

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

**Dottorato di Ricerca in Biologia e Fisiologia Cellulare
Ciclo XIX**

**Settore scientifico disciplinare BIO/18 Genetica
Coordinatore: Prof.ssa Marialuisa Melli**

**Studio del controllo trascrizionale
del gene *VM32E* in *Drosophila*: analisi genetica
delle vie di segnalazione coinvolte**

**Presentata da:
Dott. Fabio Bernardi**

**Tutore:
Prof. Giuseppe Gargiulo**

Anno Accademico 2006/2007

INTRODUZIONE	3
Lo sviluppo dell'ovario.....	5
La formazione della camera ovarica.....	7
L'oocita e le cellule nutrici	10
Le cellule follicolari	11
La determinazione dell'asse di polarità antero-posteriore della camera ovarica	12
La determinazione dell'asse di polarità dorso-ventrale della camera ovarica	17
Controllo ormonale dell'oogenesi	18
La vitellogenesi	19
Gli involucri di rivestimento dell'uovo	20
La formazione della membrana vitellina	21
La formazione dello strato ceroso	22
La formazione del corion.....	23
La formazione delle strutture specializzate del corion	24
La stabilizzazione del guscio dell'uovo.....	26
La determinazione dell'asse antero-posteriore dell'embrione.....	27
Lo sviluppo delle strutture terminali dell'embrione.....	29
La determinazione dell'asse dorso-ventrale dell'embrione	31
MATERIALI E METODI.....	33
Terreno di coltura per l'allevamento di <i>Drosophila</i>	34
Terreno per la raccolta degli embrioni	34
Ceppi di <i>Drosophila</i> utilizzati.....	34
Bilanciatori e principali marcatori fenotipici.....	35
Espressione ectopica mediata dal fattore trascrizionale Gal4.....	36
Analisi clonale.....	37
Colorazione con Neutral red	38
Sintesi delle sonde a DNA marcate con digoxigenina	38
Ibridazione <i>in situ</i>	39
Immunoistochimica	40
Colorazione con DAPI.....	41
Anticorpi	41

PREMESSA SPERIMENTALE	43
RISULTATI.....	48
I profili di espressione dei geni della membrana vitellina sono conservati in <i>Drosophila pseudoobscura</i>	49
La via di segnalazione di Dpp reprime l'espressione di VM32E.....	51
La repressione di <i>VM32E</i> da parte di Dpp è mediata dalla regione centrale del promotore.....	56
Notch potrebbe mediare la repressione Dpp-dipendente di <i>VM32E</i> nelle cellule centripete.....	59
L'attivazione ectopica dell'Egfr altera l'espressione di <i>VM32E</i> nelle cellule del corpo principale.....	60
Il complesso EcR/Usp promuove l'espressione di <i>VM32E</i>	61
DISCUSSIONE.....	68
BIBLIOGRAFIA.....	73

INTRODUZIONE

Nel corso dello svolgimento del dottorato di ricerca mi sono occupato di vari progetti che riguardano lo studio dell'oogenesi di *Drosophila melanogaster*. Tale processo coinvolge diversi tipi cellulari, di origine sia somatica che germinale, dalla cui interazione si origina l'uovo e si determinano le future strutture embrionali. L'uovo di *Drosophila* è rivestito esternamente da un guscio, composto da cinque differenti strati e dotato di strutture specializzate, che permette all'embrione di svilupparsi nell'ambiente esterno una volta che l'uovo è deposto. I diversi rivestimenti che costituiscono il guscio si formano durante le fasi finali dell'oogenesi e i loro costituenti proteici sono prodotti dalle cellule follicolari che circondano l'oocita. Queste sono responsabili anche della morfogenesi delle strutture specializzate annesse al guscio, che comprendono appendici respiratorie, micropilo e opercolo. Ad oggi sono stati clonati vari geni che codificano proteine della membrana vitellina e del corion e particolare attenzione è stata posta allo studio della regolazione dell'espressione di questi geni e della localizzazione dei relativi prodotti proteici. Studi più recenti hanno permesso inoltre di caratterizzare i vari domini di cui sono dotate le proteine e di identificarne le funzioni, gettando un po' di luce sui complessi, e in larga parte ancora ignoti, processi che sottendono al corretto assemblaggio del guscio.

Il progetto di ricerca in cui sono stato principalmente coinvolto ha riguardato l'identificazione, tramite approcci genetici, delle vie di segnalazione responsabili del controllo trascrizionale dei geni codificanti proteine della membrana vitellina e delle regioni regolative a livello delle quali si esplica tale controllo.

Il lavoro è stato condotto analizzando la localizzazione dei messaggeri e delle proteine codificate dai geni *VM32E* e *VM26A.2* in contesti genetici che alterano l'attività delle più importanti vie di segnalazione coinvolte nell'oogenesi. Un'ulteriore analisi ha preso in esame il promotore del gene *VM32E*. Utilizzando varie linee transgeniche ho saggiato la risposta trascrizionale di differenti frammenti del promotore a un'alterata segnalazione da parte delle vie precedentemente identificate.

La trattazione dei risultati è preceduta da un'introduzione, in cui sono descritti struttura e sviluppo della camera ovarica, con particolare attenzione ai processi e ai sistemi genetici che determinano la formazione degli assi dell'oocita e il differenziamento delle varie sottopopolazioni dell'epitelio follicolare.

Lo sviluppo dell'ovario

Le gonadi di *Drosophila* si originano da due differenti tipi cellulari: le cellule germinali primordiali, che derivano dalle cellule polari, e le cellule somatiche, che differenziano dal foglietto mesodermico dei segmenti addominali a5, a6 e a7. Allo stadio 3 dell'embriogenesi un gruppo di nuclei migra dal centro dell'embrione verso il polo posteriore, dove è localizzato il plasma polare, un citoplasma materno specializzato contenente i granuli polari, strutture ricche di ribosomi e proteine e messaggeri specifici delle linea germinale. Allo stadio 4 tali nuclei, che protudono dall'estremità posteriore dell'embrione, vanno incontro a cellularizzazione, dando origine alle cellule polari, che sono caratterizzate da un rallentamento del ciclo cellulare e dal silenziamento trascrizionale. Al termine dello stadio 4 le cellule polari raggiungono il numero definitivo di 35 (fig. 1).

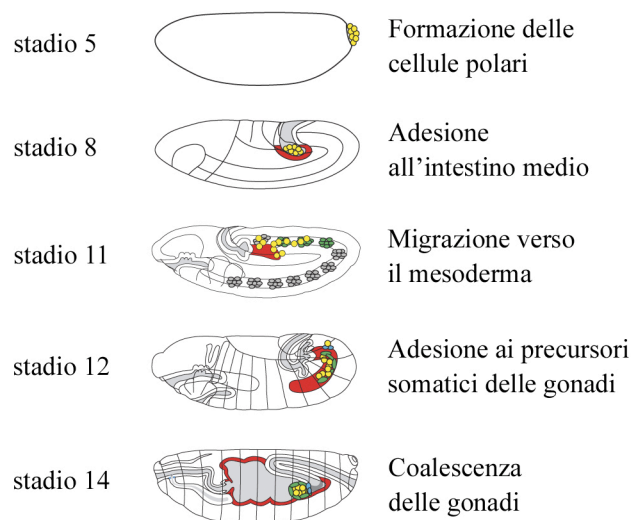


Figura 1: Illustrazione schematica delle principali fasi nella formazione delle gonadi embrionali (modificata da Santos e Lehmann, 2004). In giallo sono rappresentate le cellule polari, in rosso l'intestino medio, in verde i gruppi di precursori delle cellule somatiche della gonade e in blu i precursori specifici maschili.

Durante la gastrulazione le cellule polari aderiscono all'abbozzo dell'intestino medio e ne seguono i movimenti venendosi così a trovare, alla fine dello stadio 10, all'interno dell'embrione. Da qui migrano attivamente attraverso l'epitelio dell'intestino e, suddivise in due gruppi, raggiungono il vicino endoderma, dove si associano a uno

dei tre gruppi di precursori delle cellule somatiche della gonade che sono presenti a ciascun lato dell'embrione. Durante la successiva retrazione della banda germinale si assiste all'unione dei tre gruppi di cellule, con conseguente formazione delle gonadi (fig. 1).

Soltanto a metà del terzo stadio larvale ha inizio il differenziamento delle gonadi, che prosegue poi durante lo stadio pupale fino alla formazione degli ovari. Le gonadi, come già detto, sono costituite dalle cellule germinali, che hanno subito un notevole incremento delle loro dimensioni durante i precedenti stadi larvali, e dalle cellule somatiche. Parte di queste ultime, differenziando, originano le varie popolazioni di cellule mesodermiche che vanno a formare la guaina peritoneale, che riveste esternamente l'ovario, la guaina epiteliale, che separa tra di loro gli ovariooli, i filamenti terminali, il penducolo e le cellule basali. Contemporaneamente le cellule germinali e le rimanenti cellule somatiche a esse inframezzate si organizzano all'interno degli ovariooli in formazione dando origine, rispettivamente, alle cellule staminali della linea germinale e di quella somatica. Ciascun ovario prenda poi contatto con la rimanente parte dell'apparato riproduttore femminile che si origina a partire dai dischi imaginali germinali e che comprende gli ovidotti, le ghiandole accessorie, l'utero e le strutture annesse, la vagina e i genitali esterni (fig. 2).

I due ovari di una femmina adulta, rivestiti da una membrana peritoneale di tessuto connettivo, sono formati da sedici ovariooli paralleli, uniti all'estremità distale dai filamenti terminali, e che all'estremità prossimale prendono contatto con l'ovidotto nel quale sono rilasciate le uova mature. Ogni ovarioolo è costituito da un insieme di camere ovariche a differenti stadi di sviluppo, avvolto da una guaina composta di due strati epiteliali delimitanti uno strato intermedio di fibre muscolari, che permette la progressione delle camere ovariche all'interno dell'ovario. L'ovario è l'unità morfologica e funzionale dell'ovario e strutturalmente è suddivisibile in due regioni: il germario e il vitellario. Nel germario, la porzione più distale, sono localizzate le cellule staminali della linea somatica e germinale e al suo interno avvengono le primissime fasi dell'oogenesi, che culminano nella formazione della camera ovarica di stadio 1. All'interno del vitellario si compiono gli stadi successivi di sviluppo, in seguito ai quali la camera ovarica diventa uovo maturo.

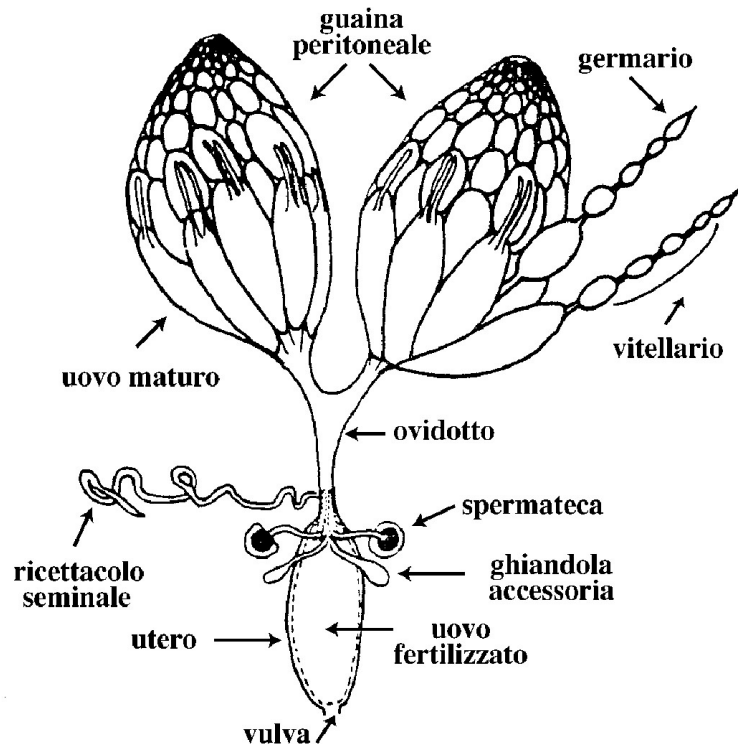


Figura 2: Rappresentazione schematica del sistema riproduttivo interno di una femmina adulta di *Drosophila melanogaster* (modificata da King, 1970).

La formazione della camera ovarica

Le camere ovariche in *Drosophila* si originano all'interno del germario, che è suddiviso, sulla base degli stadi di sviluppo della cisti, in quattro regioni (fig. 3). L'oogenesi ha inizio nella regione 1, al di sotto del filamento terminale. Qui sono localizzate le cellule staminali germinali (CSG) in numero di 2-3 che, dividendosi asimmetricamente, danno origine a nuove CSG e ai cistoblasti. La divisione asimmetrica delle CSG permette la continua produzione di uova durante tutta la vita della femmina adulta. Il cistoblasto, che si origina dalla divisione di una cellula staminale germinale, va incontro a quattro divisioni mitotiche con citochinesi incompleta, formando una cisti di 16 cellule germinali. La cisti neoformata entra quindi nella regione 2a del germario. A questo stadio le 16 cellule che compongono la cisti sono distinguibili solo dal numero di ponti citoplasmatici che le collegano, la cui formazione è una conseguenza della citochinesi incompleta. Poiché ciascuna

connessione rappresenta un ciclo di divisione, all'interno della cisti sono presenti solo 2 cellule con quattro ponti citoplasmatici, chiamate pro-oociti, che si formano dalla prima divisione del cistoblasto. Mentre la cisti attraversa la regione 2a del germario, una di queste 2 cellule differenzia in oocita. La specificazione dell'oocita è un processo complesso che prevede: l'accumulo, in uno dei due pro-oociti, di organelli citoplasmatici, quali mitocondri e centrioli e di messaggeri e proteine specifici, l'organizzazione di una rete microtubulare polarizzata e il mantenimento in meiosi di uno solo dei due pro-oociti. Tutti questi fenomeni sembrano essere controllati, direttamente e/o indirettamente, dal fusoma, un organello vescicolare che si estende asimmetricamente nelle sedici cellule attraverso i canali anulari e che è ricco di proteine citoscheletriche di membrana.

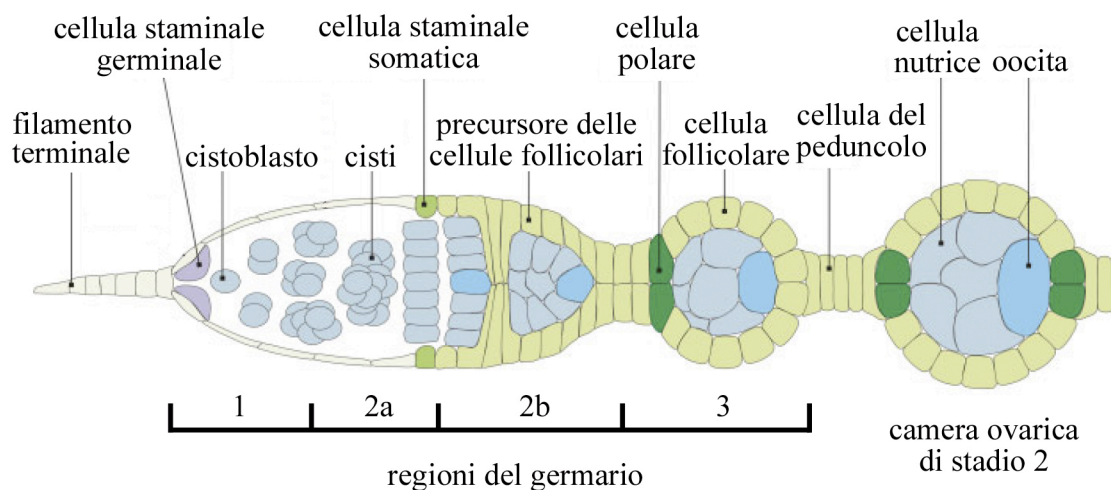


Figura 3: Rappresentazione schematica del germario di *Drosophila* (modificata da Horne-Badovinac e Bilder, 2005).

Al confine tra le regioni 2a e 2b del germario si trovano le cellule staminali della linea somatica che, così come le CSG, si dividono asimmetricamente dando origine a nuove cellule staminali e ai precursori delle cellule follicolari (fig. 3). All'entrata nella regione 2b la cisti prende contatto con i precursori delle cellule follicolari e si appiattisce, occupando l'intero diametro del germario. I precursori delle cellule follicolari, migrando verso l'interno del germario, separano tra loro le cisti. I meccanismi che regolano il riconoscimento delle singole cisti e il loro incapsulamento

da parte dei precursori delle cellule follicolari sono in gran parte ancora ignoti. Oltre alle cellule follicolari, che rivestono la cisti formando un epitelio monostratificato, i precursori delle cellule follicolari differenziano altri due tipi di cellule somatiche: le cellule polari e le cellule del peduncolo. Le prime sembrano svolgere un ruolo chiave nella localizzazione dell'oocita all'estremità posteriore della cisti, mentre le seconde separano, al momento del rilascio dal germario, la camera ovarica neoformata da quella più giovane che la precede. All'uscita dal germario la camera ovarica di stadio 1 prosegue il suo sviluppo nel vitellario fino a divenire un uovo maturo. Questo processo è stato suddiviso in 14 stadi sulla base delle dimensioni della camera ovarica, delle dimensioni relative dell'oocita, dei rapporti tra cellule follicolari e complesso oocita-cellule nutrici e del tipo di organuli presenti nell'ooplasma e della loro abbondanza (fig. 4).

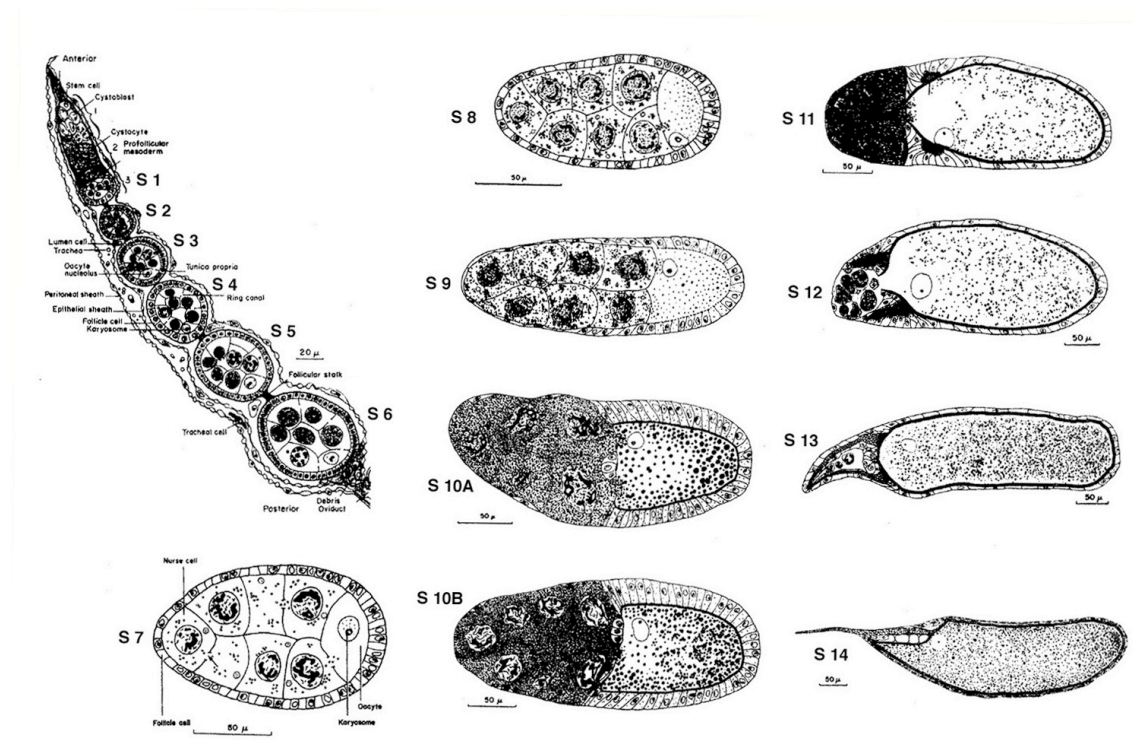


Figura 4: Rappresentazione schematica dell'ovariolo e degli stadi di sviluppo delle camere ovariche (modificata da King, 1970).

