



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

TESI DI LAUREA

in

SCIENZE BIOLOGICHE

B cromosomi nel genere *Drosophila*

B chromosomes in the *Drosophila* genus

Tesi di Laura di:

FRANCESCO PETRACCIA

Docente Relatore:

MARIA ASSUNTA BISCOTTI

Sessione autunnale 2020

Anno accademico 2019/2020

Studiando il genere *Drosophila*, delle 1600 specie documentate, solo 9 presentavano cromosomi soprannumerari.

-la *D. albomicans* presenta fino a 3 copie di cromosomi B

-la *D. kikkawai* presenta 2 tipologie di cromosomi B più grandi e sono presenti fino a 4 copie

-nei cromosomi di *D. subsilvestris* c'è il DNA satellite eterocromatico pSsP216

-a causa dell'alta variabilità cariotipica di *D. pseudoananassae* il riconoscimento di cromosomi soprannumerari come cromosomi B è ancora incerta

Year Reported	<i>Drosophila</i> Species	Location of Sample Collection	Reference
1980	<i>D. albomicans</i> ¹	Chiang Mai, Thailand	[16,17]
1983	<i>D. malerkotliana</i>	Multiple locations in Southeast Asia	[18]
1994	<i>D. kikkawai</i>	Bhubaneswar, India	[19]
1995	<i>D. subsilvestris</i>	Tübingen, Germany	[20]
2007	<i>D. lini</i>	Malipo county, Yunnan province, China	[21]
2007	<i>D. pseudoananassae</i>	Jianfengling, Hainan province, China	[21]
2009	<i>D. yangana</i> ²	Loja province, Ecuador	[22]
2009	<i>D. huancavilcae</i> ²	Manabí province, Ecuador	[22]
2014	<i>D. melanogaster</i>	Domesticated laboratory stock	[12]

¹ Also referred to as *D. nasuta albomicana*. ² B chromosomes reported but not cytologically recorded.

Drosophila melanogaster

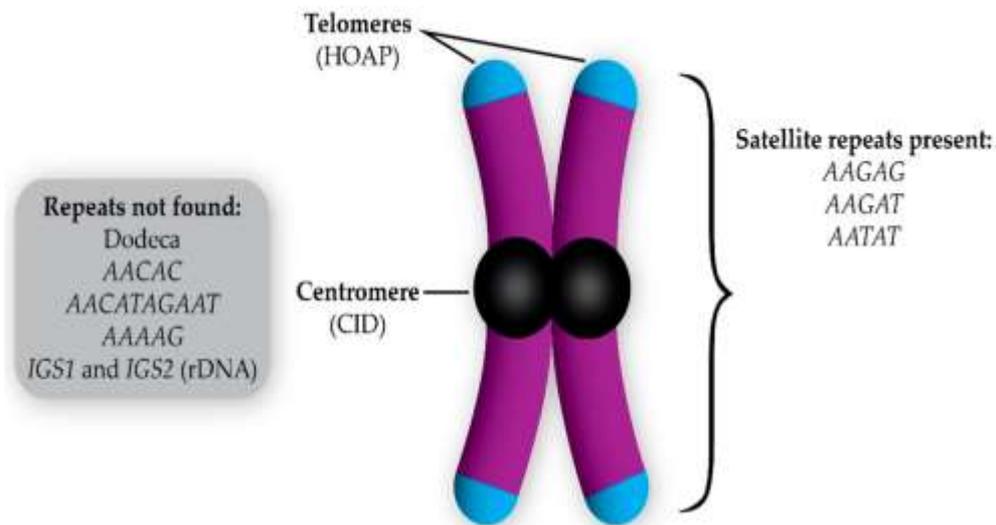
Prime tracce di cromosomi B trovate in campioni con mutazioni nulle di *matrimony*.

Tramite immunofluorescenza con anticorpi specifici per l'identificatore centromerico (CID) degli istoni ne sono stati ritrovati frammenti vicino al fuso mitotico.

