, 2002).

Il secondo modello propone invece che la trascrizione di *XIST* modifichi la cromatina adiacente e inneschi in questo modo l'inattivazione che si propaga poi a tutto il cromosoma X. In questo caso sarebbe perciò la trascrizione stessa a promuovere inattivazione (Brockdorff, 1992, 2002; Plath *et al.*, 2002).

Inattivazione della coppia X ed Y durante la spermatogenesi dei mammiferi

Questo secondo esempio di eterocromatizzazione facoltativa si verifica durante la meiosi maschile dei mammiferi. In questa fase i cromosomi sessuali vanno incontro a un processo progressivo di condensazione che porta alla formazione di una piccola struttura ovoidale attaccata alla membrana nucleare e definita corpo XY (Metzler-Guillemain *et al.*, 2003).

La formazione di questa struttura ha varie funzioni: previene la ricombinazione illegittima tra i cromosomi sessuali; restringe la ricerca dell'omologia presinaptica alla regione pseudoautosomale (PAR, *Pseudo Autosomal Region*), facilitando la sinapsi alla regione PAR dei cromosomi X e Y (Cowell *et al.*, 2002) e sottraendo le regioni non pseudoautosomali al riconoscimento da parte dei checkpoint di appaiamento (Turner *et al.*, 2000).

Il corpo XY si può facilmente discernere a livello morfologico negli spermatociti allo stadio di pachitene e diplotene (Solari, 1974; Cowell *et al.*, 2002).

Durante la spermatogenesi quindi i cromosomi sessuali diventano eterocromatici e silenti a livello trascrizionale. Il meccanismo che guida questa eterocromatizzazione facoltativa non è ancora noto, tuttavia sono state formulate diverse ipotesi a questo riguardo.

Si è pensato che esistesse un meccanismo comune per l'inattivazione del corpo XY durante la meiosi maschile e per l'inattivazione dell'X nelle cellule somatiche femminili. Questo meccanismo avrebbe coinvolto l'RNA XIST/Xist (Salido *et al.*, 1992, Ayoub *et al.*, 1997). Studi successivi hanno suggerito, però, che i trascritti XIST/Xist non partecipano alla formazione dei corpi XY (Metzler-Guillemain *et al.*, 2000, Turner *et al.*, 2002).

Non si può comunque escludere il coinvolgimento di altri trascritti non tradotti nell'eterocromatizzazione dei corpi XY durante la meiosi maschile dei mammiferi (Murchardt *et al.*, 2002).

Si è inoltre ipotizzato il coinvolgimento di specifiche proteine in questo processo. Ce ne sono diverse che localizzano sui corpi XY dei roditori in maniera più o meno specifica, tuttavia la loro funzione non è ancora nota (Smith & Benavente, 1992, Kralewski *et al.*, 1997, Turner *et al.*, 2000). Tra queste si può citare Macro-H2A1.2, presente sui corpi XY di topo allo stadio di pachitene precoce (Hoyer-Fender *et al.*, 2000). Questa proteina si localizza sulle regioni PAR dei cromosomi sessuali negli spermatociti ma anche negli oociti (Turner *et al.*, 2001) e potrebbe avere un ruolo nella repressione genica (Perche *et al.*, 2000), tuttavia la sua funzione non è ancora nota.

Altre due proteine che localizzano sui corpi XY degli spermatociti di topo sono la metiltransferasi SUV39H2, il cui ruolo è metilare selettivamente la Lys 9 dell'istone H3 (O' Carroll *et al.*, 2000) e M31, l'omologo in topo di HP1, la già citata proteina dell'eterocromatina di *Drosophila melanogaster*. M31 è distribuita nell'eterocromatina costitutiva (Wreggett *et al.*, 1994)

e sui corpi XY degli spermatociti allo stadio di pachitene tardivo e diplotene (Motzkus *et al.*, 1999). Questo suggerisce che M31 possa essere coinvolta nell'eterocromatizzazione facoltativa che ha luogo durante la meiosi. Torneremo a parlare della distribuzione di M31 e della Lys 9 metilata dell'istone H3 sui corpi XY nel prossimo capitolo.

Anche nell'uomo esiste una proteina omologa ad HP1, più precisamente ne sono state individuate 3 isoforme, HP1 α , HP1 β e HP1 γ , due delle quali rivestono i corpi XY e potrebbero quindi essere coinvolte nella loro eterocromatizzazione facoltativa (Metzler-Guillemain *et al.*, 2003).

Inattivazione di un assetto aploide nei coccidi

Il terzo esempio di eterocromatizzazione facoltativa conosciuto è dato dal sistema cromosomico dei Coccidi (Homoptera; Coccoidea).

Nel 1948, mediante osservazione morfologica, Balachowsky individuò nei Coccidi due grossi raggruppamenti cromosomici: Margaroidae e Lecano-diaspidoidae.

Lo studio cario-citologico ha confermato questa suddivisione (Tremblay, 1972): nei Margaroidi si ha un meccanismo di determinazione del sesso XX-X0, nei Lecanoidi e nei Diaspidoidi non ci sono cromosomi sessuali differenziati.

Nei maschi dei Lecanoidi l'intero assetto cromosomico aploide di origine paterna va incontro ad eterocromatizzazione (figura 1), in quelli dei Diaspidoidi invece viene eliminato.

Sistema cromosomico dei Coccidi

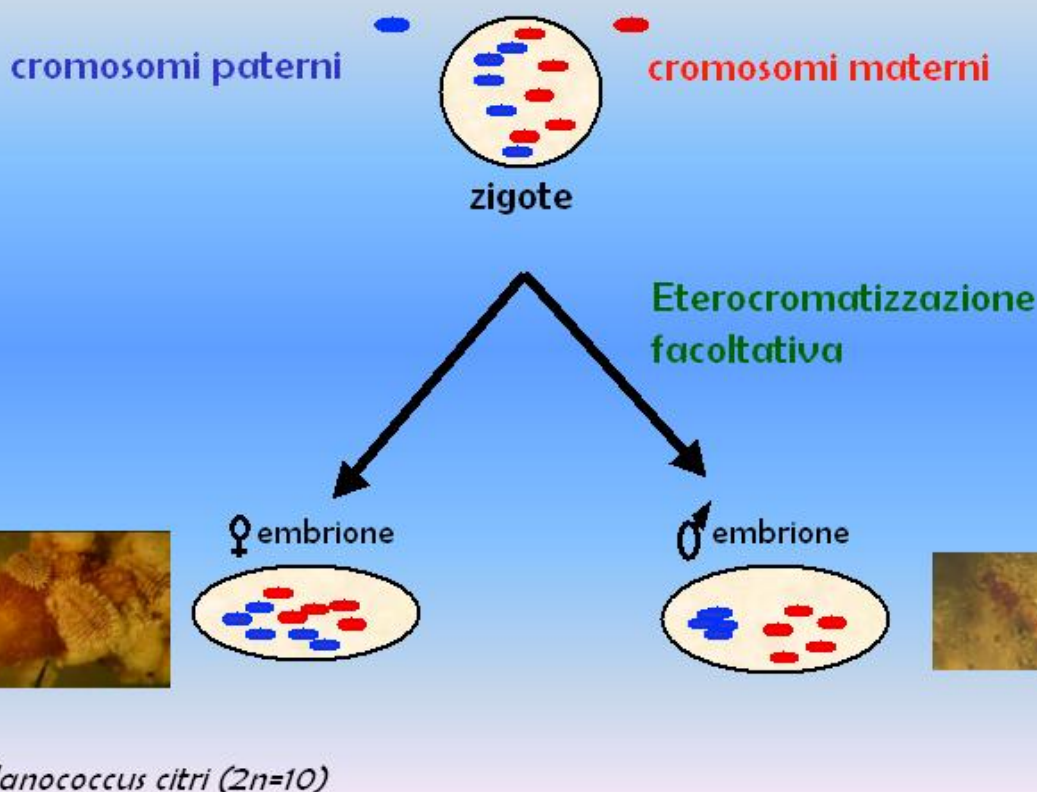


Figura 1 Sistema cromosomico Lecanoide.

Nel sistema cromosomico Lecano-Diaspidoidae non ci sono cromosomi sessuali differenziati. Dopo la fecondazione tutti i cromosomi dell'embrione sono euromatici. Allo stadio di blastula l'intero assetto cromosomico aploide di origine paterna eterocromatizza nella linea maschile dei Lecanoidi. *Planococcus citri* ($2n=10$) è una specie rappresentante del sistema Lecanoidi.

Nei maschi dei lecanoidi, immediatamente dopo la fecondazione, i cromosomi dell'embrione sono ancora euromatici. Durante la settima divisione embrionale, tutti i cromosomi di origine paterna si condensano; in interfase, i cromosomi eterocromatici si uniscono per formare un aggregato, definito cromocentro, e divengono così facilmente distinguibili dall'assetto cromosomico euromatico di origine materna. Questo fenomeno interessa solo gli embrioni destinati a diventare maschi; nelle femmine, invece, tutti i cromosomi restano euromatici (Brown and Nur, 1964, Bongiornoi *et al.*, 2001). I cinque cromosomi eterocromatici appaiono più corti e condensati di quelli euromatici, fino alla metafase, quando anche questi ultimi raggiungono un elevato grado di condensazione. Alla formazione della piastra metafasica, il set cromosomico eterocromatico e quello euromatico risultano indistinguibili.

L'assetto cromosomico paterno resta eterocromatico nella maggior parte dei tessuti; in alcuni tessuti degli animali adulti, quali i tubuli malpighiani e parte dell'intestino, l'eterocromatina reverte ad euromatina (Nur, 1967).

L'ipotesi che l'assetto cromosomico eterocromatico fosse quello di origine paterna fu formulata da Hughes-Schrader, nel 1948, ed è stata confermata da Brown e Nelson-Rees nel 1961. Irradiando i maschi ed analizzandone la prole maschile, ci si è accorti che le aberrazioni causate nei padri dal trattamento con i raggi X interessavano, nella progenie maschile, solo l'assetto eterocromatico. Trattando in maniera analoga le femmine e analizzandone la prole maschile, è stata notata la comparsa di aberrazioni a carico del solo assetto eucromatico. E' stato possibile fare questo esperimento in quanto i cromosomi dei Coccidi sono olocentrici ed olocinetici e i frammenti generati dalle radiazioni non vengono persi durante la divisione cellulare. Questi dati confermavano l'ipotesi che l'assetto eterocromatico fosse quello di origine paterna.

Hughes-Schraders aveva inoltre ipotizzato che l'assetto eterocromatico fosse geneticamente inerte. Le conferme a questa ipotesi sono arrivate da Brown e Nelson-Rees, nel 1961. Irradiando i maschi con raggi X e analizzandone la progenie maschile e femminile, è stato riscontrato un diverso tasso di sopravvivenza in corrispondenza dei vari dosaggi. Aumentando la dose di radiazioni, il numero di figlie femmine diminuiva, non subiva invece declino il numero dei figli maschi. Il trattamento induceva evidentemente mutazioni letali dominanti che elevavano il tasso di mortalità femminile; mentre, per la prole maschile non si verificava lo stesso fenomeno, poiché le mutazioni letali, che in questo caso si trovavano nell'assetto eterocromatico, non venivano espresse. Questi dati confermavano l'ipotesi di partenza, tuttavia l'assetto eterocromatico non è completamente inerte ma manifesta una certa attività residua.

Tale attività ha tre diversi effetti.

Il primo effetto è relativo alla vitalità. Irradiando pesantemente i maschi (60000-90000 rep) si vide che per la sopravvivenza della prole maschile non è importante se l'assetto eterocromatico è danneggiato, ma è determinante la quantità di materiale eterocromatico presente; la perdita di frammenti eterocromatici riduce infatti la vitalità.

Il secondo effetto è sulla fertilità. Irradiando i maschi a 30000 rep si aveva sopravvivenza del 100% della prole maschile, che tuttavia era in gran parte sterile. La percentuale di figli sterili aumentava al crescere della dose di radiazioni, arrivando al 100% con un dosaggio tra i 60000 e i 90000 rep.

Il terzo effetto riguarda la mancata intercambiabilità fra specie diverse dell'assetto eterocromatico. Se l'assetto eterocromatico fosse completamente inerte dovrebbe essere possibile sostituirlo con uno (equivalente in quantità) di un'altra specie affine di Coccidi. Il risultato atteso dopo alcuni incroci interspecifici sarebbe prole maschile vitale e femminile letale, ciò che invece si registra è letalità in entrambi i sessi (Nur and Chandra, 1963).

Recentemente si è avuta un'altra prova di una certa attività dell'assetto eterocromatico studiando l'rRNA. L'attività dei *loci* eucromatici ed eterocromatici dell'rDNA è stata analizzata studiando l'associazione fra la regione dei geni ribosomali e il nucleolo e mediante ibridazione *in situ* DNA/RNA. Da questi studi è emerso che in cellule di individui maschili i geni ribosomali situati sui cromosomi eterocromatici sono trascrizionalmente attivi (Mazzuoli *et al.*, 1999).

In conclusione quindi si può affermare che nei Coccidi l'assetto eterocromatico è geneticamente inerte ad eccezione di alcune funzioni residue.

L'assetto eterocromatico, come già detto, è di origine paterna; nei maschi, quindi, l'assetto eucromatico è quello materno, che è destinato a diventare eterocromatico nella progenie maschile. Ciò significa che, anche dopo diverse divisioni embrionali, il meccanismo di eterocromatizzazione facoltativa riesce a discriminare i due assetti cromosomici aploidi in base all'origine paterna o materna. Questo implica che i due assetti cromosomici siano differentemente marcati a seconda dell'origine parentale. Il diverso comportamento dei due assetti aploidi rientra nel fenomeno dell'imprinting genomico.

1.1.2 Imprinting

Con il termine imprinting viene indicato quel fenomeno epigenetico che denota un comportamento differenziale di due alleli o cromosomi omologhi a seconda della loro origine parentale (Crouse, 1960). In altre parole, l'espressione di certi geni dipende dal genitore da cui sono stati ereditati. I genomi di origine paterna e materna contribuiscono infatti equamente alla formazione dello zigote, ma possono avere un effetto fenotipico diverso durante lo sviluppo. Il termine imprinting indica proprio la differente marcatura cui alcuni geni o cromosomi specifici sono sottoposti durante la gametogenesi determinando l'espressione differenziale di tali geni nell'embrione e nell'adulto o il comportamento differenziale dei cromosomi. Questo concetto è stato elaborato sulla base di esperimenti di manipolazione su embrioni. Utilizzando una pipetta molto sottile è possibile asportare da uno zigote uno dei due pronuclei e sostituirlo con quello di un altro gamete. Si può così creare uno zigote con due pronuclei femminili (ginogenoti) o due maschili (androgenoti). Pur avendo un numero di cromosomi bilanciato, i ginogenoti hanno massa embrionale ben sviluppata ma tessuti extraembrionali poco differenziati, gli androgenoti invece hanno tessuti extraembrionali ben sviluppati ma massa embrionale non ben formata. In entrambi i casi si registra un arresto precoce dello sviluppo. Dal momento che il citoplasma è lo stesso nei due tipi di embrione, è chiaro che la diploidia da sola non garantisce un corretto sviluppo, per avere il quale un embrione deve ricevere un assetto cromosomico da un genitore e l'altro dal genitore di sesso opposto (Solter, 1988).

Le caratteristiche dell'imprinting sono tre: l'instaurazione, la sua trasmissione fedele ed infine la cancellazione. L'imprinting è infatti instaurato durante la gametogenesi; viene mantenuto attraverso le divisioni mitotiche nella progenie; e ritorna allo stato nativo durante la meiosi, per permettere l'instaurarsi dell'imprinting specifico del sesso dell'individuo.

Uno dei primi esempi di imprinting emerse dagli studi condotti da Helen Crouse negli anni '60 su *Sciara Ocellaris*, un insetto. Lo zigote di *Sciara* ha tre cromosomi X, due di origine paterna e uno di origine materna. Il sistema di determinazione del sesso è di tipo XX-XO. Alla settima divisione embrionale, nelle cellule della linea somatica, avviene l'eliminazione dell'X; se l'embrione elimina un solo cromosoma X di origine paterna, si sviluppa in femmina, se elimina entrambi i cromosomi X paterni, diviene maschio. Il meccanismo di eliminazione colpisce quindi selettivamente i cromosomi X di origine paterna. Appare chiaro che in ogni cellula dell'embrione alla settima divisione i cromosomi X sono distinguibili in base all'origine parentale. (Crouse, 1960)

Dopo gli studi su *Sciara* sono stati scoperti altri esempi di imprinting genomico: l'inattivazione di uno dei due cromosomi X nelle femmine di mammifero, ad esempio, non è sempre casuale, come ho già accennato: nei mammiferi marsupiali, infatti, l'inattivazione avviene sempre a carico del cromosoma X paterno, sia nei tessuti embrionali che extraembrionali, nei placentali roditori, invece, viene preferenzialmente inattivato l'X paterno nei tessuti extraembrionali, mentre nel corpo dell'embrione l'inattivazione è, come abbiamo visto, casuale.

L'eterocromatizzazione dell'assetto cromosomico di origine paterna nei Coccidi è poi un altro caso di imprinting. Nelle femmine, infatti, tutti e due gli assetti cromosomici rimangono in uno stato eucromatico dallo zigote fino all'adulto. Nei maschi invece, alla settima divisione embrionale si nota l'eterocromatizzazione dell'intero assetto di provenienza paterna. Si tratta di un chiaro esempio di imprinting genomico (Nur, 1990; Bongiorni *et al.*, 2001). Nei Coccidi, durante l'oogenesi, tramite il crossing-over, si ha un rimescolamento genico. Durante la spermatogenesi invece, l'intero corredo che era di provenienza paterna e che aveva eterocromatizzato, non andrà mai avanti a produrre dei gameti (degenera *in situ*), che si origineranno solamente da spermatozoi che contengono un assetto materno (Hughes-Schrader, 1935). Uno dei possibili candidati per marcare e distinguere, a livello molecolare, alleli e cromosomi omologhi in base all'origine parentale è la metilazione del DNA (di cui parleremo nel prossimo paragrafo) in quanto questa modificazione mostra le stesse caratteristiche di instaurazione, mantenimento e cancellazione dell'imprinting (Razin e Cedar, 1994).

Nei Coccidi sembra esserci una relazione tra imprinting e metilazione del DNA. Il ruolo della metilazione nell'imprinting è stato studiato, nella specie *P.citri*, sia a livello del DNA che cromosomale. Da questi esperimenti è risultato che, sia nei maschi che nelle femmine, i cromosomi

di origine paterna sono ipometilati (Bongiorni *et al.*, 1999). Ciò suggerisce che la metilazione fornisca un segnale che permette di discriminare i due assetti aploidi di diversa origine parentale; questo marker epigenetico viene ereditato fedelmente dalla progenie. Anticipiamo che gli enzimi responsabili della trasmissione del pattern di metilazione sono le metiltransferasi; nei Coccidi, nella specie *P.citri*, è stata identificata una DNA metiltransferasi CpG-specifica (Bizzaro, comunicazione personale). E' interessante inoltre che l'assetto ipometilato sia quello eterocromatico paterno ed (Bongiorni *et al.*, 1999); negli invertebrati dunque la metilazione sembra non essere correlata ad inattività genica, come nei vertebrati, ma ad attività. (Field *et al.*, 2004).

Riassumendo quindi, tra i fenomeni più eclatanti di eterocromatizzazione facoltativa si possono annoverare l'inattivazione del cromosoma X nelle femmine dei mammiferi, la formazione dei corpi XY nella spermatogenesi dei mammiferi e l'eterocromatizzazione di un intero genoma aploide paterno nei maschi dei Coccidi. Nei Coccidi inoltre l'eterocromatizzazione ha luogo alla settima divisione embrionale, ciò implica che gli embrioni riescano a discriminare tra i due assetti cromosomici di origine parentale diversa. Affinché questo possa avvenire i due assetti devono essere differentemente marcati; dal momento che in questo caso il fenomeno riguarda l'intero genoma si può parlare di imprinting genomico. I Coccidi presentano dunque due importanti fenomeni epigenetici: l'eterocromatizzazione facoltativa e l'imprinting genomico.

1.2. Meccanismi molecolari dei fenomeni epigenetici

In base alla natura del bersaglio molecolare che determina la conversione tra lo stato nativo e quello determinato (epigenetico), i meccanismi alla base degli effetti epigenetici possono essere suddivisi in due classi: quelli che agiscono sul DNA e quelli che modificano le proteine associate.

1.2.1 Metilazione del DNA

La metilazione del DNA è una modificazione covalente molto diffusa sia nei procarioti che negli eucarioti. Gli enzimi che effettuano tale modificazione si chiamano DNA-metiltransferasi ed operano all'interno di specifiche sequenze. Con questo processo si assiste al trasferimento di un metile da una molecola donatrice di gruppi metilici attivati (di solito la S-adenosil-L-metionina) al DNA, con la conseguente produzione di S-adenosilomocisteina e DNA metilato. Le basi usate come substrato per la metilazione sono l'adenina e la citosina ed i prodotti ottenuti sono la 5-metilcitosina, N⁴-metilcitosina e N⁶-metiladenina. La modificazione di questi basi comunque non interferisce con il normale appaiamento delle basi, in quanto il gruppo metile si posiziona nel solco maggiore del DNA. La metilazione del DNA è un segnale epigenetico in quanto non altera la sequenza nucleotidica del DNA.

Nei procarioti possono essere metilate sia l'adenina che la citosina. La metilazione del DNA in questi organismi ha tre principali ruoli biologici: riconoscimento del DNA estraneo (non self) da quello endogeno; coinvolgimento nel meccanismo della riparazione del DNA ("postreplicative mismatch repair"); controllo della replicazione del DNA e del ciclo cellulare.

Negli eucarioti la base che può essere metilata è solo la citosina con la produzione di 5-metilcitosina (Jeltsch, 2002). I livelli di metilazione variano tra le specie considerate; dall'assenza di metilazione in numerosi invertebrati ed alcune specie di lieviti si passa alla metilazione ad alti livelli dei vertebrati e delle piante (Hendrich and Tweedie, 2003). La percentuale di citosine metilate varia da 0-3% negli insetti, 5% nei mammiferi ed uccelli, 10% in pesci ed anfibi, fino ad arrivare al più del 30% in alcune piante (Adams, 1995).

Nei vertebrati i substrati preferiti per la metilazione sono le citosine dei dinucleotidi CpG; in piante e funghi vengono metilate anche le citosine che si trovano al di fuori di queste sequenze (Colot and Rossignol, 1999). Nei mammiferi si può assistere ad una rarissima metilazione delle sequenze CpNpG oppure delle sequenze senza simmetria CpA e CpT. Nelle cellule staminali embrionali di topo invece la metilazione al di fuori delle CpG rappresenta il 15-20% della metilazione totale (Costello and Plass, 2001).

Nei mammiferi sono state identificate tre DNA-metiltransferasi: Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b. L'enzima Dnmt1 è una metilasi di mantenimento e riconosce specificamente il DNA emimetilato alle sequenze CpG. Al termine della replicazione, la metilasi Dnmt1 aggiunge un gruppo metile in corrispondenza della C non metilata nel CpG del filamento di nuova sintesi, davanti alla C metilata del CpG del vecchio filamento. La Dnmt1 garantisce dunque la trasmissione stabile del pattern di metilazione del DNA alle cellule figlie (Bestor, 2000). Per quanto riguarda gli altri due enzimi, si ipotizza che siano responsabili della metilazione *de novo*, tuttavia non è ancora ben chiaro come questo possa avvenire. Secondo una teoria, essi potrebbero essere attratti da particolari sequenze di DNA. A favore di questa ipotesi è stato osservato che in topi e uomini mutanti per *Dnmt3b*, è assente la metilazione nelle sequenze di DNA ripetitivo pericentromeriche e nelle isole CpG del cromosoma X inattivo. Secondo un'altra teoria invece, potrebbe essere direttamente la cromatina che si trova in uno stato trascrizionalmente silente il bersaglio molecolare del sistema di metilazione *de novo* (Bird, 2002).

È stata scoperta anche una demetilasi appartenente alla famiglia delle proteine MBD (methyl-CpG-binding domain), chiamata MBD2, che possiede un'attività demetilasica *in vitro* (Wolffe *et al.*, 1999). Il meccanismo enzimatico di questo processo non è stato ancora chiarito.

Il ruolo principale della metilazione negli eucarioti sembra essere il silenziamento genico (Colot and Rossignol, 1999). I geni costitutivi sono caratterizzati da isole ricche in CpG, situate al

5' nella regione del promotore; queste regioni, al contrario del resto del genoma, sono costantemente demetilate. Nel caso dell'X inattivo delle femmine di mammifero, è stato constatato che i geni housekeeping (costitutivamente attivi in tutte le cellule) presentano isole CpG metilate sull'X inattivo ed ipometilate sull'omologo attivo (Prantera and Ferraro, 1990; Li *et al.*, 1992). La dimostrazione che la metilazione è correlata all'inattività deriva anche dal trattamento di cellule di mammifero con la sostanza demetilante 5-azacitidina, che determina la riattivazione dei geni situati sull'X inattivo (Mohandas *et al.*, 1981; Graves, 1982; Venolia *et al.*, 1982). La metilazione sembra sia richiesta anche per proteggere il cromosoma X attivo dal silenziamento. Infatti il gene *Xist* è espresso sull'X inattivo e non viene metilato, mentre sull'X attivo silenziato, si osserva un'ipermetilazione del suo promotore che ne blocca la trascrizione (Panning and Jaenisch, 1996).

Anche se la metilazione è implicata nel silenziamento genico, non sembra comunque che sia la causa di esso. È stato visto infatti, nel caso dell'inattivazione dell'X, che la repressione dei geni sull'X inattivo precede di qualche ora l'inizio della metilazione. Secondo questo studio la funzione della metilazione del DNA sarebbe di memorizzare i pattern di attività genica lasciando isole CpG non metilate e trascrizionalmente attive e creandone altre metilate e quindi represses. La metilazione del DNA non interviene quindi per silenziare geni trascrizionalmente attivi ma piuttosto per “confermare” il silenziamento genico precedentemente effettuato (Bird, 2002).

Il modo con cui la metilazione interviene per silenziare dei geni può variare: la metilazione dei dinucleotidi CpG nei promotori potrebbe disturbare direttamente il legame dei fattori di trascrizione ad essi, impedendo la trascrizione (Bird, 2002). Tuttavia esistono dei fattori di trascrizione, come per esempio Sp1, che risultano insensibili alla metilazione. Secondo un'altra ipotesi la presenza dei dinucleotidi metilati influenzerebbe la stabilità ed il posizionamento dei nucleosomi, determinando delle variazioni locali alla struttura cromatinica al livello del promotore, il che cambierebbe la sua accessibilità da parte dei fattori di trascrizione (Davey *et al.*, 1997).

La metilazione del DNA potrebbe essere il modo usato per creare delle “impronte” (imprint) sul genoma. Le metilasi *de novo* possono essere usate per instaurare queste impronte, quelle di mantenimento per mantenerle attraverso le divisioni cellulari ed alla fine le demetilasi per cancellarle dalla linea germinale, dove saranno reinstaurate successivamente.

L'imprinting è un fenomeno epigenetico che influenza il comportamento cromosomico prescindendo dalla sequenza nucleotidica ed è caratterizzato, come precedentemente discusso, da una fase di instaurazione, una di mantenimento ed una di cancellazione con successivo “resetting”. La metilazione del DNA, per le sue caratteristiche, rappresenta quindi un buon candidato come meccanismo epigenetico alla base di tale fenomeno, perché soddisfa le richieste del meccanismo dell'imprinting: instaurazione, trasmissione e cancellazione, (Razin and Cedar, 1994). È stata infatti

messa in relazione la metilazione del DNA ed il silenziamento allelico come conseguenza dell'imprinting: la delezione di *Dnmt1* determina la perdita d'espressione monoallelica di diversi geni imprinted (Li *et al.*, 1993).

Nei vertebrati il pattern di metilazione cambia drasticamente durante lo sviluppo. Gli spermatozoi e gli oociti presentano un alto tasso di metilazione a livello del DNA. Nell'embrione allo stadio di preimpianto si verifica un'ondata di demetilazione in tutto il genoma che cancella così il pattern di metilazione dei gameti. La fase dell'impianto dell'embrione è seguita da una metilazione *de novo* nella linea somatica, mentre la linea germinale ne rimane priva, fino alla maturazione dei gameti. Il pattern di metilazione instaurato nella linea somatica è stabilmente trasmesso alle successive generazioni cellulari tramite il meccanismo di mantenimento della metilazione (Reik *et al.*, 2001).

Un altro ruolo che ha la metilazione in piante e vertebrati è il silenziamento trascrizionale di sequenze di DNA ripetuto come per esempio trasposoni, retrovirus e retrotrasposoni. È stato visto che circa il 90% delle citosine metilate dei vertebrati si trova proprio in tali sequenze. La metilazione delle citosine situate in tali posti potrebbe fungere come difesa dell'ospite contro la trasposizione, per silenziare l'espressione di geni non necessari codificati da trasposoni ed impedire i riarrangiamenti di DNA in conseguenza degli eventi di trasposizione (Yoder *et al.*, 1997; Bender, 1998; Bestor, 1999).

È stato ipotizzato che la metilazione possa avere un ruolo nella regolazione di geni tessuto-specifici durante lo sviluppo dei mammiferi. Sono stati identificati geni che presentano differenze di metilazione tessuto-specifiche, ma non si è in grado di dimostrare come il pattern di metilazione di un gene non espresso in un tessuto riesca ad impedire la trascrizione in un tipo cellulare in cui normalmente il gene viene espresso (Walsh and Bestor, 1999).

La metilazione del DNA ha anche un ruolo cruciale nell'insorgenza di alcune patologie umane, tra cui vari tipi di cancro. In questi casi viene alterato il pattern di metilazione del DNA e si nota una generale ipometilazione del DNA ed ipermetilazione delle isole CpG. L'ipometilazione, da una parte, attivando la trascrizione di oncogeni e di retrotrasposoni latenti, potrebbe promuovere l'instabilità cromosomale; l'ipermetilazione, d'altra parte, delle isole CpG dei promotori di geni onco-soppressori, inattivandoli, potrebbe favorire la progressione della cancerogenesi.

Negli invertebrati il ruolo della metilazione del DNA non è ancora ben chiaro, come si è precedentemente accennato, ed è stato poco indagato. La presenza della citosina metilata è riportata in diverse specie di insetti appartenenti a vari ordini ed è emerso che la metilazione svolge ruoli diversi in specie diverse di insetti (Per una review sulla metilazione negli insetti: Field *et al.*, 2004).

1.2.2 Modificazioni istoniche

Un altro possibile meccanismo epigenetico in grado di regolare l'espressione genica modulando la transizione tra gli stati attivi o inattivi della cromatina, si esplica tramite le modificazioni post-traduzionali degli istoni. Si tratta di modificazioni covalenti delle code amminoterminali degli istoni che protrudono dal nucleosoma. Esse possono essere soggette a fosforilazione, acetilazione, metilazione ed ubiquitinazione. La stessa modificazione può interessare residui amminoacidici diversi ed un residuo può essere soggetto a più modificazioni. La lisina per esempio può essere sia acetilata che metilata e la metilazione stessa può essere effettuata anche sull'arginina, oltre che sulla lisina.

È stata avanzata recentemente l'ipotesi che queste modificazioni e soprattutto le loro combinazioni, costituiscano il cosiddetto "codice istonico", utilizzato per definire stati funzionali diversi (Jenuwein and Allis, 2001; Richards and Elgin, 2002; Spotswood and Turner, 2002). Una volta modificate, le code istoniche forniscono un segnale specifico in grado di essere riconosciuto da proteine di rimodellamento della cromatina capaci di modificare il suo stato (per una review sulla struttura della cromatina in relazione alle modificazioni istoniche e alle proteine di rimodellamento: Bartova *et al.*, 2008).

La prima modificazione istonica che si è visto influenzare l'espressione genica delle regioni associate, è l'acetilazione della lisina 16 dell'istone H4 (K16H4Ac) (Turner, 2000). L'acetilazione in sé porta una carica negativa, neutralizzando in questo modo in parte la carica positiva degli istoni, costringendo questi ultimi a creare dei legami più deboli con il DNA, facilitando così l'apertura della doppia elica, ed un eventuale passaggio del macchinario della trascrizione. In *Drosophila* la compensazione del dosaggio dei geni localizzati sui cromosomi sessuali avviene tramite l'ipertrascrizione dell'unico cromosoma X posseduto dai maschi. Questo cromosoma iperattivo è stato anche trovato essere iperacetilato alla lisina 16 dell'istone H4. Generalmente l'acetilazione degli istoni è associata ad iperattività trascrizionale, mentre la metilazione delle code istoniche a silenziamento genico. Non mancano però le eccezioni. Infatti la metilazione della lisina 4 dell'istone H3 si trova in regioni eucromatiche e trascrizionalmente attive.

Una delle proteine più studiate coinvolte nella formazione di strutture cromatiniche di ordine superiore è la proteina HP1 di *Drosophila melanogaster* già menzionata in precedenza.

Si è detto che HP1 è generalmente presente in regioni di eterocromatina costitutiva, sulle quali troviamo anche una particolare modificazione istonica, la metilazione della Lys 9 dell'istone H3. *In vitro* HP1 si lega alle diverse forme metilate (mono-, di- e tri-metilata) della lisina 9 dell'istone H3 (Bannister, *et al.*, 2001; Lachner, *et al.*, 2001). La lisina 9 dell'istone H3 (K9H3) metilata è proprio il sito specifico di legame della HP1 alla cromatina. *In vivo* il legame di HP1 è

associato con la forma trimetilata della K9H3 (K9H3m3) che si trova abbondantemente nell'eterocromatina pericentromerica (eterocromatina costitutiva). Nel 2001 sono stati pubblicati diversi lavori (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001; Nakayama *et al.*, 2001) che dimostrano la capacità di HP1 di riconoscere e legare l'istone H3 metilato alla Lys 9. E' stato quindi formulato un modello in cui l'attività delle metiltransferasi, la metilazione dell' H3 e HP1 sono alla base della formazione dell'eterocromatina e del silenziamento epigenetico dei geni. Oltre a riconoscere selettivamente e legare la K9H3m, HP1 interagisce con la metiltransferasi istonica della K9H3 di *Drosophila melanogaster*, SU(VAR)3-9, un modificatore del PEV (Tschiersch *et al.*, 1994) (Schotta *et al.*, 2002). La K9H3m3 è il substrato preferenziale per il legame della proteina HP1 (Lachner *et al.*, 2001) la quale, legandosi tramite il suo cromodominio, promuove la formazione della struttura eterocromatica ed allo stesso tempo recluta nuove molecole di SU(VAR)3-9 che, estendendo la metilazione della K9H3, promuove l'espansione dello stato eterocromatico (Schotta *et al.*, 2002, Sims *et al.*, 2003). Esiste, infatti, un'interazione fisica tra la regione N-terminale di SU(VAR)3-9 e il *chromo shadow* dominio di HP1, che si traduce in una stretta interrelazione funzionale fra K9H3m3 e la proteina HP1. Si può concludere quindi che, una volta instaurato, lo stato eterocromatico può essere propagato attraverso delle interazioni tra i diversi segnali epigenetici e dei complessi enzimatici in grado di riconoscere ciascun segnale epigenetico e di catalizzarne la formazione.

Gli esperimenti di immunofluorescenza condotti da James ed Elgin nel 1986, precedentemente citati, hanno rivelato la presenza di HP1 prevalentemente nelle regioni di eterocromatina costitutiva e in minima parte lungo i bracci eucromatici dei cromosomi politenici. Questi dati suggerivano che HP1 potesse avere un ruolo anche nel reprimere i geni eucromatici.

Recentemente è stato riscontrato un coinvolgimento di HP1 nella repressione trascrizionale di alcuni geni eucromatici, situati in zone di eucromatina su cui localizza anche HP1. Tali geni presentano un aumento dei livelli di trascrizione nei mutanti per HP1. L'effetto repressivo di HP1 è diminuito da mutazioni a carico di *Su(var)3-9*, il cui ortologo nei mammiferi codifica la metiltransferasi istonica dell'istone H3, e da mutazioni del gene *Su(var)2-1*, implicato nella deacetilazione dell'istone H4. HP1 è quindi implicata nella repressione dei geni eucromatici con la cooperazione dei modificatori istonici (Hwang *et al.*, 2001).

Successivamente al lavoro di Hwang è stata fornita una mappa citologica dettagliata dei siti eucromatici di HP1, anche tra specie differenti di *Drosophila*. Da questi dati è emerso che l'associazione di HP1 a specifiche regioni di eterocromatina, di eucromatina e telomeriche è una caratteristica di HP1 conservata in varie specie (Fanti *et al.*, 2003).

Questa proteina non è tuttavia coinvolta solo nel silenziamento genico; ha un ruolo nell'attivazione di alcuni geni sia eterocromatici che eucromatici.

HP1 ha infatti una funzione di attivazione trascrizionale nell'espressione di alcuni geni eterocromatici attivi, tra cui *light* e *rolled*, che subiscono effetto di posizione, con conseguente silenziamento trascrizionale a mosaico, quando traslocano nell'eucromatina (Wakimoto and Hearn, 1990; Hearn *et al.*, 1991).

E' inoltre stato recentemente dimostrato il ruolo di HP1 nell'attivazione di alcuni geni dell'eucromatina. Questa proteina è associata ai puff indotti dallo sviluppo e da shock termico sui cromosomi politenici di *Drosophila melanogaster*. Poiché i puff sono la manifestazione citologica di intensa attività genica, è stata condotta un'analisi dettagliata dell'espressione indotta da shock termico del gene codificante per la proteina HSP70 (heat shock protein 70) a differenti dosi di HP1 ed è stato dimostrato che quest'ultima è positivamente coinvolta nell'attività del gene *Hsp70*. HP1 è reclutata ai *loci* indotti da shock termico, probabilmente mediante rimozione dai suoi siti di legame sull'eucromatina e conseguente accumulo ai puff, ed è correlata positivamente con la loro espressione (Piacentini *et al.*, 2003).

1.3 Ruolo delle modificazioni istoniche nella formazione dell'eterocromatina facoltativa

La trimetilazione della K9H3 è presente anche sul cromosoma X inattivo umano dove è stato visto che HP1 colocalizzava con il segnale di K9H3m3, dimostrando che questa modificazione istonica è attiva anche nel caso dell'eterocromatizzazione facoltativa (Chadwick and Willard, 2003).

Generalmente i segnali che si trovano nelle regioni di eterocromatina facoltativa sono la trimetilazione della K27H3, la dimetilazione della K9H3 e la monometilazione della K20H4, mentre la costitutiva contiene la monometilazione della K27H3, trimetilazione della K9H3 e la trimetilazione della K20H4 (Peters *et al.*, 2003; Kohlmaier *et al.*, 2004; Schotta *et al.*, 2004).