L'ocita e le cellule nutrici

Nel germario l'ocita inizia la prima divisione meiotica e raggiunge lo stadio di pachitene. La trascrizione, all'interno del suo nucleo, è inibita allorché la camera ovarica passa nel vitellario e allo stadio 3 dell'oogenesi i cromosomi dell'ocita di condensano a formare i cariostomi. Questo evento segna l'entrata nella fase di diplotene. Allo stadio 9 si osserva una ripresa della sintesi dell'RNA da parte della vescicola germinale, seppur per un breve lasso di tempo. Tra gli stadi 11 e 13, infatti, i cromosomi riconsolidano e, dopo il dissolvimento della membrana nucleare, si dispongono in piastra metafasica. Il processo di meiosi proseguirà poi soltanto dopo la fecondazione dell'uovo.

Le cellule nutrici sono responsabili della sintesi della maggior parte del contenuto dell'uovo, tra cui i messaggeri e le proteine necessari per la corretta determinazione delle future regioni embrionali. Tali prodotti sono attivamente trasportati nell'ocita a partire dallo stadio 10 dell'oogenesi. Durante la fase di sintesi le cellule nutrici aumentano notevolmente il loro volume e vanno incontro a 10-12 endocicli asincroni, di cui solo i primi 4 sono completi (Hammond e Laird, 1985; Lilly e Spradling, 1996). Come conseguenza, al termine dell'endoreplicazione ogni cellula nutrice possiede 128 cromosomi poliploidi. Durante queste fasi si assiste inoltre a un riarrangiamento del DNA. Nei primi 5 endocicli i cromosomi sono altamente condensati e formano 4 ammassi circolari ben visibili al microscopio a epifluorescenza. Al termine del 5° ciclo, che prevede la replicazione incompleta del materiale genetico, i 128 cromosomi si separano in 64 paia di cromatidi fratelli, uniti a livello delle regioni non replicate (Dej e Spradling, 1999). A partire da questo stadio il DNA appare quindi uniformemente disperso all'interno dei nuclei. È stato ipotizzato che questa riorganizzazione cromatinica sia necessaria per disperdere le regioni organizzatrici nucleolari; ciò permetterebbe un notevole incremento nella produzione dei ribosomi e, di conseguenza, un aumento dell'attività biosintetica. La maggior parte del contenuto dell'uovo è infatti prodotta dalle cellule nutrici che sintetizzano, oltre ai messaggeri e le proteine che servono per la determinazione delle regioni embrionali, anche i materiali di riserva, i mitocondri e altri organelli cellulari. Tali prodotti sono attivamente trasportati, prima lentamente e a partire dallo stadio 11 in maniera più massiccia, nell'ocita in via

di sviluppo attraverso i canali circolari. Dallo stadio 12 le cellule nutrici entrano in apoptosi e gradualmente scompaiono (Cavaliere et al., 1998).

Le cellule follicolari

Le cellule follicolari svolgono molteplici funzioni durante l'oogenesi, essendo dapprima coinvolte nella separazione delle cisti all'interno del germario, quindi nella determinazione degli assi di polarità antero-posteriore e dorso-ventrale della camera ovarica e del futuro embrione e, infine, nella sintesi e secrezione dei costituenti proteici del vitello e dei vari strati del guscio dell'uovo.

Al momento dell'uscita dal germario la camera ovarica è avvolta da circa 80 cellule follicolari (King and Vanoucek, 1960). Durante i primi stadi dell'oogenesi (stadi 1-6) le cellule follicolari proliferano per accompagnare il notevole accrescimento delle cellule nutrici. Al termine del processo proliferativo le cellule follicolari, che hanno raggiunto il numero di 650 (Margolis e Spradling, 1995) e hanno forma cuboidale, aumentano il loro volume e vanno incontro a tre cicli di endoreplicazione. La transizione da un processo all'altro è mediata dalla via di segnalazione di Notch. La molecola segnale Delta, secreta dalla componente germinale della camera ovarica allo stadio 6 dell'oogenesi, attiva il recettore Notch nelle cellule follicolari. Questo, regolando la trascrizione di componenti chiave del ciclo cellulare (Deng et al., 2001; Schaeffer et al., 2004), determina l'inizio dell'endoreplicazione.

Durante la vitellogenesi, che ha inizio allo stadio 8, l'oocita aumenta notevolmente le proprie dimensioni in seguito all'assorbimento del vitello e la camera ovarica si espande lungo l'asse antero-posteriore, fino ad assumere forma affusolata. Questi cambiamenti della camera ovarica sono accompagnati da riarrangiamenti dell'epitelio follicolare che, a questo stadio dello sviluppo, ha già subito alcuni processi differenziativi. Al suo interno è possibile infatti individuare almeno cinque diversi tipi cellulari, ognuno dei quali andrà incontro a specifici processi di rimodellamento e di migrazione.

A partire dallo stadio 8 la maggior parte delle cellule follicolari, ovvero le cellule terminali posteriori, quelle del corpo principale e le cellule centripete, modificano la propria forma da cuboidale a colonnare e migrano posteriormente

andando a rivestire l'oocita. Ciò causa, insieme al concomitante ingrandimento della camera ovarica, una diminuzione dell'area della superficie apicale, che è compensata dall'appiattimento delle circa 50 cellule follicolari squamose che rimangono a rivestire le cellule nutrici.

Contemporaneamente a questi eventi le cellule del bordo, un gruppo di 4-8 cellule che circondano le cellule polari anteriori, perdono la loro adesione alle cellule follicolari adiacenti e migrano tra le cellule nutrici fino a raggiungere l'estremità anteriore dell'oocita. Da qui, infine, raggiungono la loro localizzazione finale migrando dorsalmente in direzione della vescicola germinale.

Allo stadio 10B le cellule centripete, migrate posteriormente a rivestire l'oocita durante gli stadi 8 e 9, si allungano e si insinuano tra l'oocita e le cellule nutrici adiacenti. Prendendo contatto con le cellule del bordo si forma così un epitelio unico che circonda completamente l'oocita.

Un altro importante evento dell'oogenesi che comporta cambiamenti nella morfologia cellulare e processi migratori è la formazione delle appendici dorsali. Queste sono originate durante gli stadi 11-14 da due gruppi di 60-65 cellule dorso-anteriori. La morfogenesi delle appendici respiratorie ha inizio con l'allungamento delle cellule lungo l'asse apico-basale, a cui segue la costrizione apicale delle 50 cellule che origineranno la superficie dorsale delle appendici. Contemporaneamente le cellule rimanenti ruotano di 90 gradi in modo tale che la loro superficie apicale si porti al di sotto delle cellule che formano la porzione dorsale.

La determinazione dell'asse di polarità antero-posteriore della camera ovarica

Nella regione 2b del germario, come già accennato precedentemente, la cisti viene circondata da un monostrato di cellule follicolari e uno dei due pro-oociti si differenzia in oocita. Subito dopo la cisti da appiattita assume morfologia sferoidale e l'oocita si localizza al polo posteriore. È questo il primo passo nella determinazione dell'asse antero-posteriore della camera ovarica. Il corretto posizionamento dell'oocita all'interno della cisti è il risultato di un processo di adesione preferenziale tra l'oocita e le cellule follicolari posteriori. Tale adesione è mediata dalle DE-caderine, proteine transmembrana, componenti delle giunzioni aderenti che si formano tra cellule adiacenti

(Gonzalez-Reyes e St Johnston, 1998a; Godt e Tepass, 1998). Sia l'oozita che le cellule follicolari posteriori sovraesprimono tali proteine e la loro rimozione dall'uno o dall'altro tipo cellulare altera la corretta localizzazione dell'oozita. Il meccanismo che porta alla sovraespressione delle DE-caderine nelle cellule follicolari posteriori è alquanto complesso e un modello in grado di spiegarlo si basa sul trasferimento dell'informazione antero-posteriore da una cisti a quella seguente. Alla sua base vi è il precoce differenziamento delle cellule polari anteriori. Queste inducono la formazione delle cellule del peduncolo, che sono necessarie affinché le cellule follicolari posteriori della cisti successiva sovraesprimano le DE-caderine (Tepass et al., 2003). Il mancato differenziamento delle cellule polari anteriori in una cisti, infatti, inibisce la formazione delle cellule del peduncolo che collegano la cisti a quella più giovane che la segue. Come conseguenza le cellule follicolari posteriori della cisti più giovane non sovraesprimono le DE caderine e l'oozita non si localizza correttamente.

Dal punto di vista molecolare un ruolo chiave in questo processo è svolto dalla via di segnalazione di Notch. Trattasi di una via utilizzata dalla quasi totalità delle specie animali nel controllare il differenziamento mediato da interazioni cellulari. Il recettore Notch è una proteina transmembrana la cui forma matura si origina in seguito a un taglio proteolitico, detto taglio S1, da parte di una convertasi furina simile (Logeat et al., 1998). I polipeptidi così formati si riassociano in un eterodimero intramolecolare (Blaumueller et al., 1997), che è attivato da i due ligandi della via, Delta e Serrate. In seguito a tale legame Notch subisce due ulteriori tagli proteolitici (S2 e S3): il primo a livello della regione extracellulare, mediato da una metalloproteasi e il secondo nella porzione intramembrana a opera di una γ -secretasi. Come risultato si ha il rilascio della porzione intracellulare del recettore (N^{ID}) che agisce da attivatore trascrizionale in associazione con l'effettore intracellulare Suppressor of Hairless (*Su(H)*) (Bray e Furriols, 2001). Notch è responsabile del differenziamento sia delle cellule polari che di quelle del peduncolo. In concomitanza con l'avvolgimento della cisti i precursori delle cellule follicolari si differenziano per dare origine a due popolazioni cellulari: una che rimane in uno stato immaturo fino a oogenesi avanzata e che continua a dividersi, l'altra che esce dal ciclo mitotico e che differenzia, dando origine prima alle cellule polari e poi alle cellule del peduncolo. I precursori delle cellule polari e di quelle del peduncolo sono distinguibili per la ridotta espressione di

eyes absent (eya), dipendente dalla via di Hedgehog, e per l'espressione di *fringe (fng)*, codificante una glicosiltransferasi che potenzia l'attivazione di Notch. La secrezione della molecola segnale Delta da parte della componente germinale della cisti induce il differenziamento, tra i precursori, di 4-5 cellule polari (Grammont e Irvine, 2001; Lopez-Schier e St. Johnston, 2001). Le cellule polari neoformate secernono quindi Unpaired che, attivando nelle rimanenti cellule progenitrici la via di JAK/STAT, ne induce il differenziamento in cellule del peduncolo (McGregor et al., 2002). In tale processo è coinvolta nuovamente la via di segnalazione di Notch, come mostrato dall'analisi clonale di mutanti Delta. La sua eliminazione dalle cellule follicolari, infatti, impedisce la formazione delle cellule del peduncolo (Lopez-Schier e St. Johnston, 2001).

La localizzazione posteriore dell'oozita all'interno della cisti rappresenta la prima asimmetria antero-posteriore. Solo allo stadio 5-6 dell'oogenesi, però, tale asimmetria diviene evidente anche nell'epitelio follicolare. Fino a questo momento, infatti, le cellule follicolari che avvolgono la camera ovarica non sono distinguibili tra loro, fatta eccezione per le cellule polari. Il primo evento in tale processo è mediato dalla via di Notch. La segnalazione di Delta, a opera della linea germinale, induce le cellule follicolari a uscire dal ciclo mitotico e ad andare incontro a differenziamento, come mostrato dall'analisi clonale di mutazioni a carico di Delta e di Notch (Grammont e Irvine, 2001; Lopez-Schier e St Johnston, 2001). Successivamente la secrezione specifica di Unpaired, da parte delle cellule polari a ciascuna estremità della camera ovarica, porta al differenziamento delle cellule follicolari terminali dal gruppo di cellule mediali del corpo principale (McGregor et al., 2002). Il gradiente morfogenetico generato da Unpaired ha come ulteriore effetto l'induzione, nei due domini terminali, di tre differenti tipi cellulari: le cellule del bordo, quelle squamose e quelle centripete (fig. 5a; Grammont e Irvine, 2002; Xi et al., 2003). Questo modello, comune ai due domini, viene contrastato all'estremità posteriore della camera ovarica dalla segnalazione di Gurken, una proteina appartenente alla famiglia dei fattori di crescita tumorali di tipo α (TGF α). L'analisi clonale di mutanti del gene *torpedo (top)*, codificante il recettore di Gurken, ha infatti evidenziato la duplicazione, al polo posteriore, dei destini acquisiti dalle cellule anteriori (Gonzalez-Reyes e St Johnston, 1998b). Gurken, secreta

dall'ocita, attiva il recettore Torpedo, omologo dell'Egfr, nelle cellule follicolari circostanti, inducendole ad acquisire il destino di cellule follicolari posteriori (fig. 5b).

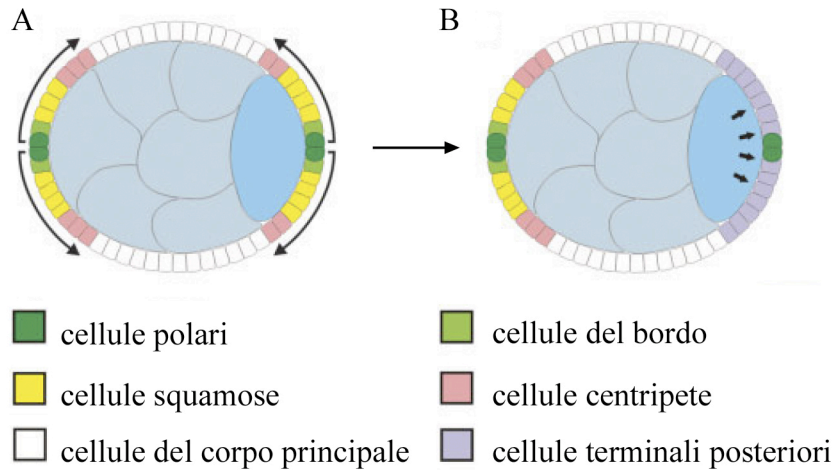


Figura 5: Determinazione delle cellule follicolari anteriori e posteriori (modificata da Horne-Badovinac e Bilder, 2005). A: Un primo segnale proveniente dalle cellule polari determina il differenziamento dei domini terminali dell'epitelio follicolare. B: Successivamente un segnale proveniente dall'ocita induce le cellule terminali posteriori ad acquisire un destino differente da quelle anteriori.

Sebbene tutte le cellule follicolari siano in grado di recepire il segnale di Gurken proveniente dall'ocita, l'Egfr è attivato solo nel dominio di cellule terminali, probabilmente in seguito all'attività combinata di Unpaired (Xi et al., 2003). In mutanti in cui l'ocita si localizza al centro della camera ovarica, infatti, le cellule follicolari del corpo principale, pur ricevendo il segnale dall'ocita, non adottano destino posteriore (Gonzalez-Reyes e St Johnston, 1994).

La determinazione delle cellule follicolari posteriori è un evento importante del processo oogenetico, in quanto da esso dipendono la successiva definizione dell'asse dorso-ventrale della camera ovarica e la localizzazione dei messaggeri che controllano la formazione delle strutture embrionali lungo l'asse antero-posteriore. In seguito al loro differenziamento, infatti, le cellule follicolari posteriori producono un segnale non ancora identificato che, recepito dall'ocita, induce la ripolarizzazione del complesso microtubulare (fig. 6). Uno dei geni coinvolti nella secrezione di questo segnale è *merlin*, che codifica un membro della famiglia delle proteine ERM (Ezrin-Radixin-Moesin). La proteina Merlin funge da ponte di giunzione tra l'actina e la membrana

citoplasmatica e si ipotizza sia coinvolta nel trasporto alla membrana apicale della molecola che induce la riorganizzazione dei microtubuli (MacDougall et al., 2001).

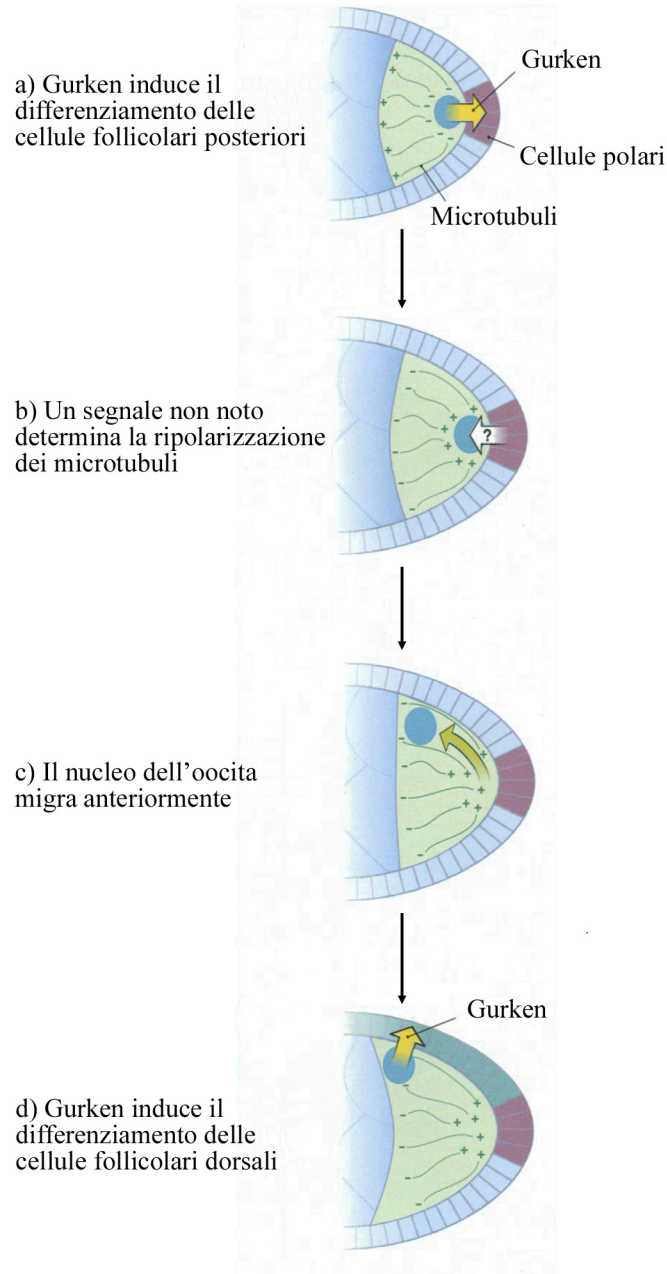


Figura 6: Illustrazione schematica delle fasi della determinazione degli assi antero-posteriore e dorso-ventrale (modificata da Anderson, 1995).

Negli stadi previtellogenicici il centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC) è localizzato al polo posteriore dell'oocita e l'estremità positiva dei microtubuli si estende quindi all'interno delle cellule nutrici. In risposta alla segnalazione proveniente

dalle cellule follicolari posteriori l'MTOC si disassembla e la nucleazione dei microtubuli avviene a livello della corteccia anteriore dell'oocita. In concomitanza a questo evento la vescicola germinale migra a un punto del margine anteriore dell'oocita. Come dimostrato dall'analisi di oociti binucleati, nei quali i due nuclei vanno a occupare posizioni casuali l'uno rispetto all'altro (Roth et al., 1999), la localizzazione della vescicola non è predeterminata. A questo stadio si assiste alla seconda segnalazione di Gurken, che induce le cellule follicolari ad acquisire destino dorsale (fig. 6).