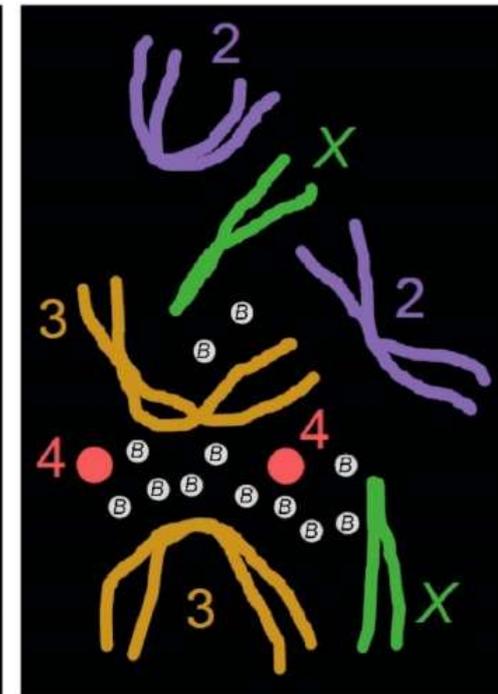
Questi frammenti presentavano sulla superficie una metilazione H3K9, tipica della cromatina silenziata.

La presenza di HOAP in questi corpi rivela la presenza di telomeri.

Queste informazioni hanno portato gli studiosi a classificare questi elementi soprannumerari come cromosomi B



(a)



(b)

COMPOSIZIONE DEI CROMOSOMI B

Tramite FISH è stato possibile analizzare la composizione dei cromosomi B rivelando la presenza di diverse sequenze di DNA satellite.

Sequenze

Non condivise dai cromosomi A

-Dodeca (cromosoma 3)

-AACAC (cromosomi 2 e Y),

-AACATAGAAT (cromosomi 2 e 3),

-AAAAG (cromosomi 2 e Y)

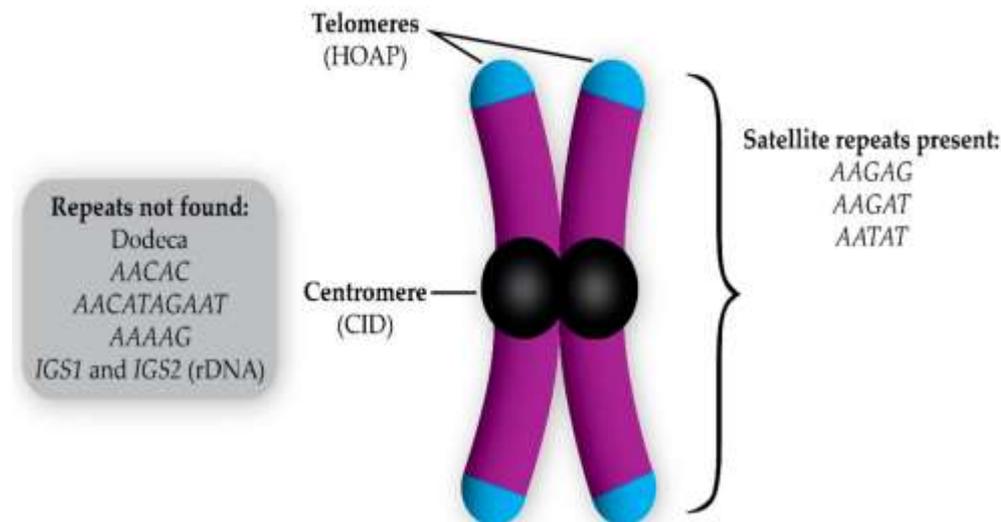
-distanziatore intergenico (IGS) (cromosomi X e Y)