L'inattivazione del cromosoma X è associata a dei segnali epigenetici, alcuni di essi condivisi con le altre regioni genomiche che presentano eterocromatina facoltativa ed altri esclusivi dell'X. Più precisamente essa presenta il trascritto specifico non codificante *XIST*, deacetilazione degli istoni, demetilazione della K4H3, dimetilazione della K9H3, trimetilazione della K27H3, monometilazione della K20H4, metilazione nelle isole CpG dei promotori genici ed un arricchimento della variante istonica macro H2A.

Allo stadio di metafase, in cellule umane, la K9H3m2 è distribuita su tutto il cromosoma X ed è stato anche visto che la K9H3m3 e K27H3m3 seguono dei pattern di bande alternate e non

coincidenti tra loro. Questa formazione di bande sembra essere il modo usato dalle due modificazioni per marcare l'eterocromatina anche in altre regioni genomiche. Anche se la K27H3m3 si trova in abbondanza sull'X inattivo rispetto alle regioni genomiche eterocromatiche, la presenza della K9H3m3 si nota anche sull'X attivo e nella cromatina pericentromerica degli autosomi (Chadwick and Willard, 2004).

Dal lavoro di questi autori si conclude che l'X inattivo è costituito da almeno due tipi diversi di eterocromatina che occupano siti diversi nel nucleo interfase. Il primo tipo è caratterizzato dalla trimetilazione della K27H3, dalla presenza del trascritto *XIST*, e dalla macro H2A, mentre l'altro tipo contiene la K9H3 trimetilata, la proteina HP1 e la K20H4 trimetilata. Andando verso la metafase questi due domini diversi, aiutati dalla loro diversa marcatura, si condensano mantenendo spazialmente distinti i due tipi alternativi di eterocromatina. Gli autori propongono che i due tipi di eterocromatina siano segnati epigeneticamente dalla K9H3 trimetilata, o dal macroH2A durante il ciclo cellulare e che a mitosi completa si associno alle altre modificazioni di ciascun tipo.

Il ruolo della K9H3m2 e della K27H3m3 nell'inattivazione del cromosoma X, è confermato nel lavoro di Rougeulle *et al.*, 2004. In questo studio è stato esaminato il ruolo di entrambe le modificazioni istoniche sul cromosoma X inattivo delle cellule somatiche. I cambiamenti dinamici di K9H3m2 e K27H3m3 durante l'inattivazione dell'X, rispetto al resto del genoma, sono distinti, suggerendo che queste due modificazioni abbiano un ruolo complementare e, probabilmente, non ridondante, in tale processo (Rougeulle *et al.*, 2004). La metiltransferasi che catalizza, *in vitro*, la metilazione della K9H3 e della K27H3 è l'enzima G9a (Tachibana *et al.*, 2001); studi *in vivo*, suggeriscono, però, che sia responsabile principalmente della mono- e la di-metilazione della K9H3, preferenzialmente nelle regioni di eucromatina silente (Rice *et al.*, 2003). L'analisi di cellule staminali mutanti per *G9a*, ha rivelato una perdita specifica di K9H3m2, senza alterazioni a carico della K27H3m3: questi due marker sembrano quindi dipendere da differenti metiltransferasi (Rougeulle *et al.*, 2004).

In un lavoro successivo (Brinkman *et al.*, 2006) è stato constatato che la K27H3m3 si localizza sulle regioni intergeniche, sui geni silenti ma anche sulla regione codificante di alcuni geni attivi situati sull'X inattivo. La K9H3m3 invece è stata trovata nelle regioni codificanti di geni attivi. Anche se la presenza di K9H3m3 ed il legame di HP1 ad essa sono legate ad ambienti eterocromatici, è stato riportato anche in un altro lavoro che la K9H3m3 e la HP1γ possono trovarsi in regioni trascritte di geni attivi di mammifero (Vakoc *et al.*, 2005). Allora si può pensare che la K9H3m3 non sia un segnale esclusivo dell'eterocromatina.

Nel lavoro di Brinkman e collaboratori (2006) non è stata constatata la presenza della K9H3m2, caratteristica dell'eterocromatina facoltativa. Sono stati trovati invece alti livelli di

acetilazione degli istoni H3 ed H4 e la trimetilazione della K4H3 nei promotori di geni non necessariamente costitutivamente attivi. Queste modificazioni si localizzano in determinate posizioni dove avveniva la transizione tra le due forme di eterocromatina presenti sull'Xi (K9H3m3 ed K27H3m3), suggerendo un loro ruolo nella partizione della cromatina differenzialmente marcata.

Riassumendo, è chiaro che la cromatina marcata differenzialmente si trova confinata in regioni diverse sull'X inattivo, ma non si è ancora capito come essa venga stabilita e se questa marcatura sia la causa o la conseguenza della trascrizione continua o della sua localizzazione subnucleare. I risultati presentati sono in disaccordo con il concetto di definizione di eterocromatina o eucromatina in base a modificazioni istoniche individuali. Lo stato trascrizionale della cromatina è invece segnato dalla presenza di segnali compositi di interdipendenza o esclusione reciproca delle modificazioni istoniche.

Lo stato di metilazione della lisina 9 dell'istone H3 è stato studiato anche sui corpi XY, durante la spermatogenesi dei mammiferi (Cowell *et al.*, 2002). Negli spermatociti di topo è stata dimostrata la presenza della K9H3m3 nella cromatina centromerica (eterocromatina costitutiva), ed anche lungo l'intero corpo XY (facoltativa). La proteina M31 in questo caso però, anche se colocalizza con la K9 metilata sulle regioni centromeriche, non si evidenzia sui corpi XY fino allo stadio del pachitene tardivo/diplotene. Si ipotizza che altre modificazioni istoniche possano interagire ed impedire il legame di M31 con la K9m3. I corpi XY, allo stadio di pachitene, differiscono dai blocchi di eterocromatina centromerica e dall'Xi, in quanto presentano un'acetilazione abbondante sull'istone H4 (Armstrong *et al.*, 1997). È noto (Zhao *et al.*, 2000; Polioudaki *et al.*, 2001) che le proteine HP1 possono interagire con l'H4, per cui l'acetilazione dell'istone H4 da sola o in concomitanza con altre modificazioni potrebbe ridurre il legame di HP1 (M31) con i corpi XY (Cowell *et al.*, 2002).

Le modificazioni istoniche e l'eterocromatizzazione facoltativa sono state studiate anche nel Coccide *Planococcus citri*. In questo caso è stato indagato il ruolo delle K9H3m3, K20H4m3 ed HP1, durante la formazione dell'eterocromatina facoltativa (Bongiorni *et al.*, 2001; Cowell *et al.*, 2002; Kourmouli *et al.*, 2004; Bongiorni *et al.*, 2007).

Come è già stato descritto, anche nei maschi dei Coccidi ha luogo un fenomeno di eterocromatizzazione facoltativa, a carico dell'intero assetto cromosomico aploide di origine paterna. Mediante esperimenti di immunoblotting e di immunofluorescenza, in cui si è fatto uso di un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina HP1 di *Drosophila*, è stata dimostrata la presenza di una proteina HP1-like nei Coccidi, nella specie *Planococcus citri*. Nei maschi la proteina HP1-like è preferenzialmente associata all'eterocromatina maschio-specifica; durante lo

sviluppo embrionale maschile la sua comparsa precede l'inizio dell'eterocromatizzazione (Bongiorni *et al.*, 2001). Questi risultati suggeriscono che la proteina HP1-like abbia un ruolo nel processo di eterocromatizzazione facoltativa. Nelle femmine questa proteina ha un pattern di localizzazione diffuso e piuttosto riproducibile lungo i cromosomi; non sono state evidenziate differenze nella distribuzione del segnale tra gli omologhi. Comparando il pattern di localizzazione di HP1-like con quello dell'eterocromatina costitutiva, definita con il metodo delle C-bande (il bandeggio C colora selettivamente l'eterocromatina costitutiva), si è visto che i segnali non coincidono perfettamente. Anche quando il sito di legame di HP1-like coincide con quello dell'eterocromatina costitutiva, raramente si ha una perfetta sovrapposizione. Nelle femmine quindi HP1-like si lega sia ai siti eterocromatici che a quelli eucromatici. Queste osservazioni permettono di ipotizzare che HP1-like rivesta un diverso ruolo nei due sessi. E' possibile che nelle femmine HP1-like sia coinvolta nella compensazione del dosaggio. Nei Coccidi tale compensazione dovrebbe uguagliare la quantità di prodotti genici delle femmine diploidi e dei maschi paraploidi reprimendo, almeno parzialmente, l'espressione dei geni (Bongiorni, *et al.*, 2001; Bongiorni and Prantera, 2003). I dati precedentemente riportati implicano l'intervento della proteina HP1-like nel silenziamento dei geni eucromatici durante lo sviluppo. Tale conclusione è in accordo con i risultati ottenuti da Hwang *et al.*, nel 2001, che hanno evidenziato per la prima volta il ruolo di HP1 in *Drosophila* nel silenziamento dei geni eucromatici, anche non coinvolti in riarrangiamenti cromosomici responsabili di PEV.

Oltre al coinvolgimento di HP1-like nel silenziamento dell'assetto cromosomico aploide di origine paterna, è stata osservata una co-localizzazione di questa proteina con la forma tri-metilata alla Lys 9 dell'istone H3 (K9H3m3) (Cowell *et al.*, 2002).

K9H3m3 e la proteina HP1-like co-localizzano infatti sul cromocentro nelle cellule maschili in interfase e sui cromosomi eterocromatici in metafase. Talvolta sono state osservate solo piccoli spot di segnale per K9H3m3 nell'eucromatina. Anche nelle cellule femminili in interfase e in mitosi K9H3m3 e HP1-like hanno un analogo pattern di localizzazione: i segnali sono distribuiti in modo sparso sulla cromatina e non presentano differenze tra i cromosomi omologhi (Cowell *et al.*, 2002).

Questi risultati suggeriscono quindi che la proteina HP1-like non solo è coinvolta nella formazione dell'eterocromatina facoltativa, ma è anche in grado di riconoscere e legare in maniera preferenziale K9H3m3. La metilazione della Lys 9 dell'H3 potrebbe essere il segnale epigenetico che innesca il processo di eterocromatizzazione facoltativa. La presenza della tri-metilazione della K9H3 e di HP1-like è fondamentale per la formazione della struttura cromocentrica.

Il ruolo delle modificazioni istoniche è stato studiato anche nei nuclei di tessuti maschili che vanno incontro a reversione (de-eterocromatizzazione del cromocentro). Nei nuclei che stanno

decondensando il segnale della K9H3m3 persiste, contrariamente a quanto accade per la HP1-like, il cui segnale diventa più diffuso e puntiforme -pur rimanendo però nel nucleo- e per la K20H4m3 che addirittura cambia localizzazione, passando al citoplasma. Questa delocalizzazione può essere dovuta ad un'azione demetilasica agente sull'istone, oppure alla sua rimozione con un meccanismo di sostituzione istonica. Si suggerisce che la perdita della K20H4m3 dal nucleo è uno dei primi stadi che portano alla reversione dei nuclei tramite lo smantellamento della cromatina cromocentrica. Il segnale citoplasmatico potrebbe sussistere a causa di un accumulo di istone metilato che è stato rimpiazzato e/o per un'eventuale esclusione nucleare della metilasi corrispondente che, una volta nel citoplasma, agisce sulla K20 dell'istone H4 neosintetizzato, metilandola. Comunque il fatto che la K20H4m3 cambi localizzazione durante la reversione, quando anche il segnale di HP1-like viene perturbato, è in accordo con il reclutamento della K20H4m3 metiltransferasi istonica, da parte della proteina HP1 (Kourmouli *et al.*, 2004, 2005; Schotta *et al.*, 2004).

L'analisi della funzione di K9H3m3 e di K20H4m3 e della proteina HP1-like è stata effettuata tramite esperimenti di dsRNA interference (RNAi) contro l'RNA del gene *HP1-like*. Distruggendo il trascritto del gene *pchet2*, omologo di *HP1*, è possibile creare fenocopie del mutante. Durante il processo di eterocromatizzazione allo stadio di blastoderma, l'assenza di HP1-like determina la dislocazione della K9H3m3 e la perdita del segnale della K20H4m3. Il cromocentro stesso non è in grado di formarsi in assenza della proteina PCHET2. Questi risultati sono in accordo con esperimenti effettuati precedentemente (Schotta *et al.*, 2002), secondo i quali la metilasi della K9H3 sarebbe ulteriormente reclutata sull'eterocromatina dalla proteina HP1. Questi risultati indicano un ruolo centrale della proteina HP1-like, visto che in sua assenza non avviene l'eterocromatizzazione facoltativa.

Anche nei mammiferi è stato visto che esiste una interazione a tre, tra la K9H3m3, la proteina HP1, e la K20H4m3. HP1 si lega alla K9H3m3 ed a sua volta recluta la metiltransferasi specifica che tri-metila la K20H4. È il caso dell'X inattivo precedentemente discusso.

Nei Coccidi la reversione ed i cambiamenti epigenetici nella struttura cromatinica che essa comporta, sembrano essere opposti al pathway epigenetico dei mammiferi -perdita del segnale della K20H4m3 con la contemporanea delocalizzazione della proteina HP1 e la permanenza sul cromocentro del segnale della K9H3m3. Potrebbe allora, visto che il pathway di metilazione lo è, essere conservata anche la via inversa nei mammiferi, quando cioè il cromosoma X inattivo va riprogrammato attivandosi negli oociti in fase dello sviluppo (Gartler and Goldman, 1994). Si tratterebbe di un pathway di importanza fondamentale, visto che i meccanismi dell'eterocromatizzazione facoltativa sono altamente conservati in organismi così filogeneticamente lontani.

Finora si è parlato della metilazione del DNA e delle modificazioni istoniche come dei meccanismi usati dall'epigenetica a se stanti, ciò non è del tutto vero però. I due meccanismi epigenetici sono anche in cooperazione tra loro. Questo diventa evidente considerando il fatto della metilazione del DNA e della deacetilazione istonica. La metilazione del DNA provoca un reclutamento di proteine in grado di legarsi alle citosine metilate. Alcune di queste si associano con dei complessi che contengono deacetilasi istoniche che a loro volta rimuovono i gruppi acetile dalle lisine degli istoni H3 ed H4, il che è noto essere un segnale di silenziamento genico condiviso da tutti gli eucarioti (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998).

1.4 SU(VAR)3-9: la metilasi della lisina 9 dell'istone H3

Nel paragrafo precedente abbiamo ampiamente descritto il cosiddetto “codice istonico” che in sinergia con il codice genetico, aumenta ulteriormente il potenziale d'informazione in una determinata regione genomica.

Una delle modificazioni istoniche più studiate è la metilazione dei residui di lisina. Segnali di attività o repressione trascrizionale possono essere modulati attraverso diversi stati di metilazione del medesimo residuo (mono-, di-, o tri-metilazione); questo permette di estendere ancora di più il potenziale informativo epigenetico delle regioni genomiche. È stato soprattutto studiato lo stato di metilazione di alcune lisine degli istoni H3 ed H4, che sembrano rivestire un più importante ruolo funzionale; in particolare, sono soggetti a metilazione differenziale le lisine K4, K9, K27 e K36 della porzione N-terminale dell'istone H3 e la K20 dell'istone H4 (van Holde, 1988) oltre ad un residuo di lisina (K79) all'interno della regione globulare dell'istone H3 (K79H3, per una review: Vaquero *et al.*, 2003). Generalmente la metilazione dei residui K4, K36 e K79 dell'istone H3 è un segnale di attività trascrizionale, mentre la metilazione delle K9 e K27 dell'istone H3 e K20H4 sono segnali di stati cromatinici silenti (Fischle *et al.*, 2003; Lachner *et al.*, 2003; Vaquero *et al.*, 2003). La teoria del codice istonico è stata avvalorata dalla scoperta di enzimi capaci di modificare la porzione amminotermine degli istoni e di proteine capaci di legarsi specificamente ai residui amminoacidici precedentemente modificati.

La metilazione dei residui istonici avviene ad opera di enzimi specifici, chiamati metiltransferasi istoniche (HMTasi). Essi sono specifici per un determinato residuo amminoacidico che funge da substrato, cui aggiungono uno, due, o tre gruppi metilici. In questo paragrafo parleremo della HMTasi SU(VAR)3-9, che è l'enzima che metila specificamente la lisina 9 dell'istone H3 (K9H3).

L'enzima SU(VAR)3-9 è una proteina coinvolta nella condensazione della cromatina ed è stata vista essere associata all'eterocromatina (Tschiersch *et al.*, 1994; Schotta and Reuter, 2000).

Le proteine associate all'eterocromatina sono state identificate per prime in *Drosophila melanogaster* come mutazioni dominanti che modificano l'effetto di posizione variegato (Reuter and Spierer, 1992; Weiler and Wakimoto, 1995; Wallrath, 1998). SU(VAR)3-9 è, fra queste proteine, quella che è stata meglio caratterizzata. Si tratta di un enzima evolutivamente conservato. Ortologi del gene *Su(var)3-9* sono stati trovati in molti organismi, dal lievito *Schizosaccharomyces pombe* (*Clr4*; Ivanova *et al.*, 1998), fino ai mammiferi (*SUV39h1* murino, *SUV39H1* umano; Aagaard *et al.*, 1999). Analisi di sequenza comparative tra la proteina umana e murina (entrambe di 412 amminoacidi) rivelano un'identità di sequenza del 95%, mentre quando esse sono comparate con quella di *Drosophila* (635 amminoacidi) si scende ad un'identità del 42%. Inoltre le proteine umana e murina presentano un'identità del 38% quando confrontate con la CLR4 (490 aminoacidi) di *S. pombe* (Tschiersch *et al.*, 1994).

L'organizzazione di *Su(var)3-9* di *Drosophila* e di altri insetti è molto complessa. Il gene si trova all'interno del secondo dei cinque introni contenuti nella sequenza genica di *eIF-2γ*, un fattore d'inizio della traduzione. Viene prodotto un pre-mRNA dicistronico il quale, dopo splicing alternativo, dà luogo a due mRNA maturi di 2.4 kb per *Su(var)3-9* e 2.0 kb per *eIF-2γ* (Tschiersch *et al.*, 1994). I due mRNA processati presentano una sovrapposizione di 330 bp al loro 5', perchè il trascritto di *Su(var)3-9* viene fuso con i primi due esoni di *eIF-2γ*. Questa regione in comune contiene un motivo di legame per il GTP, simile a quello contenuto nei fattori di allungamento EF-1α ed EF-Tu. Al di fuori della regione al N-terminale, le due proteine hanno sequenze completamente diverse (Tschiersch *et al.*, 1994).

Questa peculiare struttura genica non si ritrova nè nel lievito, nè nei mammiferi. Nell'uomo i geni *SUV39H1* ed *eIF-2γ* sono ambedue situati sul cromosoma X, ma in regioni diverse, Xp21 per *SUV39H1* e Xp11.2 per *eIF-2γ* (Geraghty *et al.*, 1993; Ehrmann *et al.*, 1998). Negli insetti appartenenti agli ordini dei Coleotteri e Lepidotteri è presente una fusione tra *Su(var)3-9* ed *eIF-2γ*, localizzata al 3' dell'mRNA processato (Krauss and Reuter, 2000).

Recentemente è stato pubblicato un lavoro molto dettagliato sull'evoluzione filogenetica della fusione di questi due geni (Krauss *et al.*, 2006). Secondo gli autori la fusione tra i due geni è avvenuta 400 milioni di anni fa, all'interno della linea evolutiva degli insetti, dopo la loro divergenza dagli altri artropodi (**figura 2**, linea rossa). Infatti altri artropodi, come collemboli (*Allacma fusca*) ed aracnidi (*Araneus diadematus*), non presentano questa fusione genica. Durante l'evoluzione degli afidi il gene *Su(var)3-9* ha subito un ulteriore riarrangiamento. Quest'ipotesi viene confermata dal ritrovamento di residui nucleotidici non funzionanti della sequenza codificante di *Su(var)3-9* all'interno del gene *eIF-2γ* e la contemporanea presenza di una copia genica di *Su(var)3-9* al di fuori della regione *eIF-2γ* (**figura 2**, linea blu).

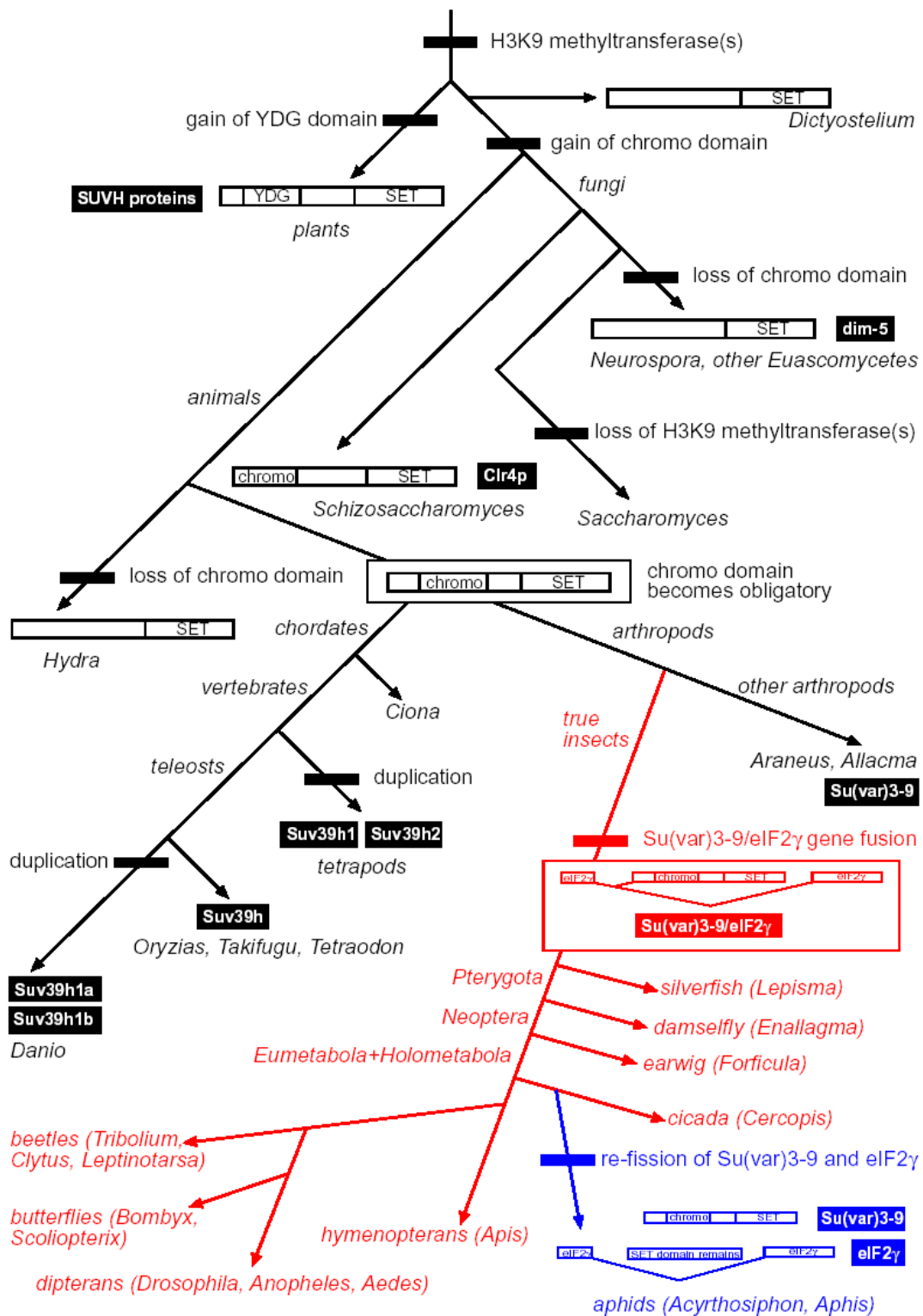


Figura 2: Albero filogenetico delle transizioni evolutive dell'organizzazione genica di *Su(var)3-9*. Sono mostrate le acquisizioni e le perdite dei domini, le duplicazioni geniche, le fusioni geniche e la scissione dal gene *eIF2γ*. I rami dell'albero non sono in scala. Ogni evento è stato rappresentato con una linea, i nomi tassonomici sono in corsivo e i nomi delle proteine riquadrati (Da Krauss *et al.*, 2006).

Il gene *Su(var)3-9* è un gene a singola copia, con l'eccezione della maggior parte dei Vertebrati e di alcuni Nematodi. Secondo Krauss e collaboratori (2006) la duplicazione genica è avvenuta in un progenitore comune dei tetrapodi, generando due geni *Suv39h1* e *Suv39h2*. Un'altra duplicazione, è avvenuta in zebra fish (*Danio rerio*) producendo i geni *Suv39h1a* e *Suv39h1b*.

Le proteine SU(VAR)3-9 presentano una struttura con dei domini più o meno conservati riconducibili alla relazione filogenetica tra le specie diverse. I domini presenti ed altamente conservati sono quattro: nella parte amminoterminale si trova il cromodominio (CHD), segue il dominio pre-SET, il dominio SET ed il dominio post-SET (**figura 3**). Il dominio SET è ulteriormente suddiviso in SET-N, SET-I e SET-C (non rappresentati in fig. 3). Tra la parte N-terminale ed il cromodominio si trova la cosiddetta regione 2, mentre la regione 4 segue il cromodominio fino al pre-SET. Mentre il dominio SET inizia quasi subito dopo la fine del pre-SET, tra SET e post-SET si trova la regione 7. Per le regioni 4 e 7 non è stata riscontrata una conservazione significativa di sequenza, e fino ad oggi non si è a conoscenza di un loro ruolo funzionale.



Figura 3: Rappresentazione schematica dei domini di SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster*. La parte amminoterminale contiene il peptide segnale per la sua localizzazione nucleare e il dominio GTPasico (in giallo) derivato dalla fusione con eIF2 γ (v. testo per dettagli), seguito a sua volta dalla regione 2. Tra il cromodominio (chromo domain) ed il dominio pre-SET si trova la regione 4, mentre si intravede la regione 7 tra il dominio SET ed il dominio post-SET, che è rappresentato in arancione.

Nelle proteine K9H3 HMTasi delle piante (SUVH), il cromodominio è stato sostituito con un dominio YDG (Baumbusch *et al.*, 2001). Anch'esso, come il cromodominio (Brehm *et al.*, 2004), presenta un'interazione forte con la parte N-terminale dell'istone (Citterio *et al.*, 2004).

La **regione proteica a monte del cromodominio** è variabile sia in lunghezza che in contenuto amminoacidico. Negli insetti contiene la regione condivisa con il eIF-2 γ , lunga da 79 a 84 amminoacidi, seguita dalla regione 2, non molto conservata, che si trova in tutti gli organismi. In *Drosophila* probabilmente questa regione, insieme alla parte condivisa con eIF-2 γ , permette alla proteina di interagire con altre proteine, come HP-1 e SU(VAR)3-7 (proteina associata all'eterocromatina). Quest'interazione permette di ottenere una corretta localizzazione nucleare (Schotta *et al.*, 2002; Delattre *et al.*, 2004), ma anche di formare strutture omodimeriche che la aiutano ad avere più alta attività enzimatica (Eskeland *et al.*, 2004). L'interazione tra il chromoshadow dominio di HP1 e la regione N-terminale di SU(VAR)3-9 sembra essere conservata

anche nei mammiferi (Aagaard *et al.*, 1999), senza che ci sia una conservazione a livello amminoacidico dell'N-terminale tra le proteine di insetti e mammiferi.

Il **cromodominio** è un dominio di circa 60 amminoacidi, molto conservato. È costituito da 1 foglietto β , formato da tre filamenti antiparalleli, di fronte a un' α -elica. Analisi funzionali di cromodomini diversi, rivelano diverse interazioni con la coda dell'istone H3, il DNA e l'RNA (per una review: Brehm *et al.*, 2004). Il cromodominio è necessario per il legame all'eterocromatina (Ivanova *et al.*, 1998; Melcher *et al.*, 2000; Schotta *et al.*, 2002), però ancora non si è a conoscenza degli specifici residui responsabili di questa interazione. Dalle analisi comparative eseguite da Krauss e collaboratori (2006) è emersa una conservazione a livello di sequenza amminoacidica più alta tra i cromodomini delle proteine HP1, rispetto a quelli di SU(VAR)3-9. Per cui, le proteine SU(VAR)3-9 potrebbero avere una minore affinità per l'istone H3, oppure presentare minore discriminazione tra i residui K9H3 modificati diversamente, rispetto alle HP1. Le proteine SU(VAR)3-9 possono essere capaci di interagire tramite il loro cromodominio con le code dell'istone H3 per facilitare e/o restringere localmente la metilazione istonica.

Il **dominio SET**, lungo da 130 a 140 amminoacidi, con i domini ad esso associati (pre- e post-SET), è invece responsabile dell'attività enzimatica presente nelle proteine SU(VAR)3-9. Il SET è un altro dominio conservato, che si trova in proteine che hanno funzioni di organizzatori della cromatina. SET è un acronimo di *S*uppressor of variegation, *E*nhancer of zeste e *T*rithorax (Tschiersch *et al.*, 1994), proteine di *Drosophila melanogaster* che contengono questo dominio. Il dominio SET è composto prevalentemente da foglietti β , che formano due domini strutturali disposti spazialmente a formare una struttura ad L.

I **domini pre- e post-SET** affiancano il dominio SET e sono regioni ricche in cisteina. Sono necessarie per l'attività di metilazione mostrata dal dominio SET. È stato infatti visto nelle piante che le metiltransferasi prive di un dominio SET affiancato da queste regioni, non sono in grado di metilare istoni (Rea *et al.*, 2000). Il dominio pre-SET forma un cluster triangolare di tre atomi di zinco coordinati da nove cisteine. Ciascun atomo di Zn^{+2} è coordinato da due cisteine uniche, mentre le rimanenti tre sono spartite, ciascuna da due atomi di zinco, per completare la loro coordinazione tetraedrica (Wilson *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Trievel *et al.*, 2002).

Da analisi comparative di sequenza dei domini SET, pre-SET e post-SET tra le proteine SU(VAR)3-9 ed altre HMTasi che metilano la K9H3 è emerso che le proteine SU(VAR)3-9 contengono quattro deviazioni conservate, dalla sequenza *consensus* rispetto alle altre proteine. Almeno due di loro sembrano avere delle conseguenze funzionali (Krauss *et al.*, 2006). 36 su 39 ortologhi SU(VAR)3-9 alla posizione 557 (secondo il gene di *Drosophila*) contengono una istidina mentre il *consensus* sarebbe una arginina. Il residuo corrispondente della proteina DIM-5 di

Neurospora crassa è essenziale per permettere la trimetilazione della K9H3 senza il rilascio intermedio del substrato, è implicata cioè nella processività dell'enzima. Per cui, sembra che le SU(VAR)3-9 non siano processive come le altre HMTasi K9H3. Si conosce, inoltre, una sostituzione dell'arginina 529 in serina, che dà la mutazione Su(var)3-9^{p^{tn}} e determina un aumento dell'attività enzimatica.

In vitro la SU(VAR)3-9 monometila e dimetila la K9H3, ma non riesce a trimetilare efficientemente l'istone. La trimetilazione si ottiene solamente a rapporti enzima/substrato elevati, oppure a tempi di reazione lunghi, producendo solo una piccola frazione dell'istone trimetilata (Eskeland *et al.*, 2004). La dimetilazione compare lentamente il che potrebbe essere dovuto ad una ridotta velocità di reazione dopo che è stata effettuata la monometilazione. Siccome la cinetica di reazione è la stessa usando come substrato la K9H3 sia non modificata che monometilata si conclude che la SU(VAR)3-9 aggiunge un metile alla K9H3 e dopo si dissocia, per poi riassociarsi ed aggiungerne il secondo gruppo metilico. È stato visto che l'interazione tra due molecole enzimatiche attraverso le loro regioni N-terminali facilita l'efficienza di metilazione, incrementando la possibilità che un'altra molecola enzimatica trovi il substrato ed operi su di esso. Pur effettuando quest'interazione, la SU(VAR)3-9 manca lo stesso di processività in confronto ad altre HMTasi.

Il dominio enzimatico responsabile della metilazione è il dominio SET. Infatti mutando il residuo 561 che si trova all'interno del dominio SET, da istidina a lisina, si abolisce l'attività enzimatica. La S-adenosil metionina (SAM) è il substrato donatore di metile, la reazione porta alla concomitante produzione di lisina metilata ed S-adenosil omocisteina. La concentrazione della SAM deve essere mantenuta entro certi livelli all'interno della cellula, cosicché il tasso di metilazione è direttamente proporzionale alla sua concentrazione e può essere regolata in questo modo dall'enzima SU(Z)5, che sintetizza la SAM. Perciò la concentrazione di SAM intracellulare potrebbe essere un regolatore dell'eterocromatina (Eskeland *et al.*, 2004).

In vivo la proteina SU(VAR)3-9 si localizza nell'eterocromatina centromerica dei nuclei politenici di *Drosophila* e nel quarto cromosoma (Schotta and Reuter, 2000), che è quasi completamente eterocromatico. In estratti nucleari di embrioni mutanti per *Su(var)3-9*, si nota una marcata riduzione della dimetilazione della K9H3, suggerendo che SU(VAR)3-9 è la principale ma non l'unica metilasi di *Drosophila* (Schotta *et al.*, 2002). Con l'immunocitologia si può vedere che in larve mutanti *Su(var)3-9* il livello di metilazione centromerica è ridotto, mentre la metilazione del quarto cromosoma è quasi non influenzata. Perciò la metilazione dipendente da SU(VAR)3-9 è limitata all'eterocromatina centromerica (Schotta *et al.*, 2002). Per questa sua localizzazione è stato constatato che sono necessarie sia la regione N-terminale che le regioni del cromodominio e del

SET, mentre per l'associazione con il quarto cromosoma, basta che sia presente la sola regione N-terminale (Schotta *et al.*, 2002).

È stata anche evidenziata una dipendenza per la localizzazione di SU(VAR)3-9 dalla proteina HP1 e viceversa. Infatti HP1 serve per la localizzazione eterocromatica di SU(VAR)3-9, visto che in mutanti *Su(var)2-5* (cioè privi di HP1) si nota la metilazione ectopica di regioni eucromatiche (Schotta *et al.*, 2002). Anche la distribuzione di HP1 viene alterata nei mutanti *Su(var)3-9*, dove si nota una sua drastica riduzione nel cromocentro, senza influire però sulla sua localizzazione sul quarto cromosoma (Schotta *et al.*, 2002). La regione proteica di SU(VAR)3-9 implicata all'interazione con HP1 è la regione aminotermine, e più precisamente i primi 152 amminoacidi che prendono contatto, come già menzionato, con il cromoshadow dominio di HP1 (Eskeland *et al.*, 2004).

Lavori successivi (Greil *et al.*, 2003; Bongiorno *et al.*, 2007) hanno ulteriormente confermato l'interdipendenza delle due proteine per quanto riguarda la loro localizzazione. HP1 e SU(VAR)3-9 mostrano però anche una loro indipendenza. Infatti colocalizzano nelle regioni pericentromeriche dei cromosomi, mentre per quanto riguarda le regioni distali, SU(VAR)3-9 si trova indipendentemente da HP1. Una causa di questa "mis-localizzazione" di HP1 e SU(VAR)3-9 potrebbe essere un impedimento sterico da parte di HP1 che non può così avvicinarsi al residuo metilato e legarsi, oppure perché il sito di legame di HP1 si trova già occupato da un'altra proteina che compete con essa per legarsi al residuo interessato (Greil *et al.*, 2003).

Dal lavoro di Greil e collaboratori è anche emerso che HP1 e SU(VAR)3-9 si localizzano su geni che vengono espressi a stadi di sviluppo specifici e che si trovano in regioni cromosomali specifiche per essere espressi in modo coordinato (cluster genici). Nelle regioni pericentromeriche entrambe le proteine si associano con geni attivi durante l'embriogenesi. Si suppone che tramite il loro legame si possa facilitare l'espressione dei geni embrionali oppure segnalarli come geni che debbano essere inattivati negli stadi successivi dello sviluppo. Il fatto che i geni di espressione embrionale siano in cluster potrebbe appunto avere un ruolo per la loro regolazione coordinata durante lo sviluppo. Nei bracci cromosomici SU(VAR)3-9 si lega a dei geni espressi preferenzialmente nei maschi adulti, reprimendoli negli stadi di sviluppo precoci e nelle femmine adulte. Per quanto riguarda la localizzazione non pericentromerica di HP1, essa non è stata messa in chiara relazione con geni di espressione solamente maschile.

1.5 Altre HMTasi K9H3

Ultimamente sta emergendo, anche in *Drosophila*, la presenza di altre HMTasi specifiche per la metilazione della lisina 9 dell'istone H3. Tra queste proteine possono essere annoverate la dG9a (Mis *et al.*, 2006; Stabell *et al.*, 2006) e dSETDB1 (Tzeng *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2008).

1.5.1 dG9a

La proteina dG9a è lunga 1.637 amminoacidi ed ha massa molecolare relativa di 95 kD. Il suo gene si trova nella regione 1A1 sul cromosoma X. Oltre ai domini SET e pre-SET, che si trovano nella parte C-terminale della proteina, contiene anche una regione di cisteine a valle del SET dominio che corrisponde al dominio post-SET. Oltre questi domini, già visti per SU(VAR)3-9, dG9a contiene a monte del pre-SET dominio, varie ripetizioni di una sequenza peptidica di 33 amminoacidi chiamata ripetizione “ankyrin”, trovata in proteine implicate in interazioni proteiche (Mosavi *et al.*, 2004). Nella parte aminotermine della proteina oltre al segnale di localizzazione nucleare, si trova un motivo AT-hook, noto per legare il DNA.

In vitro la proteina dG9a aggiunge gruppi metilici all'istone H3 sia quando è libero che quando si trova all'interno di un complesso nucleosomale. Il residuo specifico al quale vengono aggiunti i gruppi metilici è la K9H3 (Mis *et al.*, 2006). In estratti di mutanti *dG9a* è stata osservata una riduzione della mono- e dimetilazione della K9H3 e poca differenza per quanto riguarda la trimetilazione. Perciò *in vivo* dG9a agisce come un enzima che mono- e dimetila, ma interferisce anche con la trimetilazione alterando il substrato sul quale operano altre HMTasi, come per esempio SU(VAR)3-9 (Mis *et al.*, 2006). dG9a si trova in regioni eucromatiche ma anche nell'eterocromatina visto che è un soppressore dominante del PEV. Interagisce con SU(VAR)3-9 durante gli stadi di sviluppo larvali. Il modello proposto prevede che dG9a monometila la K9H3 la quale diventerebbe il substrato preferenziale di SU(VAR)3-9, per la successiva di- e trimetilazione. Tuttavia, siccome le due proteine operano sullo stesso residuo, potrebbero sostituirsi l'una con l'altra, anche se presenterebbero minore efficienza (Mis *et al.*, 2006). Altri autori invece affermano che dG9a sia una HMTasi eucromatica vista la sua esclusione dal cromocentro dei cromosomi politenici. Non escludono però che possa avere qualche ruolo, non ancora dimostrato, durante l'eterocromatizzazione facoltativa. Secondo gli stessi autori *in vitro* la dG9a è capace di mono-, di- e trimetilare, non solo la K9H3 ma anche la K27H3. Oltre questo, mostrerebbe anche una specificità di metilazione dei residui K8, K12 e K16 dell'istone H4 (Stabell *et al.*, 2006). Questi autori attribuiscono, inoltre, a *dG9a* un ruolo nel pathway dell'eccidione, tramite esperimenti di RNAi.