La determinazione dell'asse di polarità dorso-ventrale della camera ovarica

Per la corretta determinazione dell'asse dorso-ventrale è necessario che il messaggero di *gurken* sia localizzato tra il nucleo e la membrana plasmatica dell'oocita. In questo modo, infatti, la via di segnalazione dell'Egfr è attivata solo nelle cellule follicolari adiacenti e si stabilisce un'asimmetria dorso-ventrale nell'epitelio follicolare. Nella localizzazione dell'mRNA di *gurken* sono coinvolti i geni *fs(1)K10*, *squid*, *cappuccino* e *spire*. Mutazioni a carico di ciascun gene causano la delocalizzazione del messaggero nella regione anteriore (Neuman-Silberberg e Schüpbach, 1993; Roth e Schüpbach, 1994). *fs(1)K10* codifica una proteina dotata di un dominio omologo a un motivo helix-turn-helix procariotico, che la renderebbe in grado di legare gli acidi nucleici (Prost et al., 1988). La sua attività durante l'oogenesi sembra essere limitata al processo di determinazione dell'asse dorso-ventrale, in quanto le uova deposte da femmine mutanti mostrano un'espansione del dominio dorsale a scapito di quello ventrale (Wieschaus et al., 1978). Un fenotipo analogo si riscontra nei mutanti *squid*, il cui gene codifica tre differenti isoforme di proteine eterogenee in grado di legare l'RNA (hnRNPs) (Kelley, 1993). Due di queste isoforme sono coinvolte nella localizzazione dell'mRNA di *gurken* e nell'accumulo della proteina (Norvell et al., 1999). *cappuccino* e *spire*, invece, hanno un effetto più generale nella localizzazione dei messaggeri nell'oocita e i fenotipi mostrati dai mutanti sono più variabili.

Controllo ormonale dell'oogenesi

Vari sono i fattori che controllano, in *Drosophila*, la produzione di uova. Uno dei più importanti è sicuramente la quantità di cibo a disposizione degli individui. Condizioni di stress nutrizionale, infatti, inducono il blocco dell'oogenesi allo stadio 8 e 9, associato ad apoptosi delle cellule nutrici (Soller et al., 1999; Terashima e Bownes, 2004) e aumento della concentrazione di ecdisteroidi (Bownes 1989). La somministrazione di 20-idrossi-ecdisona a concentrazioni fisiologiche produce effetti simili e la concomitante applicazione di un analogo dell'ormone giovanile è sufficiente a inibire l'apoptosi (Soller et al. 1999; Terashima e Bownes, 2004). Femmine omozigoti per la mutazione temperatura sensibile *l(3)ecd^l*, inoltre, se mantenute alla temperatura restrittiva non producono uova e la concentrazione dell'ecdisona nelle ovaie cala drasticamente (Garen et al., 1977). Questi e altri risultati suggeriscono che lo stato nutrizionale dell'individuo controlli l'oogenesi attraverso la modulazione dei livelli di ecdisona e di ormone giovanile.

L'azione dell'ecdisona è mediata da un recettore nucleare eterodimerico composto dalle proteine Ultraspiracle (Usp) ed Ecdisona receptor (EcR). La funzione dell'EcR è cruciale per il normale corso dell'oogenesi. Cloni di cellule germinali mutanti per il recettore dell'ecdisona, infatti, vanno incontro a degenerazione allo stadio 8 e 9 (Buszczak et al., 1999). Il gene *EcR* codifica tre isoforme (EcRA, EcRB1 ed EcRB2) che contengono identici domini di legame al DNA e al ligando e differiscono per l'estremità N-terminale (Talbot, 1993). Entrambe le isoforme sono trascritte durante l'oogenesi e il loro livello di espressione è correlato allo stato nutrizionale dell'individuo, essendo l'EcRA attivato dallo stress nutrizionale e dall'iniezione di ecdisona, e l'EcRB inibito (Terashima e Bownes, 2005). Il complesso EcR/Usp regola direttamente i geni responsivi precoci all'ecdisona *Broad-complex (BR-C)*, *E74* e *E75*. Il gene *BR-C* codifica una famiglia di fattori trascrizionali con domini a dita di zinco (DiBello et al., 1991). Le due isoforme *Z2* e *Z3* sono prodotte allo stadio 8 in presenza di elevati livelli di ecdisona e la loro espressione ectopica induce la trascrizione di *E75A* e blocca *E75B*. *E75A* se sovraespresso induce apoptosi, mentre *E75B* la blocca in condizioni di stress nutrizionale (Terashima e Bownes, 2006). Questi risultati hanno portato alla formulazione di un modello secondo il quale la privazione di cibo induce un

aumento nella concentrazione di ecdisone che promuove l'apoptosi delle camere ovariche allo stadio 8 attraverso una cascata regolativa che comprende l'EcRA, BR-CZ2, BR-CZ3 ed E75A (Terashima e Bownes, 2006).

La vitellogenesi

A partire dallo stadio 8 dell'oogenesi l'oocita accumula al suo interno il vitello, la fonte principale di energia e molecole per la biosintesi. Esso è costituito da particelle proteiche, glicogeno e goccioline lipidiche. La componente proteica è sintetizzata principalmente a livello dei corpi grassi e, in misura minore, dalle cellule follicolari. Tre sono i membri della famiglia genica delle proteine del vitello: *Yp1* e *Yp2*, separati da una regione intergenica di 1,2 kb e trascritti in senso divergente (Barnett et al., 1980; Hung e Wensink, 1983), e *Yp3*, localizzato come i precedenti sul cromosoma 1 ma a notevole distanza da questi (Garabedian et al., 1987). Molteplici fattori controllano l'espressione dei tre geni nei corpi grassi, tra cui lo stato nutrizionale, l'ormone giovanile, l'ecdisone e i geni che determinano il sesso. La trascrizione nell'ovario sembra dipendere, invece, unicamente dal controllo ormonale e da fattori tessuto-specifici (Brennan et al., 1982; Isaac e Bownes, 1982). Una volta sintetizzate, inoltre, le proteine subiscono modificazioni post-traduzionali mediante l'aggiunta di gruppi glicosilici, fosforici e solforici.

Due enhancer, localizzati nella regione intergenica che separa *Yp1* da *Yp2*, dirigono l'espressione di entrambi i geni rispettivamente nei corpi grassi e nelle cellule follicolari (Garabedian et al., 1985). All'interno del promotore del gene *Yp3*, invece, sono stati identificati due elementi *cis*-regolativi separati e capaci di agire indipendentemente per conferire il corretto profilo di espressione stadio e tessuto specifico (Ronaldson e Bownes, 1995). L'assimilazione delle proteine del vitello da parte dell'oocita è mediata dal gene *yolkless*, codificante un membro della famiglia dei recettori per le lipoproteine a bassa densità (Schonbaum et al., 1995).

La sintesi della componente lipidica del vitello ha probabilmente luogo nelle cellule nutrici, da dove poi viene trasportata verso l'ooplasma.

Il glicogeno, infine, è sintetizzato direttamente dall'oocita, al cui interno diviene visibile a partire dallo stadio 13.

Gli involucri di rivestimento dell'uovo

Lo sviluppo embrionale in *Drosophila*, così come negli altri insetti, avviene nell'ambiente esterno. E' quindi necessario che l'uovo possieda un guscio abbastanza robusto da proteggere l'embrione che al suo interno si sta sviluppando e da minimizzare le perdite d'acqua, ma che allo stesso tempo consenta gli scambi gassosi, essenziali per la respirazione embrionale. Queste caratteristiche sono garantite da una serie di involucri di rivestimento specializzati che, dall'interno verso l'esterno, sono: la membrana vitellina, lo strato ceroso, lo strato corionico interno, l'endocorion e l'esocorion (fig. 7).

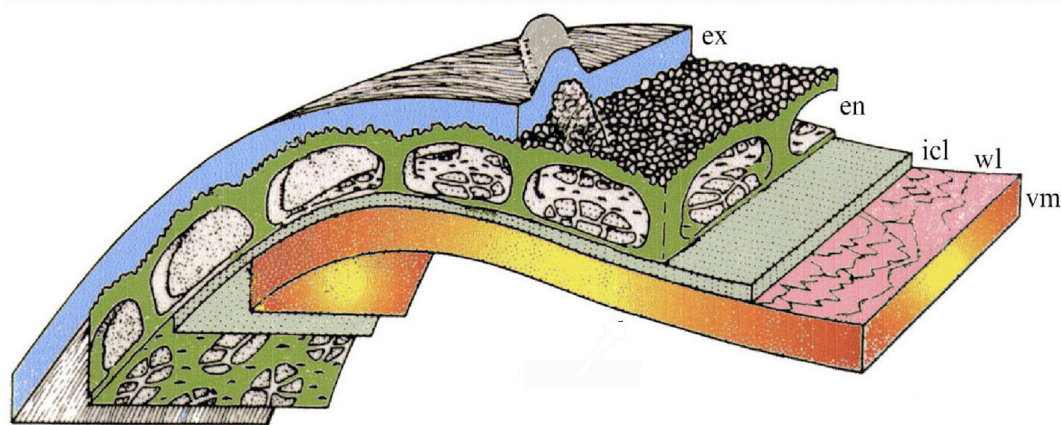


Figura 7: Rappresentazione schematica della struttura del guscio dell'uovo di *Drosophila melanogaster* (da Margaritis et al., 1980). Abbreviazioni: esocorion (ex); endocorion (en); strato corionico interno (icl); strato ceroso (wl); membrana vitellina (vm).

La membrana vitellina è una struttura rigida in grado di mantenere la forma dell'uovo anche dopo la rimozione degli strati esterni. Immediatamente al suo esterno si trova lo strato ceroso, costituito da materiale idrofobico. Segue lo strato corionico interno, di struttura cristallina che non mostra particolari specializzazioni e che insieme allo strato ceroso rende impermeabili le uova. L'endocorion è l'elemento strutturale più rilevante del corion e permette gli scambi gassosi con l'esterno. Esso è formato da uno strato interno, sottile e poroso, collegato mediante delle colonne allo strato esterno più spesso. Al suo interno sono quindi presenti delle cavità che comunicano con l'esterno

attraverso gli aeropili, localizzati al polo posteriore del guscio e nelle appendici dorsali. L'esocorion, infine, riveste esternamente l'endocorion e possiede una struttura fibrosa sottile (Spradling, 1993).

La formazione della membrana vitellina

La sintesi dei componenti che formano gli involucri di rivestimento dell'uovo avviene nelle cellule follicolari di camere ovariche vitellogeniche secondo un ordine temporale ben preciso. I primi geni a essere trascritti sono quelli che codificano proteine della membrana vitellina, lo strato più interno del guscio.

Sono stati sinora clonati quattro geni che codificano proteine della membrana vitellina: *VM26A.1* (Mindrinos et al., 1985; Burke et al., 1987), *VM34C* (Mindrinos et al., 1985), *VM26A.2* (Popodi et al., 1988) e *VM32E* (Gigliotti et al., 1989). Tutte e quattro le proteine sono ricche in prolina e alanina e possiedono un dominio idrofobico molto conservato di 38 aminoacidi, chiamato dominio VM, al cui interno sono presenti tre residui di cisteina (Burke et al., 1987; Popodi et al., 1988; Scherer et al., 1988; Gigliotti et al., 1989). A tale dominio risulta altamente omologa una regione conservata presente nelle proteine della membrana vitellina della zanzara *Aedes aegypti* (Lin et al., 1993; Edwards, 1996; Edwards, 1998). Altre similarità che accomunano i geni della membrana vitellina di *Drosophila* sono la mancanza di introni, la lunghezza del trascritto, che va da un minimo di 430 a un massimo di 800 pb, e la localizzazione sul braccio sinistro del secondo cromosoma. Come detto sopra, le proteine che formano la membrana vitellina sono le prime a essere sintetizzate. I trascritti che le codificano sono rilevabili nelle cellule colonnari a partire dallo stadio 8 e fino alla fine dello stadio 10B (Burke et al., 1987; Popodi et al., 1988; Jin e Petri, 1993; Bryant et al., 1999), con l'eccezione del trascritto del gene *VM32E* che è presente solo durante lo stadio 10 (Gargiulo et al., 1991). Le proteine sono secrete nello spazio extracellulare che separa le cellule follicolari dall'oocita, dove si accumulano nei corpi vitellinici, strutture vescicolari che si fondono durante lo stadio 10 formando uno strato omogeneo che circonda l'oocita. Contemporaneamente all'assemblaggio della membrana vitellina, le proteine *VM26A.1* e *VM26A.2* subiscono tagli proteolitici a livello delle loro estremità N- e C-terminali (Manogaran e Waring, 2004; Pascucci et al., 1996) e la proteina

VM32E è in parte reclutata nell'endocorion (Andrenacci et al., 2001) La parziale rilocalizzazione della VM32E nello strato corionico del guscio, durante gli stadi tardivi dell'oogenesi, è dipendente dalla regione C-terminale della proteina, che non presenta una significativa omologia con le altre tre proteine. La membrana vitellina, che inizialmente ha uno spessore di 1.7 μm , si assottiglia man mano che l'oocita cresce, riducendosi a 0.3 μm al termine dell'oogenesi (Margaritis et al., 1980)

Un approccio proteomico ha portato recentemente all'identificazione di altre tre proteine strutturali, codificate da geni localizzati nel cluster di geni della membrana vitellina posto in posizione 26A (Fakhouri et al., 2006). Una di queste presenta una regione di omologia al dominio VM ed è codificata dal gene *CG13997* corrispondente a un'unità trascrizionale precedentemente identificata (Popodi et al., 1988). La seconda, anch'essa identificata in precedenza come unità trascrizionale (Popodi et al., 1988; Waring, 2000), pur mancando del dominio VM possiede 7 copie di un motivo ricco in APY presente anche nella VM26A.2. Il gene corrispondente è espresso in tutto l'epitelio colonnare durante gli stadi 9 e 10 (Fakhouri et al., 2006). La terza proteina identificata manca di qualsiasi motivo presente nelle altre proteine del guscio e possiede bassa omologia con il dominio Ig (Vogel et al., 2003).

L'unico allele mutante per uno dei geni che codificano proteine della membrana vitellina è stato originariamente isolato nel corso di un'analisi morfologica delle uova prodotte da femmine affette da mutazioni che causano sterilità (Schüpbach e Wieschaus, 1989). Le uova deposte da questo mutante, denominato *fs(2)QJ42*, collassano dopo la rimozione del corion, indicando l'esistenza di alterazioni nella struttura della membrana vitellina. I mutanti presentano inoltre una forte riduzione nei livelli dell'mRNA di *VM26A.2*. L'espressione di un transgene codificante la VM26A.2 ha recuperato il fenotipo mutato dimostrando che la mutazione colpisce effettivamente il gene *VM26A.2* (Savant e Waring, 1989).

La formazione dello strato ceroso

Immediatamente all'esterno della membrana vitellina si trova lo strato ceroso, composto da materiale idrofobico. I suoi componenti sono sintetizzati dalle cellule follicolari allo stadio 10B dell'oogenesi e sono secreti in vescicole lipidiche tra gli stadi

10B e 12. Le vescicole si accumulano quindi al di sopra della membrana vitellina dove, in seguito alla formazione dello strato corionico sovrastante, si comprimono dando origine a uno strato molto sottile (Papassideri et al., 1993).

La formazione del corion

Dallo stadio 11 fino al termine dell'oogenesi le cellule follicolari sintetizzano le proteine corioniche. Queste sono dieci e la loro produzione è regolata temporalmente dall'espressione sequenziale dei geni che le codificano. I primi a essere trascritti sono i sei geni raggruppati in un unico cluster in posizione 7F sul cromosoma 1 (Parks et al., 1986). Allo stadio 13 sono espressi i geni *Cp19* e *Cp16* che, insieme a *Cp18* e *Cp15* attivi solo allo stadio 14, si trovano in un secondo cluster in posizione 66D sul terzo cromosoma (Spradling, 1981; Griffin-Shea et al., 1982). Sulla base dei loro profili trascrizionali si ritiene che i geni associati al cromosoma 1 codifichino le proteine dello strato corionico interno e dell'endocorion, mentre i geni localizzati sul terzo cromosoma codificherebbero i componenti dell'esocorion (Parks e Spradling, 1987). Oltre all'amplificazione, dovuta ai tre cicli di endoreplicazione a cui vanno incontro le cellule follicolari al termine della loro proliferazione, i due cluster di geni corionici sono selettivamente amplificati a partire dallo stadio 8 dell'oogenesi, grazie alla presenza di sequenze *in cis* contenenti un'origine di replicazione (Spradling e Mahowald, 1980; Griffin-Shea et al., 1982). Questo processo sembra essere necessario per assicurare la sintesi di notevoli quantità di proteine corioniche nel breve tempo in cui i geni sono trascrizionalmente attivi.

Un altro gene il cui prodotto partecipa alla formazione del corion è *dec-1*. Localizzato sul cromosoma 1 in posizione 7C, non è soggetto ad amplificazione e codifica tre differenti proproteine grazie a fenomeni di splicing alternativo (Waring et al., 1990). Le proproteine sono secrete dalle cellule follicolari e si localizzano nella membrana vitellina dove, in seguito a tagli proteolitici, danno origine ad almeno cinque proteine (Nogueron e Waring, 1995) che rilocalizzano, in maniera prodotto-specifica, nei vari strati del corion. Esperimenti di recupero di mutanti suggeriscono che solo la proproteina a più alto peso molecolare (fc177) sia necessaria al corretto assemblaggio del corion (Mauzy-Melitz et al., 2003).

La formazione delle strutture specializzate del corion

Il corion è dotato di strutture specializzate che assolvono a funzioni specifiche indispensabili alla fecondazione dell'uovo, agli scambi gassosi e alla fuoriuscita della larva al termine dell'embriogenesi (fig. 8).

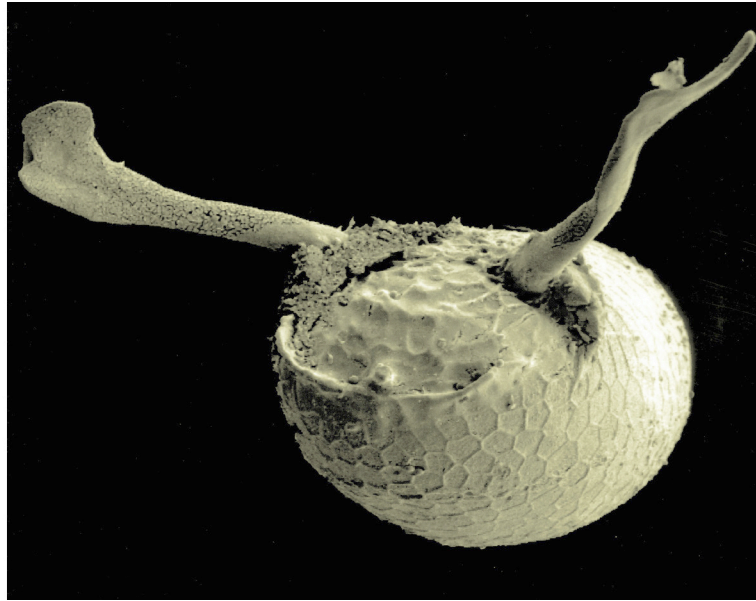


Figura 8: Fotografia al microscopio elettronico a scansione di un uovo di *Drosophila melanogaster*, orientato con la regione dorsale verso l'alto. Sono visibili le appendici dorsali, l'opercolo e il collare (da Cell, 95(3)).

Il micropilo è una di queste strutture. Si tratta di uno stretto canale che si estende obliquamente dalla porzione ventrale dell'opercolo e funge da punto d'ingresso per lo spermatozoo al momento della fecondazione. Il micropilo è originato dalle cellule del bordo e da parte delle cellule centripete (Zarani e Margaritis, 1986). Esperimenti di manipolazione che impediscono alle cellule del bordo di raggiungere l'estremità anteriore dell'oocita hanno dimostrato che le cellule centripete svolgono il ruolo principale nell'assemblaggio del micropilo, mentre le cellule del bordo sono indispensabili per la creazione della cavità al suo interno (Montell et al., 1992).

Un'altra struttura specializzata del guscio dell'uovo è l'opercolo, una regione del guscio meno resistente, che funge da punto di uscita per la larva al termine del suo sviluppo. È una struttura piana, che si trova all'estremità anteriore dell'uovo; circondata

da un rilievo detto collare è caratterizzata da un distinto disegno delle impronte lasciate dalle 50-70 cellule follicolari centripete che la originano (Margaritis et al., 1980).