Condivise dai cromosomi A

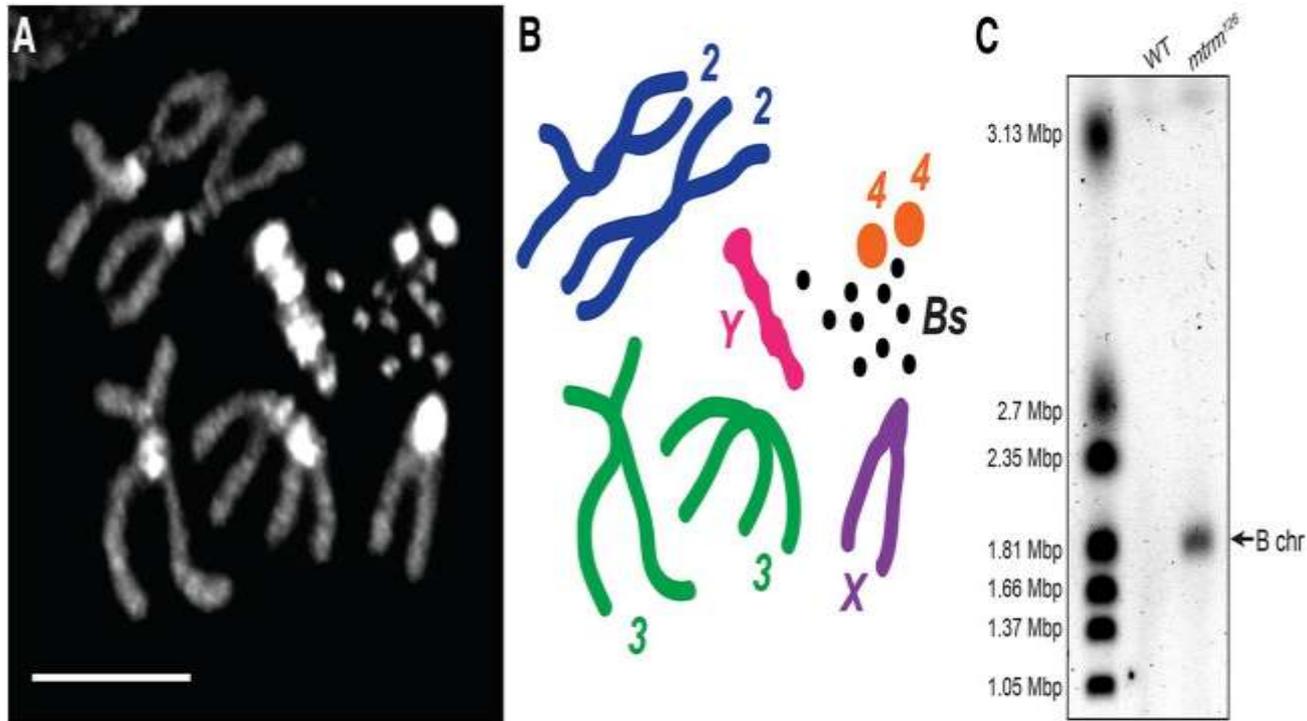
-AATAT (cromosomi 4, X e Y)

- AAGAG (tutti cromosomi)

-AAGAT (cromosoma 4)



Si sostiene che essendo AAGAT la sequenza più ripetuta nei cromosomi B essi si siano originati dal cromosoma 4 essendo l'unico a possederla.



Per ricavare più informazioni sulla composizione i cromosomi B sono stati separati dai cromosomi A tramite PFGE (Elettroforesi su gel a campo alternato).

La grandezza dei cromosomi B è riconducibile intorno a 1.8 Mbp.

La banda di DNA corrispondente ai cromosomi B è stata successivamente prelevata e sottoposta ad ulteriori analisi in assenza di cromosomi A

Sono stati riscontrati diversi elementi genetici associabili alla eterocromatina di cui grosse porzioni di sequenze che corrispondevano a elementi presenti sul cromosoma 4