In un lavoro più recente, Seum e collaboratori hanno generato un allele deletico di *dG9a* tramite ricombinazione omologa. L'analisi di questo allele ha rivelato, in contrasto con quanto

precedentemente riportato da Stabell e collaboratori, che *dG9a* non è richiesto per la vitalità delle mosche (Seum *et al.*, 2007). Tali autori discutono questa discrepanza proponendo che il fenotipo osservato in seguito ad RNAi non sia correlato al decremento nell'espressione di *dG9a* (Seum *et al.*, 2007).

1.5.2 dSETDB1

Un'altra HMTasi istonica recentemente scoperta in *Drosophila* è la dSETDB1, ortologo della SETDB1 dei mammiferi.

dSETDB1 è una metiltransferasi della K9H3 specifica del quarto cromosoma nelle cellule delle ghiandole salivari. Mutanti *dsetdb1* ipomorfi o nulli perdono la maggior parte della metilazione della K9H3 e il legame di HP1 sul quarto cromosoma. dSETDB1 sembra, quindi, essere coinvolta nella regolazione della metilazione della K9H3 e nel reclutamento di HP1 sul cromosoma 4 (Tzeng *et al.*, 2007). Inoltre si è visto che il legame di POF, una proteina specifica del quarto cromosoma, e la metilazione della K9H3 regolata da dSETDB1 sullo stesso cromosoma, sono interdipendenti. POF e dSETDB1 interagiscono *in vivo* (Tzeng *et al.*, 2007). Infine, dSETDB1 riveste un ruolo nella regolazione dell'espressione genica del cromosoma 4; nei mutanti *dsetdb1*, infatti, si assiste ad una globale riduzione dell'espressione genica su tale cromosoma (Tzeng *et al.*, 2007). Tutti questi risultati hanno suggerito l'esistenza di una rete di interazioni tra dSETDB1, HP1 e POF, in grado di regolare le modificazioni epigenetiche e l'espressione genica del cromosoma 4 di *Drosophila*.

dSETDB1 è principalmente localizzata sull'eterocromatina pericentromerica e catalizza la tri-metilazione nelle GSCs (*germline-stem cells*, cellule staminali della linea germinale) (Yoon *et al.*, 2008). Le GSCs producono gameti e sono quindi le vere "cellule staminali immortali". Nell'ovario di *Drosophila*, le GSC si dividono asimmetricamente, per produrre GSCs figlie e cistoblasti; questi ultimi si differenziano in cisti germinali. E' interessante sottolineare che, mentre le cisti della linea germinale si differenziano nella camera ovarica, la funzione di dSETDB1 è gradualmente presa da SU(VAR)3-9. Mutazioni con perdita di funzione in *dsetdb1* o in *Su(var)3-9*, aboliscono la tri-metilazione della K9H3 e il legame di HP1, rispettivamente, nella parte anteriore del germario e nella camera ovarica, e determinano la localizzazione della K9H3m3 lontano dalle regioni ricche di DNA nella maggior parte delle cellule dell'estremità posteriore del germario (Yoon *et al.*, 2008). Questi dati indicano che dSETDB1 e SU(VAR)3-9 agiscono insieme, sequenzialmente, con ruoli distinti durante l'oogenesi; *dsetdb1* riveste, quindi, un ruolo di particolare importanza a causa della sua funzione specifica per le GSCs e per il suo più severo fenotipo mutante (Yoon *et al.*, 2008).

1.6 Demetilasi istoniche

Il codice istonico non potrebbe sussistere con la sola presenza di enzimi in grado di modificare gli istoni aggiungendovi gruppi chimici. È importante per il loro ruolo come segnali epigenetici che essi siano in grado di essere rimossi quando serve. Mentre per quanto riguarda la rimozione dell'acetilazione si è a conoscenza da tempo, di enzimi capaci di deacetilare gli istoni (deacetilasi istoniche), è solamente da poco che si comincia a scoprire enzimi aventi capacità demetilasi.

Gli enzimi finora scoperti sono responsabili della demetilazione delle lisine istoniche e appartengono alla famiglia proteica chiamata “jumonji”. Si tratta di demetilasi ossidative che utilizzano il ferro ridotto (Fe^{++}) e l' α -chetoglutarato come cofattori per produrre formaldeide ed il corrispondente stato di metilazione. Potrebbe essere utile come cofattore anche l'ascorbato, avendo la capacità di ridurre lo ione ferrico a ferroso. Il dominio responsabile per la demetilazione istonica si chiama “jumonji C” (JmjC, Tsukada *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2006).

La proteina GASC1 (Gene Amplified in Squamous cell Carcinoma 1), nota anche come JMJD2C, è una delle proteine appartenenti alla sottofamiglia JMJD2 (jumonji domain containing 2) delle proteine jumonji. La JMJD2C è stata vista demetilare *in vitro* la K9H3 sia trimetilata che dimetilata. *In vivo* la sua espressione ectopica abbassa i livelli di K9H3m3 e K9H3m2, fa aumentare i livelli di K9H3m1, delocalizza la proteina HP1 e riduce i livelli di eterocromatina. Anche le proteine JMJD2A e JMJD2B, omologhi di GASC1, sono in grado di demetilare la K9H3 trimetilata e dimetilata (Cloos *et al.*, 2006).

Il ruolo della proteina JMJD2A è stato ulteriormente indagato in un'altro lavoro (Klose *et al.*, 2006). Secondo questi autori JMJD2A rimuoverebbe i gruppi metilici *in vitro* sia dalla K9H3 che dalla K36H3, fino a lasciarli completamente senza. Il substrato preferenziale però è la K9H3m3. La sovraespressione della proteina *in vivo* causa l'accumulo di K9H3m1 e K36H3m1. Dai loro esperimenti è anche emerso che in cellule che sovraesprimono la proteina JMJD2A viene persa la localizzazione pericentromerica della proteina HP1.

Il ruolo della JMJD2A è stato analizzato nelle regioni eucromatiche, in particolare nel locus genico *ASCL2*. È stato visto che abolendo il trascritto di *JMJD2A* si otteneva la sovraespressione della proteina *ASCL2* ed un incremento dei livelli della K9H3m3 e K36H3m3 alla stessa regione. Perciò si conclude che la localizzazione in questo locus da parte della proteina JMJD2A è necessaria a mantenere ridotti i livelli di metilazione di K9H3 e K36H3, e quindi una trascrizione repressa. In questo caso JMJD2A funziona da repressore trascrizionale. (Klose *et al.*, 2006).

La metilazione della K9H3 si trova in regioni eterocromatiche (Peters *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 2003) ma regola anche dei geni trovati in eucromatina (Sarraf, *et al.*, 2004; Schultz, *et al.*,

2002). Per quanto riguarda la metilazione della K36H3, essa finora è stata associata con le regioni trascritte di geni attivi. Non si sa spiegare il ruolo biologico della combinazione della rimozione della metilazione di questi due residui, ma fa pensare che ci sia qualche relazione ancora da scoprire tra queste due modificazioni epigenetiche. Stranamente la demetilazione effettuata da JMJD2A è associata con la repressione della trascrizione, suggerendo che la proteina JMJD2A potrebbe funzionare da antagonista alla metilazione delle K9H3 e K36H3, associata all'attività genica (Vakoc *et al.*, 2005; Bannister *et al.*, 2005).

Le proteine che contengono il dominio JumonjiC (JmjC) costituiscono un'estesa famiglia filogenetica con molti membri appartenenti a tutte le specie eucariotiche analizzate fino ad oggi, dal lievito all'uomo (Klose *et al.*, 2006). Poco si sa, comunque, circa l'attività demetilasica di molte di loro.

In *Drosophila melanogaster*, una ricerca per omologia di sequenza ha consentito di identificare fino a 13 proteine che contengono questo dominio (Klose *et al.*, 2006), la cui attività enzimatica resta ancora ampiamente non caratterizzata. In generale, il dominio JmjC è trovato in combinazione con altri domini proteici. In particolare, una sottoclasse delle proteine JmjC contiene, in aggiunta al dominio catalitico JmjC, un secondo dominio N-ter altamente conservato (JmjN), che è anche richiesto per l'attività enzimatica (Klose *et al.*, 2006). Le proteine JmjC+N sono note per rivestire degli importanti ruoli regolatori durante lo sviluppo e la progressione del ciclo cellulare (Klose *et al.*, 2006).

Drosophila ha 4 proteine JmjC+N : Lid (*little imaginal disc*), CG3654, JMJD2(1)/CG15835 e JMJD2(2)/CG33182. In un recente lavoro, è stata caratterizzata la loro attività demetilasica a carico degli istoni *in vivo* (Loret-Llinares *et al.*, 2008). Lid demetila la H3K4m3. Risultati simili sono stati recentemente ottenuti da altri gruppi di ricerca (Secombe *et al.*, 2007; Eissenberg *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). Inoltre, al contrario di quanto atteso in base alla sua attività enzimatica, *lid* si contrappone al silenziamento genico richiesto per l'acetilazione dell'istone H3 (Loret-Llinares *et al.*, 2008).

CG15835 e CG33182 demetilano H3K9m3 e H3K36m3; la sovraespressione di CG15835 determina la diffusione di HP1 nell'eucromatina (Loret-Llinares *et al.*, 2008). Infine, la sovraespressione di CG3654 non mostra effetti significativi sui livelli di H3K4m3, H3K9m3, H3K27m3, H3K36m3 e H4K20m3 (Loret-Llinares *et al.*, 2008).

2. SCOPO DEL LAVORO

In questo progetto di ricerca mi sono dedicata ad uno studio esaustivo del ruolo della metilazione della lisina 9 dell'istone H3 (K9H3), nella formazione dell'eterocromatina facoltativa nel coccide *Planococcus citri*. La metilazione dei residui amminoacidici degli istoni viene effettuata da enzimi chiamati metiltransferasi istoniche (HMTasi). In *Drosophila melanogaster* il gene il cui prodotto è responsabile della metilazione della K9H3, è situato sul braccio destro del cromosoma 3 ed è chiamato *Su(var)3-9*. Si tratta di un gene altamente conservato anche tra specie molto lontane filogeneticamente.

La scelta del sistema modello *Planococcus citri* quale materiale animale di studio è imputabile al suo peculiare sistema cromosomico: nei Coccidi, infatti, come ampiamente descritto nell'Introduzione, l'intero assetto cromosomico aploide di origine paterna si condensa, diventa eterocromatico ed inattivo durante la settima divisione embrionale, allo stadio di blastoderma, e si mantiene nella maggior parte dei tessuti maschili, dove forma in interfase all'interno dei nuclei una struttura chiamata cromocentro. Questo sistema permette, quindi, di seguire la formazione dell'eterocromatina facoltativa durante lo sviluppo. Inoltre questi insetti sono semplici e poco costosi da allevare, ed hanno un ciclo vitale relativamente veloce.

Al fine di caratterizzare la metilazione della K9 dell'H3 durante la formazione dell'eterocromatina facoltativa, è stato primariamente necessario identificare il gene ortologo di *Su(var)3-9* nei Coccidi, a partire dall'elevata omologia che le sequenze *Su(var)3-9* presentano, soprattutto a livello del dominio SET, in specie anche molto distanti.

In questo sistema modello, tuttavia, la genetica è poco sviluppata, e non esistono genoteche di *P. citri*. Per isolare l'ortologo di *Su(var)3-9* nei Coccidi, è stata impiegata una strategia di clonaggio basata su una serie di amplificazioni per PCR del DNA genomico di *P. citri*, utilizzando coppie di primer costruite, per omologia di sequenza, nelle regioni più conservate del gene. Gli ampliconi così ottenuti sono stati clonati, sequenziati ed analizzati tramite opportuni software per analisi di sequenza. In questo modo è stata isolata una sequenza omologa a *Su(var)3-9* nei Coccidi, alla quale ci riferiremo come *Su(var)3-9-like*.

Un altro limite derivante dall'uso dei Coccidi come sistema modello, è la mancanza di ceppi mutanti. Tuttavia tale problema può essere superato sfruttando la tecnica dell'interferenza dell'RNA.

La conoscenza del meccanismo naturale di interferenza dell'RNA ha permesso di sfruttarlo per scopi di ricerca, quale ad esempio la caratterizzazione funzionale dei geni, senza dover necessariamente ricorrere al mutante per il gene in questione. Questo strumento è infatti altamente

selettivo nei confronti del proprio bersaglio, in quanto gli siRNA aderiscono perfettamente solo all'RNA messaggero complementare alla loro sequenza nucleotidica, ed è relativamente facile da indurre. L'RNAi può quindi essere utilizzato per inattivare un determinato gene in modo da accertarne la funzione. Ciò che si ottiene sfruttando questa tecnica è una fenocopia del mutante del gene di nostro interesse (in questo lavoro, *Su(var)3-9-like*), cioè un organismo con lo stesso genotipo dei selvatici ma con fenotipo mutante. L'interferenza ad RNA non colpisce, infatti, il gene che vogliamo studiare, ma il suo trascritto, che viene prodotto e rapidamente degradato dal macchinario dell'RNAi. In questo modo, pur non avendo il mutante, possiamo studiare la funzione di un gene osservando gli effetti generati dalla mancanza del suo prodotto. Il gene *Su(var)3-9-like* ottenuto è stato perciò utilizzato in esperimenti di interferenza tramite doppio filamento di RNA (dsRNAi).

A questo scopo, embrioni ottenuti dalla dissezione di femmine gravide sono stati immersi, per tempi variabili, in una soluzione contenente il dsRNA. Parallelamente sono stati allestiti esperimenti di controllo, nei quali gli embrioni sono stati ottenuti dalla dissezione di femmine gravide nella stessa soluzione tampone impiegata per il trattamento, priva però del dsRNA di *Su(var)3-9-like*. Da questo materiale sono stati poi allestiti dei vetrini per l'osservazione in immunofluorescenza. Allo scopo di verificare il successo dell'interferenza, e quindi l'inibizione della metilazione della K9H3, e' stato utilizzato l'anticorpo contro la forma trimetilata della K9H3. Sono state inoltre effettuate immunocolorazione con l'anticorpo diretto contro la K9H3m2, la K20H4m3 e HP1, allo scopo di determinare l'eventuale influenza dell'assenza di *Su(var)3-9-like*, rispettivamente, su queste modificazioni istoniche e su questa proteina.

Al fine di ampliare l'analisi del ruolo della meK9H3 durante lo sviluppo, in relazione alla formazione dell'eterocromatina facoltativa maschio-specifica, si è fatto uso della chaetocina, un metabolita fungino che inibisce in maniera specifica SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster*, competendo con il donatore di metile SAM (S-adenosylmethionine). L'uso della chaetocina si differenzia dall'RNAi in quanto quest'ultimo impedisce la traduzione della proteina, andando a degradare l'RNA messaggero del gene bersaglio, mentre la chaetocina inibisce l'attività metiltransferasica dell'enzima, che continua tuttavia ad essere presente e a poter, eventualmente, assolvere altri ruoli, quali quello strutturale, o a poter interagire con altre proteine (nell'uomo, ad esempio, SUV39H1, omologo di SU(VAR)3-9, ha un ruolo strutturale; il SET dominio stesso stabilizza il legame della proteina all'eterocromatina pericentromerica, indipendentemente dall'attività metiltransferasica). Parallelamente sono stati allestiti dei controlli, in cui femmine gravide sono state dissezionate in una soluzione tampone analoga a quella impiegata per l'inibizione, priva però della chaetocina.

Al trattamento è seguita un'analisi citologica, al fine di rilevare eventuali anomalie a carico della cromatina, e l'immunofluorescenza con l'anti-K9H3m3, l'anti-K9H3m2, l'anti-K20H4m3 e l'anti-HP1, al fine di evidenziare che l'inibizione sia avvenuta con successo e di stabilire gli effetti, dovuti all'assenza della K9 metilata, su queste modificazioni istoniche e sulla localizzazione di HP1, come già determinato in seguito agli esperimenti di RNAi.

Per ottenere una conferma a livello molecolare di quanto già ampiamente verificato citologicamente, è stata effettuata un'estrazione di proteine dagli embrioni trattati con RNAi e/o con chaetocina, e dai rispettivi controlli, allo scopo finale di allestire degli esperimenti di Western blotting in cui ho impiegato, al solito, gli anticorpi contro la K9H3m3, la K9H3m2, la K20H4m3 e HP1.

Infine, come ulteriore passo verso la caratterizzazione della funzione e come studio preliminare per quanto riguarda la specificità di substrato mostrata dalla metilasi SU(VAR)3-9-like, è stato analizzato il pattern di localizzazione della dimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 in relazione alla trimetilazione dello stesso residuo, allo scopo di verificarne un eventuale coinvolgimento nella formazione dell'eterocromatina facoltativa.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale animale di studio

3.1.1 Allevamento di *Planococcus citri*

Planococcus citri (Homoptera, Coccoidea) è stato allevato a 26°C su patate germogliate, in contenitori di plastica o vetro. In queste condizioni il ciclo vitale di *P.citri* è di circa 37 giorni per i maschi, 45 per le femmine. Prima dell'uso le patate sono state conservate per circa un mese al buio per lasciarle germogliare in tali condizioni.



A)



B)

Figura A e B: Dimorfismo sessuale in *Planococcus citri*.

(A) Fotografia allo stereoscopio di femmina di *Planococcus citri* (Homoptera, Coccoidea). Sono state fotografate anche le punte delle pinzette da dissezione per evidenziare le dimensioni dell'insetto (6x).

(B) Fotografia allo stereoscopio di maschio di *Planococcus citri* (Homoptera, Coccoidea) (10x).

I Coccidi sono insetti Omotteri, le cui dimensioni sono inferiori al centimetro.

Le caratteristiche salienti dei Coccidi sono due: il dimorfismo sessuale e i sistemi cromosomici.

Per quanto riguarda la diversa morfologia femminile e maschile, le femmine hanno un corpo di forma variabile, appiattita, con il capo frequentemente fuso al torace e le altre delimitazioni segmentali poco visibili; sono neoteniche ed attere e ricoperte da secreti protettivi come seta, lacca o cera (A). I maschi hanno un corpo allungato e dimensioni molto inferiori a quelle della femmina (B).

3.2 Metodologie molecolari

3.2.1 Estrazione DNA da *Planococcus citri*

Il DNA estratto da *P.citri* è stato ottenuto seguendo il metodo di Savakis e Ashburner (Ashburner, 1989). Circa venti insetti sono stati collocati in un tubo eppendorf da 1.5ml ed omogeneizzati in un volume finale di 500µl di soluzione HB (Tris-HCl 0.1M pH 8, EDTA 10mM pH 8, NaCl 0,35M, urea 7M), conservata a -20°C. All'omogeneizzato è stato aggiunto un ugual volume di una miscela 1:1 di fenolo (saturato con Tris 10mM, EDTA 1mM pH8) e cloroformio, agitando delicatamente per 5-10 minuti. Le due fasi sono state separate centrifugando a 13000rpm.

Il surnatante è stato recuperato ed estratto nuovamente con fenolo/cloroformio 1:1 e una volta con solo cloroformio. Gli acidi nucleici sono stati precipitati con due volumi di etanolo assoluto. Il pellet è stato lavato con 70% etanolo e risospeso in acqua milliQ sterile. L'RNA è stato digerito con 10µg/ml di RNasi A, a temperatura ambiente per un'ora.

3.2.2 Amplificazione di frammenti genomici *Su(var)3-9-like*

La sequenza *Su(var)3-9-like* di *P. citri* ad oggi isolata nel nostro laboratorio, è stata ottenuta tramite una serie di amplificazioni per PCR da DNA genomico, con varie coppie di primer, così costruite.

Le diverse coppie di primer sono state disegnate nelle regioni altamente conservate (non solo tra gli insetti, ma su tutta la scala evolutiva, dal lievito fino ai mammiferi) sulla sequenza genomica, dell'mRNA e del cdNA di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*, o dedotte dall'allineamento della sequenza genomica di *Suv39H1* di *Homo sapiens*, *Suv39h1* di *Mus musculus*, e *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*.

Nel caso del primer Suv39/E1, disegnato sull'esone 2 comune a *Su(var)3-9* ed *eIF2γ*, sono stati testati allineamenti tra le sequenze del cdNA di *Su(var)3-9* dei vari insetti che presentano questa peculiare fusione. E' stato, infine, scelto un allineamento tra la sequenza del cdNA di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster* e del cdNA di *Su(var)3-9* di *Cercopis vulnerata*, per l'elevato grado di conservazione della sequenza tra queste due specie, e per l'appartenenza di *Cercopis vulnerata* all'ordine degli Omotteri, come il Coccide *P. citri*.

Tra i diversi primer costruiti in questo modo, le coppie che hanno amplificato frammenti *Su(var)3-9-like* sono le seguenti sequenze:

Suv39/2F:

5'- GGG ATT GTG GGC TGT AAG TG - 3' (costruito sulla sequenza genomica di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*)

Suv39/2R:

5'- TTG GAC GCA GTG TGA AGA AC - 3' (costruito sulla sequenza genomica di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*);

Suv39/3F

5'-GCC CAA AGG AGA GTA CGT TG-3' (costruito sulla sequenza genomica di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*)

R3

5'- AAA RTG VGA GAT GTT GCC ATA -3' (costruito allineando la sequenza genomica di *Suv39H1* di *Homo sapiens*, *Suv39h1* di *Mus musculus*, e di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*);

Suv39/E1

5'-CAT GTR GCT CAC GGY AAA TC-3' (costruito allineando la sequenza del cDNA di *Su(var)3-9* di *Cercopithecus aethiops* e del cDNA di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*);

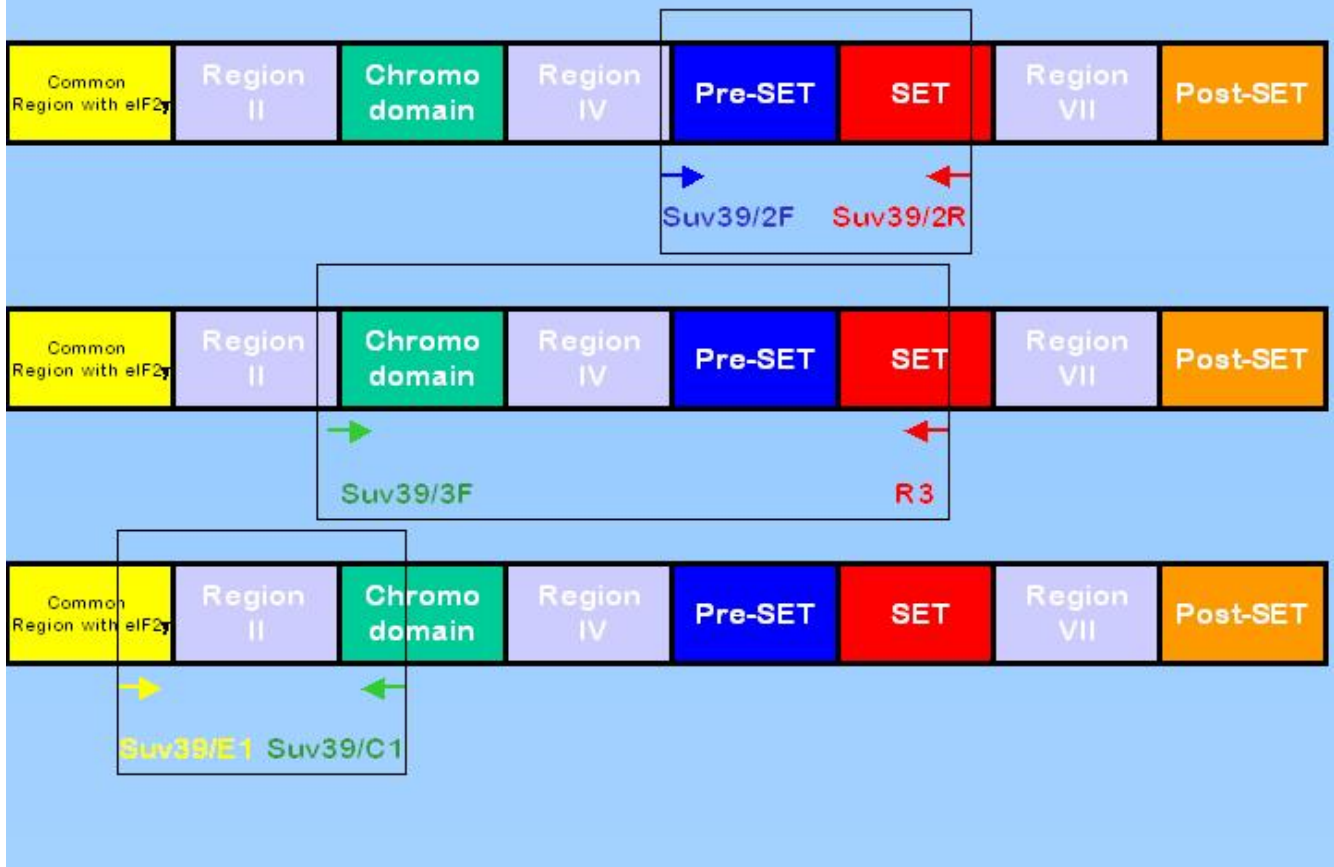
Suv39/C1

5'-GTT CTC GCT ATC ATG GTA TC-3' (costruito sulla sequenza di *Su(var)3-9-like* di *Planococcus citri*).

1µl di DNA genomico da amplificare è stato aggiunto ad una soluzione contenente primer ad una concentrazione finale 1µM, dNTP 0.2mM, tampone per la Taq Polimerasi 1x, MgCl₂ 3.5mM e 2.5U di Taq Polimerasi. L'amplificazione del DNA è stata effettuata nelle seguenti condizioni: denaturazione a 94°C per 5', appaiamento dei primer alla temperatura di annealing ottimale per ciascuna coppia (calcolata 5°C al di sotto della temperatura di melting del primer con temperatura inferiore) per 5' e sintesi del DNA a 72°C per 2', durante il 1° ciclo di amplificazione; 94°C per 1' (denaturazione), appaiamento dei primer alla temperatura di annealing ottimale per ciascuna coppia di primer per 2', 72°C per 2' (sintesi del DNA), nei successivi 30 cicli ed estensione finale a 72°C per 5'.

Per maggiore chiarezza, di seguito è riportato uno schema (schema 1) dei vari frammenti ottenuti in questo modo.

Clonaggio di *Su(var)3-9-like*



Schema 1: Lo schema rappresenta le sequenze di DNA genomico di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*. Il disegno non è stato fatto in scala, le regioni che codificano per i domini proteici conservati, e le sequenze introniche (regione II, IV e VII), per semplicità, sono raffigurate tutte delle stesse dimensioni. I riquadri delimitano le regioni omologhe isolate in *P. citri* tramite amplificazione per PCR del DNA genomico; le frecce rappresentano le relative coppie di primer che hanno prodotto tali ampliconi.

3.2.3 Clonaggio nel vettore pGEM-T

Estrazione e purificazione di frammenti di DNA da gel d'agarosio:

I prodotti della reazione di PCR sono stati fatti correre su un gel d'agarosio all'1% e visualizzati con bromuro d'etidio 10µg/ml al transilluminatore. L'eluizione della banda dal gel è stata effettuata seguendo i protocolli allegati al kit Qiagen (QIAquick extraction kit).

Reazione di ligasi nel vettore di clonaggio pGEM-T (Promega):

I prodotti PCR eluiti dal gel sono stati ligati al vettore di clonaggio pGEM-T (con un rapporto molare 3:1) seguendo il protocollo Promega. I controlli per questa reazione hanno incluso una reazione di ligasi con un inserto di DNA di controllo ed una reazione di ligasi senza inserti.

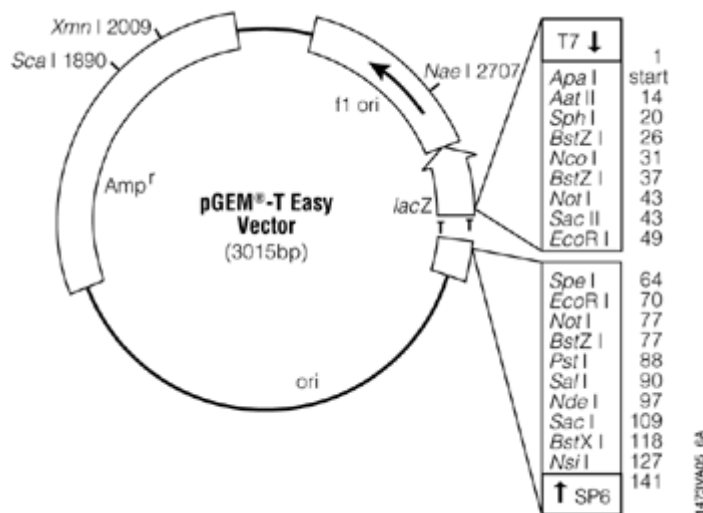


Figura C: Mappa del vettore pGEM-T Easy (Promega).

Trasformazione delle cellule DH5α di *E.coli* (Promega):

Per l'amplificazione del vettore di clonaggio contenente gli inserti, circa 30-50ng di DNA ligato sono stati aggiunti ad un'aliquota di 100μl di cellule DH5α di *E.coli* (Promega) rese competenti per la trasformazione tramite cloruro di rubidio. La trasformazione è stata condotta per mezzo d'incubazione in ghiaccio per 30', shock termico in bagno termostato a 42°C per 1'50" e nuova incubazione in ghiaccio per 2'. Dopo questi trattamenti le cellule sono state fatte crescere in LB (per 1L: bacto-tryptone 10gr, bacto-yeast extract 5gr, NaCl 10gr, pH 7.5) a 37°C, per un'ora in agitazione (225rpm) e poi piastrate su piastre di LB addensato con agar 1.5% in presenza di ampicillina 50μg/ml, X-Gal 40μg/ml, IPTG 0.5mM.

3.2.4 Screening delle colonie trasformanti

Un numero di colonie batteriche bianche, potenzialmente trasformate, sono state raccolte e fatte crescere in colture separate in terreno solido, cioè su una nuova piastra di LB + ampicillina 50μg/ml, divisa in 24-50 celle. Le stesse colonie sono state fatte crescere anche in 1.5ml di terreno liquido LB + ampicillina 50μg/ml posto in tanti tubi da batteri quante sono le colonie. Si è lasciato crescere *overnight* (o.n.) a 37°C, i tubi in agitazione.

Da ogni tubo sono state fatte estrazioni di DNA plasmidico da sottoporre a digestione enzimatica. Ogni coltura batterica è stata trasferita in una eppendorf e centrifugata a 14000rpm per 1 minuto. Il pellet è stato lavato in 1ml di TE 1M pH 8. Le colonie sono state nuovamente centrifugate e il pellet è stato risospeso in 150μl di soluzione SET (Tris-HCl 1M pH 8, EDTA 0.5M, saccarosio 20%). Alle sospensioni sono stati aggiunti 350μl di soluzione di lisi (NaOH 5M,

SDS 10%) delle membrane batteriche. Capovolgendo delicatamente si è determinata la fuoriuscita del DNA plasmidico. Si è poi lasciato in ghiaccio per 10 minuti.

Per precipitare il DNA cromosomico e l'SDS sono stati aggiunti 250µl di Na-acetato 3M pH 4.8, capovolgendo delicatamente e lasciando in ghiaccio per 20 minuti. Per recuperare il DNA plasmidico, il tutto è stato centrifugato per 10 minuti a 14000rpm. Il surnatante, contenente il DNA plasmidico, è stato trasferito in una nuova eppendorf. Al surnatante è stato aggiunto un ugual volume d'isopropanolo freddo, mescolando capovolgendo per precipitare il DNA plasmidico. Dopo aver centrifugato per 10 minuti a 14000rpm è stato eliminato delicatamente il surnatante. Il pellet è stato lavato aggiungendo 200µl d'etanolo freddo 70%. Dopo aver centrifugato a 14000rpm per 5 minuti, è stato eliminato il surnatante ed è stato asciugato il pellet di DNA plasmidico in una pompa da vuoto per 10-20 minuti, ed infine risospeso in 20µl di acqua milliQ sterile.

Si conserva poi a +4°C. 1-2µl sono stati utilizzati per l'analisi con enzimi di restrizione.

Tutte le reazioni di digestione sono state condotte secondo le condizioni suggerite dalla New England Biolabs per i diversi enzimi.

3.2.5 Sequenziamento

La purificazione del DNA è avvenuta usando colonne Micro-Spin G-50 e la sequenza è stata determinata con un sequenziatore automatico (ABI Prism) gestito dal Dott. Del Re, disponibile presso il dipartimento A.B.A.C. dell'Università degli Studi della Tuscia di Viterbo. Le analisi d'omologia di sequenza sono state fatte utilizzando il programma di ricerca BLASTn (Altschult et al., 1997) e BLASTx.

3.2.6 PCR di sostituzione

Per effettuare gli esperimenti di RNAi è stato usato il frammento *Su(var)3-9-like* di *P. citri* amplificato dalla coppia di primer *Suv39/2F-Suv39/2R*, codificante per la regione del pre-SET e del SET dominio.

Il vettore pGEM-T, contenente il cds di *Su(var)3-9-like*, è stato modificato allo scopo di mettere l'inserto tra due promotori T7. E' stata effettuata un' amplificazione per PCR mediante l'utilizzo dei seguenti primer:

T7: 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'

SP6: 5' - TAT TTA GGT GAC ACT ATA G - 3'

1µl di DNA plasmidico da amplificare è stato aggiunto ad una soluzione contenente primer ad una concentrazione finale 1µM, dNTP 0.2mM, tampone per la Taq Polimerasi 1x, MgCl₂ 1.5mM

e 2.5U di Taq Polimerasi. L'amplificazione del DNA è stata effettuata nelle seguenti condizioni: 94°C per 1'30'' (denaturazione); 45°C per 1'30'' (appaiamento dei primer) e 72°C per 1'30'' (sintesi del DNA); estensione finale 72°C per 7'.

Il DNA ottenuto da questa amplificazione per PCR è stato precipitato con ammonio acetato (1:10) e isopropanolo (1 volume) ed è stato utilizzato in una reazione di ligasi al vettore di clonaggio pGEM-T (con un rapporto molare 3:1) seguendo il protocollo Promega. I controlli per questa reazione hanno incluso una reazione di ligasi con un inserto di DNA di controllo ed una reazione di ligasi senza inserti. Successivamente è stata effettuata una trasformazione delle cellule DH5 α di *E.coli*, come precedentemente descritto. E' stato quindi effettuato uno screening delle colonie trasformanti, tramite una reazione di PCR con il primer T7. Ciò è stato fatto allo scopo di identificare il clone con il frammento inserito come mostrato nella figura D'.

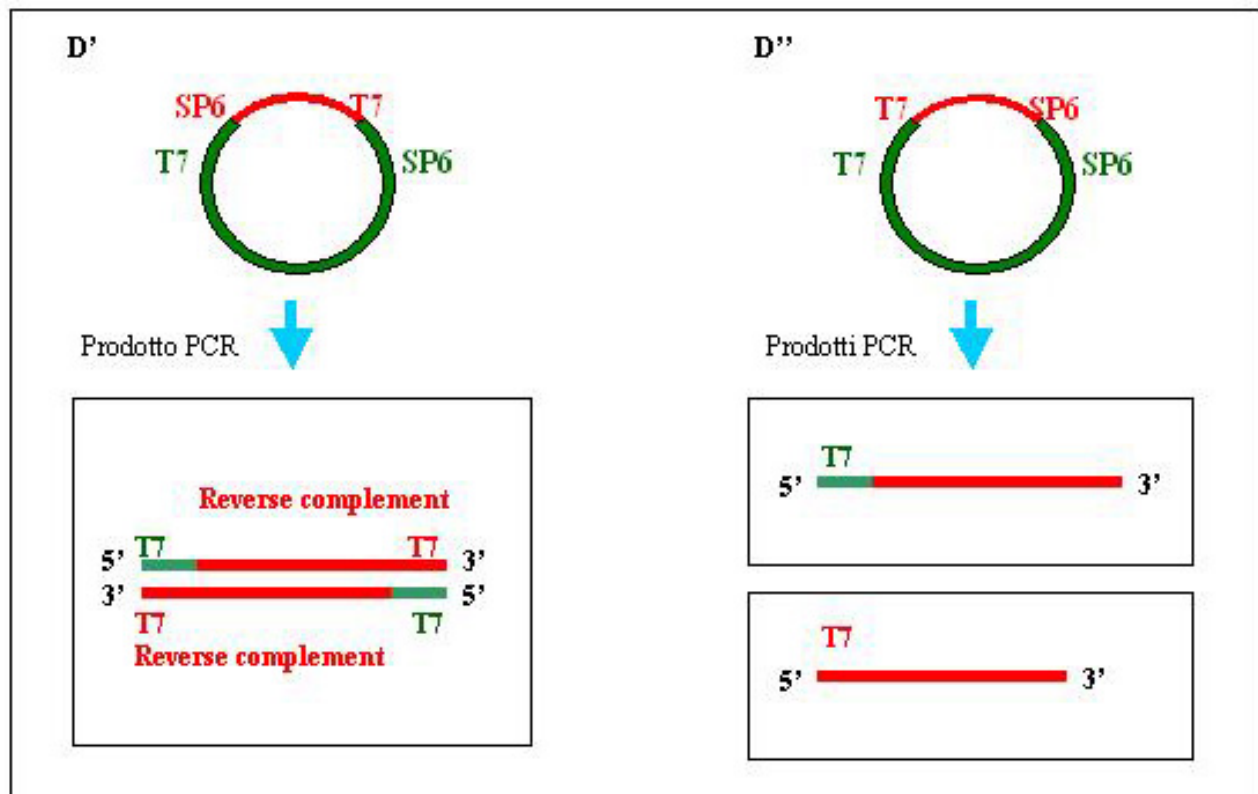


Figura D: Sono mostrati i due possibili orientamenti in cui il frammento può inserirsi nel vettore. Il vettore è colorato in verde, il frammento in rosso. I caratteri in verde indicano le sequenze T7 e SP6 di pGEM-T, quelli in rosso indicano le stesse sequenze sull'inserto. Nella modalità mostrata in D', il primer T7 può funzionare sia da forward che da reverse, fornendo come prodotto finale l'inserto collocato tra due promotori T7. Nella modalità mostrata in D'', il primer T7 può funzionare soltanto da forward, ma, venendo a mancare il primer reverse, verrà amplificato un solo filamento.