Le appendici dorsali, infine, sono strutture allungate, cilindriche, appiattite nella porzione terminale, che si estendono dall'estremità anteriore dell'uovo lateralmente alla linea mediana dorsale. Al loro interno presentano delle cavità, che da un lato sono in continuità con le cavità dell'esocorion e dall'altro comunicano con l'esterno tramite gli aeropili. Come detto precedentemente, le appendici respiratorie si originano da due gruppi di cellule colonnari dorso-anteriori che, durante gli ultimi stadi dell'oogenesi, subiscono cambiamenti morfologici e vanno incontro a migrazione.

Allo stadio 10 dell'oogenesi due vie di segnalazione principali convergono, a livello dell'epitelio follicolare dorso-anteriore, per indurre il differenziamento delle cellule che danno origine alle appendici dorsali e all'opercolo (fig. 9).

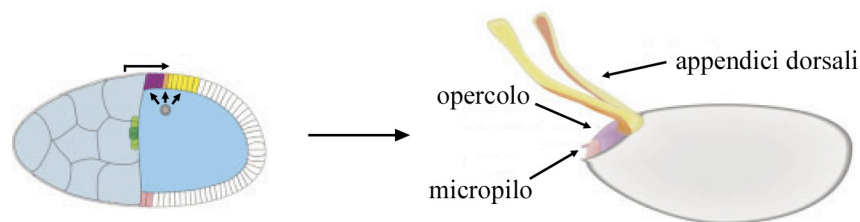


Figura 9: Illustrazione schematica delle diverse competenze delle cellule follicolari in una camera ovarica di stadio 10 e delle corrispondenti strutture nell'uovo maturo (modificata da Horne-Badovinac e Bilder, 2005).

Il primo di questi due segnali viene dalla via dell'Egfr. Come già detto, durante la loro migrazione posteriore alcune cellule follicolari transitano al di sopra del nucleo dell'ocita e sono esposte alla segnalazione di Gurken. Questo le induce ad acquisire destino di cellule follicolari dorsali, rompendo così la simmetria nelle cellule del corpo principale. Al termine della migrazione (stadio 10), nelle cellule follicolari dorso-anteriori che continuano a ricevere il segnale proveniente dall'ocita è espresso il gene *rhomboid*. Il suo prodotto è una proteasi intramembrana che, tagliandola, attiva la proteina Spitz, un altro ligando dell'Egfr (Wasserman e Freeman, 1998). Viene così indotto un aumento nella segnalazione dell'Egfr, che raggiunge il suo massimo livello nella linea mediana dorsale. Qui è espresso il gene *argos*, codificante una proteina che, secreta nello spazio extracellulare, si lega all'Egfr inibendolo. In queste cellule si

determina quindi un abbassamento dell'attività della via di segnalazione, che rimane invece alta nei due gruppi di cellule fiancheggianti (Wasserman e Freeman, 1998). È così determinata la popolazione di cellule che danno origine alle appendici dorsali.

L'altra via di segnalazione, che insieme all'Egfr controlla la formazione dell'opercolo e delle appendici dorsali, fa capo a Decapentaplegic (Dpp). Allo stadio 10 dell'oogenesi *dpp* è espresso nelle cellule squamose e in parte delle cellule centripete e alterazioni dei suoi livelli causano difetti nelle strutture anteriori del guscio. Fenotipi simili, ma più gravi, si riscontrano nelle uova deposte da femmine affette da mutazioni nei geni *saxophone (sax)* e *thick veins (tkv)*, che codificano due differenti subunità I del recettore di Dpp (Twombly et al., 1996). Il controllo esercitato da Dpp sull'opercolo è mediato dal fattore trascrizionale Bunched, omologo di TSC-22/GILZ dei vertebrati. Femmine omozigoti per un allele debole di tale gene depongono uova che mostrano un'espansione posteriore e ventrale dell'opercolo e assenza del collare che lo delimita (Dobens et al., 2000). L'analisi clonale di doppi mutanti, nei quali è contemporaneamente inibita la via di segnalazione di Dpp e l'attività di Bunched, ha permesso di dimostrare che la determinazione, da parte di Dpp, delle cellule follicolari che formano l'opercolo avviene per mezzo della regolazione negativa di *bunched* (Dobens et al., 2000). Inoltre il margine dorso-anteriore del dominio di espressione di *bunched* dipende anche dalla via dell'Egfr (Dobens et al., 2000). Un recente lavoro di Dobens et al. (2005) dimostra il coinvolgimento di Notch nella morfogenesi delle cellule centripete associata alla formazione dell'opercolo e il blocco, da parte di Bunched, della via di Notch nelle cellule colonnari adiacenti.

La stabilizzazione del guscio dell'uovo

La stabilizzazione dei vari strati del guscio dipende dalla progressiva formazione di legami chimici tra le proteine che li compongono. Le componenti del corion diventano insolubili soltanto prima dell'ovulazione, in seguito alla formazione di legami disolfuro e ditirosinici mediati da un'enzima perossidasi-simile (Mindrinos et al., 1980; Pascucci et al., 1996). Tale processo non avviene contemporaneamente in tutto il corion, bensì comincia ai poli e procede verso la regione centrale. Analisi istochimiche ed esperimenti di immunolocalizzazione hanno rilevato la presenza di perossidasi

nell'endocorion (Keramaris et al., 1991; Konstandi et al., 2005; Mindrinos et al., 1980) ed è stata inoltre dimostrata la secrezione di perossido di idrogeno da parte delle cellule follicolari in concomitanza con l'indurimento del corion (Margaritis, 1985). Come recentemente dimostrato il gene *Peroxidase (Pxd)* è espresso nelle cellule follicolari e si ipotizza codifichi la perossidasi corionica (Konstandi et al., 2005). Nel guscio dell'uovo sono state inoltre identificate altre due proteine: una appartenente alla famiglia delle eme perossidasi, che insieme a Pxd potrebbe catalizzare la formazione di residui di- e tri-tirosinici e un'ossidoreduttasi, che potrebbe fornire il perossido d'idrogeno necessario alla sintesi dei legami crociati tirosinici (Fakhouri et al., 2006).

Il processo che rende insolubile la membrana vitellina prevede l'iniziale formazione di ponti disolfuro tra i residui di cisteina delle varie proteine che la compongono e la successiva formazione di legami di altra natura (Andrenacci et al., 2001; Waring, 2000). Tramite esperimenti di microarray si sono recentemente identificati due nuovi ampliconi, specifici delle cellule follicolari, all'interno di uno dei quali sono presenti i geni *yellow-g* e *yellow-g2*, membri della famiglia yellow e putativi enzimi di conversione del dopacromo (Claycomb et al., 2004). Entrambi sono espressi nelle cellule colonnari agli stadi 11 e 12 dell'oogenesi e mutanti *yellow-g* depongono uova che, pur presentando un'esocorion normale, collassano. Ciò suggerisce che, nella stabilizzazione della membrana vitellina, possa essere coinvolta una serie di reazioni simile a quella che catalizza la conversione della dopamina (Claycomb et al., 2004). Un'altra proteina coinvolta nel corretto assemblaggio di questo strato del guscio, infatti, è *α methyl dopa resistant (amd)*, specificamente richiesta nelle cellule follicolari e anch'essa parte del processo di conversione della dopamina (Konrad et al., 1993).

La determinazione dell'asse antero-posteriore dell'embrione

Durante l'embriogenesi lo sviluppo lungo l'asse antero-posteriore è controllato da tre gruppi di geni che agiscono in maniera largamente indipendente: il gruppo dei geni anteriori, che specifica lo sviluppo della testa, del torace e l'identità dell'acron; il gruppo dei geni posteriori, necessario per lo sviluppo dell'addome e per la specificazione della linea germinale; il gruppo dei geni terminali, responsabile della formazione delle regioni terminali non segmentate dell'acron e del telson.

Come già detto, in seguito alla segnalazione dell'Egfr le cellule follicolari posteriori producono un segnale che induce la ripolarizzazione del citoscheletro e, di conseguenza, determina la localizzazione degli RNA messaggeri di *oskar* e *nanos* al polo posteriore e di *bicoid* a quello anteriore (fig. 10).

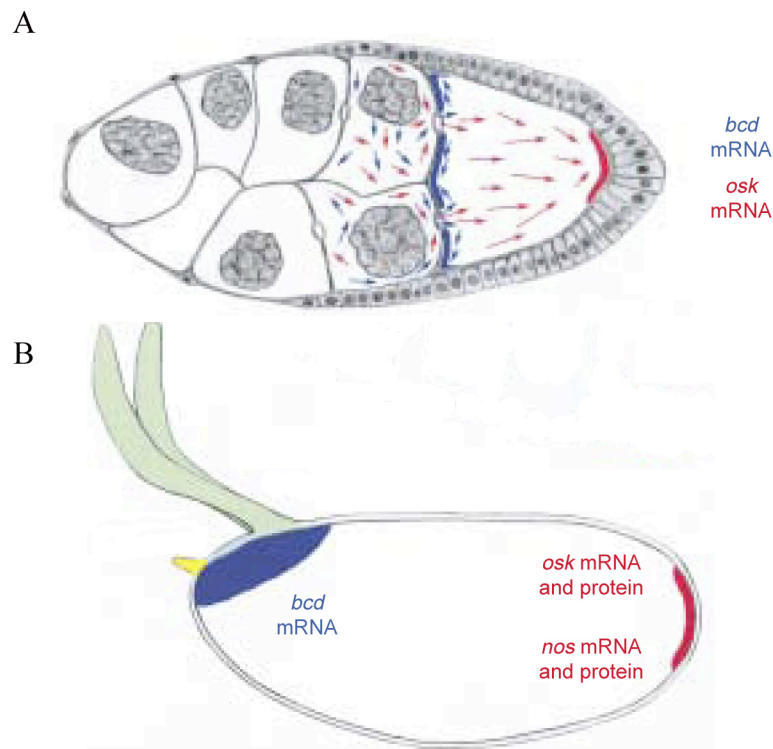


Figura 10: Illustrazione che mostra la localizzazione degli mRNA di *bicoid* (*bcd*), *oskar* (*osk*) e *nanos* (*nos*) durante la media oogenesi (stadio 9) e nell'uovo maturo (modificata da Riechmann e Ephrussi, 2001).

Il gene *bicoid* è trascritto nelle cellule nutrici e il suo messaggero è in seguito trasportato nell'oozita dove si accumula al polo anteriore. La localizzazione del trascritto dipende, tra gli altri, da *exuperantia*, *swallow* e *staufer* (Frohnhofer e Nüsslein-Volhard, 1987). *Exuperantia* è uno dei fattori che, associandosi con il messaggero di *bicoid* all'interno delle cellule nutrici, ne determina la corretta localizzazione nella regione corticale anteriore dell'oozita (Cha et al., 2001). *Swallow*, invece, legandosi alla catena leggera della dineina (Schnorrer et al., 2000), una proteina in grado di spostarsi lungo i microtubuli in direzione dell'estremità negativa, determina l'ancoraggio, mediato da *Staufen*, dell'mRNA di *bicoid* alla regione anteriore (Micklem

et al., 2000; Cha et al., 2001). Gli embrioni prodotti da femmine omozigoti per alleli forti di *bicoid* sono privi della testa e del torace e possiedono un secondo telson all'estremità anteriore, mentre gli alleli più deboli causano dei fenotipi meno gravi. Mutanti di *exuperantia*, *swallow* e *staufen*, invece, mostrano fenotipi simili a quelli indotti dagli alleli più deboli di *bicoid* (Frohnhofer e Nüsslein-Volhard, 1987). L'mRNA di *bicoid* è tradotto solo dopo l'attivazione dell'uovo, in seguito all'estensione della sua coda di poli(A) (Lieberfarb et al., 1996) e la proteina, diffondendo, forma un gradiente antero-posteriore, richiesto per l'espressione dei geni zigotici *hunchback* e *Kruppel* in due domini adiacenti della regione anteriore del blastoderma (Driever e Nüsslein-Volhard, 1988; Hulskamp et al., 1990).

I geni del gruppo posteriore controllano lo sviluppo dell'addome, che manca di uno o più segmenti negli embrioni figli di madri omozigoti per alleli mutati. Alcuni di questi geni sono inoltre coinvolti nella formazione dei granuli polari indispensabili alla formazione delle cellule polari. Il determinante morfogenetico posteriore è codificato dal gene *nanos*, il cui mRNA si accumula nel polo posteriore dell'embrione grazie all'attività di *oskar*. Così come per *bicoid*, anche il messaggero di *nanos* è tradotto solo durante le prime fasi dell'embriogenesi. Una volta sintetizzata, la proteina diffonde, formando un gradiente in direzione anteriore (Gavis e Lehmann, 1994; Bergsten e Gavis, 1999) che reprime la traduzione del messaggero materno di *hunchback*, permettendo l'espressione dei geni *gap giant* e *knirps* in due domini adiacenti.

Lo sviluppo delle strutture terminali dell'embrione

La determinazione delle strutture terminali è sotto il controllo della via Ras/Raf/MAPK che fa capo a Torso (Duffy e Perrimon, 1994). Il gene *torso* codifica un recettore tirosin-chinasico, distribuito uniformemente a livello della membrana dell'uovo, che però è attivato specificatamente alle due estremità dell'embrione da un segnale localizzato. La scoperta che la regione C-terminale di Trunk è sufficiente all'attivazione di Torso (Casali e Casanova, 2001) ha indotto a ipotizzare che il segnale si origini da un taglio proteolitico della proteina Trunk, che sarebbe secreta nel fluido perivitellinico in forma inattiva. Sono stati identificati tre geni coinvolti nella corretta localizzazione e/o formazione del ligando: uno, *torso-like*, espresso dalle cellule

follicolari anteriori e posteriori e gli altri due, *fs(1)Nasrat* e *fs(1)polehole*, espressi in linea germinale (fig. 11).

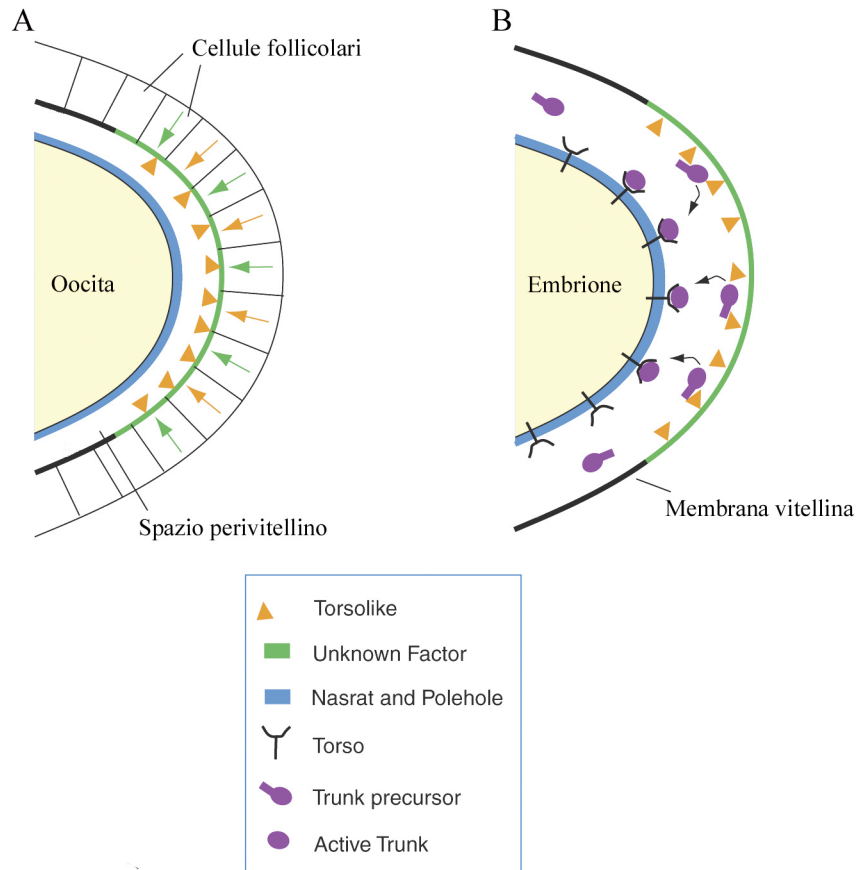


Figura 11: Modello per il meccanismo di attivazione del recettore Torso (modificata da LeMosy, 2003). Rappresentazione schematica dell'estremità posteriore di una camera ovarica (A) e di un uovo maturo (B).

È stato recentemente dimostrato che la proteina Torso-like è incorporata nella membrana vitellina ai due poli dell'embrione (Stevens et al., 2003), suggerendo che questo strato più interno del guscio dell'uovo funge da sito di ancoraggio di molecole segnale importanti per il corretto sviluppo embrionale. Le proteine Nasrat e Polehole, oltre a essere coinvolte nell'attivazione di Torso, sono anche responsabili della stabilizzazione della membrana vitellina. Alcuni mutanti, infatti, presentano difetti in questo strato (Perrimon e Gans, 1983; Perrimon et al., 1986) che sono associati a mancato cross-linking della proteina *VM26A.2* (Cernilogar et al., 2001).

L'attivazione di Torso ha come risultato finale la trascrizione dei due geni gap terminali *tailless* e *huckebein*. Il controllo esplicato dalla via Ras/Raf/MAPK è indiretto, in quanto inattiva un complesso trascrizionale che reprime l'espressione dei due geni. Di tale complesso fanno parte il corepressore Groucho e il fattore trascrizionale Capicua. Quest'ultimo è in grado di interagire in vitro con Groucho (Jimenez et al., 2000) ed è soggetto a un controllo post-trascrizionale negativo da parte della via di Torso.

La determinazione dell'asse dorso-ventrale dell'embrione

Il corretto sviluppo dell'asse dorso-ventrale in *Drosophila* dipende dalla formazione di un gradiente di localizzazione nucleare del fattore trascrizionale Dorsal. La prima fase di tale processo avviene durante l'oogenesi, quando la seconda segnalazione a opera di Gurken determina l'asimmetria dorso-ventrale della camera ovarica e reprime l'espressione del gene *pipe* nelle cellule follicolari dorsali (Sen et al., 1998). Il locus *pipe* codifica dieci proteine correlate, che mostrano similarità a eparansolfato 2-O-solfotransferasi dei vertebrati. Solo un'isoforma è espressa nella regione ventrale dell'epitelio follicolare, dove si suppone catalizzi il trasferimento di gruppi solfato alle componenti carboidratiche di una proteina o glicolipide non ancora noti (Zhu et al., 2005). Pipe esplica la propria attività nell'apparato del Golgi, dove viene localizzata da Windbeutel, una nuova proteina implicata nello smistamento a livello del reticolo endoplasmatico (Sen et al., 2000). Un altro fattore richiesto per la formazione del segnale ventralizzante è Nudel, una proteasi sintetizzata in tutte le cellule follicolari e secreta nel fluido perivitellinico (LeMosy et al., 1998). La sua forma attiva è un frammento contenente il dominio proteasico, che si genera in seguito a processamento autocatalitico e a un taglio catalizzato da un fattore ancora ignoto. Il bersaglio di Nudel non è ancora stato identificato ma potrebbe essere *Gastulation defective*, il primo membro di una cascata di proteasi secrete in forma inattiva dall'oocita o dall'embrione nelle prime fasi dello sviluppo. Gli altri componenti di questa segnalazione sono Snake ed Easter. Il risultato finale di tale cascata proteasica è la formazione del morfogeno Spätzle, il ligando del recettore Toll, unicamente al lato ventrale (fig. 12; Morisato e Anderson, 1994; Casanova et al., 1995).