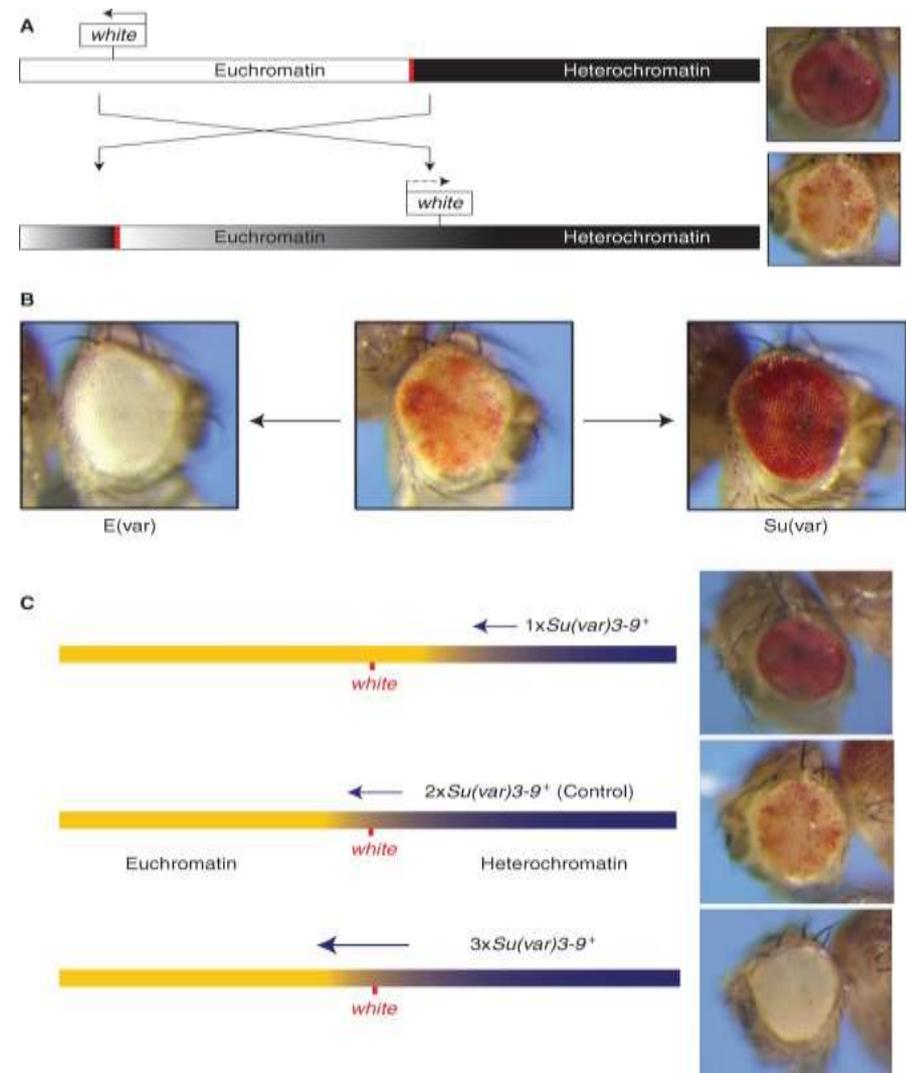
Effetti dei cromosomi B

In presenza di alti numeri di cromosomi B durante la meiosi femminile la segregazione del cromosoma 4 viene interrotta.

La somiglianza tra i due tipi di cromosomi potrebbe modificare la formazione di associazioni eterocromatiniche all'inizio della meiosi o ostruire il crossing over.

I cromosomi B possono anche influenzare la variegazione per effetto di posizione (PEV).

Il meccanismo non è chiaro ma pare che grosse quantità di eterocromatina possano funzionare da silenziatori per i geni vicini diminuendo il numero di variegazioni.



INCOGNITE

Esistono ancora fattori ignoti sulla natura dei cromosomi B:

-il meccanismo con cui si sono originati dal cromosoma 4 è ancora poco noto.

Si teorizza che si siano formati da una errata segregazione centromerica del cromosoma 4 a causa di un eccesso di sequenze AAGAT dei cromosomi B.

Si potrebbero marcare le estremità di un cromosoma 4 per controllare il processo.

Drosophila si presta come ottimo modello avendo a disposizione diverse tecniche di marcatura e la possibilità di colture

-Non si sa se il processo sia stato fortuito o se la specie sia stato un fattore determinante.

Uno studio più approfondito del gene *matrimony* potrebbe chiarirne l'origine

INCOGNITE

-Come è stato possibile che un numero così elevato di cromosomi B si sia mantenuto nel tempo?

In molti organismi i cromosomi B promuovono la propria propagazione alle generazioni successive ma non nel caso di *Drosophila*.