1 μ l di DNA plasmidico da amplificare è stato aggiunto ad una soluzione contenente primer ad una concentrazione finale 1 μ M, dNTP 0.2mM, tampone per la Taq Polimerasi 1x, MgCl₂ 1.5mM

e 2.5U di Taq Polimerasi. L'amplificazione del DNA è stata effettuata nelle seguenti condizioni: 94°C per 1'30'' (denaturazione); 45°C per 1'30'' (appaiamento dei primer) e 72°C per 1'30'' (sintesi del DNA); estensione finale 72°C per 7'. In questo modo abbiamo ottenuto l'inserito collocato tra due promotori T7.

Il DNA ottenuto da questa amplificazione per PCR è stato precipitato con ammonio acetato (1:10) e isopropanolo (1 volume) ed è stato utilizzato in un'unica reazione di trascrizione, operata dalla RNA polimerasi T7.

3.2.7 Produzione dsRNA

Trascrizione *in vitro*:

Il cds di *Su(var)3-9*, ottenuto per PCR, è stato utilizzato come stampo per la trascrizione *in vitro* (T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production Systems, Promega).

La miscela di reazione è costituita da 10 µl di Ribomax Express T7 2x Buffer, dallo stampo lineare di DNA (1 µg totale), da acqua nucleasi-free (in quantità tale da arrivare ad un volume totale di 20 µl) e da 2 µl di mix di enzimi, T7 express (contenente: la T7 RNA polimerasi, l'inibitore della ribonucleasi RNasin e la pirofosfatasi inorganica di lievito). Una volta aggiunti tutti i componenti, la miscela di reazione viene delicatamente mescolata ed incubata in bagno termostato a 37°C per 30 minuti. Successivamente lo stampo a DNA viene rimosso aggiungendo alla miscela di reazione DNasi RNasi-free, ad una concentrazione di 1 unità per µg di stampo, ed incubandola in bagno termostato a 37°C per 15 minuti.

Questo sistema di trascrizione *in vitro* consente di produrre una consistente quantità di RNA (nell'ordine di grandezza dei mg) in tempo relativamente breve.

Annealing:

Gli RNA così sintetizzati sono stati fatti riassociare a doppio filamento *in vitro*. Gli RNA vengono prima denaturati ponendoli in bagno termostato a 65°C per 30 minuti; successivamente sono rinaturati lasciandoli raffreddare a temperatura ambiente.

Il dsRNA così ottenuto è stato precipitato con ammonio acetato (1:10) e isopropanolo (1 volume) e risospeso in 500µl di soaking buffer.

3.2.8 RNAi

Circa 15-20mg di dsRNA di *Su(var)3-9* è stato introdotto negli embrioni di tre femmine, immergendo le uova fecondate in una soluzione tampone (soaking buffer: vedi paragrafo 3.3.1) contenente il dsRNA. Il soaking buffer viene impiegato in quanto permeabilizza le membrane.

Dopo 16 ore di trattamento a 26°C, gli embrioni sono stati utilizzati per preparati citologici e immunocolorati con l'anticorpo anti-HP1, anti-K9H3m3, anti-K9H3m2 e anti-K20H4m3 (come descritto nei paragrafi 3.3.1 e 3.3.2).

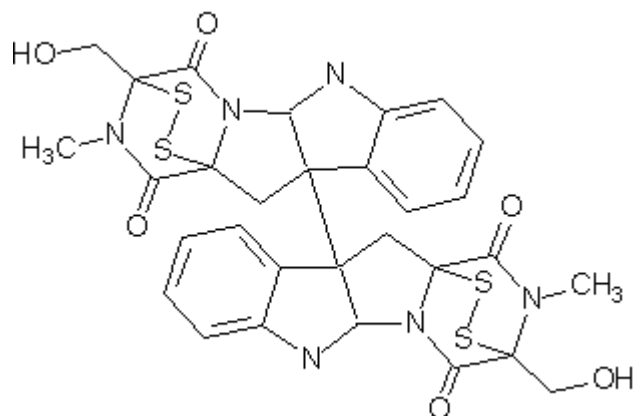
Nella stessa soluzione, priva del dsRNA, sono stati immersi, per lo stesso tempo di trattamento, embrioni utilizzati per il controllo.

L'analisi statistica è stata effettuata tramite il test del χ^2 , utilizzando il programma "Two by two table analysis online. Including chi-square, odds ratio, risk ratio"

(<http://home.clara.net/sisa/twooby2.htm>).

3.2.9. Trattamento con chaetocina

Chaetocina



La chaetocina è un metabolita fungino, con attività antimicrobica e citostatica. Appartiene alla classe delle 3,6 epidithiodiketopiperazine, di cui sono membri la gliotossina, la sporidesmina, l'oryzachloride, la verticillina A e la melinacidin. La chaetocina è un dimero molecolare di due anelli, costituiti da cinque associati, fusi in cis. Interessante notare che la chiralità della parte della 3,6 epidithiodiketopiperazina nella chaetocina è opposta alla chiralità nella gliotossina, nella sporidesmina, nell'aranotina e nell'oryzachloride, e mentre gli ultimi composti mostrano attività antivirale, la chaetocina non ne ha. Questa tossina fungina ha mostrato forte citotossicità verso le cellule HeLa ($IC_{50} = 0,05 \mu\text{g/ml}$)².

La chaetocina è un inibitore specifico della metiltransferasi istonica SU(VAR)3-9 ($IC_{50} = 0.6 \mu\text{M}$) di *Drosophila melanogaster* e del suo ortologo umano ($IC_{50} = 0.8 \mu\text{M}$), e agisce come un inibitore competitivo per la S-adenosil-metionina (Greiner *et al.*, 2005). La specificità della chaetocina per SU(VAR)3-9 rende questo composto uno strumento eccellente per lo studio della repressione genica mediata dall'eterocromatina.

Trattamento

La chaetocina ci è stata gentilmente fornita dal prof. A. Imhof; è diluita in DMSO, ad una concentrazione pari a 6,86 mM.

Per trattare gli embrioni di *P. citri* con la chaetocina, sono state effettuate una serie di prove a varie concentrazioni di tale molecola e a diversi tempi di trattamento. Evidenze di una certa efficacia dell'inibizione si registrano già con trattamenti ad una concentrazione di 50 μ M per 4h; effetti più significativi si manifestano però ad una concentrazione pari a 100 μ M per 16h, ed è in queste condizioni che sono stati effettuati la maggior parte degli esperimenti.

Femmine gravide sono state dissezionate in una soluzione tampone così composta:

per i trattati: soaking buffer, vedi paragrafo 3.3.1, chaetocina 100 μ M e DMSO 0,5%; per i controlli: soaking buffer, vedi paragrafo 3.3.1 e DMSO 0,5%.

Dopo 16 ore di trattamento a 26°C, gli embrioni sono stati utilizzati per preparati citologici e immunocolorati con l'anticorpo anti-HP1, anti-K9H3m3, anti-K9H3m2 e anti-K20H4m3 (come descritto nei paragrafi 3.3.1 e 3.3.2).

L'analisi statistica è stata effettuata tramite il test del χ^2 , utilizzando il programma "Two by two table analysis online. Including chi-square, odds ratio, risk ratio"

(<http://home.clara.net/sisa/twooby2.htm>).

3.2.10. Estrazione delle proteine totali da *Planococcus citri*

Un estratto di proteine da animali in toto è stato ottenuto seguendo il metodo descritto in Platero *et al.*, 1995. Sono stati omogeneizzati embrioni ottenuti da femmine gravide, pestellandoli in ghiaccio con 400 μ l di buffer freddo (Tris-HCl 60mM pH 6.8, glicerolo 10%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 350mM, blue di bromofenolo 0.01%, leupeptina 10 μ g/ml, PMSF 1mM, benzamidina 10 μ M, fenetrolina 1 μ g/ml, aprotinina 10 μ g/ml, H₂O milli-Q). L'omogeneizzato è stato fatto bollire 15 minuti, sonicato in ghiaccio (60% potenza, 2 volte per 10") e poi nuovamente bollito 15 minuti. I campioni sono stati posti a 75°C per 3/4 d'ora. Il surnatante è stato recuperato dopo aver centrifugato a 14000rpm per 10 minuti e poi congelato velocemente a -20°C.

3.2.11. SDS-PAGE

15 μ g degli estratti proteici sono stati fatti correre in un gel di SDS-poliacrilammide al 15% (acrilammide 15%, bis-acrilammide 2.67%) a 120V per due ore, usando il sistema Mini-Protean II system (BioRad, Richmond, CA).

3.2.12. Western Blotting

Le proteine sul gel sono state successivamente trasferite elettricamente su una membrana di nitrocellulosa a 150mA per due ore a 4°C, usando un apparato per elettroblotting "semidry" (BioRad).

3.2.13. Ibridazione su filtro

Dopo il trasferimento il filtro è stato bloccato 1h a temperatura ambiente con 5% di “non fat dried milk” in TBST (0,05% Tween 20 + 1X TBS [Tris-Hcl 10mM pH 8.0, NaCl 150mM]). Il filtro è stato incubato con anticorpo di topo anti-HP1 (C1A9 monoclonale), 1:500, anticorpo di topo anti- α -tubulina 1:500, anticorpo di coniglio anti-K9H3m3 1:750 in TBST, oppure anticorpo di anticorpo di topo anti- α -tubulina 1:500, anticorpo di coniglio anti-K20H4m3 1:750 e anticorpo di topo anti-K9H3m2 1:500 in TBST, per tutta la notte a 4°C, lavato in TBST per tre volte (15 minuti cadauno) e poi incubato un'ora con una diluizione 1:2000 in TBST dell'anticorpo secondario "goat anti-mouse IgG" coniugato con HRP ("Horseradish peroxidase" Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e "goat anti-rabbit IgG" coniugato con HRP ("Horseradish peroxidase" Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Dopo tre ulteriori lavaggi di 15 minuti ciascuno in TBST, il filtro è stato incubato con il reagente Luminolo (GE Healthcare Amersham ECL Western Blotting Analysis System). Le bande chemiluminescenti sono state osservate attraverso l'esposizione del filtro ad una pellicola per raggi X (Kodak, Rochester, NY), a tempi variabili da 1 a 5 minuti. I controlli negativi sono stati allestiti incubando i campioni proteici con il solo anticorpo secondario.

3.3 Metodologie citologiche

3.3.1 Preparati citologici

I preparati cromosomici da embrioni sono stati ottenuti come descritto da Bongiorno *et al.*, 1999.

Femmine gravide sono state dissezionate e mantenute in una soluzione ipotonica 0,8% di sodio-citrato. La soluzione ipotonica è stata rimossa in seguito a centrifugazione per 2 minuti a 3000rpm. Per gli esperimenti di RNAi, e per i trattamenti con la chaetocina, femmine gravide sono state dissezionate e mantenute in una soluzione tampone (soaking buffer: Na₂HPO₄ 10.9mM, KH₂PO₄ 5.5mM, NaCl 2.1mM, NH₄Cl 4.7mM, spermidina 3mM). La soluzione tampone è stata rimossa in seguito a centrifugazione per 2 minuti a 3000rpm.

Al pellet è stato aggiunto il fissativo Bradley-Carnoy (cloroformio: etanolo: acido acetico, 4:3:1). Il pellet è stato disperso tramite ripetuti passaggi attraverso l'ago ipodermico di una siringa

da 1ml fino alla completa omogeneizzazione. La sospensione è stata centrifugata a 4500rpm per 8 minuti. Dopo aver risospeso il pellet in metanolo:acido acetico (3:1), 60µl di sospensione sono stati seminati per ogni vetrino lasciato poi asciugare (vetrini per air-drying).

Gli embrioni interi sono stati ottenuti attraverso il procedimento sopra descritto con la variante che il pellet con gli embrioni non viene omogeneizzato ma solo leggermente disperso attraverso la siringa per creare dei buchi nella membrana vitellinica.

3.3.2 Immunolocalizzazione *in situ*

Immediatamente dopo la preparazione, i vetrini sono stati reidratati con tre lavaggi di 10 minuti ciascuno in PBS 1x, permeabilizzati con PBS 1x + 1% TritonX-100 (10 minuti a temperatura ambiente) e lavati per tre volte in PBS 1x. Il bloccaggio è stato effettuato con Normal Goat Serum (NGS) al 5% in H₂O sterile per 30 minuti. I vetrini sono stati incubati per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario diluito in PBS 1x + 0,1% BSA (Albumina di Siero Bovino).

L'anticorpo monoclonale anti-HP1, C1A9 (diluito 1:50), è stato isolato da James ed Elgin (James and Elgin, 1986) e ci è stato gentilmente fornito dalla Prof.ssa Wakimoto.

L'anticorpo contro la modificazione istonica K9H3m2 (diluito 1:50) è stato acquistato presso la ditta UpState Biotechnologies.

L'anticorpo contro la modificazione istonica K9H3m3 (diluito 1:100) ci è stato gentilmente fornito dal Prof. Singh.

L'anticorpo contro la modificazione istonica K20H4m3 (diluito 1:100) ci è stato gentilmente fornito dal Prof. Singh.

Dopo tre lavaggi in PBS 1x, i vetrini sono stati incubati con gli anticorpi secondari, diluiti 1:100 (l'anticorpo diretto contro l'immunoglobulina IgG (H+L) di topo) o 1:200 (l'anticorpo diretto contro l'immunoglobulina IgG (H+L) di coniglio), in PBS 1x + 0,1% BSA per un'ora a temperatura ambiente. L'anticorpo secondario diretto contro l'immunoglobulina di topo è coniugato con AlexaTM 488; quello diretto contro l'immunoglobulina di coniglio è coniugato con AlexaTM 594 (Molecular Probes, Eugene, OR).

Dopo l'incubazione i vetrini sono stati lavati tre volte in PBS 1x e controcolorati con DAPI 0,2µg/ml (4',4'-diamidino-2-fenilindole, Boehringer, Mannheim) in SSC 2x (SSC 20x = NaCl 0,3M, trisodio citrato 0,03M) per 5 minuti. Infine, i vetrini sono stati chiusi con un coprioggetto 24x50 e sigillati con smalto previa aggiunta di alcune gocce di antifade (DABCO [Sigma] 23,3mg/ml, Tris-Cl 1M pH 7,5-8 alla concentrazione finale di 20mM, glicerolo sterile 9:1 in antifade) che rallenta il decadimento della fluorescenza. Controlli negativi sono stati ottenuti attraverso l'incubazione dei vetrini con il solo anticorpo secondario.

3.3.3 Osservazione al microscopio a fluorescenza

I preparati citologici sono stati osservati al microscopio a fluorescenza immunofluorescenza Zeiss Axiophot equipaggiato con una lampada a vapori di mercurio da 100W. Per l'osservazione sono state usati i seguenti filtri di eccitazione (Chroma):

DAPI: filtro d'eccitazione 360/40 nm;

ALEXA⁴⁸⁸: filtro d'eccitazione 492/18 nm;

ALEXA⁵⁹⁴: filtro d'eccitazione 572/25 nm.

Le immagini fluorescenti sono state acquisite con una CCD camera (serie 200; Photometrics, Tucson, AZ) e trasferite utilizzando il programma IPLab Spectrum (Signal Analytic, Vienna, VA), ad un computer Macintosh Power 4100 (Apple, Cupertino, CA) per l'elaborazione. La sovrapposizione e l'elaborazione delle immagini è stata effettuata con il programma Adobe Photoshop (Adobe System, Mountain View, CA).

4. Risultati

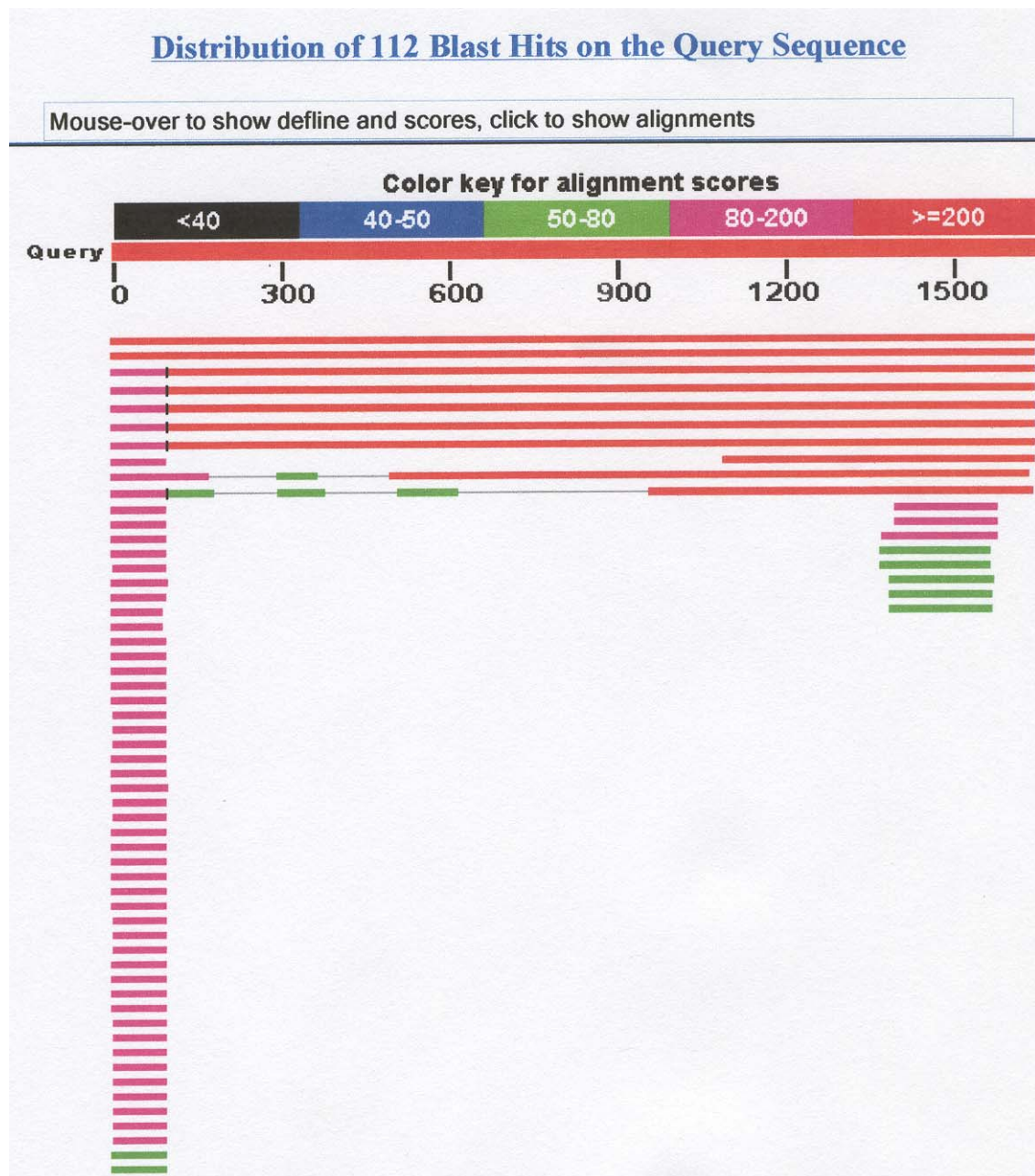
4.1 Clonaggio del gene *Su(var)3-9-like*

L'RNA interference si sta rivelando la tecnica d'elezione per dissezionare la funzione di un gene di cui non si abbiano a disposizione mutanti nell'organismo di studio. Per cui, per poter studiare il possibile ruolo della metiltransferasi dell'istone H3 alla lisina 9 (K9H3 HMTasi) nella formazione dell'eterocromatina facoltativa maschio-specifica nel Coccide *Planococcus citri*, ho pensato di usare la sequenza del gene *Su(var)3-9* di *P. citri* per costruire un RNA a doppio filamento da usare per l'interferenza. Ovviamente, per poter portare a termine questo compito avevo bisogno della sequenza del gene in questione. Quindi, come primo passo ho dovuto isolare e clonare la K9H3 HMTasi, sfruttando la sua possibile omologia con il gene ortologo presente in altre specie. La mia scelta è caduta, inizialmente, sul dominio SET, che presenta l'attività metiltransferasica, perché è un dominio evolutivamente conservato dal lievito fino ai mammiferi; sfruttando l'omologia di sequenza è stato possibile amplificare per PCR dal DNA genomico sequenze *Su(var)3-9-like* di *Planococcus citri*.

Il frammento ottenuto è stato sequenziato ed analizzato da software di analisi di sequenza. Una volta identificato il SET dominio, lo scopo che mi sono prefissa è stato quello di estendere la conoscenza della sequenza genica in direzione 5', amplificando, per PCR, il DNA genomico di *P. citri*, tramite omologia di sequenza (Per ulteriori dettagli sulle varie reazioni di PCR e sul criterio di costruzione dei primer, vedere materiali e metodi).

L'analisi BLASTn (**figura 4**) contro un database nucleotidico, ha permesso l'identificazione del frammento amplificato dal DNA genomico, come l'omologo di *Su(var)3-9* in *Planococcus citri*. Questo frammento è stato perciò chiamato *Su(var)3-9-like*. La probabilità, espressa tramite il valore E, che la corrispondenza tra la sequenza nucleotidica *Su(var)3-9-like*, e ciascuna sequenza emersa da questo confronto, sia casuale, è significativamente molto bassa. L'analisi BLASTn indica un'identità di sequenza del 98% tra il frammento ottenuto dal *Planococcus citri* e *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster*.

Figura 4: Analisi BLASTn per *Su(var)3-9-like*



L'allineamento Clustal W tra la sequenza di *P. citri* e *D. melanogaster* (**figura 5**) mostra i nucleotidi identici.

Figura 5: Allineamento della sequenza genica del frammento clonato da *Planococcus citri* (“citri”, riga inferiore) e della parte corrispondente di *Su(var)3-9* di *Drosophila melanogaster* (“drome”, riga superiore). Gli asterischi * indicano i residui nucleotidici identici tra le due sequenze; in blu ed in rosso i nucleotidi diversi tra le due sequenze.

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

```

drome      C ATGTGGCTCACGGCAAATCCACGGTGGTCAAAGCCATATCCGGCGTGACAGCTGTGCGC 60
citri      C ATGTGGCTCACGGCAAATCCACGGTGGTCAAAGCCATATCCGGCGTGACAGCTGTGCGC 60
*          * * * * *

drome      TTCAAGAACGAAGTGGAGCGCAACATCACAATCAAGCTGGAACGCTTGAGCGAAAAAAA 120
citri      TTCAAGAACGAAGTGGAGCGCAACATCACAATCAAGCTGGAACGCTTGAGCGAAAAAAA 120
*          * * * * *

drome      ATCAAAAATCTTTTGACCTCCAAGCAGCAGCGACAGCAGTATGAAATCAAACAGCGTTCA 180
citri      ATCAAAAATCTTTTGACCTCCAAGCAGCAGCGACAGCAGTATGAAATCAAACAGCGTTCA 180
*          * * * * *

drome      ATGCTGCGCCACCTGGCGAATTGCGGCGACATAGCCGATTCCGCCGCCTCTGCACCAAG 240
citri      ATGCTGCGCCACCTGGT CGAATTGCGGCGACATAGCCGATTCCGCCGCCTCTGCACCAAG 240
*          * * * * *

drome      CCAGCTTCGTCTTCCATGCCAGCATCCACCTCCAGTGTAGATAGACGCACCAACCCGGCGA 300
citri      CCAGCTTCGTCTTCCATGCCAGCATCCACCTCCAGTGTAGATAGACGCACCAACCCGGCGA 300
*          * * * * *

drome      AGCACCAGTCAGACCTCACTGAGTCCAAGCAATAGTAGCGGCTATGGCAGCGTTTTTGGC 360
citri      AGCACCAGTCAGACCTCACTGAGTCCAAGCAATAGTAGCGGCTATGGCAGCGTTTTTGGC 360
*          * * * * *

drome      TGCAGGAACATGATGTGGACAAAATACCCAGTCTCAACGGATTGCCCCAACTGAAGCGT 420
citri      TGCAGGAACATGATGTGGACAAAATACCCAGTCTCAACGGATTGCCCCAACTGAAGCGT 420
*          * * * * *

drome      CGACGCAGCAGTTGTGTGGGCGCCCCAACTCCCAACTCCAAGCGGCGAAAAATAACATG 480
citri      CGACGCAGCAGTTGTGTGGGCGCCCCAACTCCCAACTCCAAGCGGCGAAAAATAACATG 480
*          * * * * *

drome      GGAGTAATTGCCAAAAGGCCGCCAAAGGAGAGTACGTTGTGGAGCGTATTGAATGCGTC 540
citri      GGAGTAATTGCCAAAAGGCCGCCAAAGGAGAGTACGTTGTGGAGCGTATTGAATGCGTC 540
*          * * * * *

drome      GAGATGGATCAATATCAGCCAGTCTTCTTCGTCAAATGGCTGGGATACCATGATAGCGAG 600
citri      GAGATGGATCAATATCAGCCAGTCTTCTTCGTCAAATGGCTGGGATACCATGATAGCGAG 600
*          * * * * *

drome      AACACCTGGGAAAGTCTTGCCAACGTGGCCGACTGCGCCGAAATGGAGAAGTTTGTGGAG 660
citri      AACACCTGGGAAAGTCTTGCCAACGTGGCCGACTGCGCCGAAATGGAGAAGTTTGTGGAG 660
*          * * * * *

drome      CGGCATCAGCAGCTCTACGAGACATACATAGCCAAGATAACCACTGAGCTTGAGAAGCAG 720
citri      CGGCATCAGCAGCTCTACGAGACATACATAGCCAAGATAACCACTGAGCTTGAGAAGCAG 720
*          * * * * *

drome      CTGGAGGCATTGCCACTAATGGAGAACATTACGGTGGCCGAAGTAGACGCTATGAGCCA 780
citri      CTGGAGGCATTGCCACTAATGGAGAACATTACGGTGGCCGAAGTAGACGCTATGAGCCA 780
*          * * * * *

drome      CTCAATCTGCAGATCGATCTTATACTGCTCGCCCAATATCGCGCTGCTGGCAGTCGAAGC 840
citri      CTCAATCTGCAGATCGATCTTATACTGCTCGCCCAATATCGCGCTGCTGGCAGTCGAAGC 840
*          * * * * *

drome      CAAAGGGAACCGCAGAAAATTGGAGAACGAGCCCTGAAAAGCATGCAAATCAAGCGGGCC 900
citri      CAAAGGGAACCGCAGAAAATTGGAGAACGAGCCCTGAAAAGCATGCAAATCAAGCGGGCC 900
*          * * * * *

```

```

drome      CAATTTGTACGACGCAAGCAGTTGGCTGATCTAGCATTGTTTCGAGAAGCGCATGAATCAT 960
citri      CAATTTGTACGACGCAAGCAGTTGGCTGATCTAGCATTGTTTCGAGAAGCGCATGAATCAT 960
*****

drome      GTGGAGAAACCGTCACCGCCAATACGTGTTGAGAACAACATTGATCTGGACACCTAGAC 1020
citri      GTGGAGAAACCGTCACCGCCAATACGTGTTGGGAACAACATTGATCTGGGACACCTAGAC 1020
*****

drome      AGCAATTTTCATGTACATACATGATAACATAATCGGCAAGGATGTGCCCAAGCCGGAAGCG 1080
citri      AGCAATTTTCATGTACATACATGATAACCTAATCGGCAAGGATGTGCCCAAGCCGGAAGCG 1080
*****

drome      GGGATTGTGGGCTGTAAGTGCACTGAAGACACAGAGGAGTGTACTGCCTCTACGAAGTGT 1140
citri      GGGATTGTGGGCTGTAAGTGCACTGAAGACACAGAGGAGTGTACTGCCTCTACGAAGTGT 1140
*****

drome      TGTGCCCGCTTCGCCGGCGAGCTGTTTCGCTACGACGAAAGCACACGGCGCTTGCCTT 1200
citri      TGTGCCCGCTTCGCCGGCGAGCTGTTTCGCTACGACGAAAGCACACGGCGCTTGCCTT 1200
*****

drome      CGTCCCGGAAGTGCCATCTATGAGTGCAATAGCCGCTGCTCGTGCGATTCAAGCTGCTCC 1260
citri      CGTCCCGGAAGTGCCATCTATGAGTGCAATAGCCGCTGCTCGTGCGATTCAAGCTGCTCC 1260
*****

drome      AACCCTCTGGTGCAGCACGGACGCCAGGTACCGTTGGTGTCTGTTTAAGACCGCCAACGGC 1320
citri      AACCCTCTGGTGCAGCACGGACGCCAGGTACCGTTGGTGTCTGTTTAAGACCGCCAACGGC 1320
*****

drome      AGCGGATGGGGGGTGCAGCGCAACTGCCTTGCCTAAGGGTGAATTTGTGTGCGAGTAC 1380
citri      AGCGGATGGGGGGTGCAGCGCAACTGCCTTGCCTAAGGGTGAATTTGTGTGCGAGTAC 1380
*****

drome      ATTGAGAGATCATCACCAGCGATGAGGCAAATGAGCGCGGCAAGGCGTATGACGACAAT 1440
citri      ATTGAGAGATCATCACCAGCGATGAGGCAAATGAGCGCGGCAAGGCGTATGACGACAAT 1440
*****

drome      GGGAGGACATATCTGTTTCGACTTGGATTACAACACAGCTCAGGATAGCGAGTACACTATC 1500
citri      GGGAGGACATATCTGTTTCGACTTGGATTACAACACAGCTCAGGATAGCGAGTACACTATC 1500
*****

drome      GATGCAGCTAACTATGGCAACATCTCGCACTTTATCAATCACTCTTGCGATCCTAATCTC 1560
citri      GATGCAGCTAACTATGGCAACATCTCGCACTTTATCAATCACTCTTGCGATCCTAATCTC 1560
*****

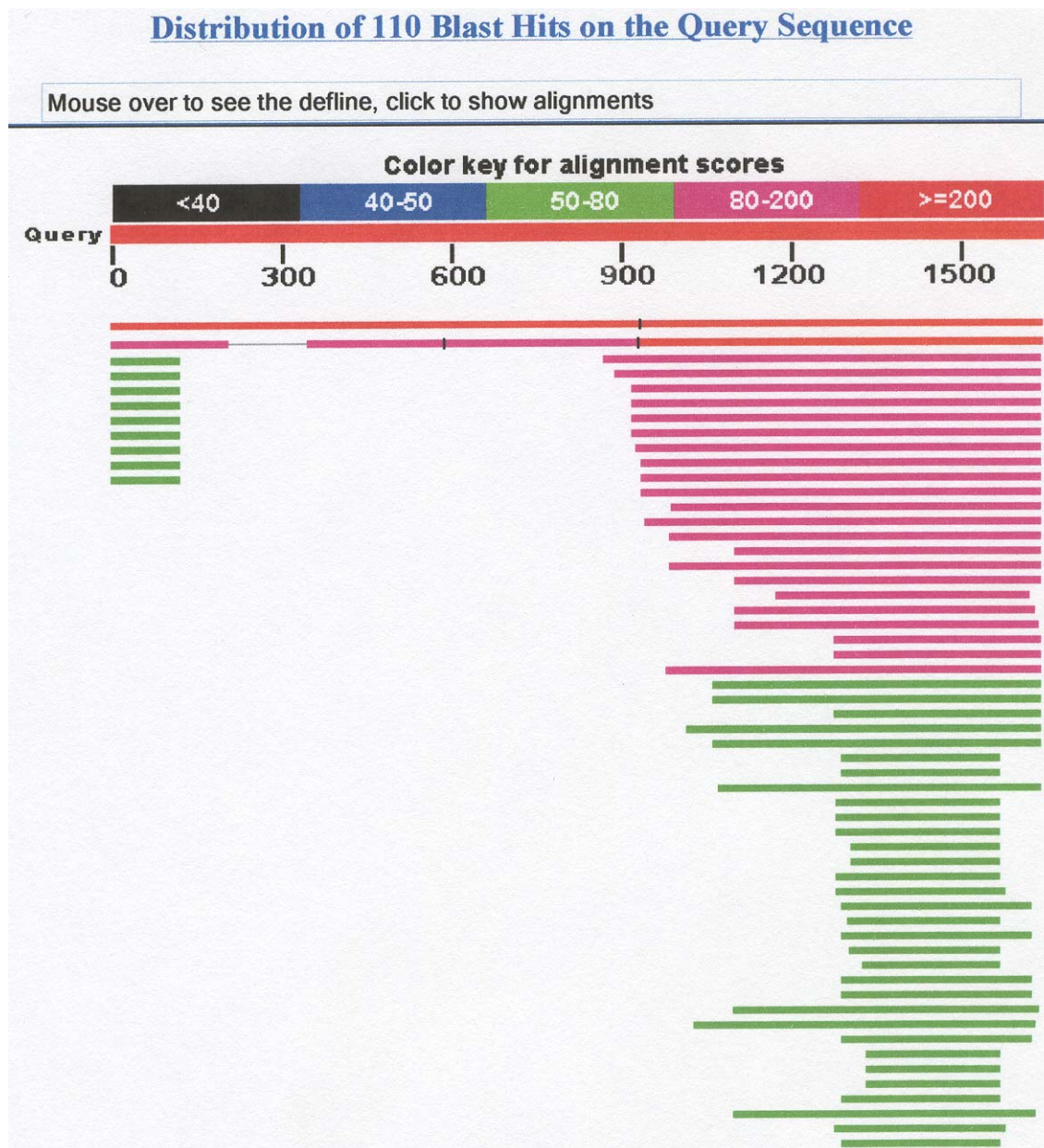
drome      GCCGTGTTCCCCTGTGGATCGAGCACCTGAATGTCGCGCTGCCGCACCTCGTGTCTTC 1620
citri      GCCGTGTTCCCCTGTGGATCGAGCACCTGAATGTCGCGCTGCCGCACCTCGTGTCTTC 1620
*****

drome      AACTGCGTCCAA 1633
citri      AACTGCGTCCAA 1633
*****

```

L'analisi BLASTx mi ha permesso di confrontare la traduzione in vitro del frammento ottenuto da *Planococcus citri* con il database SwissProt. La probabilità, espressa tramite il valore E, che la corrispondenza tra la proteina SU(VAR)3-9-like putativa e ciascuna sequenza emersa da questo confronto sia casuale, è significativamente molto bassa (**figura 6**).

Figura 6: Analisi BLASTx della sequenza SU(VAR)3-9-like



La sequenza SU(VAR)3-9-like di *Planococcus citri* presenta un livello d'identità quasi totale con la corrispondente regione di diversi ortologhi SU(VAR)3-9 e di altre K9H3 HMTasi.

Più precisamente SU(VAR)3-9-like di *Planococcus citri* mostra un'identità del 97% (98% di similarità) con la corrispondente proteina SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster* (**figura 7**); 42% di identità (60% di similarità) con i domini pre-SET e SET di Suv39h2 del topo e SUV39H2 umana; 44% di identità (59% di similarità) con i domini pre-SET e SET della proteina umana SUV39H1 e della Suv39h1 murina; mostra inoltre un buon livello di identità (39%) e 55% di similarità con i domini pre-SET e SET della proteina CLR4 di *Schizosaccharomyces pombe* ed infine ha un'identità del 35% (49% di similarità) con i domini pre-SET e SET della proteina DIM5 di *Neurospora crassa*.

Figura 7: Allineamento tra la sequenza amminoacidica dedotta del frammento clonato di *Planococcus citri* (“citri”, riga inferiore) e la proteina SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster* (“drome”, riga superiore).