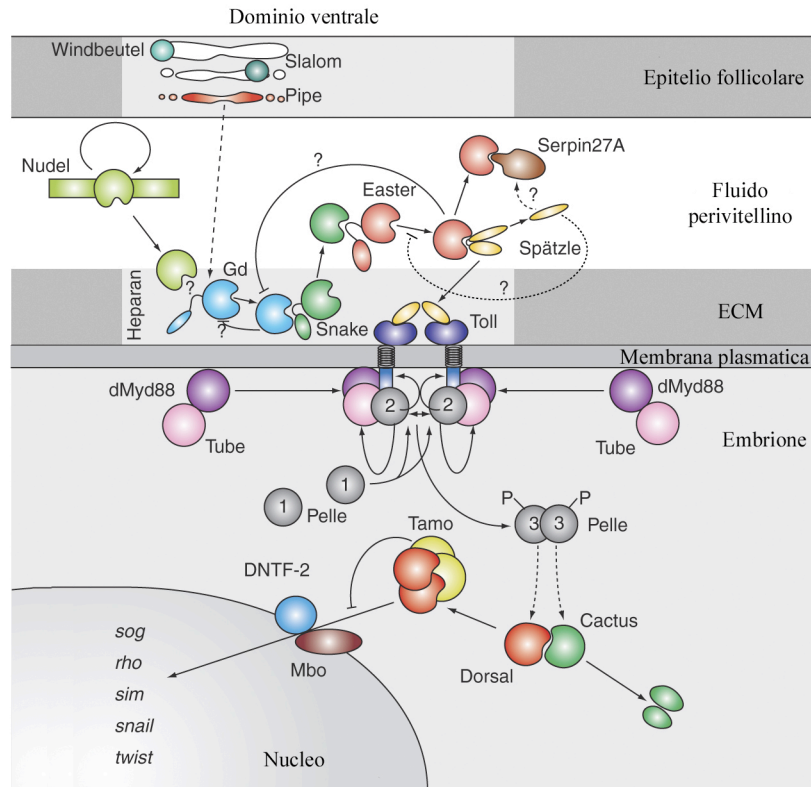


Figura 12: Modello per il meccanismo di attivazione del recettore Toll e per la cascata di trasduzione del segnale a valle (modificata da Moussian e Roth, 2005).

Il gene *toll* codifica un recettore tirosin-chinasico che dimerizza in presenza del ligando e recluta, attraverso le proteine adattatrici Tube e Krapfen/dMyd88, la serina/treonina chinasi Pelle (Hu et al., 2004). Questa, probabilmente con l'ausilio di altre proteine a valle, induce la degradazione di Cactus, l'omologo dell'I κ B, e il conseguente rilascio di Dorsal, il morfogeno ventrale omologo dell'NF κ B (fig. 12; Govind e Steward, 1991; Kidd, 1992). Dorsal trasloca quindi nei nuclei del blastoderma sinciziale dove regola, in maniera dipendente dalla sua concentrazione, la trascrizione di geni zigotici precoci. Nella porzione pi \dot{u} ventrale, che presenta la concentrazione maggiore di Dorsal, \acute{e} indotta l'espressione di *twist* e *snail*, responsabili del differenziamento del mesoderma. Nelle cellule laterali adiacenti, dove i livelli di Dorsal raggiungono valori intermedi o bassi, sono espressi i geni *single-minded*, *rhomboid* e *short gastrulation*, necessari per la determinazione e la suddivisione del neuroectoderma. A livello della rimanente regione dorsale, infine, l'assenza di Dorsal permette l'espressione del morfogeno Dpp che specifica l'amniosierosa e l'ectoderma dorsale.

MATERIALI E METODI

Terreno di coltura per l'allevamento di *Drosophila*

I ceppi di *Drosophila melanogaster* utilizzati sono stati allevati su un terreno a base di farina di mais, zucchero e lievito. Il terreno è preparato sciogliendo 10 g di agar e 50 g di zucchero in 1.6 l di acqua e portando a ebollizione. Vengono quindi aggiunti 150 g di farina di mais e si lascia bollire per 20 minuti a fuoco moderato. Si aggiungono poi 50 g di lievito e si continua a cuocere per altri 10 minuti. A termine cottura si aggiungono 4 g di nipagina, un antimicotico, precedentemente sciolti in 16 ml di alcool etilico al 95%. Il terreno viene quindi versato negli opportuni recipienti e lasciato raffreddare e asciugare all'aria.

Terreno per la raccolta degli embrioni

Il terreno per la raccolta degli embrioni è preparato sciogliendo 9 g di agar e 10 g di zucchero in 300 ml di acqua. Dopo aver portato a ebollizione, si aggiungono 100 ml di succo di mela commerciale e 10 ml di una soluzione al 10% di nipagina in etanolo. Il terreno è quindi versato in piastre Petri di 3.5 cm di diametro e, una volta solidificato, le piastre sono conservate a 4°C. Al momento dell'uso sulla superficie del terreno è aggiunto del lievito ammorbidito con qualche goccia di acqua e aceto di mele.

Ceppi di *Drosophila* utilizzati

- Ceppo selvatico di *Drosophila pseudoobscura* (Tucson *Drosophila* species stock center)
- y^l, w^{67c23} (ceppo di riferimento)
- $y^*, w^*; P\{GawB\}CY2$ (Queenan et al., 1997)
- $y^*, w^*; Mad^{l2}, P\{neoFRT\}40A/SM6a$ (Sekelsky et al., 1995)
- $w^*; P\{Ubi-GFP\}, P\{neoFRT\}40A; P\{GawB\}GRI, P\{UAS-FLP\}$ (Gupta e Schüpbach, 2003)
- $y^*, w^*, P\{UAS-Mad\}, P\{UAS-Mad\}; SM6a/Gla$ (Newfeld et al., 1996)

- y^*, w^* ; $P\{UAS-Med\}$ (Marquez et al., 2001)
- y^*, w^* ; $P\{UAS-tkv^{Q253D}\}$ (Nellen et al., 1996)
- w^* ; $P\{UAS-GFP\}$
- w^* ; $P\{UAS-dpp\}$ (Tracey et al., 2000; Bloomington # 1486)
- w^* ; $P\{His2Av^{T:Avic\GFP-S65T}\}$ (Clarkson e Saint, 1999)
- $P\{Vm32E^{-253:-39.T:Ecol\lacZ}\}$; ry^* (Cavaliere et al., 1997)
- $P\{Vm32E^{-112:-39.T:Ecol\lacZ}\}$; ry^* (Cavaliere et al., 1997)
- $P\{Vm32E^{-348:-254\Delta-112:-39.T:Ecol\lacZ}\}$; ry^* (Cavaliere et al., 1997)
- y^1, w^{67c23} ; $P\{Vm32E^{T:Hsap\MYC}\}$ (Andrenacci et al., 2001)
- w^* ; $P\{UAS-N^{intra}\}$ (Dobens et al., 2005)
- y^*, w^* ; $P\{UAS-\lambda top\}$ (Queenan et al., 1997)
- y^1, w^* ; $P\{GAL4-Act5C(FRT.CD2)\}$ (Pignoni e Zipursky, 1997; Bloomington # 4779)
- w^{1118} ; $P\{hsFLP\}$; CyO/Adv^1 (Golic, 1991; Bloomington # 6)
- y^1, w^{1118} ; $P\{hsFLP\}$; $Dr^{mio}/TM3, ry^*, Sb^1$ (Golic, 1991; Bloomington # 7)
- usp^2 ; $P\{neoFRT\}19A/FM7a$ (Oro et al., 1990)
- w^* ; $P\{hsFLP\}$; $P\{tubP-GAL80\}$; $P\{neoFRT\}19A$; $P\{UAS-mCD8::GFP\}$ (Lee e Luo, 1999; Bloomington # 5134)
- y^1, w^* ; $P\{tubP-GAL4\}/TM3, Sb^1$ (Lee e Luo, 1999; Bloomington # 5138)
- w^{1118} ; $P\{UAS-EcR^{B1.dsRNA}\}$ (Roignant et al., 2003; Bloomington # 9329)
- w^{1118} ; $P\{UAS-EcR^{A.dsRNA}\}/TM3, P\{ActGFP\}, Ser^1$ (Roignant et al., 2003; Bloomington # 9328)
- w^{1118} ; $P\{UAS-EcR^{dsRNA}\}$ (Colombani et al., 2005; Bloomington # 9327)
- y^1, w^{67c23} ; $SM5/Sp$

Bilanciatori e principali marcatori fenotipici

FM7a (First Multiple 7a): bilanciatore del cromosoma 1, porta i marcatori $B^1, sc^8, v^{Of}, w^a, y^{31d}$

SM6a (Second Multiple 6a): bilanciatore del cromosoma 2, porta i marcatori $Cy^1, al^2, cn^{2P}, dp^{lv1}, sp^2$

SM5 (Second Multiple 5): bilanciatore del cromosoma 2, porta i marcatori *Cy¹, al², cn², ds⁵⁵, lt^y, sp²*

CyO (Curly of Oster): bilanciatore del cromosoma 2, porta i marcatori *Cy¹, cn², dp^{lv}, pr¹*

TM3, Sb¹ (Third Multiple 3): bilanciatore del cromosoma 3, porta i marcatori *Ubx^{bx-34e}, e¹, kni^{ri-1}, l(3)89Aa¹, p^p, sep¹*

y^{}* e *y¹* (*yellow*): mutazioni che causano assenza di pigmentazione corporea

w^{}*, *w¹¹¹⁸* e *w^{67c23}* (*white*): mutazioni che causano assenza di pigmentazione nell'occhio

Cy¹ (*Curly*): mutazione presente nei bilanciatori del cromosoma due, conferisce un fenotipo caratterizzato da ali ricurve verso l'alto

Sp (*Sternopleural*): mutazione che causa un aumento del numero di setole sternopleurali

Sb¹ (*Stubble*): mutazione presente nel bilanciatore TM3, causa ispessimento e accorciamento delle setole dello scutello

Espressione ectopica mediata dal fattore trascrizionale Gal4

Per gli esperimenti di espressione ectopica, indotta utilizzando la linea CY2Gal4, sono state analizzate femmine aventi genotipo:

- *y^{*}, w^{*}/w^{*}; P{GawB}CY2/P{UAS-GFP};*
- *y^{*}, w^{*}/w^{*}; P{GawB}CY2/+; P{UAS-dpp}/+;*
- *y^{*}, w^{*}, P{UAS-Mad}, P{UAS-Mad}/y^{*}, w^{*}; P{GawB}CY2/SM6a;*
- *y^{*}, w^{*}/y^{*}, w^{*}; P{GawB}CY2/P{UAS-Med};*
- *y^{*}, w^{*}/y^{*}, w^{*}; P{GawB}CY2/+; P{UAS-tkv^{Q253D}}/+;*
- *P{Vm32E^{-253:-39.T:Ecol\lacZ}}/y^{*}, w^{*}; P{GawB}CY2/+; P{UAS-dpp}/+;*
- *y^{*}, w^{*}/w^{*}; P{GawB}CY2/P{Vm32E^{-348:-254Δ-112:-39.T:Ecol\lacZ}}; P{UAS-dpp}/+;*
- *y^{*}, w^{*}/w^{*}; P{GawB}CY2/+; P{Vm32E^{-112:-39.T:Ecol\lacZ}}, ry^{*}/P{UAS-dpp};*
- *y^{*}, w^{*}, P{UAS-λtop}/y^{*}, w^{*}; P{GawB}CY2/+.*

Tali femmine sono state ottenute incrociando i ceppi parentali, se necessario opportunamente bilanciati. Gli incroci sono stati condotti a 18°C. Le femmine della progenie, aventi i genotipi sopraindicati, sono state selezionate, trasferite insieme a

maschi y^1, w^{67c23} su terreno fresco addizionato di lievito e lasciate 3 giorni a 29°C prima della dissezione degli ovari.

Per gli esperimenti di espressione clonale sono stati analizzati gli ovari di femmine aventi genotipo:

- $y^1, w^*, P\{GAL4-Act5C(FRT.CD2)\}/w^{1118}, P\{hsFLP\}; P\{UAS-N^{intra}\};$
- $y^1, w^*, P\{GAL4-Act5C(FRT.CD2)\}/w^{1118}, P\{hsFLP\}; P\{UAS-EcR^{dsRNA}\}/P\{UAS-EcR^{dsRNA}\};$
- $y^1, w^*, P\{GAL4-Act5C(FRT.CD2)\}/y^1, w^{1118}, P\{hsFLP\}; P\{UAS-EcR^{B1.dsRNA}\}/P\{UAS-EcR^{B1.dsRNA}\};$
- $y^1, w^*, P\{GAL4-Act5C(FRT.CD2)\}/y^1, w^{1118}, P\{hsFLP\}; P\{UAS-EcR^{A.dsRNA}\}/+.$

Tali femmine, ottenute da opportuni incroci tra i ceppi parentali, sono state trasferite, insieme a maschi y^1, w^{67c23} , su terreno fresco e sottoposte, nell'arco di due giorni, a 4 heat-shock (3 per l'espressione clonale di $UAS-N^{intra}$) della durata di un'ora ciascuno. Gli ovari sono stati quindi dissezionati 6 giorni (3 nel caso dell'espressione clonale di $UAS-N^{intra}$) dopo l'ultimo trattamento heat-shock.

Analisi clonale

I cloni di cellule follicolari omozigoti per l'allele Mad^{12} sono stati indotti utilizzando il ceppo $P\{GawB\}GRI, P\{UAS-FLP\}$, che esprime l'enzima FLP di lievito in tutte le cellule follicolari, compresi i loro precursori. Attraverso opportuni incroci si sono ottenute femmine aventi genotipo:

- $y^*, w^*/w^*; Mad^{12}, P\{neoFRT\}40A/P\{Ubi-GFP\}, P\{neoFRT\}40A; P\{GawB\}GRI, P\{UAS-FLP\}/+;$
- $y^*, w^*/P\{Vm32E^{-253:-39.T:Ecol\lacZ}\}; Mad^{12}, P\{neoFRT\}40A/P\{Ubi-GFP\}, P\{neoFRT\}40A; P\{GawB\}GRI, P\{UAS-FLP\}/+.$

Queste femmine sono state mantenute a 25°C per tre giorni insieme a maschi y^1, w^{67c23} e si è quindi proceduto alla dissezione degli ovari.

I cloni di cellule follicolari omozigoti per l'allele usp^2 , invece, sono stati indotti in femmine aventi genotipo: $usp^2, P\{neoFRT\}19A/w^*, P\{hsFLP\}, P\{tubP-GAL80\}, P\{neoFRT\}19A; P\{UAS-mCD8::GFP\}/+; P\{tubP-GAL4\}/+.$ Tali femmine sono state mantenute, insieme a maschi y^1, w^{67c23} , su terreno fresco e sottoposte,

nell'arco di due giorni, a tre heat-shock di un'ora ciascuno. Gli ovari sono stati quindi dissezionati 9 giorni dopo l'ultimo trattamento heat-shock.

Colorazione con Neutral red

Uova di 0-12 ore sono state raccolte dalle piastre Petri in opportuni cestelli e dopo averle risciacquate con acqua distillata sono state decorionate in una soluzione al 50% di ipoclorito di sodio (Sigma). Dopo vari lavaggi con acqua distillata, gli embrioni decorionati sono stati lasciati per 10 minuti in una soluzione 5 mg/ml di Neutral red (Sigma) in PBS (10 mM tampone Na-fosfato pH 7.5, 130 mM NaCl) e quindi lavati 6 volte in PBS + 0.05% Triton-X100 per rimuovere il colorante in eccesso. Gli embrioni sono stati infine posti in vaschette di vetro e contati mediante l'ausilio di un microscopio stereoscopico oppure montati in una soluzione 50% di glicerolo in PBS e fotografati al microscopio ottico Nikon con ottica Nomarski.

Sintesi delle sonde a DNA marcate con digoxigenina

Le sonde sono state preparate mediante PCR utilizzando dUTP marcata con la digoxigenina.

Per la sonda diretta contro il trascritto del gene *VM32E* come template è stato utilizzato il plasmide HH5/EcoRI (Gigliotti et al., 1989) e come primer i due oligonucleotidi che si appaiano, rispettivamente, con le regioni +310/+328 e +431/+450 della sequenza codificante del gene *VM32E*. Le sequenze dei due primer sono: 5'-ACACAGAACAGGTGCCAC-3' per quello prossimale e 5'-CGGTGATCATGACAACTGGG-3' per quello distale. Le condizioni utilizzate per la reazione di PCR sono le seguenti (le concentrazioni indicate sono quelle finali): DNA HH5/EcoRI (0.5 ng/μl), primer (1.0 pmoli/μl ciascuno), enzima Amplitaq (0.05 U/μl), MgCl₂ (3 mM), DIG dUTP (0.03 mM), tampone PCR (1x), DIG labeling mix (1x). L'amplificazione è stata condotta secondo il seguente programma: 1 ciclo a 95°C, 5 minuti; 35 cicli formati da 45 secondi a 94°C e 30 secondi a 70°C; 1 ciclo di 2 minuti a 72°C.

Per la sonda diretta contro il messaggero del gene *VM26A.2* come template è stato utilizzato il DNA genomico estratto dal ceppo Canton S e come primer due oligonucleotidi di 26 e 24 basi la cui rispettiva sequenza è 5'-CCGAGTGGGCTATAAAGTGGATTGGC-3' e 5'-ACCCCGTCGCGGCATAGGAGGCAT-3'. Tali primer consentono l'amplificazione di un frammento di 272 pb della regione codificante del gene *VM26A.2*. Le condizioni di reazione applicate sono le seguenti: DNA genomico CS (0.5 ng/μl), primer (1.0 pmoli/μl ciascuno), enzima Amplitaq (0.025 U/μl), MgCl₂ (2 mM), DIG dUTP (0.03 mM), tampone PCR (1x), DIG labeling mix (1x). L'amplificazione è stata condotta secondo il seguente programma: 1 ciclo a 95°C, 5 minuti; 35 cicli formati da 45 secondi a 94°C, 30 secondi a 68°C e 30 secondi a 72°C; 1 ciclo a 72°C, 2 minuti.

Dopo aver verificato, mediante gel elettroforesi, l'avvenuta amplificazione, le sonde sono state sottoposte a precipitazione con LiCl 0.4 M e 3 volumi di etanolo 98%. Infine sono state risospese in 1/5 del volume di reazione.

Ibridazione *in situ*

Gli ovari di femmine invecchiate per alcuni giorni su terreno fresco ricco di lievito sono stati dissezionati in EBR (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 10 mM Hepes pH 6.9) con l'ausilio di 2 siringhe da insulina e successivamente fissati per 20 minuti in "devitellinization buffer", composto da 200 μl di 4% paraformaldeide in PBT (10 mM tampone Na-fosfato pH 7.2, 130 mM NaCl e 0.1% Tween-20), 20 μl di DMSO e 600 μl di eptano. Il fissativo è stato poi rimosso e, dopo 3 veloci lavaggi in PBT, gli ovari sono stati lavati due volte per 5 minuti in agitazione con la stessa soluzione. Si è quindi proceduto alla separazione degli ovaroli con aghi da insulina e alla permeabilizzazione per 30 minuti in 10 μg/ml di proteinasi K in PBT. L'attività della proteinasi K è stata poi bloccata con due lavaggi rapidi in 2 mg/ml di glicina in PBT. Dopo 4 lavaggi in PBT gli ovaroli sono stati nuovamente fissati per 15 minuti in 4% paraformaldeide in PBT. Eliminato il fissativo si sono fatti 3 lavaggi veloci e 2 lavaggi da 5 minuti ciascuno in PBT. La preparazione all'ibridazione con la sonda è stata condotta effettuando 1 lavaggio da 10 minuti in una miscela formata da 1 volume di

PBT e 1 volume di soluzione di ibridazione (50% formammide, 5X SSC, 50 µg/ml di eparina e 0.1% Tween-20) e un successivo lavaggio da 10 minuti in soluzione di ibridazione. Gli ovari sono stati quindi posti a preibridare per 1 ora a 46°C in soluzione di ibridazione contenente 100 µg/ml di DNA carrier denaturato. Rimossa la maggior parte del sopranatante si è aggiunta la sonda denaturata e i campioni si sono lasciati a ibridare per tutta la notte a 46°C. Il giorno successivo la sonda in eccesso è stata eliminata con 4 lavaggi da 15 minuti in soluzione di ibridazione a 46°C. Gli ovari sono stati poi reidratati mediante lavaggi da 15 minuti in miscele contenenti volumi crescenti di PBT (1:4, 3:2, 1:1, 2:3 e 4:1). I primi 3 lavaggi sono stati effettuati a 46°C, mentre i rimanenti 2 a temperatura ambiente in agitazione. Dopo un breve lavaggio in PBT i campioni sono stati lavati 2 volte in 1% BSA in PBT e successivamente incubati in agitazione a temperatura ambiente con l'anticorpo diretto contro la digoxigenina coniugato con l'enzima fosfatasi alcalina (Roche; dil. 1:2000). L'anticorpo era stato precedentemente preadsorbito a una diluizione 1:40 per un ora su camere ovariche fissate. Dopo 3 lavaggi rapidi e 3 da 10 minuti in PBT, le camere ovariche sono state lavate altre 3 volte per 5 minuti con la soluzione di rivelazione (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9.5, 0.1% Tween-20 e 1 mM levamisole). La reazione colorimetrica è stata infine condotta al buio in 0.5 ml di soluzione di colorazione a cui sono stati aggiunti 10 µl di NBT/BCIP (Roche). A colorazione avvenuta la reazione è stata bloccata mediante 3 lavaggi in PBT. Le camere ovariche sono quindi state montate in Fluoromount e l'osservazione è stata condotta al microscopio Zeiss dotato di ottiche Nomarski.