Si è dedotto che sia il background genetico dell'insetto a permettere il mantenimento dei cromosomi B anche dopo diverse generazioni.

Pare che l'interruzione dell'attività di *matrimony* modifichi la segregazione durante il processo di meiosi dei geni che non formano crossing-over, come i cromosomi B.

Per fare chiarezza su questo meccanismo basterebbe lavorare su campioni di ovociti di *Drosophila* utilizzando tecniche di fluorescenza monitorando la segregazione dei geni.

Drosophila come modello

In conclusione la *Drosophila* si presterebbe come un ottimo modello sperimentale

Abbondanza di strumenti genici e genomici

Possibilità di monitorare diverse generazioni in poco tempo

Colture facili da allevare in laboratorio

Database bioinformatico molto vasto

Similarità tra cromosomi B in *Drosophila* e uomo che in quest'ultimo possono causare sindromi e infertilità

1-introduzione

I cromosomi B, inizialmente scoperti nel 1906 da Wilson nell'insetto emittero *Metapodium*, sono cromosomi soprannumerari non essenziali, presentano principalmente eterocromatina, non sono ereditati in modo mendeliano, non si appaiano o ricombinano durante la meiosi e sono stati identificati al giorno d'oggi in diverse specie. La comprensione di questi cromosomi è in continuo cambiamento grazie alla maggior accessibilità a tecniche molecolari e genomiche avanzate con cui è possibile verificare la presenza di materiale genetico attivo o di elementi ripetitivi nei cromosomi B. Uno dei problemi più grandi però è la mancanza di organismi modello facilmente studiabili in laboratorio che permettano di collegare possibili effetti dei cromosomi B sul genotipo al fenotipo. Grazie alla recente scoperta di cromosomi B in esemplari di *Drosophila melanogaster* è stato possibile cominciare uno studio tramite analisi molecolare per comprendere meglio la loro origine, struttura e funzione. Di seguito esponiamo le specie in cui è stata rilevata la presenza di cromosomi soprannumerari nel genere *Drosophila* e mettiamo in evidenza alcune domande in sospeso nella biologia dei cromosomi B per le quali si stanno cercando delle risposte.

2-Cromosomi B nel genere *Drosophila*

Su oltre 1600 specie documentate all'interno del genere *Drosophila*, oltre 600 di queste sono state campionate per determinare la forma e il numero dei loro cromosomi. Ad oggi, i cromosomi B soprannumerari sono stati identificati in sole nove specie di *Drosophila*.

Della specie *D. albomicans*, raccolte intorno a Chiang Mai in Thailandia, sono stati studiati due ceppi differenti: il primo presentava cromosomi soprannumerari puntiformi da 1 a 2 copie mentre il secondo presentava fino a 3 copie di cromosomi B. Negli studi successivi si è registrato un aumento del numero di cromosomi B in individui coltivati in laboratorio: in 3 anni la percentuale di individui che trasportava almeno una copia di cromosoma B è passata dal 67% al 98% mentre gli individui che possedevano 3 o più copie è passata dal 5% al 40%. Successivi studi hanno dimostrato che i cromosomi B in *D. albomicans* promuovono la propria propagazione all'interno della popolazione. Sebbene un'analisi della composizione eterocromatica attraverso varie tecniche di colorazione abbia rivelato che i cromosomi B di *D. albomicans* differiscono dai cromosomi A, non sono state tratte conclusioni su come tali differenze possano influenzare la proliferazione del cromosoma B. Forse un esame più attento del recente genoma sequenziato di *D. albomicans* fornirà la chiave.

Campioni di *D. malerkotliana* e *D. kikkawai* sono state catturate rispettivamente nel sud-est asiatico e in India. Quest'ultima portava 2 varianti di cromosomi B considerevolmente più grandi rispetto a quelli in *albomicans* e *malerkotliana* mentre il numero massimo di copie raggiunte è stato 4.