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

```

drome      MATAEAQIGVNRNLQKQDLSNLDVSKLTPLSPEVISRQATINIGTIGHVAHGKSTVVKAI 60
citri      -----PVAHGKSTVVKAI 13
                        *****

drome      SGVQTVRFKNELEARNITIKLERLSEKKIKNLLTSKQQRQQYEIKQRSMLRHLAELRRHSR 120
citri      SGVQTVRFKNELEARNITIKLERLSEKKIKNLLTSKQQRQQYEIKQRSMLRHLVELRRHSR 73
                        *****

drome      FRRLCTKPASSMPASTSSVDRRTTRRSTSQTSLSPSNSSGYGSVFGCEEHDVDKIPSLN 180
citri      FRRLCTKPASSMPASTSSVDRRTTRRSTSQTSLSPSNSSGYGSVFGCEEHDVDKIPSLN 133
                        *****

drome      GFAKLKRRRSSCVGAPTPNSKRKNNMGVIAKRPPKGEYVVERIECVEMDQYQPVFFVKW 240
citri      GFAKLKRRRSSCVGAPTPNSKRKNNMGVIAKRPPKGDYVVERIECVEMDQYQPVFFVKW 193
                        *****

drome      LGYHDSSENTWESLANVADCAEMEFVERHQQLYETYIAKITTELEKQLEALPLMENITVA 300
citri      LGYHDSSENTWESLANVADCAEMEFVERHQQLYETYIAKITTELEKQLEALPLMENITVA 253
                        *****

drome      EVDAYEPLNLQIDLILLAQYRAAGSRSQREPQKIGERALKSMQIKRAQFVRRKQLADLAL 360
citri      EVDAYEPLNLQIDLILLAQYRAAGSRSQREPQKIGERALKSMQIKRAQFVRRKQLADLAL 313
                        *****

drome      FEKRMNHVEKPSPIRVENNIDLDTIDSNFMYIHDNIIGKDVPKPEAGIVGCKCTEDTEE 420
citri      FEKRMNHVEKPSPIRVGNIDLGHLDSNFMXIHDNLIGKDVPKPEAGIVGCKCTEDTEE 373
                        *****

drome      CTASTKCCARFAGELFAYERSTRRLRLRPGSAIYECNSRSCDSSCSNRLVQHGRQVPLV 480
citri      CTASTKCCARFAGELFAYERSTRRLRLRPGSAIYECNSRSCDSSCSNRLVQHGRQVPLV 433
                        *****

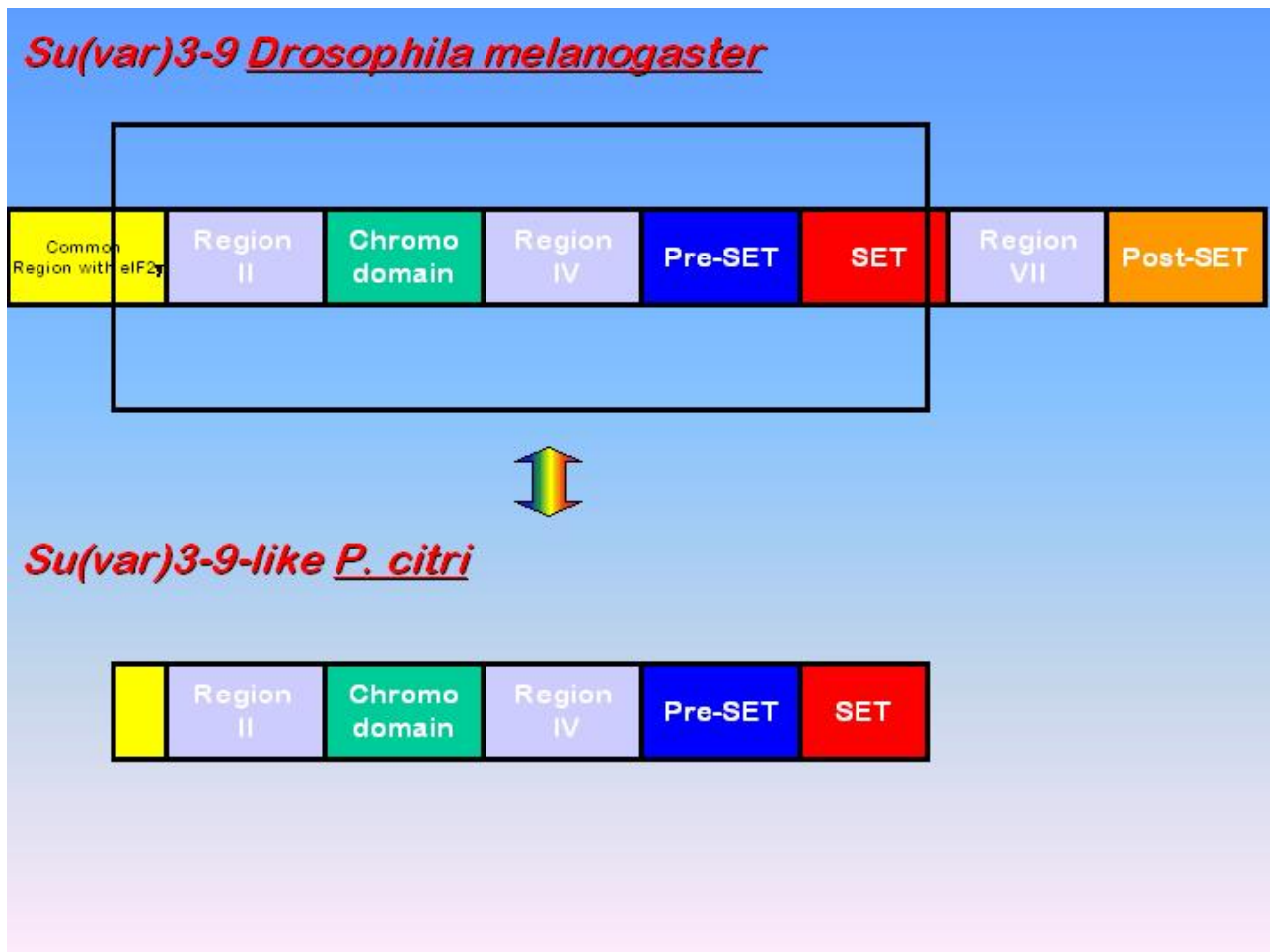
drome      LFKTANGSGWGVRAATALRKGEFVCEYIGEIIITSDEANERGKAYDDNGRTYLFDLDYNTA 540
citri      LFKTANGSGWGVQAATALRKGEFVCEYIGEIIITSDEANERGKAYDDNGRTYLFDLDYNTA 493
                        *****

drome      QDSEYTIDAANYGNISHFINHSCDPNLAVFPCWIEHLNVALPHLVFFTLRPIKAGEELS 600
citri      QDSEYTIDAANYGNISHFINHSCDPNLAVFPCWIEHLNVALPHLVFFTLRPX----- 545
                        *****

drome      DYIRADNEDVPYENLSTAVRVECRCGRDNCRKVL 635
citri      -----

```

Nello schema 1 è riportata, a livello esemplificativo e riassuntivo, la regione Su(var)3-9-like isolata in *Planococcus citri* e la regione corrispondente di SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster*.



Schema 1: Nel pannello superiore sono rappresentati i domini (non in scala) della proteina SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster*; nel pannello inferiore, la corrispondente regione SU(VAR)3-9-like isolata in *Planococcus citri*.

4.2 Il processo d'eterocromatizzazione facoltativa è regolato dalla proteina SU(VAR)3-9-like

4.2.1 Creazione di fenocopie *Su(var)3-9* knockout

Esperimenti d'interferenza mediata dall'RNA (RNAi) a doppio filamento (dsRNA) di *Su(var)3-9-like* hanno permesso di studiare un possibile ruolo della proteina SU(VAR)3-9-like nel processo d'eterocromatizzazione facoltativa, che caratterizza l'assetto cromosomico d'origine paterna nei maschi dei Coccidi. Lo scopo di questa strategia sperimentale è quello di creare fenocopie di mutanti *Su(var)3-9-like*, e quindi analizzare gli effetti provocati dall'assenza della proteina SU(VAR)3-9-like nel momento della formazione dell'eterocromatina facoltativa. Embrioni di *Planococcus citri*, a stadi di sviluppo embrionale differenti (dallo zigote alla gastrula), sono stati incubati per tempi variabili (4, 8 e 16 ore) con una soluzione contenente l'RNA a doppio filamento di *Su(var)3-9-like*. Esperimenti di controllo sono stati allestiti incubando parallelamente embrioni nella stessa soluzione di interferenza senza il doppio filamento. I vetrini ottenuti da preparati citologici di embrioni trattati e di controllo, sono stati immunocolorati con l'anticorpo monoclonale

anti-HP1 (C1A9) di *Drosophila melanogaster*, con l'anticorpo contro la forma trimetilata della K9H3 (K9H3m3), con l'anticorpo contro la forma dimetilata della K9H3 (K9H3m2) e con l'anticorpo contro la forma trimetilata della K20H4 (K20H4m3). I dati qui di seguito mostrati, fanno riferimento al trattamento con il dsRNA per 16h.

In **figura 8** sono messi a confronto i nuclei di un embrione maschile di controllo (pannello A), con nuclei di embrioni maschili trattati con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* (pannelli B, C, D). Nei nuclei interfaseici di embrioni di controllo l'assetto cromosomico aploide eterocromatico forma una struttura ben definita e brillante, chiamata cromocentro, che si evidenzia colorando la cromatina con il DAPI (**fig. 8A**). Nella **figura 8A** in basso a destra, si nota anche un nucleo prometafasico, in cui, nonostante anche i cromosomi di origine materna abbiano ormai raggiunto un elevato grado di condensazione, tuttavia è ancora possibile distinguerli da quelli eterocromatici paterni. L'immunocolorazione con l'anticorpo contro la K9H3m3 (**fig. 8A'**, in rosso) evidenzia nei nuclei interfaseici una massa fluorescente che si localizza sul cromocentro, mentre nell'eucromatina il segnale è diffuso. Lo stesso pattern si evidenzia anche per l'anticorpo contro HP1 (**fig. 8A''**, in verde). Nel nucleo prometafasico sia il segnale della K9H3m3 (**fig. 8A'**) che di HP1 (**fig. 8A''**) mostrano sempre una distribuzione preferenziale sui cromosomi eterocromatici. Nella **figura 8A'''** è invece mostrata la sovrapposizione della colorazione in DAPI con i segnali dei due anticorpi (cromatina colorata in blu, il segnale di K9H3m3 in rosso ed il segnale di HP1 in verde); la sovrapposizione mette in evidenza come entrambi gli anticorpi colocalizzano sul cromocentro. I pannelli **B**, **C** e **D** mostrano immagini di nuclei maschili trattati per l'RNAi con il dsRNA corrispondente al gene *Su(var)3-9-like*. È evidente che il trattamento provoca la disorganizzazione della cromatina. Il cromocentro appare disassemblato e non più facilmente riconoscibile, se non perché si possono individuare probabili elementi residui (**8D**, frecce). Inoltre, nei trattati il segnale della K9H3m3 appare meno intenso e non più limitato al cromocentro (**8B'**, **C'**, **D'**). Si può anche notare che il segnale della proteina HP1 è quasi assente (**8B''**, **C''**, **D''**). L'immagine sovrapposta (**8B'''**, **C'''** e **D'''**) mostra chiaramente la dispersione dei segnali dei due anticorpi, che non marcano più preferenzialmente la cromatina. In **8C** sono evidenti difetti cromosomici indotti dal trattamento con il dsRNA, come possibili frammentazioni cromosomiche (frecce), non presenti nei controlli.

La **figura 9** mette in confronto nuclei femminili di controllo (pannello A), con nuclei provenienti dal trattamento con la tecnica dell'RNAi (pannelli B e C). Come atteso, i nuclei di femmine selvatiche sono completamente eucromatici e non possiedono cromocentri. Il segnale della K9H3m3 è diffuso su tutta la cromatina (**fig. 9A'**, in rosso), mentre il segnale dell'anticorpo contro HP1 mostra un pattern a spot rispetto al segnale K9H3 ma non mostra aggregazioni estese (**fig.**

9A'', in verde). La sovrapposizione delle tre immagini mette in evidenza la natura più diffusa del segnale dell'anticorpo di K9H3m3 rispetto a quello di HP1 sul nucleo, anche se i due segnali colocalizzano in determinate regioni (**fig. 9A'''**, cromatina colorata in blu, K9H3m3 in rosso ed HP1 in verde). Nei pannelli **B** e **C** sono mostrati nuclei femminili interfasicci, provenienti da embrioni interferiti con l'RNA a doppio filamento di *Su(var)3-9-like*. Sono evidenti i difetti a carico della condensazione della cromatina che risulta più decondensata e meno organizzata rispetto ai nuclei di controllo. Il segnale della K9H3m3 è del tutto assente in alcuni nuclei, mentre persiste in altri (**B'** e **C'**), dove rimane sempre diffuso, anche se fortemente diminuito. Il segnale di HP1, invece è completamente assente (**B''** e **C''**).

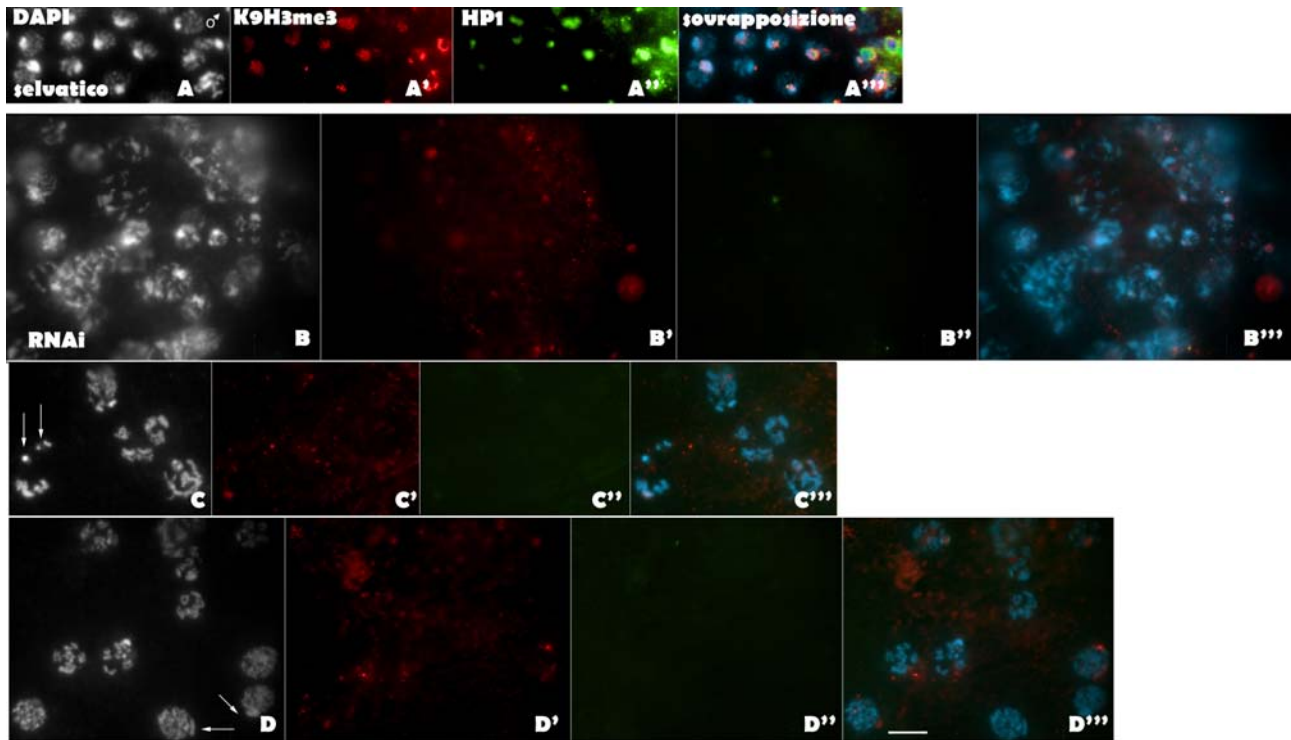


Figura 8: Effetto del trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* sul pattern della K9H3 trimetilata e di HP1 in nuclei maschili. Il pannello superiore mostra nuclei di embrione maschile di controllo ottenuti con la stessa soluzione di interferenza, priva però del dsRNA. I pannelli **B**, **C** e **D** presentano nuclei dopo il trattamento dell'RNAi. **A**, **B**, **C**, **D**: immagine colorata in DAPI per evidenziare la cromatina. **A'**, **B'**, **C'**, **D'**: localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3). **A''**, **B''**, **C''**, **D''**: localizzazione del segnale della proteina HP1. **A'''**, **B'''**, **C'''**, **D'''**: sovrapposizione delle immagini dei segnali degli anticorpi e della cromatina. La cromatina è stata pseudocolorata in blu, il segnale della K9H3m3 in rosso ed il segnale della HP1 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10µm.

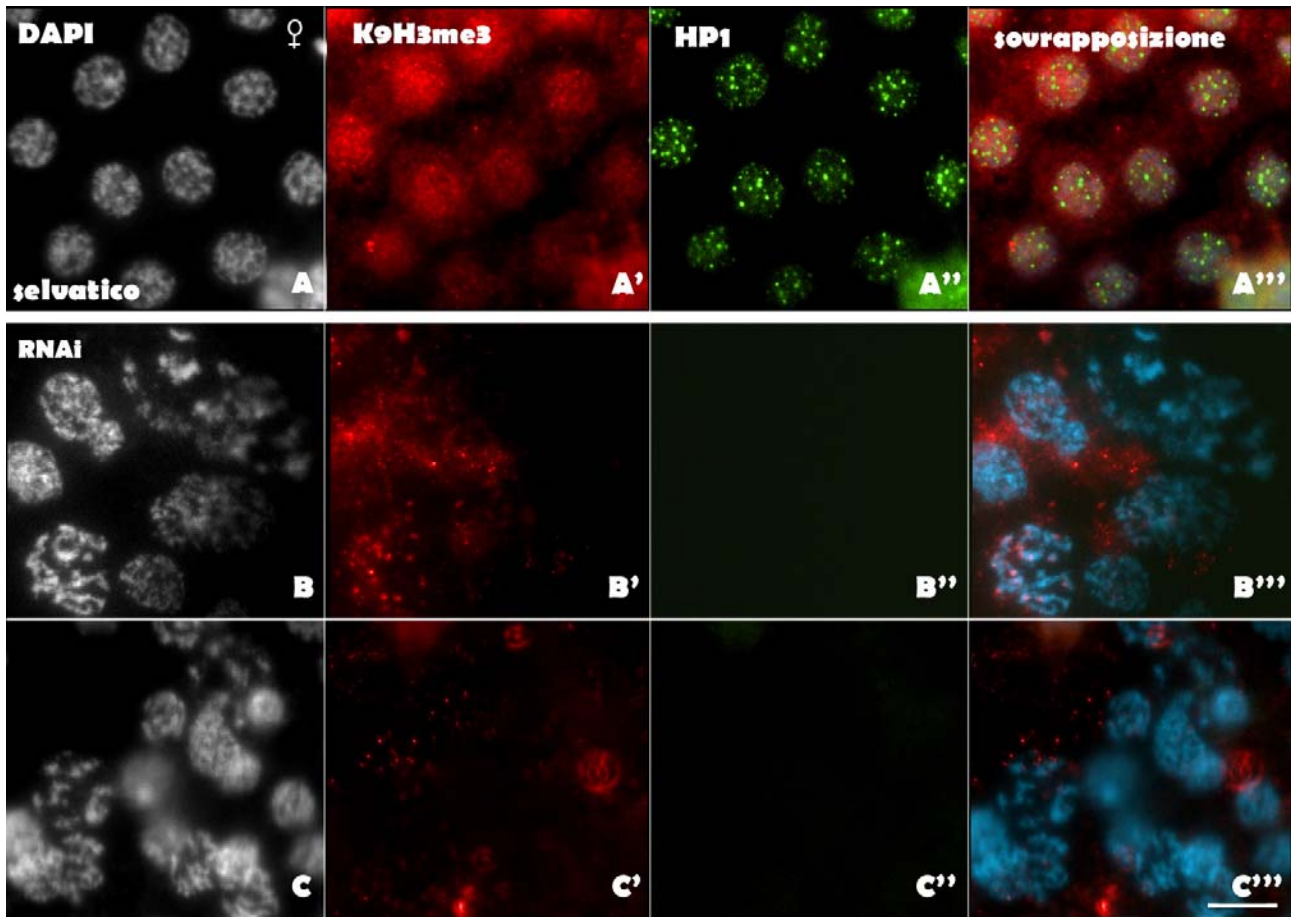


Figura 9: Effetto del trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* sul pattern della K9H3 trimetilata e di HP1 in nuclei femminili. Nel pannello superiore **A** sono mostrati nuclei di embrione femminile provenienti dagli esperimenti di controllo. I pannelli **B** e **C** mostrano i nuclei interferiti. **A, B, C**: colorazione in DAPI della cromatina. **A', B', C'**: localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3) in nuclei femminili. **A'', B'', C''**: localizzazione del segnale del anticorpo contro la proteina HP1. **A''', B''', C'''**: immagine sovrapposta delle tre precedenti. La cromatina è pseudocolorata in blu, il segnale anti-K9H3m3 in rosso ed il segnale anti-HP1 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10µm.

I preparati trattati con l'RNAi presentavano anche altre anomalie nei loro nuclei, tra cui le dislocazioni di cromosomi dalla piastra metafasica. La **figura 10** mostra questi difetti. Nel **pannello A** sono mostrati dei nuclei di un embrione maschile, dove si nota una piastra metafasica, in cui è evidente un cromosoma non allineato (freccia) fenomeno che ricorre molto spesso tra i trattati. La stessa situazione si ritrova nei **pannelli B e C** della **figura 10**.

Nella **figura 11** invece viene mostrato un altro tipo di anomalia riscontrata nei trattati. Essa mette in evidenza delle figure interpretabili come fusioni telomeriche che subiscono i cromosomi d'embrioni trattati. Si può notare la fusione di due o tre cromosomi a formare una struttura ad anello (testa di freccia).

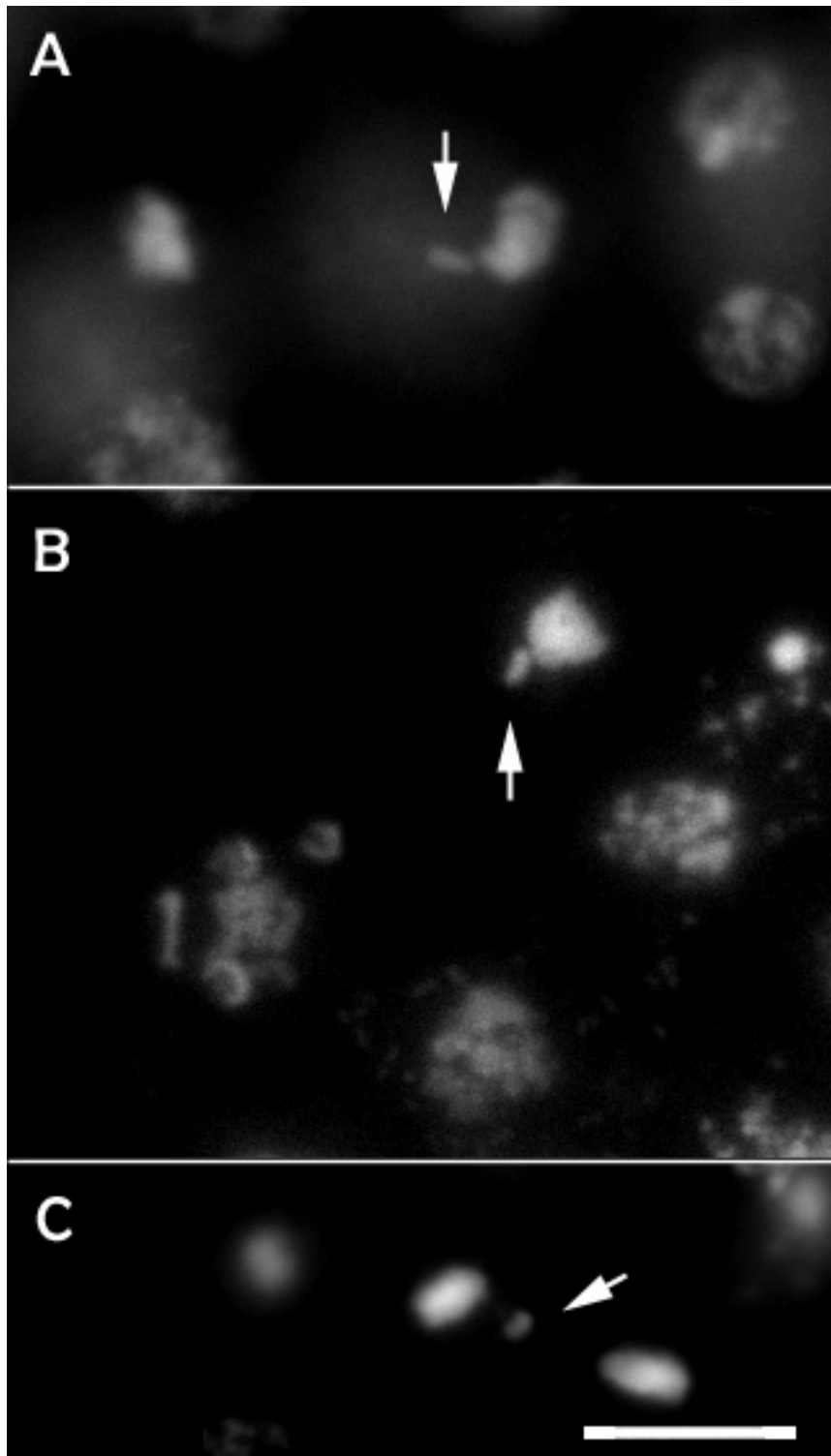


Figura 10: Dislocazioni cromosomiche provocate dal trattamento dell'RNAi con il dsRNA di *Su(var)3-9-like*. A, B, C: sono mostrate piastre metafasiche che presentano dislocazioni cromosomiche indicate dalle frecce (1000x). La cromatina è colorata in DAPI. La barra corrisponde a 10µm.

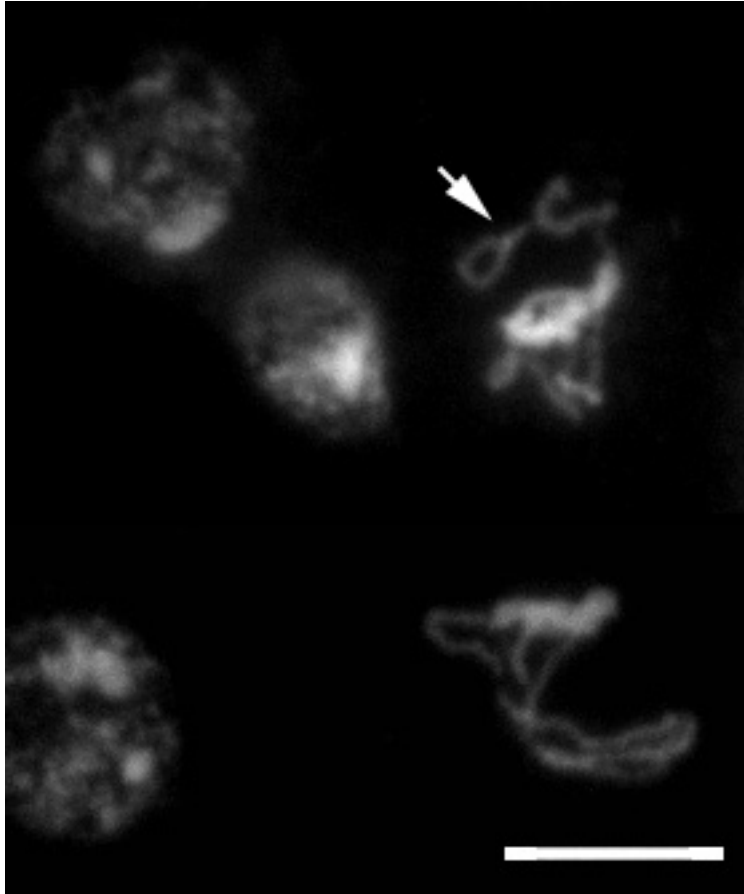


Figura 11: Fusioni telomeriche provocate dal trattamento di embrioni con dsRNA di *Su(var)3-9-like*. Possibili fusioni telomeriche in nuclei trattati. Si nota la struttura ad anello nel nucleo in alto a destra e “l’ammassamento” dei cromosomi a strutture poco definite (1000x). La cromatina è colorata in DAPI. La barra corrisponde a 10µm.

La **figura 12** mostra un confronto del pattern di immunocolorazione della K9H3m2 sui nuclei di un embrione maschile di controllo (pannello A) e sui nuclei di un embrione maschile trattato (pannello B).

Nei nuclei di controllo, il segnale della K9H3m2 (**fig. 12A'**) è localizzato al cromocentro, con dei piccoli spot di segnale eucromatico; nei nuclei trattati (**fig. 12B'**), invece, il segnale risulta fortemente decrementato e delocalizzato dal nucleo al citoplasma, come appare ben evidente dall'analisi dell'immagine sovrapposta (**fig. 12B'''**).

Come controllo abbiamo riportato il pattern di immunocolorazione della K9H3m3, sui nuclei di controllo (**fig. 12A''**) e sui nuclei trattati (**fig. 12B''**), già descritto precedentemente.

La **figura 13** mette a confronto il pattern di immunocolorazione della K9H3m2 sui nuclei femminili di controllo (pannello A) e sui nuclei femminili trattati (pannello B).

Sui nuclei di controllo, il segnale di questa modificazione istonica è localizzato in maniera diffusa su tutto il nucleo (**fig. 13A'**); sui nuclei trattati, invece, la K9H3m2 (**fig. 13B'**) è quasi completamente assente.

Le immagini dell'immunocolorazione della K9H3m3 (**fig. 13A''** e **13B''**) sono state inserite come controllo.

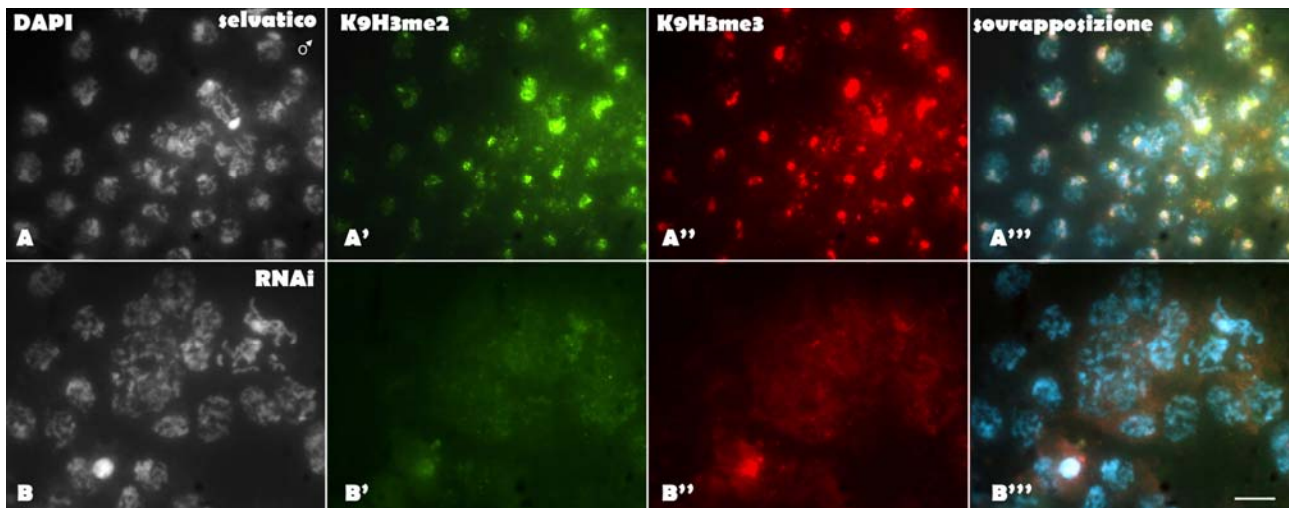


Figura 12: Effetto del trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* sul pattern della K9H3 dimetilata in nuclei maschili. Il pannello superiore mostra nuclei di embrione maschile di controllo ottenuti con la stessa soluzione di interferenza, priva però del dsRNA. Il pannello **B** presenta nuclei dopo il trattamento dell'RNAi. **A, B**: immagine colorata in DAPI per evidenziare la cromatina. **A'', B''**: localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3). **A', B'**: localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 dimetilata (K9H3m2). **A''', B'''**: sovrapposizione delle immagini dei segnali degli anticorpi e della cromatina. La cromatina è stata pseudocolorata in blu, il segnale della K9H3m3 in rosso ed il segnale della K9H3m2 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10µm.

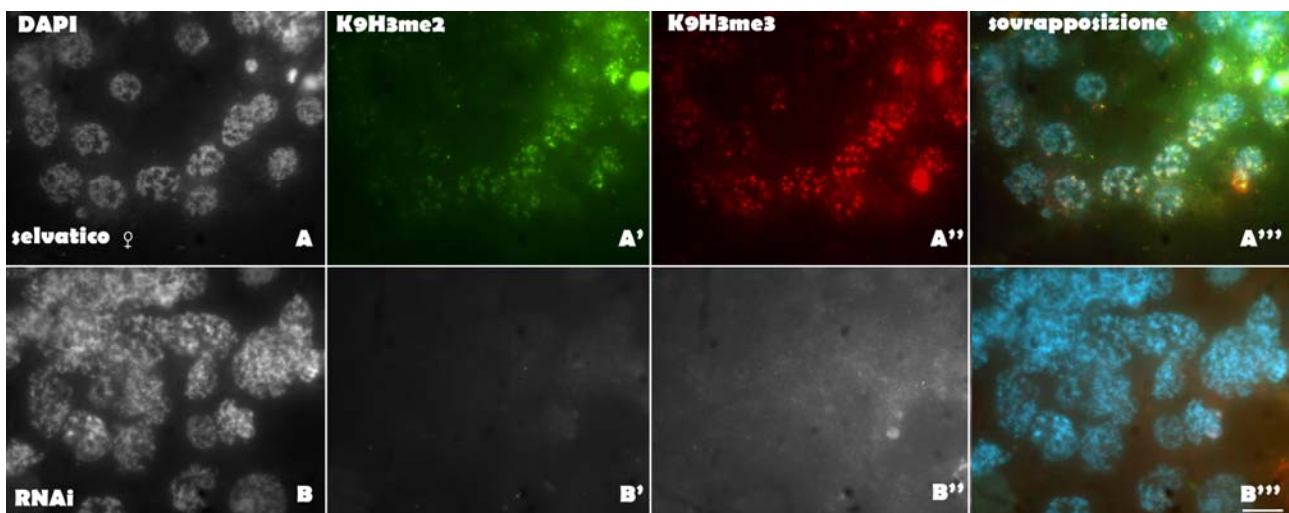


Figura 13: Effetto del trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* sul pattern della K9H3 dimetilata in nuclei femminili. Nel pannello superiore **A** sono mostrati nuclei di embrione femminile provenienti dagli esperimenti di controllo. Il pannello **B** mostra i nuclei interferiti. **A, B**: colorazione in DAPI della cromatina. **A'', B''**: localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3) in nuclei femminili. **A', B'**: localizzazione del segnale dell'anticorpo contro la lisina 9 dell'istone H3 dimetilata (K9H3m2). **A''', B'''**: immagine sovrapposta delle tre precedenti. La cromatina è pseudocolorata in blu, il segnale anti-K9H3m3 in rosso ed il segnale anti-K9H3m2 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10µm.

In **figura 14** viene effettuato un confronto dell'immunocolorazione della K20H4m3 sui nuclei di un embrione maschile di controllo (pannello A) e sui nuclei di embrioni maschili trattati (pannelli B, C, D).

Sui nuclei di controllo il segnale della K20H4m3 è prevalentemente localizzato al cromocentro, mostrando però anche degli spot di segnale eucromatico (**fig. 14A'**). Sui nuclei trattati (**fig. 14B'**, **14C'** e **14D'**) il segnale è quasi completamente assente, e, quando presente, è diffuso dal nucleo al citoplasma, come ben visibile dalle immagini della sovrapposizione (**fig. 14B''** e **14C''**).

La **figura 15** mostra un confronto dell'immunocolorazione della K20H4m3 su nuclei femminili di controllo (pannello A) e su nuclei femminili trattati (pannello B).

Sui nuclei di controllo, la K20H4m3 è localizzata in maniera diffusa su tutto il nucleo (**fig. 15A'**); sui nuclei trattati, invece, il segnale è presente in quantità decrementata e diffuso dal nucleo al citoplasma (**fig. 15B'**), come ben evidenziato dall'immagine sovrapposta (**fig. 15B''**).

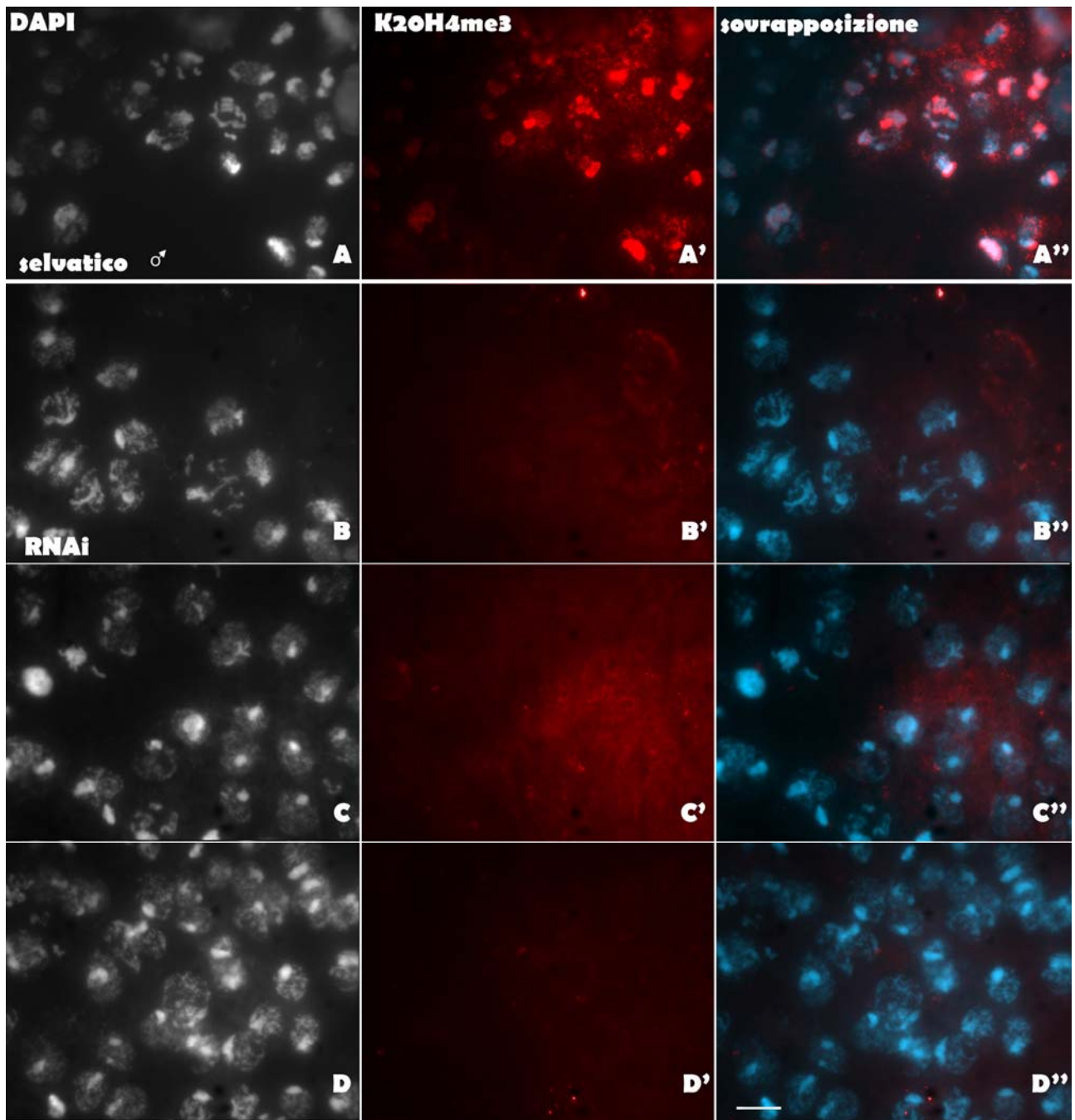


Figura 14: Effetto del trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* sul pattern della K20H4 trimetilata in nuclei maschili. Il pannello superiore mostra nuclei di embrione maschile di controllo ottenuti con la stessa soluzione di interferenza, priva però del dsRNA. I pannelli **B**, **C** e **D** presentano nuclei dopo il trattamento dell'RNAi. **A**, **B**, **C**, **D**: Immagine colorata in DAPI per evidenziare la cromatina. **A'**, **B'**, **C'**, **D'**: localizzazione del segnale della lisina 20 dell'istone H4 trimetilata (K20H4m3). **A''**, **B''**, **C''**, **D''**: sovrapposizione delle immagini dei segnali dell'anticorpo e della cromatina. La cromatina è stata pseudocolorata in blu e il segnale della K20H4m3 in rosso. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10µm.