Immunoistochimica

Gli ovari di femmine invecchiate per alcuni giorni su terreno fresco ricco di lievito sono stati dissezionati in PBS (10 mM tampone Na-fosfato pH 7.5, 130 mM NaCl) e fissati per 20 minuti in 4% paraformaldeide in PBS. Il fissativo è stato poi rimosso e dopo 3 lavaggi da 5 minuti in PBT (PBS e 0.1% Triton-X-100) i singoli ovaricoli sono stati separati con l'ausilio di aghi da insulina. Si è quindi proceduto con 1 lavaggio da 15 minuti con 3% BSA in PBT, a cui è seguita l'incubazione con gli anticorpi primari opportunamente diluiti nella stessa soluzione. L'incubazione è durata

l'intera notte ed è stata condotta a 4°C. Il mattino seguente si è eliminata la soluzione con l'anticorpo e si sono effettuati tre lavaggi in PBT e 1 lavaggio in 3% BSA in PBT. Successivamente i campioni sono stati incubati per due ore a temperatura ambiente in leggera agitazione con gli anticorpi secondari diluiti in 3% BSA in PBT. Dopo 4 lavaggi in PBT le camere ovariche sono state montate in Fluoromount e l'osservazione dei preparati è stata condotta al microscopio confocale Leica (TCS SL) e al microscopio a epifluorescenza Nikon.

Colorazione con DAPI

La colorazione con il marcatore nucleare DAPI è effettuata durante l'immunoistochimica, dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario. Al termine dell'incubazione vengono effettuati due lavaggi, uno in PBT e uno in PBS, di 10 minuti ciascuno e le camere ovariche sono quindi incubate in una soluzione di DAPI 1 µg/µl in PBS a cui seguono due lavaggi in PBS di 10 minuti. Prima del montaggio in Fluoromount i campioni sono trasferiti in PBT.

Anticorpi

Gli anticorpi primari utilizzati nei diversi esperimenti di immunolocalizzazione condotti sono:

- anticorpo policlonale anti-VM32E (anti-CVM32E, Andrenacci et al., 2001; dil. 1:100), ottenuto in coniglio e diretto contro un peptide di 15 aminoacidi corrispondenti ai residui da 102 a 106 dell'estremità C-terminale di VM32E;
- anticorpo policlonale anti-VM26A.2 (anti-VMP, Andrenacci et al., 2001; dil. 1:50), ottenuto in coniglio e diretto contro un peptide di 19 aminoacidi corrispondenti ai residui da 18 a 36 dell'estremità N-terminale di VM32E;
- anticorpo monoclonale anti-MYC (9E10, Santa Cruz Biotechnology; dil. 1:100), ottenuto in topo;
- anticorpo policlonale anti-pSmad (PS1, Tanimoto et al., 2000; dil. 1:500), ottenuto in coniglio e diretto contro la forma fosforilata di Smad1;

- anticorpo monoclonale anti- β gal (40-1A, Developmental Studies Hybridoma Bank; dil. 1:25), ottenuto in topo e diretto contro l'enzima β -galattosidasi di *E. coli*;
- anticorpo monoclonale anti-Usp (AB11, Christianson et al., 1992; dil. 1:50), ottenuto in topo e diretto contro il primo dominio a dita di zinco della proteina Ultraspiracle;
- anticorpo monoclonale anti-CD2 (MCA154G, Serotec; dil. 1:250), ottenuto in topo e diretto contro l'antigene di superficie CD2 di ratto;
- anticorpo monoclonale anti-EcR^{B1} (AD4.4, Developmental Studies Hybridoma Bank; dil. 1:10), ottenuto in topo e diretto contro la regione compresa tra gli aminoacidi in posizione 68 e 222 dell'isoforma B1 del recettore dell'eccidione;
- anticorpo monoclonale anti-EcR-Common (AG10.2, Developmental Studies Hybridoma Bank; dil. 1:1), ottenuto in topo e diretto contro la regione comune a tutte le isoforme dell'EcR, compresa tra gli aminoacidi in posizione 648 e 878;
- anticorpo monoclonale anti-EcR^A (15G1a, Developmental Studies Hybridoma Bank; dil.), ottenuto in topo e diretto contro la regione compresa tra gli aminoacidi in posizione 15 e 152 dell'isoforma A del recettore dell'eccidione.

Gli anticorpi secondari utilizzati per rilevare gli anticorpi primari sono:

- anticorpo anti-IgG (F(ab')₂) di coniglio, ottenuto in pecora e coniugato con il fluorocromo Cy3 (Sigma; dil. 1:1000);
- anticorpo anti-IgG (F(ab')₂) di topo, ottenuto in pecora e coniugato con il fluorocromo Cy3 (Sigma; dil. 1:100);
- anticorpo anti-IgG (H+L) di topo, ottenuto in capra e coniugato con il fluorocromo FITC (Molecular Probes; dil. 1:250)
- anticorpo anti-IgG (H+L) di topo, ottenuto in capra e coniugato con il fluorocromo Cy5 (Jackson ImmunoResearch; dil. 1:200)

PREMESSA SPERIMENTALE

Il gruppo di ricerca del Prof. Gargiulo è da tempo impegnato nello studio dell'epitelio follicolare e nell'analisi delle caratteristiche funzionali e regolative dei geni, espressi durante l'oogenesi, che codificano le principali componenti dell'involucro vitellino. Il progetto che mi ha visto principalmente coinvolto riguarda l'identificazione, attraverso approcci genetici, delle vie di segnalazione responsabili del controllo trascrizionale del gene *VM32E*, uno dei quattro membri della famiglia dei geni della membrana vitellina. L'interesse verso *VM32E* è dato dalle peculiarità che lo differenziano dagli altri membri della famiglia genica a cui appartiene. Tali caratteristiche fanno supporre un suo importante ruolo nel processo di assemblaggio del guscio dell'uovo.

VM32E, pur codificando una proteina della membrana vitellina, presenta un'espressione tardiva. Come mostrato da esperimenti di ibridazione *in situ*, infatti, il suo messaggero è presente solo allo stadio 10 dell'oogenesi (Gargiulo et al., 1991) mentre gli altri geni (*VM26A.1*, *VM26A.2* e *VM34C*) sono trascritti in un lasso di tempo più ampio, che va dallo stadio 8 al 10 (Burke et al., 1987; Popodi et al., 1988; Jin e Petri, 1993; Bryant et al., 1999). Oltre a questa differenza temporale nell'espressione, la localizzazione del trascritto di *VM32E* evidenzia una diversa attività del gene nelle popolazioni cellulari che compongono l'epitelio colonnare. Il suo messaggero è inizialmente presente allo stadio 10A in un gruppo di cellule follicolari ventrali e solo allo stadio 10B si osserva l'espressione anche nel dominio dorsale. Inoltre il gene risulta represso nelle regioni terminali dell'epitelio che riveste l'oocita (rispettivamente freccia e punta di freccia in fig. 13A). Al contrario *VM26A.2* è uniformemente espresso in tutte le cellule colonnari allo stadio 10 (fig. 13B). Ulteriori peculiarità sono emerse dallo studio della localizzazione della proteina. Utilizzando un anticorpo policlonale, diretto contro la regione carbossilica specifica della *VM32E*, si è visto che, allo stadio 10, la distribuzione della proteina all'interno dell'epitelio follicolare rispecchia il profilo di espressione del gene, mancando nei domini di cellule colonnari anteriori e posteriori (rispettivamente freccia e punta di freccia in fig. 13C). Oltre a un segnale intracellulare, in corrispondenza delle cellule che la sintetizzano la proteina è rilevabile anche nello spazio extracellulare che separa le cellule follicolari dall'oocita. Negli stadi successivi la proteina si distribuisce uniformemente nella membrana vitellina in formazione, indicando che, una volta secreta, essa è in grado di muoversi verso i poli (Andrenacci et

al., 2001). In accordo con i risultati degli esperimenti di ibridazione in situ, la proteina VM26A.2 è invece rilevabile, utilizzando un anticorpo specifico, in tutto l'epitelio colonnare dallo stadio 8 al 10 dell'oogenesi e il suo segnale è uniformemente distribuito nello spazio extracellulare (fig. 13D).

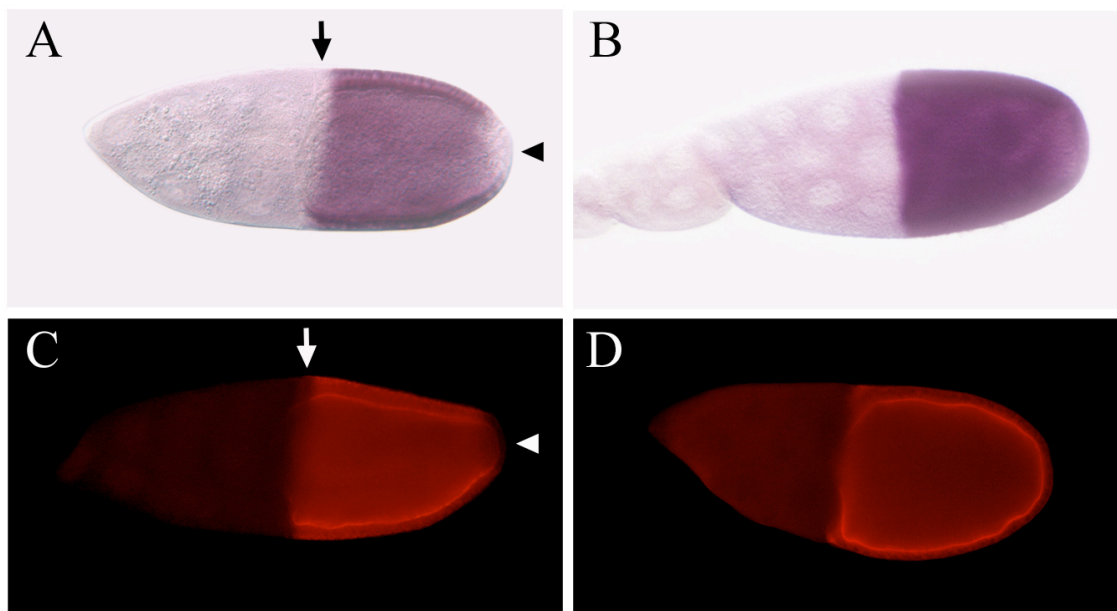


Figura 13: Espressione dei geni *VM32E* e *VM26A.2* in camere ovariche di stadio 10B. **A,B:** Profilo di espressione dei geni *VM32E* e *VM26A.2* rilevato mediante ibridazione *in situ*. **A:** Il gene *VM32E* è espresso in tutte le cellule follicolari colonnari, a eccezione di quelle più anteriori (freccia) e posteriori (punta di freccia). **B:** Allo stadio 10 il gene *VM26A.2* è trascritto in tutte le cellule colonnari. **C,D:** Immunolocalizzazione delle proteine VM32E e VM26A.2. **C:** VM32E non è sintetizzata nelle cellule colonnari anteriori (freccia) e in gruppo di cellule follicolari posteriori (punta di freccia). **D:** La proteina VM26A.2 è distribuita uniformemente in tutto l'epitelio colonnare. In tutti i pannelli le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra e, in A e C, con il lato dorsale verso l'alto.

L'analisi al microscopio elettronico ha inoltre evidenziato che negli stadi tardivi dell'oogenesi, in concomitanza con la formazione del corion, parte della proteina VM32E si rilocalizza nello strato endocorionico. Ciò indica che VM32E è una componente sia della membrana vitellina che dell'endocorion (Andrenacci et al., 2001).

Lo studio *in vivo* dell'espressione del gene reporter *lacZ*, diretta da differenti frammenti del promotore di *VM32E*, ha permesso di definire la regione minima che determina il corretto profilo d'espressione spazio-temporale del gene. Tale regione si estende dalla posizione -348 alla -39 e una sua fine dissezione ne ha evidenziato la natura modulare, portando all'identificazione di tre regioni regolative, al cui interno

sono presenti gli elementi che attivano o reprimono l'espressione del gene nelle differenti popolazioni cellulari dell'epitelio colonnare (fig. 14).

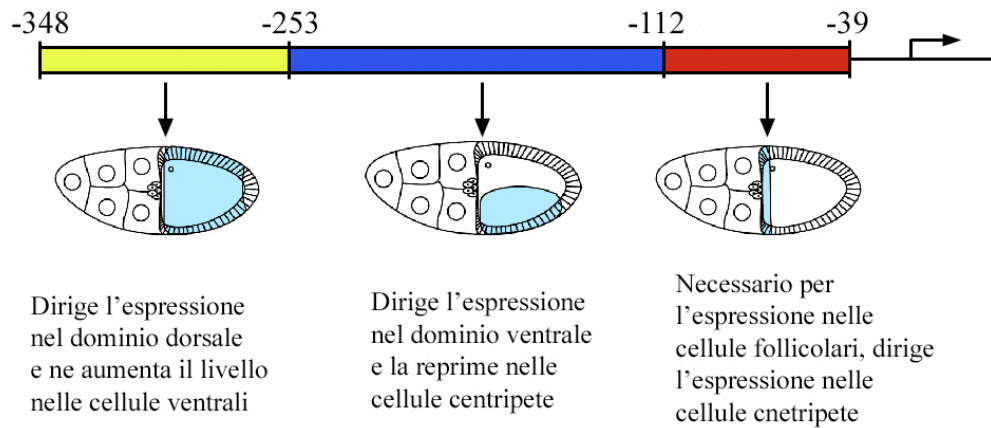


Figura 14: Rappresentazione schematica del promotore di *VM32E*. Sono mostrate le tre regioni contenenti gli elementi regolatori che controllano l'espressione del gene nei diversi domini cellulari dell'epitelio follicolare.

Il ruolo chiave nella regolazione trascrizionale di *VM32E* è svolto dalla porzione prossimale del promotore, che va dalla posizione -112 alla -39. Tale regione promuove l'espressione del gene reporter nelle sole cellule centripete ed è necessaria al funzionamento delle regioni a monte. Costrutti privi di tale regione non sono in grado di promuovere la trascrizione nei domini di espressione di *VM32E*. La regione centrale del promotore, che si estende dalla posizione -253 alla -113, è infatti incapace di attivare il gene reporter se isolata, ma in associazione con la sequenza -112/-39 abolisce l'espressione ectopica nelle cellule centripete e attiva l'espressione a livello dell'epitelio follicolare ventrale. Ciò indica la presenza, all'interno di tale regione (-253/-113), di almeno due elementi regolatori in cis: uno che reprime la trascrizione nelle cellule centripete, l'altro che la promuove nelle cellule ventrali. Analogamente, la terza regione identificata, compresa tra le posizioni -348 e -254, se isolata dirige l'espressione nelle cellule del bordo, mentre in associazione con la porzione prossimale (-112/-39), attiva la trascrizione in tutto l'epitelio colonnare, a eccezione delle cellule terminali posteriori. Al suo interno sono quindi presenti elementi che controllano positivamente l'espressione nelle popolazioni di cellule follicolari dorsali e ventrali.

Queste caratteristiche acquisiscono maggiore rilevanza alla luce di studi recenti, che suggeriscono che il guscio dell'uovo possa fungere anche da sito di ancoraggio di molecole prodotte dalle cellule follicolari e coinvolte nella determinazione delle strutture embrionali. Mediante saggi di immunolocalizzazione è stata infatti dimostrata la presenza ai due poli della membrana vitellina, dove la proteina VM32E si localizza solo tardivamente, della proteina Torso-like (Stevens et al., 2003), uno dei componenti della segnalazione che induce il differenziamento delle strutture terminali dell'embrione. Attraverso esperimenti di cromatografia in fase liquida associata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), inoltre, è stata evidenziata la presenza, all'interno del guscio dell'uovo, di Nudel, una delle proteasi attive nella determinazione dell'asse dorso-ventrale dell'embrione (Fakhouri et al., 2006). In quest'ottica il profilo di espressione di *VM32E* e la localizzazione della corrispondente proteina potrebbero essere funzionali alla corretta incorporazione nella membrana vitellina dei segnali materni che controllano lo sviluppo embrionale. L'identificazione delle vie di segnalazione che regolano la trascrizione di *VM32E*, quindi, può fornire nuove informazioni sul complesso sistema che sottende alla corretta formazione del guscio dell'uovo.

RISULTATI

Gli innumerevoli lavori condotti sull'oogenesi in *Drosophila melanogaster* hanno identificato le principali vie di segnalazione attive durante i vari stadi di tale processo, fornendo informazioni sul loro ruolo nei processi differenziativi che sottendono alla formazione dell'uovo maturo. Quasi nulla si sa, invece, riguardo la regolazione dei geni che codificano proteine strutturali del guscio. Nel tentativo di gettare un po' di luce su tali meccanismi ho cercato di identificare, attraverso approcci genetici, le vie di segnalazione che controllano l'espressione di *VM32E*, uno dei 4 geni codificanti proteine della membrana vitellina.

I profili di espressione dei geni della membrana vitellina sono conservati in *Drosophila pseudoobscura*

Il gene *VM32E* è soggetto a un fine controllo trascrizionale, che ne determina l'espressione in specifiche sottopopolazioni dell'epitelio colonnare in un arco temporale ben definito, che corrisponde allo stadio 10 dell'oogenesi. Il significato biologico di tale profilo non è noto ma ipotizziamo sia funzionale al ruolo svolto dalla proteina *VM32E*. Una conferma dell'importanza di tale controllo è giunta dall'analisi dell'espressione degli ortologi di *VM32E* e *VM26A.2* in *Drosophila pseudoobscura*, una specie filogeneticamente distante 25-30 milioni di anni da *D. melanogaster* (Powell, 1996).

Attraverso una ricerca bioinformatica ho identificato la proteina *Dpse\GA14189* (GenBank protein EAL33865), l'ortologo in *Drosophila pseudoobscura* di *VM32E*. Le due proteine presentano un'identità del 70% e una similarità del 77% (fig. 15A). Altamente conservati risultano sia il dominio idrofobico (VM), caratteristico delle proteine della membrana vitellina, che la sequenza aminoacidica contro la quale è diretto l'anticorpo che riconosce specificamente la *VM32E* (13 aminoacidi su 15). Tale anticorpo, utilizzato in esperimenti di immunolocalizzazione su camere ovariche di *Drosophila pseudoobscura*, è in grado di rilevare la proteina *Dpse\GA14189*. Come si evince dalla fig. 15C, tale proteina è sintetizzata solo allo stadio 10 dell'oogenesi e non è presente nelle cellule follicolari anteriori e posteriori (rispettivamente freccia e punta di freccia in fig. 15C), analogamente a *VM32E*.