La prima linea di *D. subsilvestris*, raccolte in Germania sudoccidentale, presentavano 5 cromosomi puntiformi simili al momento della cattura ma nei successivi 14 anni in laboratori sono stati persi mentre nella seconda linea è stato possibile ricondurli a cromosomi B dato che non subivano politenizzazione, indicando che fossero eterocromatici. Inoltre, i cromosomi B portano il DNA satellite eterocromatico pSsP216, che indica che potrebbero essere sorti dalla eterocromatina del centromero di un cromosoma A acrocentrico che porta anche questa ripetizione.

D. lini e *D. pseudoananassae*, raccolte in Cina, presentano cromosomi soprannumerari. Le dimensioni e la consistenza di quelli presenti in *D. lini* sono riconducibili a cromosomi B mentre per *D. pseudoananassae*, data la sua vasta variabilità del cariotipo, sarebbero necessari altri studi per sincerarsi che questi cromosomi siano effettivamente soprannumerari e non essenziali.

Le *D. yangon* e *D. huancavilcae*, raccolte in Ecuador, presentano cromosomi soprannumerari ma non sono citati citologicamente in letteratura.

Per ultima citiamo la *D. melanogaster* che si presta come ottimo organismo modello per questo studio data la vasta gamma di tecniche molecolari per poter studiare meglio la natura dei cromosomi B.

3.1-Caratterizzazione dell'originale cromosoma B di *Drosophila melanogaster*

Le prime tracce di cromosomi B sono state ritrovate in *Drosophila* che presentavano una mutazione nulla nella proteina Matrimony che inibisce l'azione della polo-chinasi durante la meiosi femminile. I cromosomi B, inizialmente confusi per un parassita batterico intracellulare (*Wolbachia*), sono stati individuati negli ovociti di *Drosophila* durante la prometafase meiotica.

Tramite l'immunofluorescenza (IF) con l'utilizzo di anticorpi specifici per identificare gli istoni centromerici (CID) in *Drosophila* sono stati ritrovati frammenti di CID all'interno di questi presunti batteri localizzati lungo il fuso mitotico. Questi ultimi presentavano sulla superficie una metilazione H3K9, tipica della cromatina silenziata. Dato che questi elementi presentavano centromeri, erano eterocromatici e di piccole dimensioni vennero classificati come cromosomi B.

Inoltre, sembra che questi frammenti possano anche avere telomeri come indicato dalla presenza di HOAP (HP1/ORC-associated protein) codificata da *cav* (caravaggio) che è una proteina di capping specifica dei telomeri in *Drosophila*.

Per studiare la composizione dei cromosomi B sono state usate sonde marcate tramite FISH (fluorescent in situ hybridization) rivelando la presenza di sequenze di DNA satellite che si trovano anche sui cromosomi A come l'AATAT (cromosomi 4, X e Y) e AAGAG (tutti cromosomi). Le sequenze ripetute dai cromosomi A che non sono state trovate sui cromosomi B sono state Dodeca (cromosoma 3), AACAC (cromosomi 2 e Y), AACATAGAAT (cromosomi 2 e 3), AAAAG (cromosomi 2 e Y) e il distanziatore intergenico (IGS) tra le ripetizioni del DNA ribosomiale (cromosomi X e Y)

Si sostiene che i cromosomi B provengano dal cromosoma 4 dato che la ripetizione satellite più frequente è AAGAT sono presenti in questo cromosoma.

Per ricavare più informazioni sulla composizione i cromosomi B sono stati separati dai cromosomi A tramite PFGE (Elettroforesi su gel a campo alternato).

La grandezza dei cromosomi B è riconducibile intorno a 1.8 Mbp e la banda di DNA corrispondente ai cromosomi B è stata estratta dal gel e sottoposta ad next-generation sequencing (NGS) in assenza dei cromosomi A. Anche se non sono state rilevate regioni geniche note, sono stati trovati numerosi elementi genetici più spesso associati all'eterocromatina (ad es. Trasposoni e sequenze ripetute di DNA satelliti) in cui una grande porzione era piena di sequenze ripetitive trovate anche sul cromosoma 4.