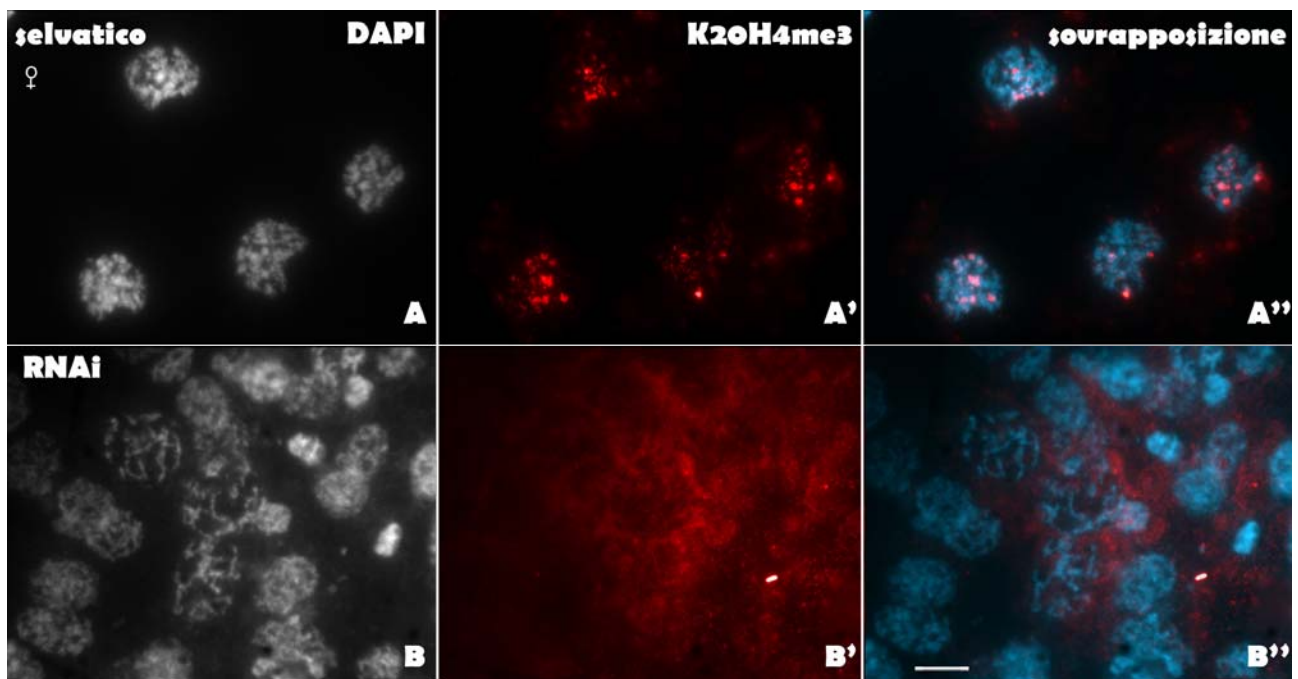


Figura 15: Effetto del trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* sul pattern della K20H4 trimetilata in nuclei femminili . Nel pannello superiore **A** sono mostrati nuclei di embrione femminile provenienti dagli esperimenti di controllo. Il pannello **B** mostra i nuclei interferiti. **A, B:** colorazione in DAPI della cromatina. **A', B':** localizzazione del segnale della lisina 20 dell'istone H4 trimetilata (K20H4m3) in nuclei femminili. **A'', B'':** immagine sovrapposta delle tre precedenti. La cromatina è pseudocolorata in blu e il segnale anti-K20H4m3 in rosso. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10µm.

Per verificare la significatività dei dati citologici ho usato il test del χ^2 . In particolare ho voluto verificare se la percentuale di nuclei mitotici con difetti cromatinici osservata nei trattati fosse significativa, o dovuta, per esempio, alla permanenza degli embrioni nella soluzione di interferenza.

Nella **tabella 1** sono confrontati i nuclei mitotici alterati e i nuclei mitotici normali osservati sia nei trattati sia nei controlli, ottenuti incubando gli embrioni con la stessa soluzione di interferenza, priva però del dsRNA (soluzione *mock*). Dall'analisi statistica si evince che la percentuale di nuclei mitotici con difetti cromatinici nei trattati rispetto ai mock è statisticamente significativa ($P=0,0000$).

Tabella 1: Analisi statistica della significatività delle alterazioni cromatiniche. La maggiore percentuale di nuclei mitotici alterati osservata nei trattati è dovuta al trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like*.

	Controllo	Trattato
Profasi-prometafasi alterate	9 (16%)	145 (65%)
Profasi-prometafasi normali	47 (84%)	79 (35%)

P = 0,0000

Successivamente, ho voluto verificare se ci fosse una differenza tra i due sessi, per quanto concerne la percentuale di nuclei mitotici alterati presente nei trattati. In **tabella 2** sono messi a confronto i nuclei mitotici alterati e i nuclei mitotici normali analizzati nei maschi e nelle femmine interferiti. Dall'analisi statistica si evince che la maggior percentuale di nuclei mitotici alterati nei maschi rispetto alle femmine è al limite della soglia di significatività.

Tabella 2: Analisi statistica della significatività delle alterazioni cromatiniche tra i due sessi.

	Maschi	Femmine
Profasi-prometafasi alterate	65 (72%)	80 (60%)
Profasi-prometafasi normali	25 (28%)	54 (40%)

P = 0,0545

Anche per le dislocazioni dalle piastre metafasiche è stata eseguita l'analisi statistica.

La **tabella 3** mostra come l'analisi statistica eseguita tramite il test del χ^2 mi ha permesso di valutare che le dislocazioni osservate nel corso degli esperimenti con l'RNAi sono significativamente superiori ai controlli ($P = 0,0000$).

Tabella 3: Analisi statistica della significatività dei risultati osservati per quanto riguarda le dislocazioni metafasiche. Sono confrontate le metafasi presentanti dislocazioni e non, all'interno dei preparati trattati con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* e dei controlli.

	Controllo	Trattato
Metafasi con dislocazioni	34 (6%)	382 (39%)
Metafasi senza dislocazioni	504 (94%)	596 (61%)

P = 0,0000

Successivamente, ho voluto verificare se ci fosse una differenza tra i due sessi, per quanto concerne la percentuale di nuclei metafasici con dislocazioni presente nei trattati. In **tabella 4** sono messi a confronto i nuclei metafasici con dislocazioni e i nuclei metafasici che ne sono privi, analizzati nei maschi e nelle femmine interferiti. Dall'analisi statistica si evince che la percentuale di nuclei metafasici con dislocazioni presente nei maschi è significativamente superiore a quella riscontrata nelle femmine ($P = 0,0000$).

Tabella 4: Analisi statistica della significatività delle differenze nel numero di dislocazioni metafasiche osservate nei due sessi. I nuclei metafasici maschili, risultano più sensibili al trattamento con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* di quelli femminili.

	Maschi	Femmine
Metafasi con dislocazioni	159 (46%)	223 (35%)
Metafasi senza dislocazioni	189 (54%)	407 (65%)

P = 0,0015

Come si è già detto, i dati riportati fino ad ora si riferiscono a tempi di incubazione degli embrioni pari a 16h. I trattamenti effettuati a 4h e a 8h, forniscono gli stessi risultati, tranne un particolare caso. In tabella 5 sono messi a confronto i nuclei metafasici con dislocazioni e i nuclei metafasici che ne sono privi, analizzati nei maschi e nelle femmine interferiti in seguito a 8h di trattamento. Dall'analisi statistica si evince che, contrariamente a quanto osservato per il trattamento a 16h, la percentuale di nuclei metafasici con dislocazioni presente nei maschi non è significativamente superiore a quella riscontrata nelle femmine.

Tabella 5: Analisi statistica della significatività dei risultati osservati per quanto riguarda le dislocazioni metafasiche tra i due sessi.

	Maschi	Femmine
Metafasi con dislocazioni	52 (29%)	31 (25%)
Metafasi senza dislocazioni	125 (71%)	91 (75%)

P = 0,4513

Concludiamo con la tabella (**tabella 6**) che mette in evidenza le differenze di sopravvivenza tra gli embrioni dei due sessi in seguito al trattamento per l'RNAi. Dato che non c'è la possibilità di

“contare” gli embrioni morti, le differenze di sopravvivenza possono essere inferite dal confronto della proporzione fra maschi e femmine, negli stessi stadi embrionali, in preparati trattati e nei controlli. I dati in **tabella 6** derivano dal confronto tra il numero di embrioni maschili e femminili osservati in due stadi di sviluppo embrionale (stadi di blastula e gastrula), che sono facilmente riconoscibili e in cui è già avvenuta la formazione dell’eterocromatina facoltativa (elemento che permette di discriminare quasi sempre, anche quando la cromatina è danneggiata, il sesso dell’embrione). L’analisi statistica è stata eseguita tramite il test del χ^2 .

Dalla **tabella 6** si può notare che a 16h di trattamento non si osservano differenze significative di letalità fra i due sessi.

Tabella 6: Confronto della vitalità (vedi testo) degli embrioni dei due sessi in preparati sottoposti al trattamento per l’RNAi e nei controlli.

	Controllo	Trattato
Maschi	89 (47%)	89 (52%)
Femmine	101 (53%)	83 (48%)

P = 0,3515

4.2.2 Inibizione dell’attività dell’enzima SU(VAR)3-9

Un altro metodo, oltre all’RNAi, per studiare un possibile ruolo della proteina SU(VAR)3-9-like nel processo d’eterocromatizzazione facoltativa, è l’uso della chaetocina. La chaetocina è un metabolita fungino, con attività antimicrobica e citostatica, che inibisce in modo specifico la metiltransferasi istonica SU(VAR)3-9 (IC_{50} = 0.6 μ M) di *Drosophila melanogaster* e del suo ortologo umano (IC_{50} = 08 μ M) (Greiner *et al.*, 2005).

Embrioni di *Planococcus citri*, a stadi di sviluppo embrionale differenti (dallo zigote alla gastrula), sono stati incubati per tempi variabili (4 e 16 ore) con una soluzione contenente la chaetocina a concentrazioni di 50 e 100 μ M. Esperimenti di controllo sono stati allestiti incubando parallelamente embrioni nella stessa soluzione priva del metabolita. I vetrini ottenuti da preparati citologici di embrioni trattati e di controllo, sono stati immunocolorati con l’anticorpo contro la forma trimetilata della K9H3 (K9H3m3), con l’anticorpo monoclonale anti-HP1 (C1A9) di *Drosophila melanogaster*, con l’anticorpo contro la forma dimetilata della K9H3 (K9H3m2) e con l’anticorpo contro la forma trimetilata della K20H4 (K20H4m3). I dati qui di seguito mostrati, fanno riferimento al trattamento con chaetocina 100 μ M per 16h.

La **figura 16** mostra nuclei di un embrione maschile di controllo (pannello A) e nuclei di embrioni maschili trattati con la chaetocina 100 μ M (pannelli B e C). Sono messe a confronto le immunocolorazioni con l’anticorpo anti-K9H3m3 e con l’anti-HP1. Abbiamo già ampiamente

descritto nelle precedenti immagini il pattern di localizzazione della K9H3m3 e di HP1 sui nuclei di controllo. Sui nuclei trattati, invece, sia l'anti-K9H3m3 (**fig. 16B'' e 16C''**), sia l'anti-HP1 (**fig. 16B' e 16C'**), appaiono fortemente diminuiti e diffusi dal nucleo al citoplasma, come risulta evidente dall'analisi dell'immagine sovrapposta (**fig. 16B''' e 16C'''**).

L'analisi dei nuclei trattati evidenzia anche dei danni a carico dell'organizzazione della cromatina. Il cromocentro appare disassemblato e non più facilmente riconoscibile; è possibile individuare il sesso dell'embrione solo mediante alcuni nuclei sui quali esso è ancora distinguibile.

La **figura 17** mostra dei nuclei femminili di controllo (pannello A) e dei nuclei provenienti dal trattamento con la chaetocina 100µM (pannelli B e C).

Sono messe a confronto le immunocolorazioni con l'anticorpo anti-K9H3m3 e con l'anti-HP1. Abbiamo già ampiamente descritto nelle precedenti immagini il pattern di localizzazione della K9H3m3 e di HP1 sui nuclei di controllo.

Sui nuclei trattati, invece, i segnali della K9H3m3 e di HP1 sono quasi completamente assenti o fortemente decrementati (**fig. 17B'', 17C'', 17B' e 17C'**).

Sono inoltre evidenti dei difetti a carico della condensazione della cromatina che risulta più decondensata e meno organizzata rispetto ai nuclei di controllo.

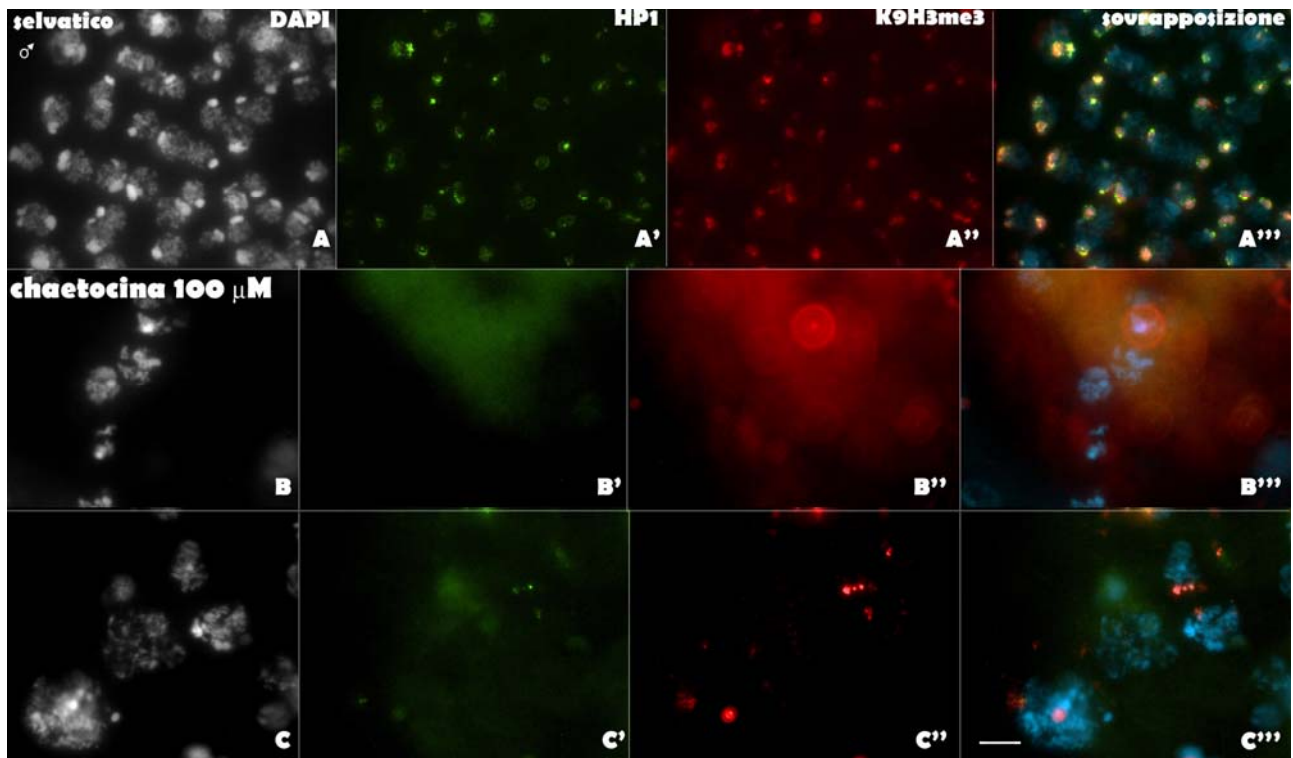


Figura 16: Effetto della chaetocina sul pattern della K9H3 trimetilata e di HP1 in nuclei maschili. Il pannello superiore mostra nuclei di embrione maschile di controllo ottenuti con la stessa soluzione del trattamento, priva però della chaetocina. I pannelli **B** e **C** presentano nuclei dopo il trattamento con la chaetocina. **A, B, e C:** immagine colorata in DAPI per evidenziare la cromatina. **A'', B'', C'':** localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3). **A', B', C':** localizzazione del segnale della proteina HP1. **A''', B''', C''':** sovrapposizione delle immagini dei segnali degli anticorpi e della cromatina. La cromatina è stata pseudocolorata in blu, il segnale della K9H3m3 in rosso ed il segnale della HP1 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10μm.

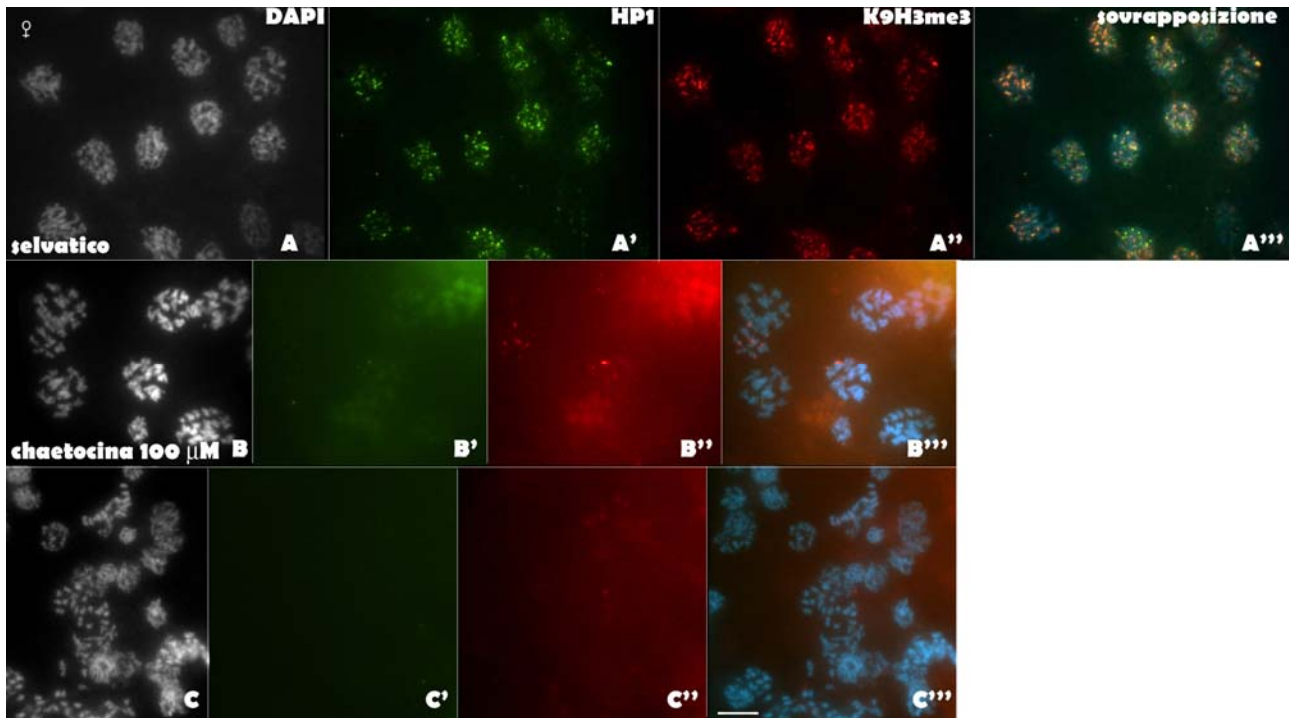


Figura 17: Effetto della chaetocina sul pattern della K9H3 trimetilata e di HP1 in nuclei femminili. Nel pannello superiore **A** sono mostrati nuclei di embrione femminile provenienti dagli esperimenti di controllo. I pannelli **B** e **C** mostrano i nuclei trattati. **A, B, C**: colorazione in DAPI della cromatina. **A'', B'', C''**: localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3) in nuclei femminili. **A', B', C'**: localizzazione del segnale dell'anticorpo contro la proteina HP1. **A''', B''', C'''**: immagine sovrapposta delle tre precedenti. La cromatina è pseudocolorata in blu, il segnale anti-K9H3m3 in rosso ed il segnale anti-HP1 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10μm.

I preparati trattati con la chaetocina 100 μ M presentavano anche altre anomalie nei loro nuclei, tra cui le dislocazioni di cromosomi dalla piastra metafasica. La **figura 18** mostra questi difetti. In basso a sinistra si nota una piastra metafasica, in cui è evidente un cromosoma non allineato sulla piastra, fenomeno che ricorre molto spesso tra i trattati. In alto a destra si notano un cromosoma, e sopra di esso altri tre, che non sono allineati ai sei sottostanti in piastra.

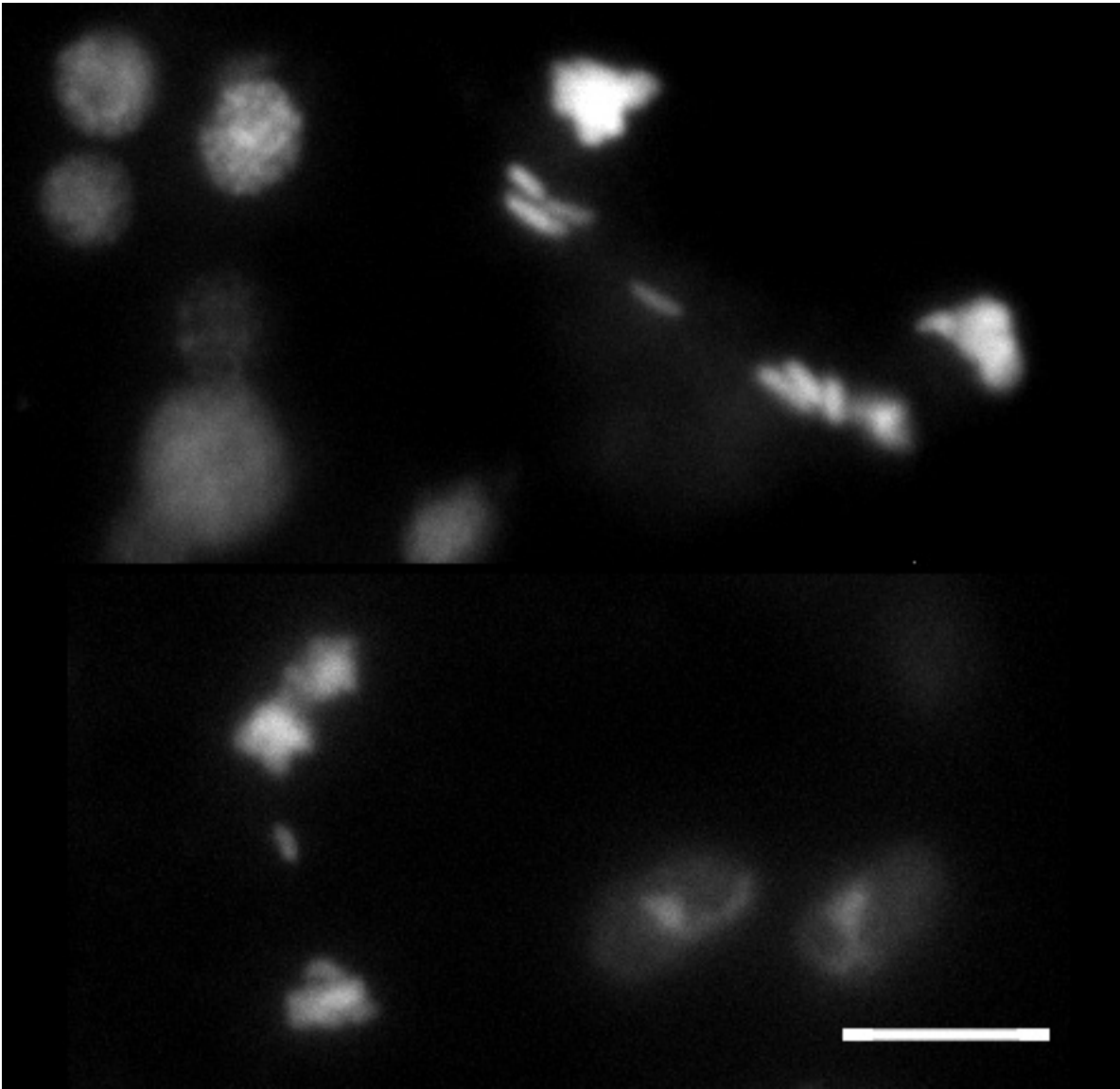


Figura 18: Dislocazioni cromosomiche provocate dal trattamento con la chaetocina. Sono mostrate piastre metafasiche che presentano dislocazioni cromosomiche (1000x). La cromatina è colorata in DAPI. La barra corrisponde a 10µm.

In **figura 19** viene effettuato un confronto dell'immunocolorazione della K9H3m2 su nuclei maschili di controllo (pannello A) e su nuclei maschili trattati (pannello B).

Abbiamo già avuto modo, analizzando le precedenti immagini, di descrivere il pattern di localizzazione della K9H3m2 sui nuclei di controllo.

Sui nuclei trattati, il segnale della K9H3m2 è completamente assente (**fig. 19B'**), così come il segnale della K9H3m3 (**fig. 19B''**), riportato come controllo, e già descritto anche nella precedente immagine.

Nella **figura 20** viene effettuato un confronto dell'immunocolorazione della K9H3m2 su nuclei femminili di controllo (pannello A) e su nuclei femminili trattati (pannello B).

Il pattern di localizzazione della K9H3m2 sui nuclei di controllo è già stato descritto nelle precedenti immagini; sui nuclei trattati, è invece quasi completamente assente (**fig. 20B'**). Il segnale della K9H3m3 è stato riportato come controllo, e, come abbiamo già potuto evidenziare nelle precedenti immagini, è anch'esso fortemente diminuito (**fig. 20B''**) e diffuso dal nucleo al citoplasma (**fig. 20B'''**, sovrapposizione).

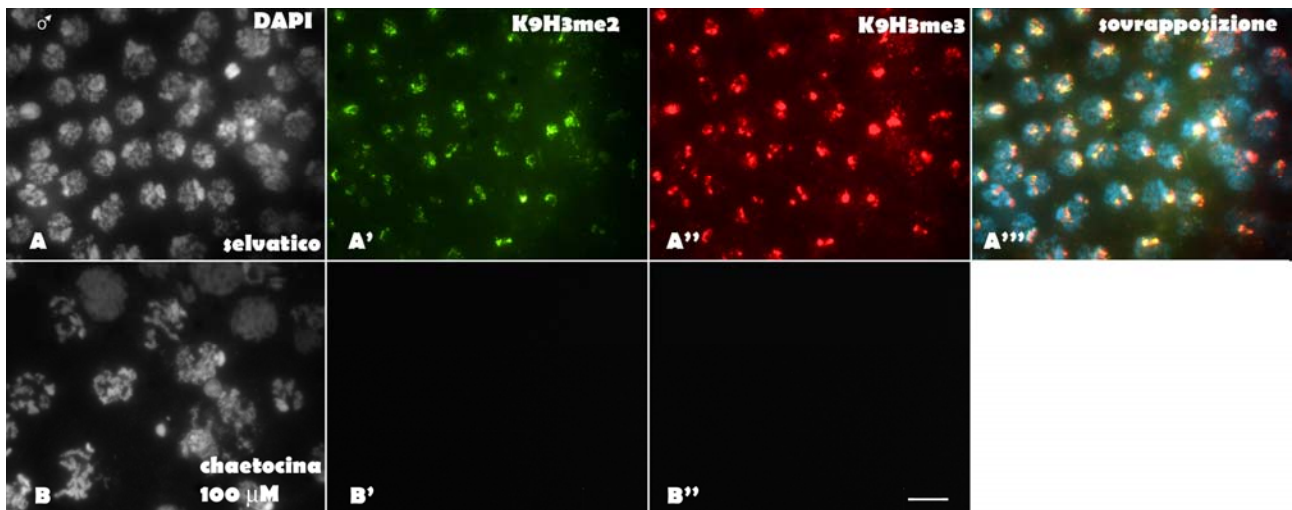


Figura 19: Effetto della chaetocina sul pattern della K9H3 dimetilata in nuclei maschili. Il pannello superiore mostra nuclei di embrione maschile di controllo ottenuti con la stessa soluzione del trattamento, priva però della chaetocina. Il pannello **B** presenta nuclei dopo il trattamento con la chaetocina. **A, B:** Immagine colorata in DAPI per evidenziare la cromatina. **A'', B'':** localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3). **A', B':** localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 dimetilata (K9H3m2). **A''', B''':** sovrapposizione delle immagini dei segnali degli anticorpi e della cromatina. La cromatina è stata pseudocolorata in blu, il segnale della K9H3m3 in rosso ed il segnale della K9H3m2 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10μm.

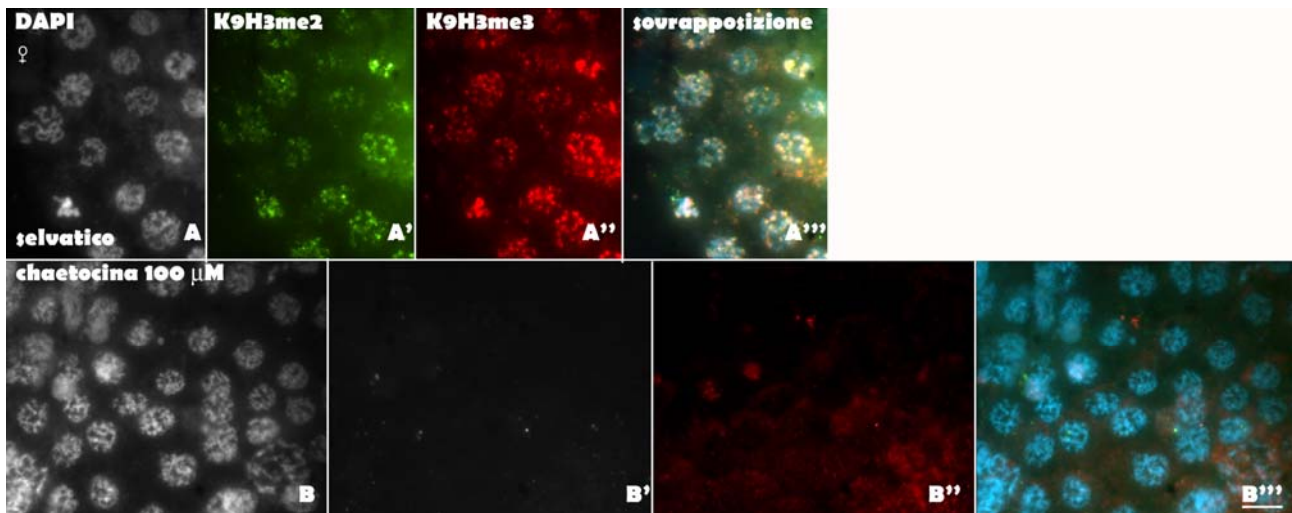


Figura 20: Effetto della chaetocina sul pattern della K9H3 dimetilata in nuclei femminili. Nel pannello superiore **A** sono mostrati nuclei di embrione femminile provenienti dagli esperimenti di controllo. Il pannello **B** mostra i nuclei trattati. **A, B:** colorazione in DAPI della cromatina. **A'', B'':** localizzazione del segnale della lisina 9 dell'istone H3 trimetilata (K9H3m3) in nuclei femminili. **A', B':** localizzazione del segnale dell'anticorpo contro la lisina 9 dell'istone H3 dimetilata (K9H3m2). **A''', B''':** immagine sovrapposta delle tre precedenti. La cromatina è pseudocolorata in blu, il segnale anti-K9H3m3 in rosso ed il segnale anti-K9H3m2 in verde. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10μm.

In **figura 21** viene effettuato un confronto del segnale della K20H4m3 tra i nuclei di un embrione maschile di controllo (pannello A) e i nuclei di embrioni maschili trattati (pannelli B e C).

Il pattern di localizzazione di questa modificazione istonica sui nuclei di controllo è stato precedentemente descritto; sui trattati (**fig. 21B'** e **21C'**) è quasi del tutto assente.

Nella **figura 22** viene confrontata l'immunocolorazione della K20H4m3 su nuclei femminili di controllo (pannello A) e su nuclei femminili trattati (pannelli B e C).

Anche in questo caso, il pattern di localizzazione della K20H4m3 sui nuclei di controllo è stato precedentemente descritto; sui nuclei trattati il segnale è fortemente decerementato (**fig. 22B'** e **22C'**) e diffuso dal nucleo al citoplasma (**fig. 22B''** e **22C''**, sovrapposizione).

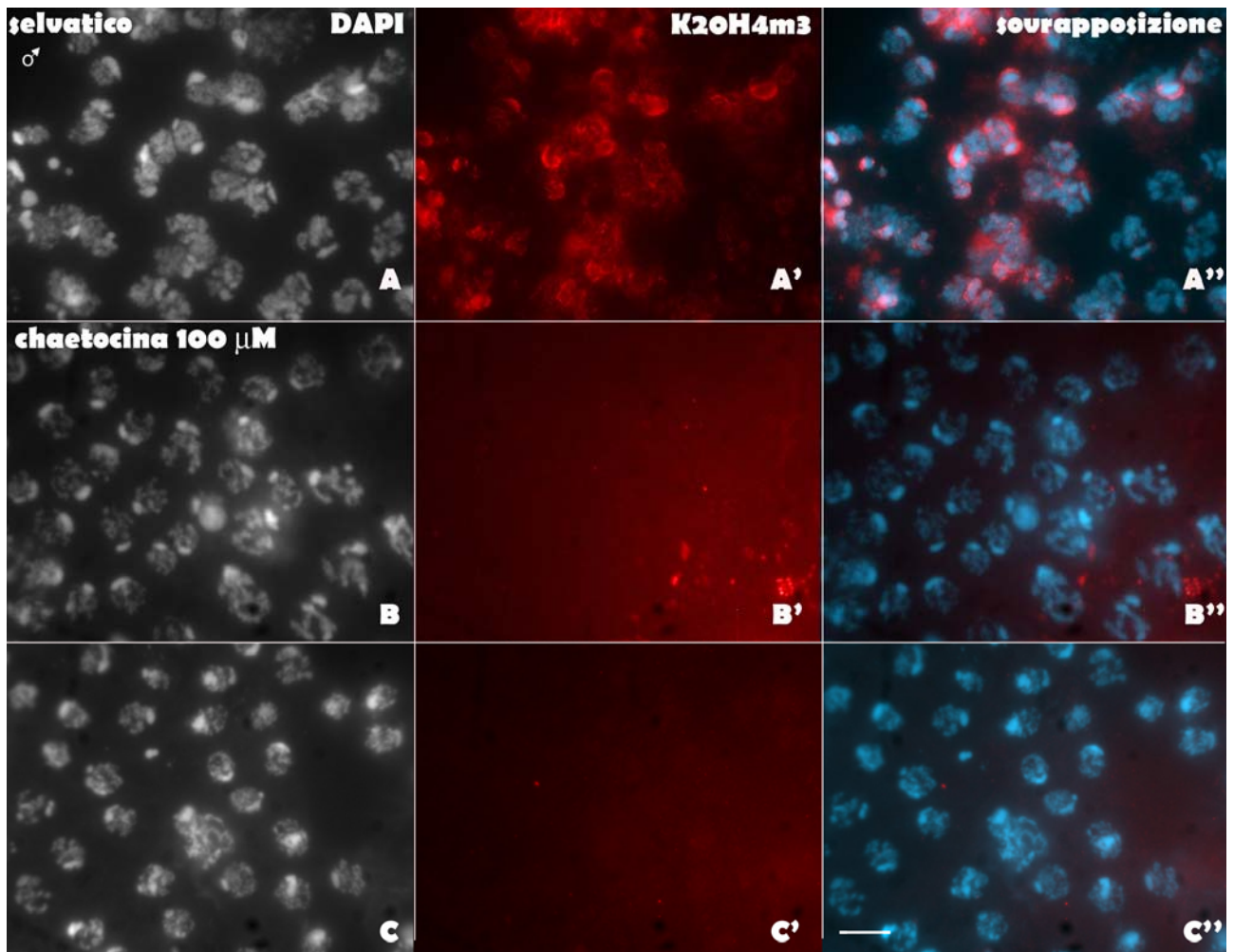


Figura 21: Effetto della chaetocina sul pattern della K20H4 in nuclei maschili. Il pannello superiore mostra nuclei di embrione maschile di controllo ottenuti con la stessa soluzione del trattamento, priva però della chaetocina. I pannelli **B** e **C** presentano nuclei dopo il trattamento con la chaetocina. **A**, **B**, e **C**: immagine colorata in DAPI per evidenziare la cromatina. **A'**, **B'**, **C'**: localizzazione del segnale della lisina 20 dell'istone H4 trimetilata (K20H4m3). **A''**, **B''**, **C''**: sovrapposizione delle immagini del segnale dell'anticorpo e della cromatina. La cromatina è stata pseudocolorata in blu, il segnale della K20H4m3 in rosso. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10 μ m.

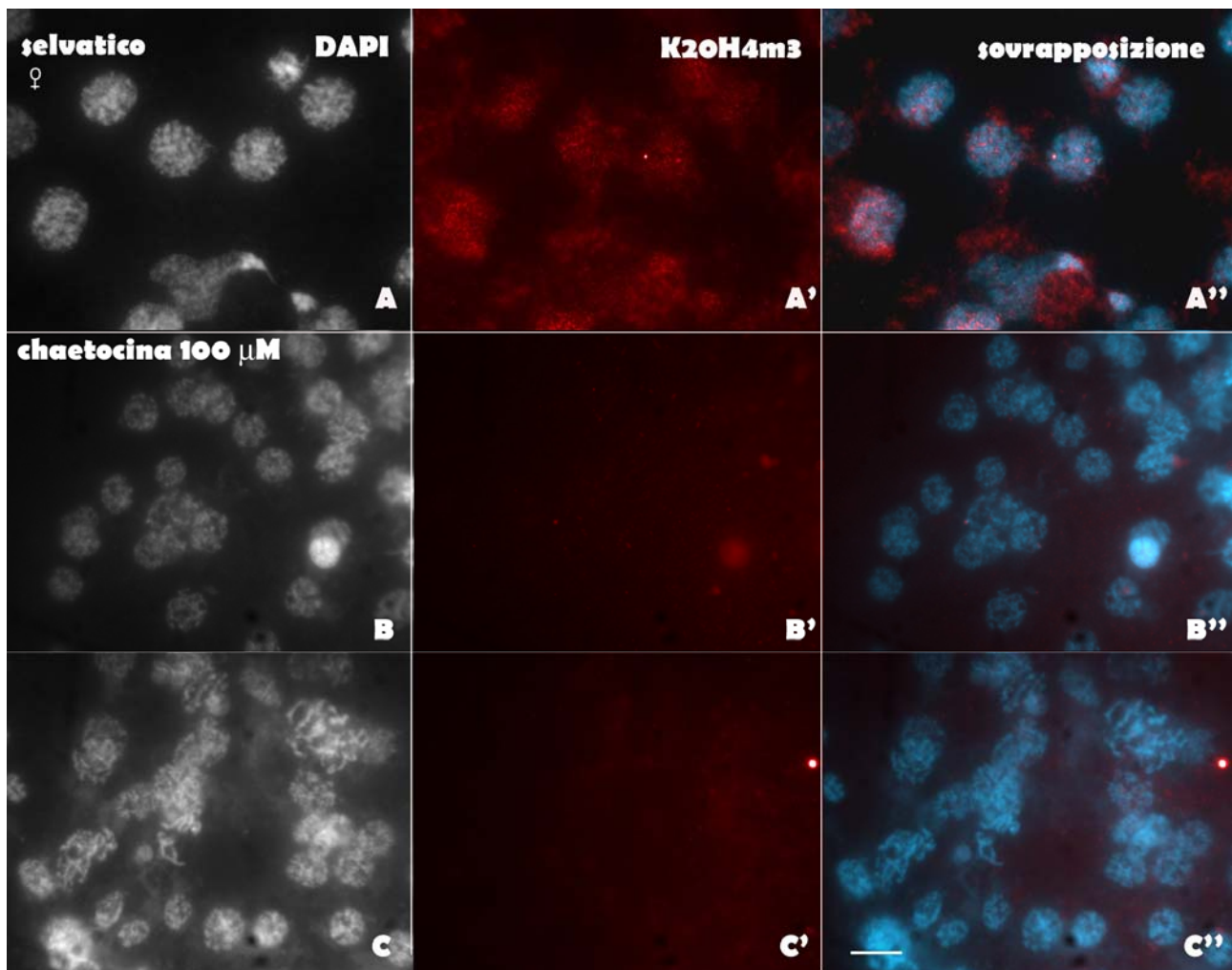


Figura 22: Effetto della chaetocina sul pattern della K20H4 in nuclei femminili. Nel pannello superiore **A** sono mostrati nuclei di embrione femminile provenienti dagli esperimenti di controllo. I pannelli **B** e **C** mostrano i nuclei trattati. **A, B, C**: colorazione in DAPI della cromatina. **A', B', C'**: localizzazione del segnale della lisina 20 dell'istone H4 trimetilata (K20H4m3) in nuclei femminili. **A'', B'', C''**: immagine sovrapposta delle due precedenti. La cromatina è pseudocolorata in blu, il segnale anti-K20H4m3 in rosso. Tutti gli ingrandimenti sono 1000x. La barra corrisponde a 10μm.