A

```

VM32E      MQIVALTLVAFVAIAGASCPYAAPAPAYSAPAAS--SGYPAPPCPTNYLFSCQPNLAPAP 58
GA14189    -----VVLFAAFACASCSSSYAAPAPAPAAAPASSYSVVPAPPCPKNYLFSCQPNLVPAP 55
           :.*.* . * *. . . .***** :*.*.* * .*****.*****.***

VM32E      CAQEAP--AYGSAGAYTEQVPHYVGSFNREQLQQFHQRIGMAALMEELRGLGQGIQGQOY 116
GA14189    CAQQAAPAAAYGSAGAYTEQVPSYIGFAPYQQLQYHQYRIGNAALIDELRSLGQGIQGQOY 115
           ***:* . ********** *:* . :***:***** ***:***.*****

```

B

```

VM26A.2    MAFNFGHLLIAGLVALSAVSSETIQLQPTQGILIPAPLAENIRVSRAAAYGG-YGAAPAAP 59
GA21501    MAFNIGNILLIAAVVG-AVAGETIQLQPTQGILIPAPLAENIRVSRAAAYGGYGAPAAP 59
           ***:*:*:* . * . **:.*****.*****.*****.*****.***

VM26A.2    SYSAPAAP-----AAQAYSAPAAPAYSAPAAPAYSAPAAPAYSAPAAPAYSAPAAPA--- 111
GA21501    SYSAPAAPSYSAPAAPSYSAPAAPSYSAPATPSYSAPAAPSYAAPAAPSYSAPAAPAAPS 119
           ***** ** :*****:*****:*:*****:*:*****:*****

VM26A.2    YSAPASIPSPPCPKNYLFSCQPSLQPVPCSAQAQSYGSAGAYSQYVVPQYAVPFVREL 168
GA21501    YAAPAGIPSPPCPKNYLFSCQPSLQPVPCSAAPSYGSAGAYSQYVVPQYAVPYVRE- 175
           *:*:* .*****.*****.*****.*****.*****.*****.***

```

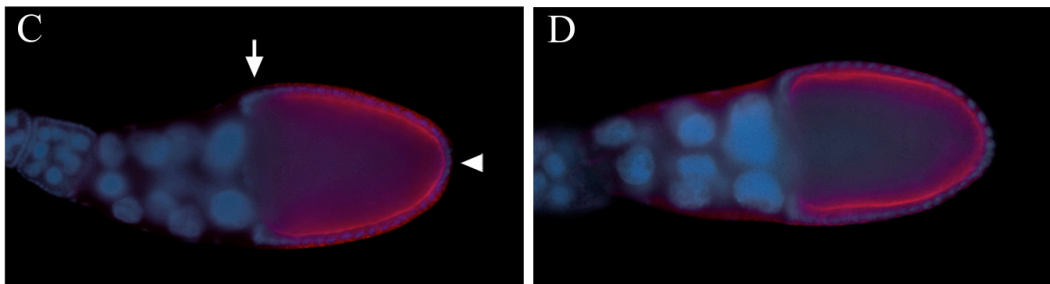


Figura 15: Analisi comparativa di VM32E, VM26A.2 e delle rispettive proteine ortologhe di *Drosophila pseudoobscura*. **A:** Allineamento delle sequenze proteiche di VM32E e dell'ortologo GA14189. In giallo è evidenziato il dominio VM, mentre sottolineato è indicato l'epitopo contro cui è diretto l'anticorpo anti-CVM32E. **B:** Allineamento delle sequenze proteiche di VM26A.2 e dell'ortologo GA21501. In giallo è evidenziato il dominio VM; la sequenza riconosciuta dall'anticorpo anti-VMP, è sottolineata. **C,D:** Immunolocalizzazione delle proteine GA14189 e GA21501. Per visualizzare meglio la distribuzione delle proteine le camere ovariche sono state sottoposte a colorazione con DAPI. Visioni trasversali, ottenute al microscopio ottico a fluorescenza, di camere ovariche di stadio 10B di *Drosophila pseudoobscura*. **C:** L'ortologo di VM32E non è sintetizzato nelle cellule colonnari anteriori (freccia) e in un gruppo di cellule follicolari posteriori (punta di freccia). **D:** La proteina ortologa di VM26A.2 è distribuita uniformemente nell'epitelio follicolare. In **C** e **D** le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra.

La ricerca bioinformatica ha identificato anche *Dpse*\GA21501 (GenBank protein EAL34278), la proteina di *D. pseudoobscura* ortologa a VM26A.2. Il grado di conservazione tra le due proteine è maggiore rispetto a quello mostrato tra VM32E e il suo ortologo. La percentuale di identità è infatti dell'80%, mentre la similarità addirittura dell'87% (fig. 15B). Il dominio VM si è mantenuto pressochè inalterato tra le due proteine nel corso dell'evoluzione e anche la sequenza ripetuta, riconosciuta dall'anticorpo anti-VMP, è quasi identica. Ciò ci ha permesso di utilizzare l'anticorpo

anti-VMP per rilevare, in esperimenti di immunostochimica su camere ovariche di *Drosophila pseudoobscura*, la distribuzione della proteina *Dpse*GA21501. Dal confronto tra le figg. 13D e 15D si nota come, anche in questo caso, i due orologi presentano un profilo di espressione identico, essendo entrambe le proteine sintetizzate dallo stadio 8 al 10 in tutto l'epitelio colonnare. La conservazione tra le due specie dei profili d'espressione dei geni orologi suggerisce l'esistenza di meccanismi di regolazione simili per i geni della membrana vitellina e l'importanza della regolazione di *VM32E* per la funzione della proteina da esso codificata.

La via di segnalazione di Dpp reprime l'espressione di VM32E

Come già detto il gene *VM32E* è inattivo nelle cellule follicolari anteriori poste al confine tra oocita e cellule nutrici. Al fine di definire in maggior dettaglio questo dominio cellulare ho condotto esperimenti di immunostochimica su camere ovariche provenienti da femmine che esprimono la proteina di fusione His2avDGFP, che marca selettivamente i nuclei. L'analisi dei campioni al microscopio confocale ha mostrato che, anteriormente, la proteina VM32E non è sintetizzata in un dominio molto ristretto, formato da massimo due file di cellule sul lato ventrale e tre su quello dorsale (fig. 16A). Tale dominio potrebbe coincidere con le cellule centripete, il cui differenziamento è controllato dalla via di segnalazione di Decapentaplegic (Twombly et al., 1996), un membro della famiglia dei TGF β . Come mostrato sia da esperimenti di ibridazione *in situ* che dalla rilevazione dell'attività β -galattosidasi in una linea enhancer trap specifica, il gene *dpp* è espresso a partire dallo stadio 8 in un gruppo di 20-30 cellule follicolari anteriori. Allo stadio 10 il trascritto è presente nelle cellule squamose e nella fila più anteriore di cellule centripete (Twombly et al., 1996).

L'attivazione della via richiede il legame del morfogeno Dpp a un complesso recettoriale eterotetrameric, formato da due recettori di tipo I (Thick veins) e due di tipo II (Punt). Il recettore così costituito attiva poi, fosforilandola, la proteina Mad, l'unico fattore trascrizionale della via ad ora noto in *Drosophila*. La disponibilità di un anticorpo diretto contro la forma fosforilata di Mad (Tanimoto et al., 2000) permette di visualizzare *in vivo* i domini cellulari nei quali è attiva la via di Dpp. La provenienza di

tale anticorpo (coniglio) ne impedisce però l'utilizzo in esperimenti di coimmunolocalizzazione con l'anticorpo specifico per la VM32E. Per ovviare a questo problema mi sono avvalso di un ceppo transgenico di *Drosophila* che esprime, sotto il controllo del promotore minimo di *VM32E*, la proteina di fusione VM32E-MYC (Andrenacci et al., 2001), rilevabile con un anticorpo monoclonale che riconosce l'epitopo Myc. Come mostrato in fig. 16B le cellule nelle quali è attiva la via di segnalazione di Dpp non sintetizzano la proteina chimerica. Ciò dimostra che il dominio di non espressione di *VM32E* coincide con le cellule centripete e suggerisce che la via di Dpp potrebbe reprimere *VM32E* in queste cellule.

Per testare tale ipotesi ho indotto l'espressione ectopica di Dpp nell'epitelio follicolare, avvalendomi del sistema UAS/Gal4, e ne ho analizzato gli effetti sulla trascrizione di *VM32E*. Il ceppo CY2Gal4 (Queenan et al., 1997), utilizzato per dirigere l'espressione del transgene *UAS-dpp*, è un enhancer-trap attivo, a partire dallo stadio 8 dell'oogenesi, nelle cellule che danno origine all'epitelio colonnare, come mostrato dall'espressione del gene reporter *UAS-GFP* (fig. 16C). Nelle camere ovariche prodotte da femmine CY2Gal4/*UAS-dpp* l'espressione di *VM32E* è completamente abolita, come mostrato sia da esperimenti di ibridazione *in situ* che attraverso immunostochimica (fig. 16D,F). Di contro la trascrizione di *VM26A.2* non presenta alcuna alterazione, essendo la distribuzione del suo messaggero identica al contesto selvatico (fig. 16E vs 13B).

L'assenza di espressione di *VM32E* in questo contesto genetico mi ha indotto ad analizzare l'integrità della membrana vitellina delle uova deposte. L'espressione ectopica di *dpp* induce profonde alterazioni nelle strutture corioniche anteriori (Dobens et al., 2000). In particolare le uova mostrano riduzione o completa assenza delle appendici dorsali ed espansione dell'opercolo nella regione dorsale. Oltre a questi fenotipi riportati in letteratura ho evidenziato la presenza di difetti nell'assemblaggio dell'involucro vitellino. Come già detto la membrana vitellina è una struttura rigida, che mantiene la forma dell'uovo anche dopo la rimozione degli strati corionici esterni. Inoltre risulta normalmente impermeabile al colorante naturale neutral red, che viene quindi utilizzato per rilevare alterazioni a carico di questo strato (LeMosy e Hashimoto, 2000; Cernilogar et al., 2001).

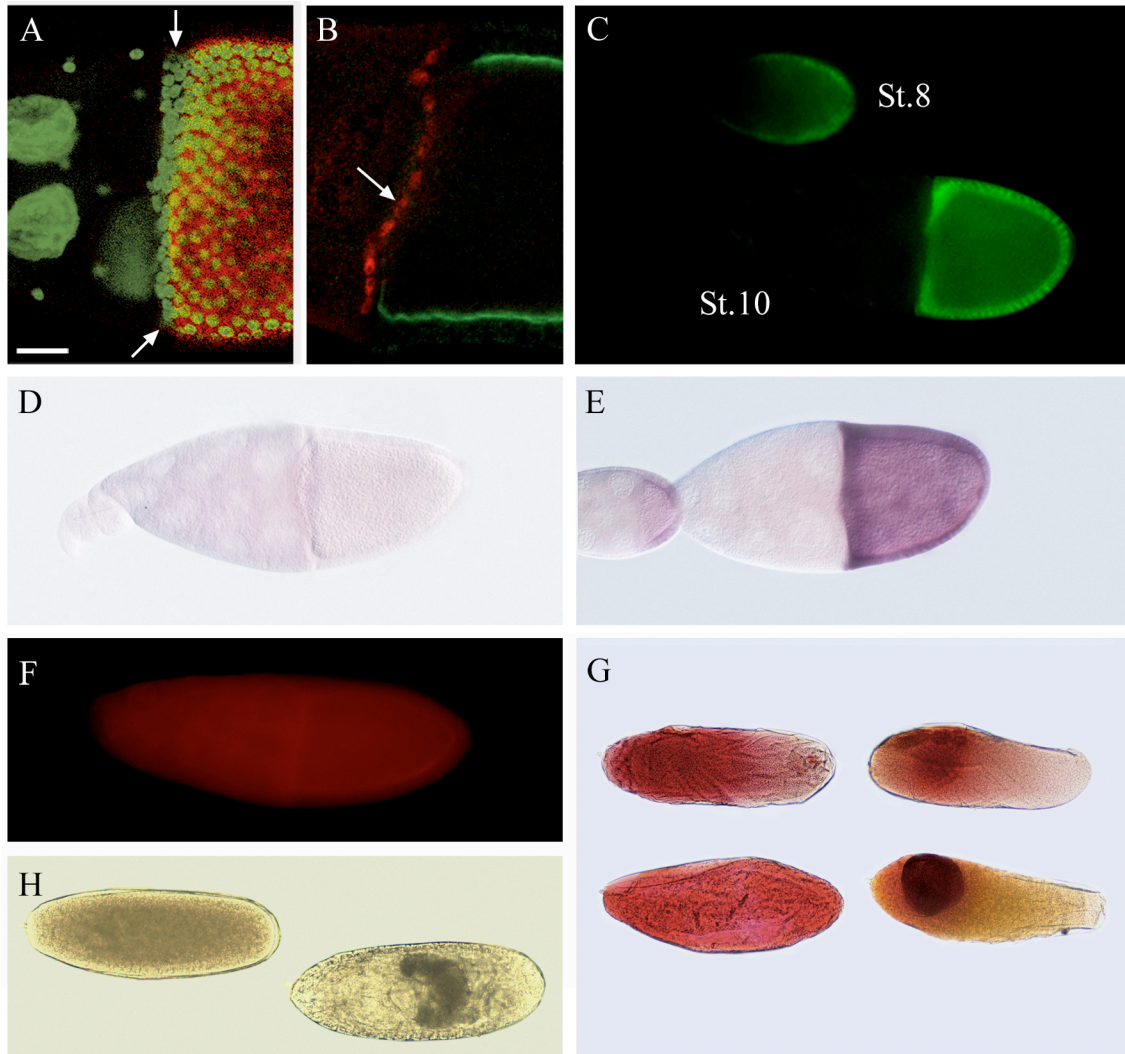


Figura 16: L'espressione ectopica di *dpp* reprime la trascrizione di *VM32E* nelle cellule follicolari. **A:** Sezione superficiale, ottenuta al microscopio confocale, della regione anteriore dell'epitelio colonnare di una camera ovarica di stadio 10B. I nuclei sono marcati in verde dall'espressione della proteina chimerica His2avDGFP. *VM32E* (rosso) non è sintetizzata in un ristretto dominio di cellule follicolari anteriori (freccie). **B:** Sezione trasversale analizzata al microscopio confocale di una camera ovarica di stadio 10B. La proteina chimerica *VM32E-MYC* (verde) non è sintetizzata nelle cellule centripete (freccia) nelle quali è presente la forma fosforilata della proteina Mad (pMad; rosso). **C:** Visione trasversale al microscopio ottico a fluorescenza mostrante l'espressione del reporter *UAS-GFP*, diretta dalla linea enhancer trap *CY2Gal4*, in due camere ovariche di diverso stadio. L'espressione è rilevabile nelle cellule follicolari colonnari dallo stadio 8 al 10. **D-F:** Rilevazione, mediante ibridazione *in situ*, dei trascritti dei geni *VM32E* (D) e *VM26A.2* (E) e immunolocalizzazione della proteina *VM32E* (F) in camere ovariche che esprimono ectopicamente *dpp*. **D,E:** In questo contesto genetico l'espressione di *VM32E* è repressa (D), mentre la trascrizione di *VM26A.2* non risulta alterata (E). **F:** La proteina *VM32E* non è rilevabile in seguito all'espressione ectopica di *dpp*. **G,H:** Immagini a basso ingrandimento di uova sottoposte a colorazione con neutral red. **G:** Uova deposte da femmine *CY2Gal4/UAS-dpp* che mostrano differenti gradi di colorazione. **H:** Uova deposte da femmine selvatiche che risultano impermeabili al colorante. In tutti i pannelli le camere ovariche e le uova sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. In A la barra corrisponde a 20 μm .

Il 41,7% (245 su 588) delle uova deposte da femmine *CY2Gal4/UAS-dpp* risultano permeabili al colorante (fig. 16G), contro il 3,7% (20 su 542) delle uova selvatiche (fig. 16H). Il grado di assorbimento del colorante nelle uova deposte da femmine mutanti è variabile e nei fenotipi più estremi si ha un collasso dell'uovo in seguito alla rimozione del corion.

Un'ulteriore dimostrazione della capacità di Dpp di reprimere *VM32E* è giunta dall'analisi del profilo trascrizionale del gene in camere ovariche nelle quali è stata indotta l'espressione ectopica di alcuni componenti della via di segnalazione di Dpp, quali il recettore Tkv, il fattore trascrizionale Mad e il cofattore Medea, che insieme a Mad regola l'espressione genica. Quando si induce l'attivazione della via in tutto l'epitelio follicolare, facendo esprimere una forma costitutivamente attiva di Tkv (*Tkv^{Q253D}*; Nellen et al., 1996), il trascritto di *VM32E* non è più sintetizzato (fig. 17A). Un risultato analogo si ottiene esprimendo il gene *Mad* (fig. 17C), mentre un fenotipo meno penetrante si osserva nelle camere ovariche di femmine *CY2Gal4/UAS-Med*. In questo contesto, infatti, la trascrizione di *VM32E* è ridotta significativamente, ma non abolita (fig. 17B). Questa differenza potrebbe essere dovuta al fatto che il ceppo utilizzato per esprimere ectopicamente il fattore trascrizionale Mad possiede due copie del transgene integrate sullo stesso cromosoma (Newfeld et al., 1996).

I risultati sopra descritti indicano chiaramente che la via di Dpp, se attivata ectopicamente, è in grado di reprimere il gene *VM32E* e suggeriscono inoltre che, in contesto selvatico, tale via possa controllare negativamente l'espressione di *VM32E* nelle cellule centripete. Per dimostrarlo ho analizzato gli effetti dell'inattivazione della via in questo dominio cellulare. A causa dell'aploinsufficienza di *dpp* sono ricorso all'analisi clonale dell'allele nullo *Mad^{l2}*, che causa la sintesi di una proteina tronca (Sekelsky et al., 1995), incapace di trasdurre il segnale di Dpp all'interno della cellula. La formazione dei cloni è stata indotta con il sistema Flp/FRT (Golic, 1991) e le cellule omozigoti per la mutazione si distinguono per l'assenza del marcatore GFP. Come si osserva nelle figg. 17D-F l'attività del gene *VM32E* è inalterata in cloni di cellule follicolari del corpo principale, che normalmente non ricevono il segnale di Dpp, mentre si ha sintesi ectopica di *VM32E* se la segnalazione è inibita nelle cellule centripete (freccia nelle figg. 17F,G). In questo dominio cellulare, quindi, l'assenza di

espressione del gene *VM32E* è dovuta alla repressione mediata dalla segnalazione di Dpp.