3.2-Effetti dei cromosomi B in *Drosophila melanogaster* sui cromosomi A

Recentemente è stata studiata una coltura di *D. melanogaster* che presentava intorno ai 10 cromosomi B per individuo senza variazioni importanti a livello fenotipico per i maschi ma si è notato che durante la meiosi femminile la segregazione del cromosoma 4 viene interrotta dai cromosomi B con un meccanismo non ancora conosciuto.

Questa interruzione può essere ricondotta alla somiglianza della sequenza eterocromatica tra il cromosoma 4 e i cromosomi B modificando la formazione di associazioni eterocromatiniche all'inizio della meiosi oppure i cromosomi B possono ingombrare l'azione del crossing over durante la meiosi.

I cromosomi B possono anche influenzare la variegazione per effetto di posizione (PEV).

Tramite un marcatore genetico visivo bianco (w), specifico per la pigmentazione dell'occhio, si ottiene un modello di occhio con colore variegato. Anche se il meccanismo di soppressione della PEV non è del tutto compreso si ritiene che grosse quantità di eterocromatina possano funzionare da silenziatori per i geni vicini diminuendo il numero di variegazioni.

È stato visto che i cromosomi B influenzano la PEV in più regioni del genoma, il che indica che la loro presenza può alterare i confini del silenziamento eterocromatico dei cromosomi A

4-Il cromosoma B in *D. melanogaster* come un modello emergente per la biologia del cromosoma B

Ogni cromosoma B ha una propria biologia e le domande più frequenti vertono sulla loro origini e sul loro mantenimento nel tempo all'interno del corredo cromosomico e il modello di *D. melanogaster* è un ottimo organismo per studiare meglio la natura di questi geni.

Le attuali analisi di cromosomi B in *D. melanogaster* dimostrano che si siano originati dal cromosoma 4 ma il meccanismo è ancora incerto. Si suppone si siano formati a causa di una errata segregazione centromerica del cromosoma 4 durante la meiosi data l'abbondante presenza di AAGAT nei cromosomi B. Questa ipotesi può essere chiarita creando e monitorando un cromosoma con le estremità marcate dopo numerosi eventi mitotici. *D. melanogaster* si dimostra un ottimo modello per questa operazione date le numerose tecniche molecolari di marcatura e la possibilità di monitorare in coltura diverse generazioni che presentano cromosomi B.

Una volta fatto questo si può studiare se il background genetico di Matrimony giochi un ruolo nella formazione dei cromosomi B dato che non si sa se la loro formazione sia stato un evento fortuito o se il genotipo originale della mosca abbia giocato un ruolo fondamentale.

Un'altra incognita è il fatto che un numero così alto di cromosomi B sia stato mantenuto per così tanto tempo. In altri sistemi i cromosomi B promuovono la propria propagazione alle generazioni successive tramite diversi meccanismi (Trasmissione e azionamento dei cromosomi B parassiti) ma non nel caso dei cromosomi B di *D. melanogaster* quindi è stato ipotizzato che sia proprio il background genico di questa specie a promuovere il mantenimento dei cromosomi soprannumerari. Nella meiosi femminile Matrimony controlla la corretta segregazione di cromosomi che non formano crossing-over e, dato che i cromosomi B in *Drosophila* non sembrano formare crossing-over, l'interruzione dell'attività di Matrimony può modificare la loro segregazione.

Per studiare meglio questo processo è sufficiente l'utilizzo di protocolli stabiliti o strumenti fluorescenti in campioni fissi.

In sintesi lo studio di questo sistema modello accelererà significativamente la nostra comprensione sui cromosomi B.

5-Conclusioni

Con il suo potente set di strumenti genetici e genomici, c'è molto da imparare sui cromosomi B di *D. melanogaster*. Studiare la biologia dei cromosomi B in un sistema modello così robusto e versatile fornirà informazioni su altri sistemi cromosomici B e su piccoli cromosomi soprannumerari (sSMC) trovati nell'uomo che possono essere dannosi per la nostra salute. Questi sSMC sono simili ai cromosomi B in molti modi e sono stati associati a varie sindromi, disabilità intellettive e infertilità. Pertanto, i cromosomi B in *D. melanogaster* sono un sistema modello promettente con scoperte che potrebbero potenzialmente avere valore sia per la biologia che per la medicina.