Per verificare la significatività dei dati citologici ho usato il test del χ^2 . In particolare ho voluto verificare se la percentuale di nuclei mitotici con difetti cromatinici osservata nei trattati fosse significativa, o dovuta, per esempio, alla permanenza degli embrioni nella soluzione di interferenza.

Nella **tabella 7** sono confrontati i nuclei mitotici alterati e i nuclei mitotici normali osservati sia nei trattati sia nei controlli, ottenuti incubando gli embrioni con la stessa soluzione priva però della chaetocina (soluzione *mock*). Dall'analisi statistica si evince che la percentuale di nuclei mitotici con difetti cromatinici nei trattati rispetto ai mock è statisticamente significativa ($P=0,0000$).

Tabella 7: Analisi statistica della significatività delle alterazioni cromatiniche. La maggiore percentuale di nuclei mitotici alterati osservata nei trattati è dovuta al trattamento con la chaetocina.

	Nuclei profasici e prometafasici alterati maschili e femminili	Nuclei profasici e prometafasici normali maschili e femminili
Controllo	26 (7%)	325 (93%)
Trattato	229 (74%)	79 (26%)

P = 0,0000

Successivamente, ho voluto verificare se ci fosse una differenza tra i due sessi, per quanto concerne la percentuale di nuclei mitotici alterati presente nei trattati. In **tabella 8** sono messi a confronto i nuclei mitotici alterati e i nuclei mitotici normali analizzati nei maschi e nelle femmine trattati. Dall'analisi statistica si evince che la percentuale di nuclei mitotici alterati presente nelle femmine non è significativamente superiore a quella riscontrata nei maschi.

Tabella 8: Analisi statistica della significatività delle alterazioni cromatiniche tra i due sessi.

	Nuclei profasici e prometafasici alterati	Nuclei profasici e prometafasici normali
Maschi (trattati)	21 (66%)	11 (34%)
Femmine (trattati)	208 (75%)	68 (25%)

P = 0,2324

Anche per le dislocazioni dalle piastre metafasiche è stata eseguita l'analisi statistica.

La **tabella 9** mostra come l'analisi statistica eseguita tramite il test del χ^2 mi ha permesso di valutare che l'incremento di dislocazioni osservate nei campioni trattati rispetto al controllo è statisticamente significativo ($P=0,0000$).

Tabella 9: Analisi statistica della significatività dei risultati osservati per quanto riguarda le dislocazioni metafasiche. Sono confrontate le metafasi presentanti dislocazioni e non, all'interno dei preparati trattati con la chaetocina e dei controlli.

	Metafasi con dislocazioni maschili e femminili	Metafasi senza dislocazioni maschili e femminili
Controllo	144 (7%)	2057 (93%)
Trattato	418 (44%)	542 (56%)

P = 0,0000

Successivamente, ho voluto verificare se ci fosse una differenza tra i due sessi, per quanto concerne la percentuale di nuclei metafasici con dislocazioni presente nei trattati. In **tabella 10** sono messi a confronto i nuclei metafasici con dislocazioni e i nuclei metafasici che ne sono privi, analizzati nei maschi e nelle femmine trattati. Dall'analisi statistica si evince che la percentuale di nuclei metafasici con dislocazioni presente nei maschi non è significativamente superiore a quella riscontrata nelle femmine.

Tabella 10: Analisi statistica della significatività dei risultati osservati per quanto riguarda le dislocazioni metafasiche tra i due sessi.

	Metafasi con dislocazioni	Metafasi senza dislocazioni
Maschi (trattati)	206 (46%)	239 (54%)
Femmine (trattati)	212 (41%)	303 (59%)

P = 0,1101

Come si è già detto, i dati riportati fino ad ora si riferiscono a tempi di incubazione degli embrioni pari a 16h ed ad una concentrazione della chaetocina pari a 100µM. I trattamenti effettuati a 4h e a 50µM forniscono gli stessi risultati, tranne un particolare caso. In **tabella 11** sono messi a confronto i nuclei metafasici con dislocazioni e i nuclei metafasici che ne sono privi, analizzati nei maschi e nelle femmine trattati con chaetocina 100µM per 4h. Dall'analisi statistica si evince che la percentuale di nuclei metafasici con dislocazioni presente nei maschi è significativamente superiore a quella riscontrata nelle femmine (P=0,0000).

Tabella 11: Analisi statistica della significatività dei risultati osservati per quanto riguarda le dislocazioni metafasiche tra i due sessi. I nuclei metafasici maschili, risultano più sensibili al trattamento con la chaetocina di quelli femminili.

	Metafasi con dislocazioni	Metafasi senza dislocazioni
Maschi (trattati)	46 (48%)	50 (52%)
Femmine (trattati)	40 (24%)	127 (76%)

P = 0,0000

Concludiamo con la tabella (**tabella 12**) che mette in evidenza le differenze di sopravvivenza tra gli embrioni dei due sessi in seguito al trattamento con la chaetocina. Come già

spiegato (vedi tabella 6), questo parametro viene dedotto dal confronto della proporzione di embrioni maschili e femminili negli stessi stadi di sviluppo.

Dalla **tabella 12** si può notare che a 16h di trattamento, il tasso di letalità maschile è statisticamente più elevato di quello femminile.

Tabella 12: Confronto della vitalità (vedi testo) degli embrioni dei due sessi in preparati sottoposti al trattamento con chaetocina e nei controlli.

	Controllo	Trattato
Maschi	178 (62%)	61 (50%)
Femmine	107 (38%)	62 (50%)

P = 0,0155

L'effetto del trattamento con dsRNA di *Su(var)3-9-like* e con la chaetocina è stato confermato tramite esperimenti di Western blotting. Estratti proteici totali da embrioni trattati con RNAi, o con chaetocina, e dai relativi controlli, sono stati separati tramite SDS-PAGE, trasferiti su filtro di nitrocellulosa, e quindi incubati con l'anticorpo monoclonale anti-HP1 (C1A9) di *Drosophila melanogaster*, con l'anticorpo contro la forma trimetilata della K9H3 (K9H3m3), con l'anticorpo contro la forma dimetilata della K9H3 (K9H3m2), con l'anticorpo contro la forma trimetilata della K20H4 (K20H4m3) e con l'anticorpo contro l' α -tubulina come controllo.

Dall'analisi del Western blotting (**figura 23A, B e C**) si deduce che, negli embrioni trattati con dsRNA di *Su(var)3-9-like* per 16h, i livelli delle forme di- e tri-metilate della K9H3 (**fig. 23A, B e 23C**), della forma trimetilata della K20H4 (**fig. 23C**) e della proteina PCHET2 (**fig. 23A e 23B**) sono fortemente ridotti rispetto ai controlli. La proteina caricata come controllo, l' α -tubulina, non è influenzata dal trattamento (**fig. 23A, B e C**). Analogamente, negli embrioni trattati con chaetocina 100 μ M per 16h i livelli delle forme di- e tri-metilate della K9H3 (**fig. 23A, B e C**), della forma trimetilata della K20H4 (**fig. 23C**) e della proteina PCHET2 (**fig. 23A e B**) sono fortemente ridotti rispetto ai controlli. La proteina caricata come controllo, l' α -tubulina, non è affetta dal trattamento (**fig. 23A, B e C**).

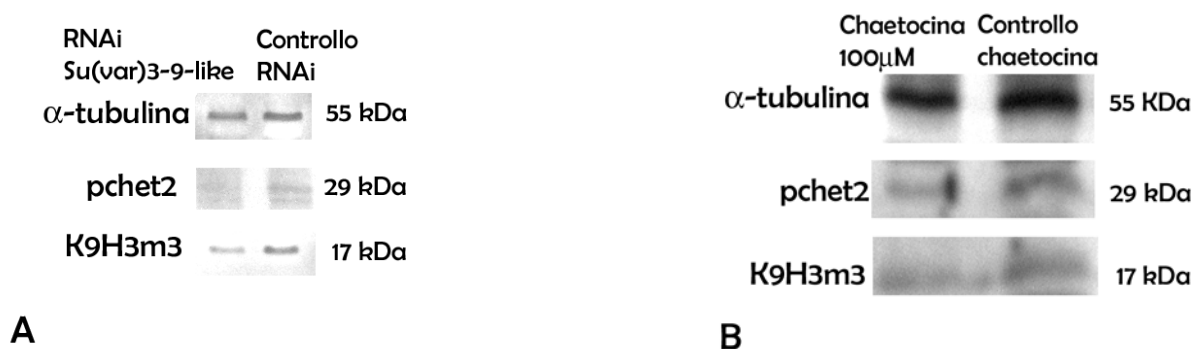
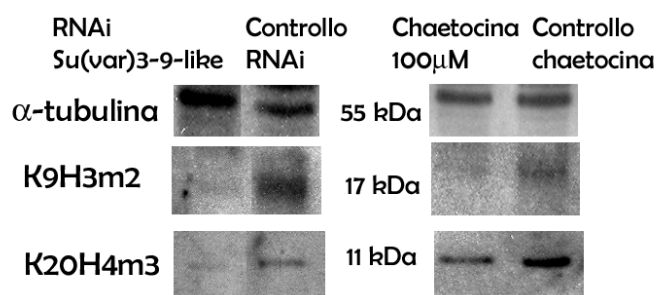


Figura 23A (a sinistra): I livelli di metilazione della K9H3m3 e della proteina PCHET2 subiscono un decremento negli estratti proteici cellulari totali da embrioni trattati con dsRNA di *Su(var)3-9-like*.

Gli estratti proteici cellulari totali da embrioni trattati con dsRNA di *Su(var)3-9-like* e dai relativi controlli, sono stati separati tramite SDS-PAGE, trasferiti su filtro di nitrocellulosa ed incubati con l'anticorpo anti-K9H3m3, con l'anticorpo anti-HP1 e con l'anti- α -tubulina. Questo ha evidenziato livelli di trimetilazione della K9H3 e di proteina PCHET2 ridotti nei trattati rispetto ai relativi controlli. La proteina α -tubulina, caricata come controllo, non è affetta dal trattamento.

Figura 23B (a destra): I livelli di metilazione della K9H3m3 e di proteina PCHET2 subiscono un decremento negli estratti proteici cellulari totali da embrioni trattati con chaetocina 100 μ M, per 16h.

Gli estratti proteici cellulari totali da embrioni trattati con chaetocina 100 μ M per 16h, e dai relativi controlli, sono stati separati tramite SDS-PAGE, trasferiti su filtro di nitrocellulosa ed incubati con l'anticorpo anti-K9H3m3, anti-HP1 e con l'anti- α -tubulina. Questo ha evidenziato livelli di trimetilazione della K9H3 e della proteina PCHET2 ridotti nei trattati rispetto ai relativi controlli. La proteina α -tubulina, caricata come controllo, non è affetta dal trattamento.



C

Figura 23C: I livelli di metilazione della K9H3m2 e della K20H4m3 subiscono un decremento negli estratti proteici cellulari totali da embrioni trattati con dsRNA di *Su(var)3-9-like*, o da embrioni trattati con chaetocina 100 μ M, per 16h.

Gli estratti proteici cellulari totali da embrioni trattati con dsRNA di *Su(var)3-9-like*, o da embrioni trattati con chaetocina 100 μ M per 16h, e dai relativi controlli, sono stati separati tramite SDS-PAGE, trasferiti su filtro di nitrocellulosa ed incubati con l'anticorpo anti-K9H3m2, con l'anti-K9H3m2 e con l'anti- α -tubulina. Questo ha evidenziato livelli di dimetilazione della K9H3 e di trimetilazione della K20H4 ridotti nei trattati rispetto ai relativi controlli. La proteina α -tubulina, caricata come controllo, non è affetta dal trattamento.

4.3 Stati di metilazione dell'istone H3 alla lisina 9 che caratterizzano la formazione dell'eterocromatina facoltativa

Per analizzare il pattern di metilazione della lisina 9 dell'istone H3 durante il ciclo cellulare ho allestito dei preparati di tessuti embrionali. Gli embrioni provenivano dalla dissezione di femmine gravide in soluzione ipotonica. Una volta eseguito il protocollo sperimentale (v. materiali e metodi) i vetrini venivano immunocolorati con un anticorpo contro la forma trimetilata della lisina 9 dell'istone H3 (K9H3m3) e con un secondo anticorpo contro la forma dimetilata della lisina 9 dell'istone H3 (K9H3m2). Dopo colorazione con anticorpi secondari marcati con fluorocromi discriminanti, i vetrini venivano osservati al microscopio a fluorescenza. Il pattern della trimetilazione della K9H3 nei Coccidi è stato ampiamente studiato nel nostro laboratorio (Cowell *et al.*, 2002; Bongiorno *et al.*, 2007), perciò la **figura 27** riassume due diversi pattern della dimetilazione che ho riscontrato nei nuclei maschili, effettuando questi esperimenti, in confronto alla trimetilazione dello stesso residuo. Nella **figura A** sono mostrati nuclei maschili colorati con il DAPI, il cromocentro maschio-specifico è evidente in ogni nucleo. Nella **figura A'** è mostrato il pattern di dimetilazione osservato su questi nuclei. Il segnale dell'anticorpo anti-K9H3m2 (pseudocolorato in verde) è puntiforme con localizzazione sia etero- che eucromatica. A livello dell'eterocromatina facoltativa il segnale circonda il cromocentro, mentre l'anticorpo contro la forma trimetilata della lisina 9 (**figura 27: A''**, in rosso) riconosce l'intera massa del cromocentro. Sulle regioni eucromatiche, tutti e due i segnali risultano in un pattern debole e diffuso coincidente (vedi sovrapposizione in A'''; cromatina in blu, segnale della K9H3m2 in verde e segnale di K9H3m3 in rosso). Nel pannello inferiore della **figura 27** è invece rappresentato il secondo pattern di dimetilazione riscontrato nei nuclei maschili. In questo caso l'anticorpo contro K9H3m2 (**fig. B'**) mostra un segnale più simile a quello dell'anticorpo contro la K9H3m3 (**fig. B''**), in particolare la dimetilazione risulta più localizzata sul cromocentro.

Lo studio della dimetilazione nei nuclei femminili è riportato nella **figura 26**. Il segnale mostrato dalla K9H3m2, in verde, è puntiforme, brillante e diffuso su tutto il nucleo. Lo stesso vale per il segnale contro la K9H3m3, in rosso. L'immagine sovrapposta mostra la colocalizzazione dei due segnali (cromatina colorata in blu, K9H3m2 in verde e K9H3m3 in rosso).

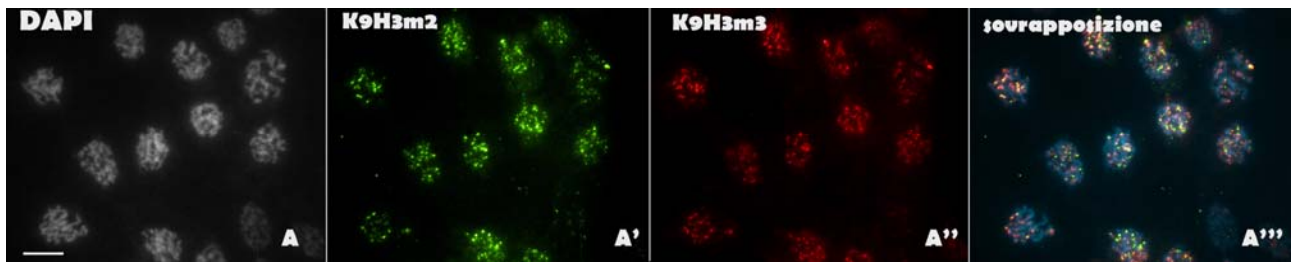


Figura 26: Pattern di localizzazione della dimetilazione della K9H3 nei nuclei femminili. Nuclei interfase femminili colorati con il DAPI (1000x). **K9H3m2:** localizzazione del segnale dell'anticorpo contro la dimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 in nuclei interfase femminili (1000x). **K9H3m3:** localizzazione del segnale dell'anticorpo contro la trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 negli stessi nuclei (1000x). Nella sovrapposizione la cromatina è pseudocolorata in blu, il segnale dell'anti-K9H3m2 in verde ed anti-K9H3m3 in rosso. La barra corrisponde a 10µm.

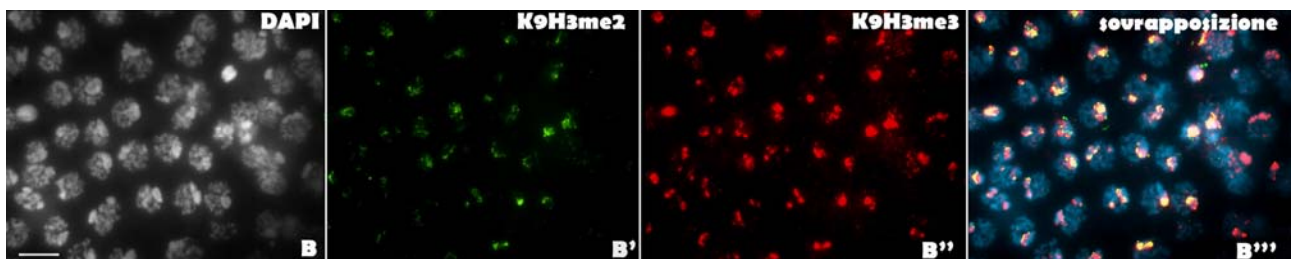
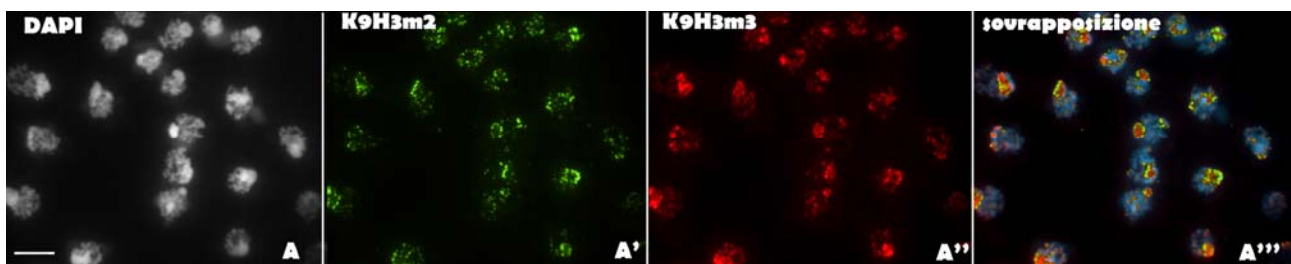


Figura 27: Pattern diversi di localizzazione della dimetilazione della K9H3 nella cromatina maschio-specifica. **A, B:** nuclei interfase maschili colorati con il DAPI (1000x). **A', B':** localizzazione del segnale dell'anticorpo contro la lisina 9 dell'istone H3 (K9H3) dimetilata (1000x). **A'', B'':** localizzazione del segnale dell'anticorpo contro la K9H3 trimetilata negli stessi nuclei (1000x). **A''', B''':** immagine sovrapposta della cromatina pseudocolorata in blu, del segnale dell'anti-K9H3m2 in verde ed anti-K9H3m3 in rosso. La barra corrisponde a 10µm.

5. DISCUSSIONE

L'informazione genetica contenuta in una sequenza nucleotidica è decifrata attraverso un codice genetico. Molecolarmente il macchinario trascrizionale trascrive quest'informazione in un RNA che a sua volta può essere tradotto in proteina, la quale esplica la sua funzione all'interno della cellula e/o dell'organismo che la contiene. Perciò una mutazione a livello della sequenza genica, può determinare effetti rilevanti nel suo prodotto proteico. Il prodotto di un gene dipende esclusivamente dalla propria sequenza nucleotidica, ma l'espressione del gene oltre ad essere regolata trascrizionalmente può dipendere anche da una forma di regolazione superiore. Questo tipo di regolazione genica definita "epigenetica" è in grado di modulare, in maniera trasmissibile, l'espressione di un gene attraverso dei "segnali" sovrainpressi alla sequenza nucleotidica che comunque rimane invariata.

I segnali epigenetici consistono in modificazioni sia a livello del DNA (come la metilazione delle basi azotate) sia a carico delle code istoniche protrudenti dall'ottamero nucleosomico. Le modificazioni istoniche risultano dall'aggiunta covalente di gruppi chimici a specifici residui amminoacidici sulle code N-terminali. Le diverse modificazioni creano specifici segnali che, in sinergia tra loro (codice istonico), permettono o escludono il legame di proteine associate alla cromatina, per determinare in questo modo il suo stato di condensazione finale e la sua conseguente espressione. In questo modo l'espressione genica viene modulata da strutture cromatiniche di ordine superiore, generate da segnali epigenetici (modificazioni istoniche e/o metilazione del DNA) che creano i) dei domini permissivi all'espressione genica (eucromatina), ii) regioni represses in stadi specifici dello sviluppo o del ciclo cellulare (eterocromatina facoltativa) e iii) domini permanentemente repressi come i centromeri ed i telomeri (eterocromatina costitutiva), che però al loro interno possono contenere singoli geni attivi.

In questa tesi ho focalizzato l'attenzione sui diversi stati di metilazione (di- e tri-metilazione) della lisina 9 dell'istone H3 (K9H3) in relazione alla formazione dell'eterocromatina facoltativa. In *Drosophila melanogaster* il responsabile della di- e tri-metilazione della K9H3 è l'enzima SU(VAR)3-9. La presenza della K9H3 metilata crea sulla cromatina il sito di legame per la proteina HP1, che legandosi promuove la creazione ed il mantenimento delle strutture eterocromatiche, trascrizionalmente inattive.

Su(var)3-9 è un gene altamente conservato e suoi ortologhi sono stati trovati in specie diverse, dall'uomo (*SUV39H1*), fino al lievito *S. pombe* (*Clr4*). Per questo motivo abbiamo voluto indagarne l'eventuale presenza e la funzione nel Coccide *Planococcus citri*. Sfruttando l'alto grado di conservazione nel SET dominio fra specie diverse, abbiamo costruito dei primer degenerati che,

tramite amplificazione per PCR del DNA genomico di *P.citri*, hanno prodotto un frammento di 553 bp, che una volta sequenziato ed analizzato è stato visto essere omologo al dominio SET del gene *Su(var)3-9*. Sfruttando, analogamente, l'alto grado di conservazione di altre regioni del gene quali il chromo dominio e l'esone 2 comune a *Su(var)3-9* ed *eIF2 γ* , abbiamo ottenuto per PCR un altro frammento, che si è rivelato omologo al gene *Su(var)3-9*.

Il frammento di 1633 bp, ad oggi isolato, presenta un'identità del 98% con la corrispondente sequenza di *Drosophila* (1616 nucleotidi identici su un totale di 1633). La proteina putativa della sequenza clonata, presenta identità di sequenza del 97% con la corrispondente proteina di *Drosophila*. Questa sorprendente similarità conferma l'alto grado di conservazione del dominio funzionale SET, responsabile dell'attività metilasica, in specie anche molto distanti filogeneticamente. Attualmente nel nostro laboratorio è in corso il clonaggio della parte rimanente del gene *Su(var)3-9-like*, che in *D. melanogaster* ha una lunghezza di 5541 bp. Dai primi dati preliminari sembra emergere che in *P. citri* il gene *Su(var)3-9-like* non è fuso con il gene *eIF2 γ* , analogamente a quanto avviene in altre specie d'insetti, diversi dal genere *Drosophila*, come gli afidi (Krauss et al., 2006).

Il clonaggio, in *P. citri*, di un frammento *Su(var)3-9-like* contenente il dominio SET, ci ha permesso di caratterizzare funzionalmente il gene *Su(var)3-9-like* e quindi il possibile ruolo della metilasi SU(VAR)3-9 durante la formazione dell'eterocromatina maschio-specifica. A questo proposito è stata impiegata la tecnica dell'interferenza tramite RNA a doppio filamento (RNAi). Il doppio filamento di RNA inattiva selettivamente il trascritto del gene corrispondente, creando in questo modo delle fenocopie del mutante. Questa tecnica offre grandi potenzialità soprattutto nel caso in cui non si dispone di mutanti.

Per cui, abbiamo incubato embrioni a diversi stadi di sviluppo con il dsRNA di *Su(var)3-9-like* ed allestito dei preparati citologici che abbiamo analizzato per immunofluorescenza con l'anticorpo anti-K9H3m3. Ovviamente la presenza di trimetilazione alla lisina 9 dell'istone H3 segnala l'attività e quindi la presenza della metilasi SU(VAR)3-9. L'osservazione dei vetrini ottenuti da embrioni trattati per l'RNAi ha messo in evidenza la diminuzione o addirittura l'assenza di immunocolorazione con l'anticorpo anti-K9H3m3 nella maggior parte delle cellule degli embrioni trattati (**fig. 8, 9, 12 e 13**) mentre negli esperimenti di controllo (vedere materiali e metodi) l'immunocolorazione persisteva. Questo risultato dimostra: i) l'efficacia dell'interferenza ad RNA con la sequenza corrispondente al dominio SET della metilasi istonica *Su(var)3-9-like* di *P. citri*; ii) che il gene da noi clonato in *P. citri* interviene nella trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 e quindi può essere considerato *bona fide* l'ortologo del gene *Su(var)3-9*. La persistenza in alcune cellule trattate del segnale della metilazione della K9H3 può essere spiegata tenendo conto che negli

embrioni più avanzati (dopo la decima divisione, allo stadio di blastoderma avanzato) è sicuramente già stata prodotta la metilasi SU(VAR)3-9-like, per cui il successo dell'interferenza dipende anche dal turnover della proteina endogena. Inoltre lavorando *in vivo* con embrioni con un numero variabile di cellule (dallo zigote con 1 cellula fino alla gastrula con 2¹⁴ cellule) non è possibile calcolare la quantità di RNA somministrato per cellula.

Perciò si è cercato di “standardizzare” gli esperimenti dissezionando sempre lo stesso numero di femmine gravide, così da ottenere approssimativamente lo stesso numero di embrioni, e conducendo le nostre osservazioni solo su embrioni precoci.

Oltre ad osservare l'assenza o la diminuzione di immunofluorescenza relativa al segnale di trimetilazione della K9H3, negli embrioni interferiti abbiamo anche osservato una forte diminuzione dell'immunocolorazione con gli anticorpi contro la K9H3m2 (**fig. 12 e 13**), contro la K20H4m3 (**fig. 14 e 15**) e contro la proteina HP1-like (**fig. 8 e 9**).

Si è detto che SU(VAR)3-9 è una metilasi della K9H3, che nelle altre specie è in grado di effettuare la di- e la tri-metilazione (Schotta *et al.*, 2002); ciò è perfettamente in linea con la diminuzione o addirittura l'assenza di immunocolorazione con l'anticorpo anti-K9H3m2 nella maggior parte delle cellule embrionali, e costituisce, inoltre, allo stesso tempo, un'ulteriore prova della buona riuscita dell'interferenza ad RNA.

Per quanto riguarda, inoltre, il sensibile decremento del segnale della K20H4m3, che perde la sua caratteristica localizzazione nucleare, sia nei nuclei maschili, sia nei femminili, e diffonde dalla cromatina al citoplasma è interessante sottolineare che la trimetilazione della K9H3 è richiesta anche per l'induzione della trimetilazione della K20H4 (Schotta *et al.*, 2004). Sono stati, infatti, identificati due enzimi responsabili della trimetilazione della K20H4, Suv4-20h1 e Suv4-20h2. L'interazione fisica della regione C-ter degli enzimi Suv4-20h con la proteina HP1 suggerisce il seguente modello di trimetilazione sequenziale della K9H3 e della K20H4: Suv39h trimetila la K9H3. La K9H3m3 è, a sua volta, riconosciuta e legata dalla proteina HP1, la quale è anche in grado di reclutare altro enzima Suv39h, mediante un'interazione proteina-proteina, facilitando, in tal modo, la propagazione dello stato eterocromatico. HP1 recluta, inoltre, come sopra riportato, gli enzimi Suv4-20h, che catalizzano la trimetilazione della K20H4. La presenza di K9H3m3 e dell'enzima Suv39h, sembrano, comunque, necessarie solo affinché la K20H4 sia trimetilata; infatti, nei mutanti *Suv39h*, la mono e la dimetilazione della K20H4 non sono alterate, mentre la trimetilazione è completamente persa dall'eterocromatina pericentrica.

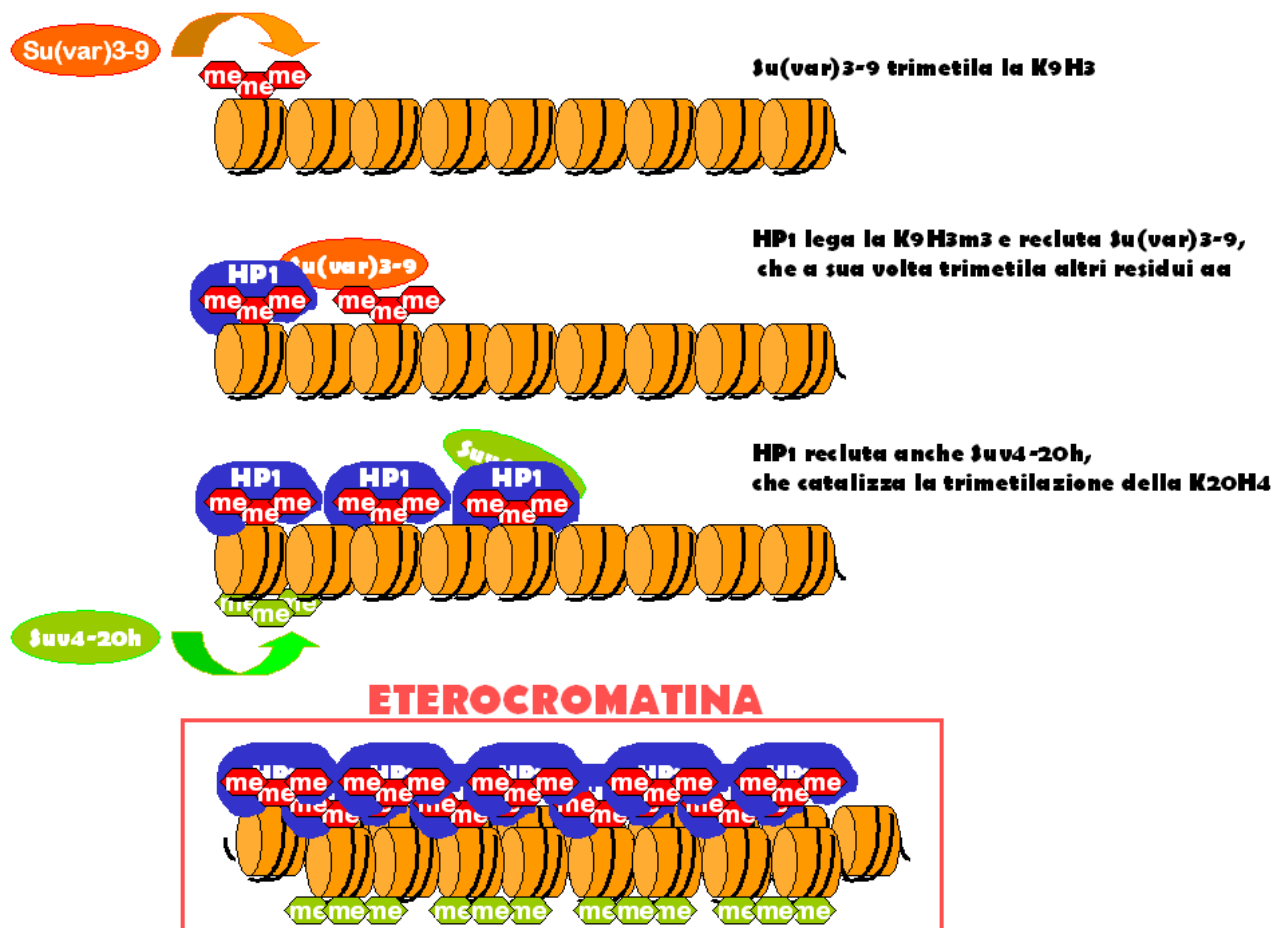
La localizzazione nel citoplasma, che accompagna la quasi totale scomparsa del segnale nucleare di K9H3m3 e K9H3m2 potrebbe essere il risultato dell'elevato turnover cui vanno

incontro le proteine del rimodellamento della cromatina (Belmont, 2003), specialmente in quegli stadi di sviluppo, come quelli embrionali, in cui le divisioni cellulari sono rapide.

In un nostro recente lavoro (Bongiorni *et al.*, 2007), abbiamo dimostrato la stretta interrelazione funzionale tra la K9H3m3 e la proteina HP1-like in *Planococcus citri*. Infatti, negli embrioni sottoposti a RNAi con la sequenza *pchet2* (che è il gene *HP1-like* in *P. citri*), si osservano il disassemblaggio del cromocentro maschio-specifico, difetti della cromatina e, oltre all'attesa scomparsa del segnale di HP1-like, anche la scomparsa del segnale di K9H3m3. La K9H3m3 è il substrato preferenziale per il legame della proteina HP1 (Lachner *et al.*, 2001) la quale si lega tramite il suo cromodominio, promuove la formazione della struttura eterocromatica reclutando allo stesso tempo nuove molecole di SU(VAR)3-9 che, estendendo la metilazione della K9H3, richiamano nuove molecole di HP1 promuovendo l'espansione dello stato eterocromatico (Schotta *et al.*, 2002, Sims *et al.*, 2003). Negli embrioni interferiti con *pchet2*, si osserva, inoltre, la perdita di immunocolorazione con l'anticorpo contro la K20H4m3, spiegabile con il mancato reclutamento, da parte di HP1-like, della HMTase specifica per la K20H4 (Kourmouli *et al.*, 2004; Schotta *et al.*, 2004). HP1-like è quindi richiesto per l'eterocromatizzazione facoltativa dell'assetto cromosomico aploide di origine paterna, e si profila come un componente essenziale del pathway K9H3m3-HP1-K20H4m3, dal momento che, la sua assenza, determina un decremento e/o una perdita di immunocolorazione per entrambe le modificazioni istoniche.

I dati di questa tesi confermano quindi pienamente la stretta interrelazione funzionale fra K9H3m3 e la proteina HP1. L'assenza totale di immunocolorazione per HP1-like nei nuclei interferiti con il dsRNA di *Su(var)3-9*, potrebbe spiegarsi considerando il fatto che la proteina non riuscendo a trovare il suo sito di legame (K9H3m3) viene "segnalata" per essere catabolizzata. Un'altra spiegazione dell'assenza del segnale anti-HP1, potrebbe essere un "mascheramento" dei siti riconosciuti dall'anticorpo monoclonale da me usato, perchè la proteina non essendo legata al suo target molecolare non assume più la conformazione spaziale giusta, rendendo inaccessibili gli epitopi che le permettono di essere riconosciuta dall'anticorpo utilizzato. Inoltre, la drastica alterazione del cromocentro osservata nelle fenocopie dei mutanti per *Su(var)3-9* (vedi sotto) è identica a quella osservata nelle fenocopie dei mutanti *HP1-like* (Bongiorni *et al.*, 2007). Nel loro insieme questi risultati suggeriscono che i prodotti di *Su(var)3-9* e di *HP1-like* agiscono in un complesso (possibilmente in concorso anche con altre proteine) e che basta ridurre drasticamente la quantità di uno qualsiasi dei due per ottenere lo stesso fenotipo mutante. In altri termini, nessuno dei due geni è epistatico, da un punto di vista molecolare, sull'altro. Questo è confermato da quanto osservato in *Drosophila*, dove i mutanti per HP1, *Su(var)2-5* (Eissenberg *et al.*, 1990), e quelli per la metilasi istonica specifica per la K9 dell'H3, *Su(var)3-9* (Schotta *et al.*, 2002), presentano un

fenotipo di soppressione della variegazione quasi sovrapponibile. Di questo complesso dovrebbe ragionevolmente far parte anche la metiltransferasi della K20H4m3, Suv4-20h. Si può ipotizzare un modello di metilazione sequenziale della K9H3m3 e della K20H4m3, in cui SU(VAR)3-9-like di/trimetila la K9H3, che viene riconosciuta e legata dalla proteina HP1-like, la quale, a sua volta, recluta, sia altre molecole di SU(VAR)3-9-like, per propagare in tal modo lo stato eterocromatico, sia Suv4-20h, per trimetilare la K20H4.



Una conferma, a livello molecolare, di questi dati citologici, ci è venuta dagli esperimenti di western blotting effettuati sugli estratti proteici degli embrioni interferiti con il dsRNA di SU(VAR)3-9-like e sui relativi controlli (**fig. 23A, B e C**). E' interessante sottolineare, oltre al decremento della K9H3m3, della K9H3m2 e della K20H4m3, la forte riduzione del livello di HP1-like nei trattati, che ci permette di discriminare fra le due ipotesi precedentemente fatte per giustificare l'assenza di immunocolorazione per HP1-like negli embrioni interferiti. Il dato molecolare sembra favorire la prima ipotesi, ossia la proteina, non trovando il suo sito di legame (K9H3m3), viene "segnalata" e degradata. Nell'ipotesi, infatti, di un'inaccessibilità da parte dell'anticorpo monoclonale usato, HP1-like dovrebbe essere presente negli embrioni, ma non nella sua conformazione selvatica, per il mancato legame al suo target molecolare; come risultato di un

esperimento di western blotting dovremmo quindi visualizzare dei livelli di questa proteina equiparabili tra trattati e controlli, anziché il consistente decremento da noi osservato nei primi.

Un altro aspetto interessante è la presenza, negli embrioni interferiti, di danni alla cromatina. Per approfondire il ruolo di SU(VAR)3-9-like durante la formazione dell'eterocromatina facoltativa, abbiamo rivolto una particolare attenzione alla morfologia del cromocentro maschio-specifico. I nostri dati dimostrano che la deprivazione della metilasi istonica SU(VAR)3-9 provoca diversi tipi di difetti della cromatina, sia in nuclei maschili sia femminili. Il confronto con i preparati di controllo dimostra, in maniera significativa (65% contro 16%; **tabella 1**), che questi difetti sono dovuti al trattamento con il dsRNA.

Per quanto riguarda i nuclei maschili, la struttura del cromocentro risulta gravemente danneggiata, fino al punto di rendere difficile la sua identificazione e quindi il riconoscimento degli embrioni maschili. Il segnale della K9H3m3 nei nuclei interferiti perde la sua localizzazione cromocentrica e, come già discusso, anche la proteina HP1-like risulta quasi assente.

Nei nuclei femminili trattati con il dsRNA si nota la forte riduzione del segnale della K9H3m3, accompagnata da drastica decondensazione della cromatina e dalla concomitante perdita del segnale della proteina HP1-like.

Nel corso degli esperimenti di RNAi effettuati, sono stati riscontrati anche dei difetti nei nuclei di cellule in divisione, come le dislocazioni di singoli cromosomi dalle piastre metafasiche e le fusioni telomeriche. Per quanto riguarda le dislocazioni dalla piastra metafase, esse sono riscontrate con una frequenza statisticamente più elevata nei trattati rispetto ai controlli (39% contro 6%, **tabella 3**); i nuclei metafasici maschili risultano, in particolare, più sensibili al trattamento dei femminili (46% contro 35%, **tabella 4**), ma solo a 16h di trattamento; ciò può essere spiegato se consideriamo che nei nuclei maschili i cromosomi eterocromatici, per allinearsi in piastra metafase, devono “districarsi” dal cromocentro e che questo processo può essere compromesso drasticamente nel caso di un cromocentro anormale come quello alterato dalla interferenza.

E' interessante sottolineare come anche la privazione di HP1-like, prodotta da RNAi in *P. citri* provochi lo stesso fenotipo di alterazione mitotica (Bongiorni *et al.*, 2007). Questo dato conferma ulteriormente la possibilità che *Hp1*-like e *Su(var)3-9* partecipino nello stesso complesso di rimodellamento della cromatina, che così avrebbe anche un ruolo nella corretta esecuzione della mitosi.

A sostegno di questa possibilità esistono studi su mutanti a guadagno o perdita di funzione per l'enzima Suv39h in linee cellulari di mammifero, che suggeriscono un ruolo per il sistema di metilazione SUV39H1-HP1 nella segregazione cromosomica (Melcher *et al.*, 2000). In *S. pombe*, i geni *clr4* e *swi6*, che codificano gli omologhi di SUV39H1 e HP1 nei lieviti di fissione, sono

richiesti per il silenziamento genico eterocromatico (Thon *et al.*, 1994, Ivanova *et al.*, 1998) e per la funzione centromerica (Ekwall *et al.*, 1996). L'abolizione dell'attività metiltrasferasica di Ctr4 previene l'associazione pericentrica della proteina Swi6 (Bannister *et al.*, 2001) e compromette la metilazione della K9H3 (Nakayama *et al.*, 2001). Sebbene i mutanti nulli *ctr4* e *swi6* siano vitali, la mutazione di entrambi i loci porta a difetti di segregazione cromosomica (Ekwall *et al.*, 1996). In questo contesto risulta quindi sorprendente che i mutanti *Su(var)3-9* non hanno mostrato difetti di segregazione cromosomica in *Drosophila* (Tschiersch *et al.*, 1994).

È noto da tempo (Fanti *et al.*, 1998) che una delle funzioni di HP1 in *Drosophila* sia la prevenzione delle fusioni telomeriche. Negli embrioni di *P. citri* interferiti con il dsRNA del dominio SET di *Su(var)3-9-like*, le fusioni telomeriche possono essere dovute all'assenza di localizzazione della proteina HP1-like, provocata dall'interferenza contro l'RNA di *Su(var)3-9-like* e la conseguente perdita del suo sito di legame, come discusso in precedenza.

L'ultimo elemento affrontato è stato quello della possibile letalità embrionale conseguente ai trattamenti con il dsRNA del dominio SET di *Su(var)3-9-like*. Pur sospettando che le anomalie finora descritte abbiano come esito un certo grado di letalità embrionale, tuttavia, non abbiamo avuto la possibilità di analizzarla a causa delle peculiari modalità di riproduzione delle femmine di queste specie (ad esempio, il fatto che parte dello sviluppo embrionale si svolga all'interno della madre). Abbiamo però potuto calcolare la letalità in relazione al sesso degli embrioni, analizzando il numero di embrioni maschili e femminili osservati nei controlli e nei trattati, rispetto al numero totale di embrioni riscontrati nei medesimi preparati. Vanno esclusi gli stadi embrionali precoci dove non è possibile riconoscere il sesso dell'embrione per l'assenza della formazione dell'eterocromatina facoltativa e quindi del tipico cromocentro maschio-specifico. Va inoltre considerato che il rapporto sessi nei controlli può variare tra esperimenti diversi, in quanto la determinazione del sesso in *P. citri* è verosimilmente influenzata da fattori ambientali (Nelson-Rees, 1960).

I nostri dati (**tabella 6**) non hanno dimostrato nessuna differenza statisticamente significativa di mortalità in funzione del sesso.

Un altro metodo, oltre all'RNAi, per studiare un possibile ruolo della proteina SU(VAR)3-9-like nel processo di eterocromatizzazione facoltativa, è l'uso della chaetocina. La chaetocina è un metabolita fungino, con attività antimicrobica e citostatica, che inibisce in modo specifico la metiltransferasi istonica SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster* e il suo ortologo umano (Greiner *et al.*, 2005). La specificità della chaetocina per SU(VAR)3-9 rende questo composto uno strumento eccellente per lo studio della repressione genica mediata dall'eterocromatina. Come si è già detto, l'RNAi consente di creare fenocopie di mutanti nulli *Su(var)3-9-like* e quindi analizzare gli effetti

provocati dall'assenza della proteina SU(VAR)3-9-like nel momento della formazione dell'eterocromatina facoltativa. Il trattamento con la chaetocina, invece, inibisce l'attività metiltransferasica di SU(VAR)3-9 ma non altera la struttura della proteina, che resta presente nella cellula ed, eventualmente, in grado di espletare attività differenti da quella catalitica. Per queste ragioni è stato interessante testare l'effetto di questo inibitore sul nostro sistema modello e confrontarlo con i dati provenienti dal trattamento con RNAi.

Embrioni di *Planococcus citri*, a stadi di sviluppo embrionale differenti (dallo zigote alla gastrula), sono stati incubati per tempi variabili con una soluzione contenente la chaetocina a concentrazioni variabili. Negli embrioni trattati con la chaetocina si nota la forte diminuzione del segnale dell'anticorpo contro la K9H3m3 e contro la K9H3m2 (**fig. 19 e 20**), ed una sua "mis-localizzazione" nel citoplasma, che accompagna la quasi totale scomparsa del segnale anti-HP1 (**fig. 16 e 17**) e del segnale anti-K20H4m3 (**fig. 21 e 22**).

La diminuzione o addirittura l'assenza di immunocolorazione con l'anticorpo anti-K9H3m3 e con l'anticorpo anti-K9H3m2 nella maggior parte delle cellule embrionali di preparati trattati con l'inibitore dimostra che la chaetocina anche in *Planococcus citri* è in grado di inibire l'attività metilasica di SU(VAR)3-9-like. L'assenza di K9H3m2, in particolare, conferma la capacità di SU(VAR)3-9-like di catalizzare sia la reazione di dimetilazione della K9H3, sia la trimetilazione, analogamente a SU(VAR)3-9 di *Drosophila melanogaster*. La persistenza in alcune cellule di embrioni trattati del segnale della metilazione della K9H3 può essere spiegata tenendo conto che negli embrioni più avanzati la metilazione può avere già avuto luogo prima della somministrazione della molecola di inibitore. Tuttavia, il segnale residuale della K9H3m3 nei nuclei di embrioni maschili interferiti perde la sua localizzazione cromocentrica, e la struttura del cromocentro risulta gravemente danneggiata fino al punto da rendere difficile la sua identificazione e quindi il riconoscimento degli embrioni maschili. Inoltre, come già osservato con l'RNAi, anche la proteina HP1-like risulta quasi assente.

Una conferma, a livello molecolare, dei dati citologici così ottenuti, ci viene dagli esperimenti di western blotting condotti su estratti proteici di embrioni trattati con la chaetocina e dei relativi controlli.

Nell'insieme questi dati confermano pienamente i risultati ottenuti con l'RNAi e la stretta inter-relazione fra tutti i marker epigenetici da noi analizzati. E' interessante notare un minore decremento di K20H4m3 a carico dei trattati con chaetocina, rispetto ai trattati con dsRNA di *Su(var)3-9-like*. In questi ultimi il prodotto del gene *Su(var)3-9-like* è abolito, mentre il trattamento con la chaetocina priva SU(VAR)3-9-like della sua attività catalitica, ma la proteina continua ad essere presente e a poter espletare eventuali altre funzioni. Si può allora ipotizzare che, la minore

influenza sulla K20H4m3 della chaetocina, sia imputabile ad un'interazione tra la HMTase della K20H4 e SU(VAR)3-9-like stessa, in cui è implicata una regione diversa dal suo sito catalitico. D'altra parte è già stata verificata un'interazione fisica tra la HMTase della K20H4 ed HP1 (Schotta *et al.*, 2004); inoltre, in mutanti nulli *Suv39h* (l'ortologo umano di *Su(var)3-9*), la K20H4m1 e la K20H4m2 non sono alterate, mentre la K20H4m3 è completamente persa dall'eterocromatina pericentrica, portando a concludere che la presenza dell'enzima Suv39h possa dirigere la trimetilazione della K20H4 in siti specifici (Schotta *et al.*, 2004). E' quindi plausibile che SU(VAR)3-9-like stessa influenzi la trimetilazione della K20H4, ragione per cui gli embrioni trattati con chaetocina, nei quali SU(VAR)3-9-like continua ad essere presente, pur privata della sua attività catalitica, sono meno colpiti dal decremento di questa modificazione istonica.

Si può quindi concludere che i dati ottenuti trattando gli embrioni di *P. citri* con la chaetocina, confermano pienamente quanto verificato tramite utilizzo di interferenza del dsRNA di *Su(var)3-9-like*, e quindi le ipotesi precedentemente espresse circa l'esistenza di un complesso K9H3m3-HP1-K20H4m3 coinvolto nella formazione dell'eterocromatina facoltativa; essi gettano, inoltre, nuova luce su una possibile interazione tra SU(VAR)3-9-like e la trimetilazione della K20H4.

Per quanto riguarda gli effetti sulla struttura della cromatina, i dati ottenuti dimostrano che l'inibizione della metilasi istonica SU(VAR)3-9 provoca un aumento significativo di difetti della cromatina, sia in nuclei maschili che femminili (**tabella 7**).

Per quanto riguarda i nuclei maschili, la struttura del cromocentro risultava gravemente danneggiata.

Questi dati confermano quelli ottenuti con l'RNAi e suggeriscono che la trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 svolge un ruolo cruciale nel normale processo di organizzazione della cromatina.

L'ultimo elemento emerso dai trattamenti con la chaetocina riguarda la letalità embrionale. Dai dati riportati alla **tabella 12** si nota una diminuzione significativa di embrioni maschili nei trattati rispetto ai controlli (50% contro 62%), con un conseguente aumento di embrioni femminili nei trattati rispetto ai controlli (50% contro 38%). Questo dato contrasta con l'assenza di letalità sesso-specifica riscontrata con l'RNAi. Per tentare di spiegare questa apparente contraddizione, è necessario tenere conto che ciò che noi possiamo misurare è una letalità differenziale fra maschi e femmine e non una letalità assoluta. Si può ipotizzare che anche i trattati con RNAi subiscano, in analogia ai trattati con la chaetocina, una significativa diminuzione di embrioni maschili, a causa dell'assenza di SU(VAR)3-9-like e quindi della sua attività metilasica a carico della K9 H3, compensata però da un pari livello di decremento di embrioni femminili, tale da determinare

l'assenza di letalità sesso-specifica. La letalità femmina-specifica a carico degli embrioni trattati con RNAi potrebbe essere spiegata da una funzione di SU(VAR)3-9-like, non legata alla sua attività di metilasi istonica, che è essenziale solo per le femmine. Negli embrioni femminili trattati con chaetocina non si registra un analogo tasso di mortalità preferenziale in quanto tale trattamento inibisce esclusivamente l'attività metiltrasferasica di SU(VAR)3-9-like, lasciandone inalterate eventuali altre funzioni. In assenza di ulteriori dati e verifiche, questa ipotesi va considerata solo una delle possibili spiegazioni del fenomeno.

In conclusione, questi dati gettano nuova luce sul ruolo della metilazione della lisina 9 dell'istone H3 nel processo di rimodellamento della cromatina che accompagna l'eterocromatizzazione facoltativa. Il dato più innovativo riguarda la quasi totale sovrapposizione degli effetti della deprivazione di SU(VAR)3-9 e di quella di HP1-like. Continuando con questi studi, in un futuro prossimo ci proponiamo di ottenere un modello circa l'azione spazio-temporale della metiltransferasi SU(VAR)3-9-like nel regolare l'eterocromatizzazione facoltativa in *Planococcus citri*.

La presenza, negli embrioni privati di SU(VAR)3-9 o della sua attività, di metafasi mitotiche irregolari fa inoltre intravedere un ruolo della metilazione della lisina 9 dell'istone H3 nelle alterazioni del normale processo mitotico.

6. Bibliografia

- Aagaard, L., Laible, G., Selenco, P., Schmid, M., Dorn, R., Schotta, G., Kuhfittig, S., Wolf, A., Lebersorger, A., Singh, P.B., Reuter, G. and Jenuwein, T. (1999).
Functional mammalian homologues of the Drosophila PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins that complex with the heterochromatin component M31.
EMBO J. 18: 1923-1938.
- Adams, R.L. (1995).
Eucariotic DNA methyltransferases - structure and function.
Bioessays 2: 139-145.
- Armstrong, S.J., Hulten, M.A., Keohan, A.M. and Thomson, E.M. (1997).
Different strategies of X-inactivation in germinal and somatic cells: histone H4 underacetylation does not mark the inactive X chromosome in the mouse male germline.
Exp. Cell Res. 230: 399-402.
- Ashburner, M. (1989).
Drosophila: A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ayoub, N., Richler, C. and Wahrman, J. (1997).
Xist RNA is associated with the transcriptionally inactive XY body in mammalian male meiosis.
Chromosoma 106: 1-10.
- Ballabio, A. and Willard, H.F. (1992).
Mammalian X-chromosome inactivation and the Xist gene.
Current Opinion in Genetics and Development 2: 439-447.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. and Kouzarides, T. (2001).
Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain.
Nature 410: 120-124.
- Barr, M.L. (1960).
Sexual dimorphism in interphase nuclei.
Am. J. Hum. Genet. 12: 118-27.
- Bartova, E., Krejčí, J., Harničarová, A., Galiová, G. and Kozubek, S. (2008).
Histone modification and nuclear architecture: A review.
JHC DOI: 10.1369/jhc.2008.951251
- Baumbusch, L.O., Thorstensen, T., Krauss, V., Fischer, A., Naumann, K., Assalkhou, R., Schulz, I., Reuter, G. and Aalen, R.B. (2001).
The Arabidopsis thaliana genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes.
Nucleic Acids Res. 29: 4319-4333.

- Belmont, A. (2003).
Dynamics of chromatin, proteins, and bodies within the cell nucleus.
Current Opinion in Cell Biology. 15:304-310.
- Bender, J. (1998).
Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing.
Trends Biol. Sci. 23: 252-256.
- Bestor, T.H. (1999).
Sex brings transposons and genomes into conflict.
Genetica 107: 289-295.
- Bestor, T.H. (2000).
The DNA methyltransferases of mammals.
Hum. Mol. Genet. 9: 2395-2402.
- Bird, A. (2002).
DNA methylation patterns and epigenetic memory.
Genes Dev. Jan1; 16(1): 6-21.
- Bongiorni, S., Cintio, O. and Prantera, G.(1999).
The relationship between DNA methylation and chromosome imprinting in the Coccid, Planococcus citri.
Genetics 151: 1471-1478.
- Bongiorni, S., Mazzuoli, M., Masci, S. and Prantera, G. (2001).
Facultative heterochromatization in parahaploid male mealybugs: involvement of a heterochromatin-associated protein.
Development 128: 3809-3817.
- Bongiorni, S. and Prantera, G. (2003).
Imprinted facultative heterochromatization in mealybugs.
Genetica 117(2): 271-279.
- Bongiorni, S., Pasqualini, B., Taranta, M., Singh, P.B. and Prantera, G. (2007).
Epigenetic regulation of facultative heterochromatinisation in Planococcus citri via the Me(3)K9H3-HP1-Me(3)K20H4 pathway.
J. Cell Sci. 120: 1072-1080.
- Brehm, A., Tufteland, K.R., Aasland, R. and Becker, P.B. (2004).
The many colors of chromodomains.
Bioessays 26: 133-140.
- Brinkman, A.B., Roelofsen, T., Pennings, S.W.C., Martens, J.H.A., Jenuwein, T. and Stunnenberg, H.G. (2006).
Histone modification patterns associated with the human X chromosome.
EMBO reports 7(6): 628-634.

- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., Swift, S. and Rastan, S. (1992).
The product of the mouse Xist gene is a 15kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus.
 Cell 71: 515-526.
- Brockdorff, N. (2002).
X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind Xist RNA.
 Trends Genet. 18(7): 352-358.
- Brown, S.W. and Nur, U. (1964).
Heterochromatic Chromosomes in the Coccids.
 Science 145: 130-136.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2003).
Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome.
 Hum. Mol. Genet. 12(17): 2167-2178.
- Chadwick, B.P. and Willard, H.F. (2004).
Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome.
 PNAS 101(50): 17450-17455.
- Chevillard, C., Reik, W., McDermott, M., Fontes, M., Mattei, M.G. and Singh, P.B. (1993).
Chromosomal localization of human homologs of the Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1) gene.
 Mamm. Genome 4(2): 124-126.
- Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., Di Fiore, P.P. and Bonapace, I.M. (2004).
Np95 is a histone-binding protein endowed with ubiquitin ligase activity.
 Mol. Cell Biol. 24: 2526-2535.
- Cloos, P.A.C., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H. and Helin, K. (2006)
The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3.
 Nature 442(7100): 307-311.
- Colot, V. and Rossignol, J.L. (1999).
Eucariotic DNA methylation as an evolutionary device.
 Bioessays 21: 402-411.
- Costello, J.F. and Plass, C. (2001).
Methylation matters.
 J. Med. Genet. 38: 285-303.

Cowell, I.G., Aucott, R., Mahadevaiah, S.K., Burgoyne, P.S., Huskisson, N., Bongiorni, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Wu, R., Gilbert, D.M., Shi, W., Fundele, R., Morrison, H., Jeppersen, P. and Singh, P.B. (2002).

Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals.
Chromosoma 111: 22-36.

Crouse, H. V. (1960).

The controlling element in sex chromosome behaviour in Sciara.
Genetics 45: 1429-1443.

Davey, C., Pennings, S. and Allan, J. (1997).

CpG methylation remodels chromatin structure in vitro.
J. Mol. Biol. 267: 276-288.

Delattre, M., Spierer, A., Jaquet, Y. and Spierer, P. (2004).

Increased expression of Drosophila Su(var)3-7 triggers Su(var)3-9-dependent heterochromatin formation.
J. Cell Sci. 117: 6239-6247.

Donaldson, K.M. and Karpern, G.H. (2002).

Modifiers of terminal deficiency-associated position effect variegation in Drosophila.
Genetics, 160(3): 995-1009.

Ehrmann, I.E., Ellis, P.S., Mazeyrat, S., Duthie, S., Brockdorff, N., Mattei, M.G., Gavin, M.A., Affara, N.A., Brown, G.M., Simpson, E., Mitchell, M.J. and Scott, D.M. (1998).

Characterization of genes encoding translation initiation factor eIF-2 γ in mouse and human: sex chromosome localization, escape from X-inactivation and evolution.
Hum. Mol. Genet. 7: 1725-1737.

Eissenberg, J.C. and Elgin, S.C.R. (2000).

The HP1 protein family: getting a grip on chromatin.
Curr. Opin. in Genetics & Development 10: 204-210.

Eissenberg, J.C., Lee, M.G., Schneider, J., Ilvarsonn, A., Shiekhata, R. and Shilatifard, A. (2007).

The trithorax-group gene in Drosophila little imaginal discs encodes a trimethylated histone H3 Lys4 demethylase.
Nat. Struct. Mol. Biol., 14: 344-346.

Ekwall, K., Nimmo, E.R., Javerzat, J.P., Borgstrom, B., Egel, R., Cranston, G. and Allshire, R. (1996).

Mutations in the fission yeast silencing factors clr4+ and rik+ disrupt the localisation of the chromo domain protein Swi6p and impair centromere function.
Cell Sci. 109: 2637-2648.

Eskeland, R., Czermin, B., Boeke, J., Bonaldi, T., Regula, J.T. and Imhof, A. (2004).

The N-terminus of Drosophila SU(VAR)3-9 mediates dimerization and regulates its methyltransferase activity.
Biochemistry 43: 3740-3749.

- Field, L.M., Lyko, F., Mandrioli, M. and Pranter G. (2004).
DNA methylation in insects.
Insect Mol Biol. 13(2):109-15.
- Fischle, W., Wang, Y. and Allis, C.D. (2003).
Histone and chromatin cross-talk.
Curr. Opin. Cell Biol. 15: 172-183.
- Gartler, S.M. and Goldman, M.A. (1994).
Reactivation of inactive X-linked genes.
Dev. Genet. 15: 504-514.
- Geraghty, M.T., Brody, L.C., Martin, L.S., Marble, M., Kearns, W., Pearson, P., Monaco, A.P., Lehrach, H. and Valle, D. (1993).
The isolation of cDNAs from OATL1 at Xp11.2 using a 480-kb YAC.
Genomics 16: 440-446.
- Grant, S.G. and Chapman, V.M. (1988).
Mechanism of X-chromosome regulation.
Annu. Rev. Genet. 22: 199-233.
- Graves, J.A. (1982).
5-Azacytidine-induced re-expression of alleles on the inactive X chromosome in a hybrid mouse cell line.
Exp. Cell Res. 141: 99-105.
- Greil, F., van der Kraan, I., Delrow, J., Smothers, J.F., de Wit, E., Bussemaker, H.J., van Driel, R., Henikoff, S. and van Steensel, B. (2003).
Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location.
Genes Dev. 17: 2825-2838.
- Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E. and Imhof, A. (2005).
Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9.
Nature Chemical Biology 1: 143-145.
- Hamvas, R.M., Reik, V., Gaunt, S.J., Brown, S.D. and Singh, P.B. (1992).
Mapping of a mouse homolog of a heterochromatin protein gene the X chromosome.
Mamm. Genome 2(1): 72-75.
- Heitz, E. (1928).
Das heterochromatin der moose.
I. Jahrb. Wiss. Botanik 69: 762-818.
- Hendrich, B. and Tweedie, S. (2003).
The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals.
Trends Genet. 19: 269-277.

- Hoyer-Fender, S., Costanzi, C. and Pehrson, J.R. (2000).
Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachitene stage of spermatogenesis.
 Exp. Cell Res 258(2): 254-260.
- Hughes-Schrader, S. (1935).
The chromosome cycle of Phenacoccus (Coccidae).
 Biol. Bull. 69: 462-468.
- Ivanova, A.V., Bonaduce, M.J., Ivanov, S.V. and Klar, A.J.S. (1998).
The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast.
 Nat. Genet. 19: 192-195.
- James, T.C. and Elgin, S.C.R. (1986).
Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene.
 Molecular and Cellular Biology. Nov.: 3862-3872.
- James, T.C., Eissenberg, J.C., Craig, C., Dietrich, V., Hobson, A. and Elgin, S.C.R. (1989).
Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of Drosophila.
 Eur. J. Cell Biol. 6: 3862-3872.
- Jeltsch, A. (2002).
Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases.
 Chem Bio Chem 3: 274-293.
- Jenuwein, T. and Allis, D.C. (2001).
Translating the Histone Code.
 Science 293: 1074-1080.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J.C., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J. and Wolffe, A.P. (1998).
Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription.
 Nature Gen 19: 187-191.
- Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006).
The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36.
 Nature 442(7100): 312-316.
- Kohlmaier, A., Savarese, F., Lachner, M., Martens, J., Jenuwein, T. and Wuts, A. (2004).
A chromosomal memory triggered by XIST regulates histone methylation in X inactivation.
 PLoS Biol. 2: E171.
- Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D.M., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Shi, W., Fundele, R. and Singh, P.B. (2004).
Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals.
 J. Cell Sci. 117: 2491-2501.

- Kourmouli, N., Sun, Y.M., van der Sar, S., Singh, P.B. and Brown, J.P. (2005).
Epigenetic regulation of mammalian pericentric heterochromatin in vivo by HP1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 337: 901-907.
- Kralewski, M., Novello, A. and Bennavente, R. (1997).
A novel Mr 77,000 protein of the XY body of mammalian spermatocytes: its localization in normal animals and in Searle's translocation carriers.
Chromosoma 106: 160-167.
- Krauss, V. and Reuter, G. (2000).
Two Genes Become One: The Genes Encoding Heterochromatin Protein SU(VAR)3-9 and Translation Initiation Factor eIF-2 γ Are Joined to a Dicistronic Unit in Holometabolic Insects.
Genetics 156: 1157-1167.
- Krauss, V., Fassl, A., Fiebig, P., Patties, I. and Sass, H. (2006).
The evolution of the histone methyltransferase gene Su(var)3-9 in metazoans includes a fusion with and a re-fission from a functionally unrelated gene.
BMC Evol. Biol. 6: 18; doi:10.1186/1471-2148-6-18.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. and Jenuwein, T. (2001).
Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins.
Nature 410: 116-120.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J. and Jenuwein, T. (2003).
An epigenetic road map for histone lysine methylation.
J. Cell Sci. 116: 2117-2124.
- Lee, N., Zhang, J., Klose, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S. and Zhang, Y. (2007).
The trithorax-group protein Lid is a histone H3 trimethyl-Lys4 demethylase.
Nat. Struct. Mol. Biol., 14: 341-343.
- Lewin, B. (1998).
The mystique of Epigenetics.
Cell 93: 301-303.
- Lewin, B. (2002).
"I nucleosomi"
In II gene VI Cap.27: 665-699.
- Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992).
Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.
Cell 69: 915-926.
- Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R. (1993).
Role for DNA methylation in genomic imprinting.
Nature 366: 362-365.
- Lloret-Llinares, M., Carrè, C., Vaquero, A.Q., de Olano, N. and Azorin, F. (2008).
Characterization of Drosophila melanogaster JmjC+N histone demethylases.
Nucleic Acids Research 36(9): 2852-2863.

- Lock, L.F., Takagi, N. and Martin, G.R. (1987).
Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation.
Cell 48(1): 39-46.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997).
Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.
Nature, 389: 251–260.
- Lyon, M.F. (1962).
Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome.
Am. J. Hum. Genet. 14: 135-48.
- Mazzuoli, M., Bongiorno, S., Natoni, F. e Prantera, G. (1999).
“Attività dei geni ribosomali nei set aploidi eucromatico ed eterocromatico in *Planococcus citri* (Homoptera-Coccoidea)”
1° Convegno FISV (Federazione Italiana Scienze della Vita).
- Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenco, P., Laible, G. and Jenuwein, T. (2000).
Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation and mitotic progression.
Mol. Cell Biol. 20: 3728-3741.
- Melcher, M., Schmid, M., Aagaard, L., Selenko, P., Laible, G. and Jenuwein, T. (2000).
Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression.
Mol. Cell Biol. 20: 3728-3741.
- Metzler-Guillemain, C., Luciani, J., Depetris, D., Guichaoua, M.R. and Mattei, M.G. (2003).
HP1β and HP1γ, but not HP1α, decorate the entire XY body during human male meiosis.
Chromosome Research 11: 73-81.
- Mis, J., Ner, S.S. and Grigliatti, T. (2006).
Identification of three histone methyltransferases in Drosophila: dG9a is a suppressor of PEV and is required for gene silencing.
Mol. Gen. Genomics: DOI 10.1007/s00438-006-0116-x.
- Mohandas, T., Sparkes, R.S. and Shapiro, L.J. (1981).
Reactivation of an inactive human X chromosome: Evidence for X inactivation by DNA methylation.
Science 211: 393-396.
- Motzkus, D., Singh, P.B. and Hoyer-Fender, S. (1999).
M31, a murine homolog of drosophila HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis.
Cytogenet. Cell genet. 86: 83-88.
- Murchardt, C., Guilleme, M., Seeler, J.S., Trouche, D., Dejean, A. and Yaniv, M. (2002).
Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 (alpha).
EMBO Rep 3(10): 975-981.

- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. and Grewal, S.I.S. (2001).
Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly.
Science 292: 110-113.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N. and Bird, A. (1998).
Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.
Nature 393: 386-389.
- Nelson-Rees. (1960).
A study of sex predetermination in mealybug Planococcus citri (Risso).
J Exp Zool. 144: 111-37.
- Nur, U. and Chandra, H.S.(1963).
Interspecific hybridization and gynogenesis in mealybugs.
Am Naturalist 97: 197-202.
- Nur, U. (1967).
Reversal of heterochromatinization and the activity of the paternal chromosome set in the male mealybug.
Genetics 56: 375-389.
- Nur, U. (1990).
Heterochromatinization and eucromatinization of whole genome in scale insects (Coccoidea: Homoptera).
Development, Supplement: 29-34.
- O' Carroll D., Scherthan, H., Peters, A.H., Opravil, S., Haynes, A.R., Laible, G., Rea, S., Schmid, M., Lebersorger, A., Jerratsch, M., Sattler, L., Mattei, M.G., Denny, P., Brown, S.D., Schweizer, D. and Jenuwein, T. (2000).
Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis -specific expression.
Mol. Cell Biol. 20(24): 9423-9433.
- Panning, B. and Jaenisch, R. (1996).
DNA hypomethylation can activate Xist expression and silence X-linked genes.
Genes Dev. 10: 1991-2002.
- Perche, P.Y., Voure'h, C., Konecny, L., Souchier, C., Robert-Nicoud, M., Dimitrov, S. and Khochbin, S. (2000).
Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density.
Curr. Biol. 10(23): 1531-1534.
- Peters, A.H.F.M., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A.H.A, Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H.A. and Jenuwein, T. (2003).
Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin.
Mol. Cell 12: 1577-1589.

- Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D.A. and Panning, B. (2002).
Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation.
Annu. Rev. Genet. 36: 233-278.
- Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drossou, V., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B., Giannakouros, T. and Georgatos, S.D. (2001).
Acetylation-dependent associations of histones H3/H4 with HP1.
EMBO Rep 2: 290-295.
- Powers, J.A. and Eissenberg, J.C. (1993).
Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding.
J. Cell Sci. 1209: 291-299.
- Razin, A. and Cedar, H. (1994).
DNA methylation and genomic imprinting.
Cell 77(4): 473-6.
- Rea, S., Eiosenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T. (2000).
Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases.
Nature 406: 593-599.
- Reik, W., Dean, W. and Walter, J. (2001).
Epigenetic reprogramming in mammalian development.
Science 293: 1089-1093.
- Reuter, G., and Wolff, I. (1981).
Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in Drosophila melanogaster.
Mol. Gen. Genet., 182(3): 516-519.
- Reuter, G. and Spierer, P. (1992).
Position-effect variegation and chromatin proteins.
Bioessays 14: 605-612.
- Rice, J.C., Briggs, S.D., Ueberheide, B., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Shinkai, Y. and Allis, C.D. (2003).
Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains.
Mol. Cell 12: 1591-1598.
- Richards, E.J. and Elgin, S.C.R. (2002).
Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects.
Cell 108: 489-500.
- Rougeulle, C., Chaumeil, J., Sarma, K., Allis, C.D., Reinberg, D., Avner, D. and Heard, D. (2004).
Differential Histone H3 Lys-9 and Lys-27 Methylation Profiles on the X Chromosome.
MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 24(12): 5475-5484.

- Salido, E.C., Yen, P.H., Mohandas, T.K. and Shapiro, L.J. (1992).
Expression of X-inactivation-associated gene Xist during spermatogenesis.
Nat. Genet. 2: 196-199.
- Sarraf, S.A. and Stancheva, I. (2004).
Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly.
Mol. Cell 15: 595-605.
- Schotta, G. and Reuter, G. (2000).
Controlled expression of tagged protein in Drosophila using a new modular P-element vector system.
Mol. Gen. Genet. 262: 916-920.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. and Reuter, G. (2002).
Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing.
EMBO J. 21: 1121-1131.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D. and Jenuwein, T. (2004).
A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin.
Genes Dev. 18: 1251-1262.
- Schultz, D., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. and Rauscher, F. (2002).
SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins.
Genes Dev. 16: 919-932.
- Secombe, J., Li, L., Carlos, L., and Eisenman, R.N. (2007).
The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth.
Genes Dev., 21: 537-551.
- Seum, C., Bontron, S., Reo, E., Delattre, M. and Spierer, P. (2007)
Drosophila G9a is a nonessential gene.
Genetics 177(3): 1955-7.
- Sinclair, D.A.R., Mottus, R.C. and Grigliatti, T.A. (1983).
Genes which suppress position effect variegation in Drosophila melanogaster are clustered.
Mol. Gen. Genet., 191: 326-333.
- Singh, P.B., Miller, J.R., Pearce, J., Kothary, R., Burton, R.D., Paro, R., James, T.C. and Gaunt, S.J. (1991).
A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants.
Nucleic Acid Res. 19: 789-794.

- Smith, A. and Benavente, R. (1992).
Meiosis specific protein selectively associated with sex chromosomes of rat pachitene spermatocytes.
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6938-6942.
- Solari, A.J. (1974).
The behavior of the XY pair in mammals.
 Int. Rev. Cytol. 38: 273-317.
- Solter, D. (1988).
Differential imprinting and expression of maternal and paternal genome.
 Annu Rev Genet. 22: 127- 146.
- Spotswood, H.T. and Turner, B.M. (2000).
An increasingly complex code.
 J Clin Invest. 110(5): 577-582.
- Stabell, M., Eskeland, R., Bjørkmo, M., Larsson, J., Aalen, R.B., Imhof, A. and Lambertsson, A. (2006)
The Drosophila G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development.
 Nuc. Acid Res. 34(16): 4609-4621.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000).
The language of covalent histone modifications.
 Nature, 403: 41–45.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. and Shinkai, Y. (2001).
Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3.
 J. Biol. Chem. 276:25309–25317.
- Thon, G., Cohen, A. and Klar, A.J.S. (1994).
Three additional linkage groups that repress transcription and meiotic recombination in the mating-type region of Schizosaccharomyces pombe.
 Genetics 138: 29-38.
- Tremblay, E., (1972).
La carilogia nella sistematica delle cocciniglie (Homoptera:Coccoidea).
 Estratto dagli Atti del IX Congresso Nazionale di Entomologia. Siena 21-25 Giugno 1972.
- Triebel, R.C., Beach, B.M., Dirk, L.M., Houtz, R.L. and Hurley, J.H. (2002).
Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase.
 Cell 111: 91-103.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G. (1994).
The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes.
 EMBO J. 13: 3822-3831.

- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006).
Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins.
Nature 439: 811-816.
- Turner, J.M., Mahadevaiah, S.K., Benavente, R., Offenberg, H.H., Heyting, C. and Burgoyne, P.S. (2000).
Analysis of male meiotic “sex body” proteins during XY female meiosis provides new insights into their functions.
Chromosoma 109(6): 426-432.
- Turner, J.M., Burgoyne, P.S. and Singh, P.B. (2001).
M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis.
J. Cell Sci. 115(Pt 18): 3367-3375.
- Tzeng, T., Lee, C., Chan, L. and Shen, C.K.J. (2007).
Epigenetic regulation of the Drosophila chromosome 4 by the histone H3K9 methyltransferase dSETDB1.
PNAS 104(31): 12691-12696.
- Vakoc, C.R., Mandat, S.A., Olenchok, B.A. and Blobel, G.A. (2005).
Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin.
Mol. Cell 19: 381-391.
- van Holde, K.E. (1988).
Chromatin.
New York: Springer Verlag.
- Vaquero, A., Loyola, A. and Reinberg, D. (2003).
The constantly changing face of chromatin.
Science’s SAGE KE, <http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/sageke;2003/14/re4>.
- Venolia, L., Gartler, S.M., Wasserman, E.R., Yen, P., Mohandas, T. and Shapiro, L.J. (1982).
Transformation with DNA from 5 azacytidine-reactivated X chromosomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 2352-2354.
- Walsh, C.P. and Bestor, T.H. (1999).
Cytosine methylation and mammalian development.
Genes Dev. 13: 26-34.
- Wallrath, L.L. (1998).
Unfolding the mysteries of heterochromatin.
Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 147-153.
- Weiler, K.S. and Wakimoto, B.T. (1995).
Heterochromatin and gene expression in Drosophila.
Annu. Rev. Genet. 29: 577-605. Review.

Wilson, J.R., Jing, C., Walker, P.A., Martin, S.R., Howell, S.A., Blackburn, G.M., Gamblin, S.J. and Xiao, B. (2002).

Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9.
Cell 111: 105-115.

Wolffe, A.P., Jones, P.L. and Wade, P.A. (1999).

DNA demethylation.

Proc Natl Acad Sci USA 96: 5894-5896.

Wreggett, K.A., Hill, F., James, P.S., Hutchings, A., Butcher, G.W. and Singh, P.B.(1994).

A mammalian homologue of Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin.

Cytogenet. Cell Genet.66(2): 99-103.

Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y.I., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J. and Zhang, Y. (2006).

JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor.

Cell 125: 483-495.

Yoder, J.A., Walsh, C.P. and Bestor, T.H. (1997).

Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites.

Trends Genet. 13: 335-340.

Yoon, J., Lee, K., Park, J., Yu, K., Paik, S. and Kang, Y. (2008)

dSETDB1 and SU(VAR)3-9 Sequentially Function during Germline-Stem Cell Differentiation in Drosophila melanogaster.

PloS ONE 3(5): e2234.

Zhang, X., Tamaru, H., Khan, S.I., Horton, J.R., Keefe, L.J., Selker, E.U. and Cheng, X. (2002).

Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase.

Cell 111: 117-127.

Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C.D. and Eissenberg, J.C. (2000).

Heterochromatin protein 1 (HP1) binds to nucleosomes and DNA in vitro.

J. Biol. Chem. 275: 28332-28338.