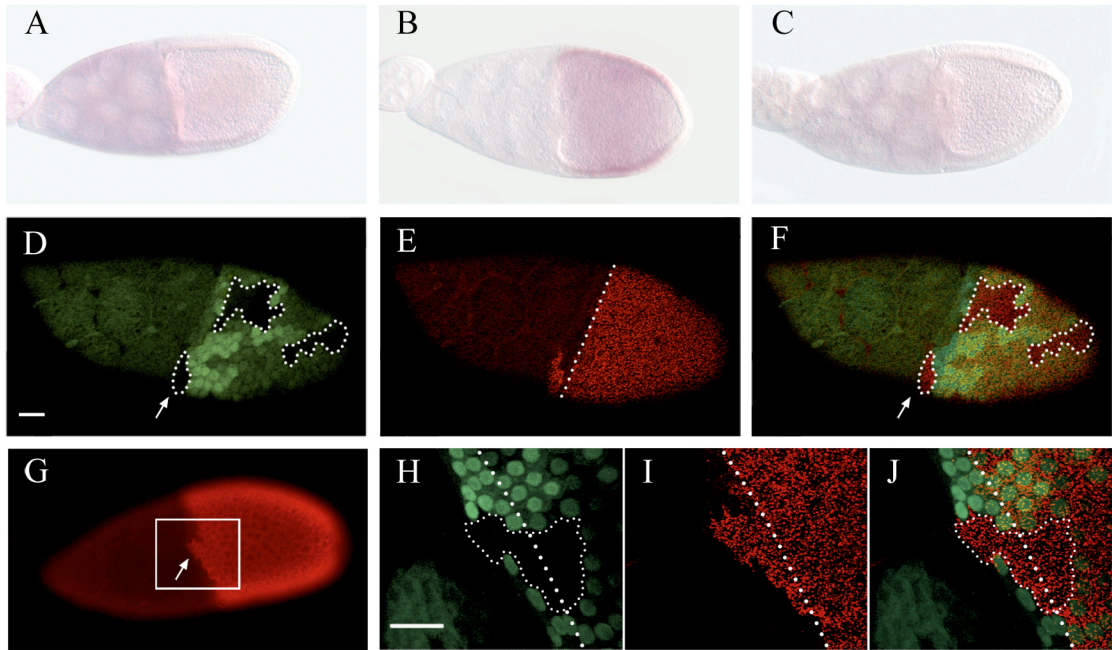


Figura 17: La via di segnalazione di Dpp reprime l'espressione di *VM32E* nelle cellule centripete. **A-C:** Rilevazione del trascritto di *VM32E* mediante ibridazione *in situ*. **A:** L'espressione ectopica di una forma costitutivamente attiva del recettore *Tkv* reprime completamente l'espressione di *VM32E*. **B:** Il livello del trascritto di *VM32E* è drasticamente ridotto in seguito all'espressione del transgene *UAS-Med* in tutto l'epitelio colonnare. **C:** L'espressione, guidata dalla linea *CY2Gal4*, di due copie del transgene *UAS-Mad* abolisce la trascrizione di *VM32E*. **D-F:** Sezione superficiale, ottenuta al microscopio confocale, di una camera ovarica di stadio 10B. **D:** Espressione del marcatore *Ubi-GFP*, la cui assenza identifica i cloni di cellule follicolari omozigoti per la mutazione *Mad¹²* (aree tratteggiate). **E:** Immunolocalizzazione della proteina *VM32E*. La linea tratteggiata indica il margine anteriore di normale espressione del gene. **F:** Sovrapposizione delle due immagini precedenti, che mostra l'espressione ectopica del gene *VM32E* nel clone che comprende le cellule centripete (freccia). **G-J:** Camera ovarica di stadio 10B nella quale è presente un clone di cellule follicolari anteriori omozigoti per la mutazione *Mad¹²*. **G:** Visione superficiale, ottenuta al microscopio ottico a fluorescenza, di una camera ovarica di stadio 10B mostrante sintesi ectopica di *VM32E* in un gruppo di cellule centripete (freccia). **H-J:** Sezione superficiale, ottenuta al microscopio confocale, della regione delimitata dal riquadro in G. **H:** Clone di cellule (area tratteggiata) che comprende alcune cellule centripete, a sinistra della linea tratteggiata, e alcune cellule colonnari anteriori, a destra. **I:** Immunolocalizzazione della proteina *VM32E*. **J:** Sovrapposizione di H e I dalla quale si evince che nelle cellule centripete che ricadono all'interno del clone la proteina *VM32E* è sintetizzata ectopicamente. In tutti le immagini le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. La barra in D e H corrisponde a 20 μm .

La repressione di *VM32E* da parte di Dpp è mediata dalla regione centrale del promotore

I lavori precedentemente condotti sul promotore di *VM32E* (Cavaliere et al, 1997; Andrenacci et al., 2000) indicano l'esistenza, nella regione centrale del promotore (-253/-113), di un elemento *in cis* che blocca l'espressione del gene nelle cellule centripete. Per verificare se la repressione indotta da Dpp fosse mediata da tale elemento ho analizzato l'attività di 3 differenti costrutti in contesti genetici che alterano la normale segnalazione da parte di Dpp.

La porzione più prossimale del promotore (-112/-39), in un contesto selvatico, dirige l'espressione del gene *lacZ* nelle sole cellule centripete (freccie in fig.18A), come si evince da esperimenti di coimmunolocalizzazione con l'anticorpo diretto contro la forma fosforilata di Mad (figg. 18B-D). L'attivazione della via di Dpp in tutto l'epitelio colonnare (*CY2Gal4/UAS-dpp*) non altera in alcun modo l'espressione del reporter nelle cellule centripete (figg. 18E-G), indicando che Dpp non agisce a livello di questa regione del promotore.

L'aggiunta della regione -253/-113 modifica l'attività della regione prossimale del promotore. Il costrutto *-253/-39-lacZ* è infatti attivo nel dominio ventrale dell'epitelio follicolare e l'espressione nelle cellule centripete è repressa (fig. 18H). All'interno della porzione -253/-113 esiste quindi un elemento che controlla negativamente la trascrizione del gene nelle cellule centripete. Tale elemento potrebbe essere il bersaglio della repressione indotta dalla via di segnalazione di Dpp. Quest'ipotesi è avallata da esperimenti di espressione ectopica di *dpp* che, come mostrato in fig. 18I, è in grado di abolire completamente l'attività del costrutto *-253/-39-lacZ*. Un'ulteriore conferma è giunta dall'analisi di un terzo costrutto, *-348/-254/-112/-39-lacZ*, che comprende il promotore minimo (-348/-39) di *VM32E* deieto della regione centrale. In un contesto selvatico questo costrutto è attivo in tutto l'epitelio colonnare, a eccezione delle cellule terminali posteriori (fig. 18J). Nelle camere ovariche provenienti da femmine *CY2Gal4/UAS-dpp* l'espressione del gene *lacZ* è inalterata (fig. 18K), indicando che è la regione -253/-112 a mediare la repressione a opera di Dpp.

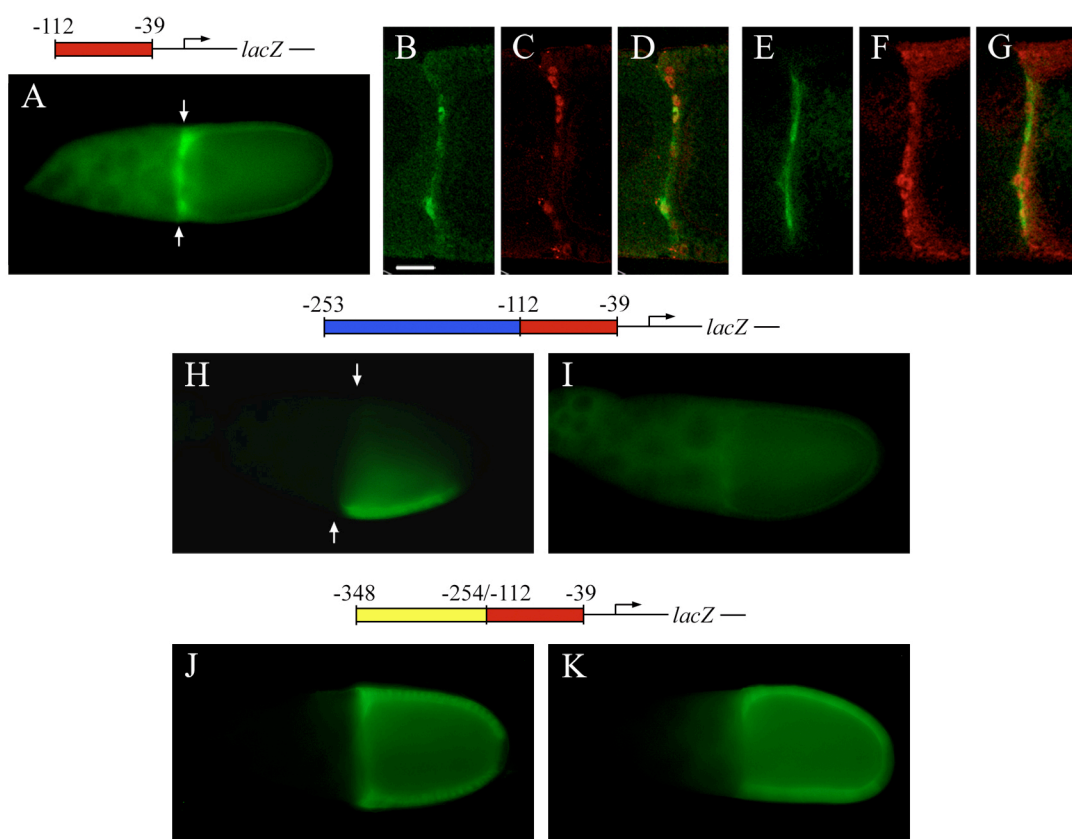


Figura 18: La regione -253/-113 del promotore di *VM32E* risponde all'attivazione ectopica della via di segnalazione di Dpp. **A-K:** Immunolocalizzazione della proteina β -galattosidasi in camere ovariche di stadio 10B, che esprimono il gene reporter *lacZ* sotto il controllo di differenti regioni del promotore di *VM32E*. **A-G:** Analisi dell'attività della regione -112/-39. **A:** Visione trasversale al microscopio ottico a fluorescenza mostrante l'espressione del reporter nelle cellule centripete (freccie). **B-G:** Coimmunolocalizzazione delle proteine β -galattosidasi (verde) e pMad (rosso). Sezioni trasversali, ottenute al microscopio confocale. **B-D:** Camera ovarica proveniente da femmina selvatica. **D:** Sovrapposizione di B e C. Il dominio di espressione del gene reporter coincide con le cellule centripete nelle quali è attiva la via di segnalazione di Dpp. **E-G:** Camera ovarica che esprime ectopicamente *dpp*. **G:** Sovrapposizione di E e F. L'espressione del gene *lacZ* non risulta alterata. **H,I:** Analisi dell'attività della regione -253/-39. Visioni trasversali al microscopio ottico a fluorescenza. **H:** Camera ovarica selvatica. La regione -253/-39 dirige l'espressione del reporter nelle cellule follicolari ventrali ma non nelle cellule centripete (freccie). **I:** Camera ovarica che esprime ectopicamente *dpp*, nella quale non si ha sintesi di β -galattosidasi. **J,K:** Analisi dell'attività del costrutto -348/-254/-112/-39-*lacZ*. Visioni trasversali ottenute al microscopio ottico a fluorescenza. **J:** Camera ovarica selvatica mostrante espressione di *lacZ* in tutto l'epitelio colonnare, a eccezione di un piccolo gruppo di cellule follicolari posteriori. **K:** Camera ovarica nella quale è stata indotta l'espressione di *dpp* in tutto l'epitelio follicolare. L'espressione del gene *lacZ* non è alterata. In tutti i pannelli le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. La barra in B corrisponde a 20 μ m.

L'analisi dell'attività del costrutto -253/-39-*lacZ* in cloni di cellule follicolari omozigoti per la mutazione *Mad*^{l2} ha fornito un'ulteriore prova a favore del modello proposto. L'osservazione al microscopio confocale ha evidenziato derepressione del transgene nelle cellule centripete nelle quali è bloccata la segnalazione di Dpp (freccie nelle figg.

19A-F). Come si evince dalle figg. 19C,F (freccie) il gene *lacZ* è espresso ectopicamente nelle cellule centripete mutanti, e la sua attivazione è indipendente dalla posizione del clone lungo l'asse dorso-ventrale della camera ovarica. La proteina β -galattosidasi è infatti sintetizzata sia in cloni di cellule centripete ventrali (figg. 19A-C) che dorsali (figg. 19D-F). Il blocco della segnalazione in cloni di cellule follicolari del corpo principale, inoltre, non modifica l'attività del costrutto. Nei cloni localizzati nella regione ventrale dell'epitelio follicolare, infatti, permane l'espressione del gene reporter (parentesi nelle figg. 19A-C) mentre nei cloni dorsali non si osserva attivazione ectopica (asterisco nelle figg. 19D-F).

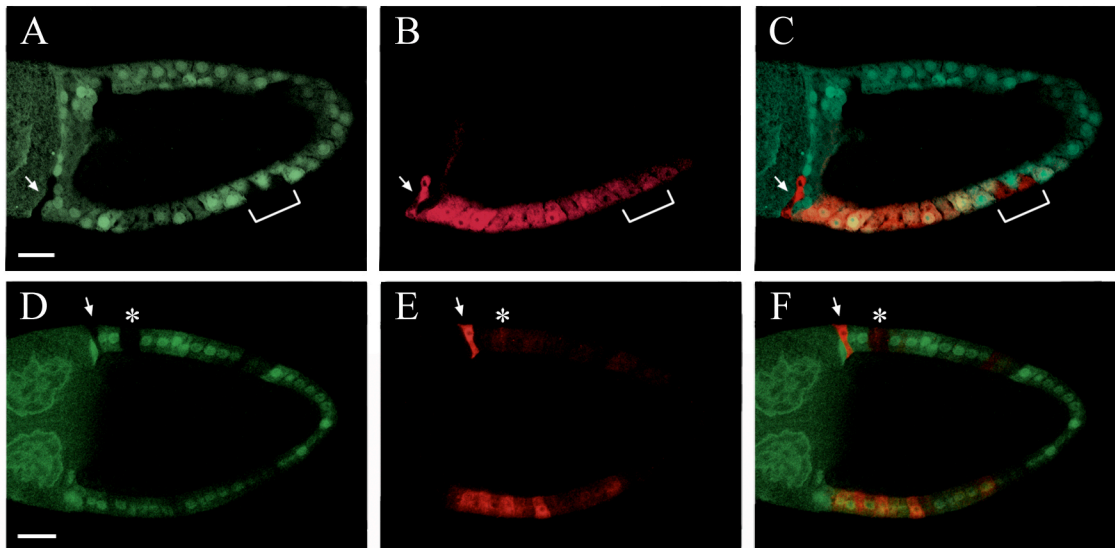


Figura 19: La regione -253/-113 del promotore di *VM32E* contiene un elemento di risposta a Dpp. **A-F:** Immunolocalizzazione della proteina β -galattosidasi (rosso), espressa sotto il controllo della regione -253/-39 del promotore di *VM32E*, in camere ovariche di stadio 10B che presentano cloni di cellule follicolari omozigoti per la mutazione *Mad*¹². I cloni sono marcati negativamente dalla GFP. Sezioni trasversali ottenute al microscopio confocale. **A-C:** Camera ovarica dotata di due cloni, uno all'interno delle cellule centripete (freccia) e l'altro nelle cellule follicolari ventrali (parentesi). **C:** Sovrapposizione di A e B. Il transgene -253/-39-*lacZ* è derepresso nel clone di cellule centripete. **D-F:** Camera ovarica dotata di due cloni, uno all'interno delle cellule centripete (freccia) e l'altro nelle cellule follicolari dorsali (asterisco). **F:** Sovrapposizione di D ed E. La proteina β -galattosidasi è sintetizzata ectopicamente nel clone di cellule centripete, mentre non è espressa nel clone di cellule dorsali. In tutti i pannelli le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. La barra in A e D corrisponde a 20 μ m.

Poiché la ricerca di putativi siti di legame per il complesso trascrizionale Mad-Medea all'interno della regione -253/-113 del promotore di *VM32E* non ha dato esiti positivi, crediamo che la segnalazione di Dpp reprima *VM32E* indirettamente. Un'ipotesi che sto analizzando prevede che sia Notch a mediare la risposta di *VM32E* a Dpp.

Notch potrebbe mediare la repressione Dpp-dipendente di *VM32E* nelle cellule centripete

Un recente lavoro (Dobens et al., 2005) ha evidenziato che allo stadio 10 dell'oogenesi alti livelli di Notch sono presenti nelle cellule squamose e centripete. Inoltre ha dimostrato che l'attivazione della via di segnalazione di Notch è limitata a questo dominio cellulare dal fattore trascrizionale Bunched, a sua volta controllato da Dpp. Alla luce di questi dati ho intrapreso un'analisi volta a indagare il possibile coinvolgimento di Notch nella repressione di *VM32E* a opera di Dpp. In particolare sto analizzando, attraverso una serie di esperimenti, l'espressione di *VM32E* in contesti in cui la via di segnalazione di Notch è alterata. Un primo risultato interessante viene dall'espressione clonale del dominio intracellulare di Notch (N^{intra}), che induce l'attivazione costitutiva della via di segnalazione (Dobens et al., 2005). L'espressione clonale è indotta utilizzando una cassetta Flip-out che accoppia al sistema UAS/Gal4 la tecnica Flp/FRT (Pignoni e Zipursky, 1997). Nei cloni che esprimono ectopicamente il transgene $UAS-N^{intra}$, evidenziabili per la perdita del marcatore CD2, il gene *VM32E* è represso (figg. 20A-C), suggerendo che Notch ne possa controllare negativamente l'espressione nelle cellule centripete. Ulteriori esperimenti sono in corso per confermare quest'ipotesi.

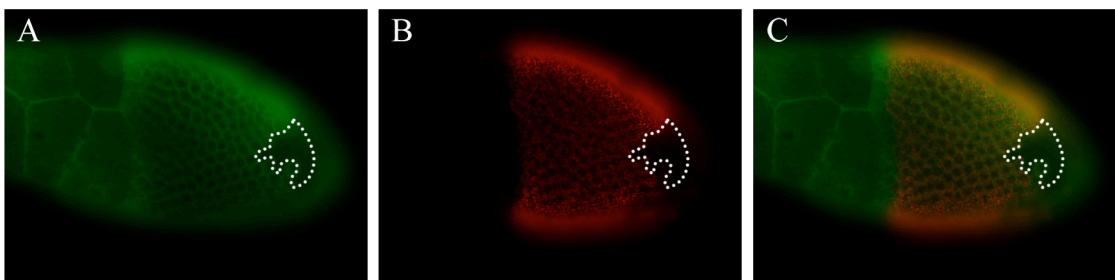


Figura 20: L'espressione ectopica di una forma costitutivamente attiva di Notch reprime il gene *VM32E*. **A-C:** Visione superficiale, al microscopio ottico a fluorescenza, di una camera ovarica di stadio 10B. **A:** Immunolocalizzazione del marcatore CD2, la cui assenza identifica il clone di cellule che esprime il transgene $UAS-N^{intra}$ (area tratteggiata). **B:** Immunolocalizzazione della proteina VM32E. **C:** Sovrapposizione di A e B. All'interno del clone è abolita la sintesi di VM32E. La camera ovarica è orientata con l'estremità anteriore a sinistra.

L'attivazione ectopica dell'Egfr altera l'espressione di *VM32E* nelle cellule del corpo principale

Come detto l'espressione di *VM32E* è soggetta a un fine controllo temporale. Il trascritto del gene è inizialmente rilevabile in camere ovariche di stadio 10A nella regione ventrale dell'epitelio follicolare e allo stadio 10B l'espressione si estende anche alle cellule follicolari dorsali. Questa differente attività del gene lungo l'asse dorso-ventrale dell'epitelio follicolare suggerisce un coinvolgimento della via di segnalazione dell'Egfr nella sua regolazione. Per indagare quest'aspetto ho esaminato l'espressione di *VM32E* in camere ovariche nelle quali la via dell'Egfr è attivata ectopicamente. A tal fine mi sono avvalso di un transgene codificante una forma costitutivamente attiva del recettore (λ -Top; Queenan et al., 1997), la cui espressione è stata indotta per mezzo del ceppo CY2Gal4. In questo contesto genetico si osserva repressione di *VM32E* in un dominio più esteso di cellule follicolari anteriori e posteriori (fig. 21A). Nelle cellule del corpo principale che continuano a esprimere il gene, inoltre, il livello del trascritto risulta inferiore al normale, come mostrato anche dall'immunolocalizzazione della proteina (fig. 21C). L'espressione del gene *VM26A.2*, di contro, non è influenzata dall'attivazione dell'Egfr (fig. 21B). Esperimenti di ibridazione in situ, infatti, non evidenziano né alterazioni nel normale profilo di espressione spazio-temporale del gene né differenze nel livello di trascritto sintetizzato.

Come mostrato da colorazione con neutral red, alle profonde alterazioni riscontrate nel profilo trascrizionale di *VM32E* si associano anche in questo caso, come per l'espressione ectopica di Dpp, difetti nella membrana vitellina. Se incubate con il colorante, il 63% (154 su 253) delle uova deposte da femmine CY2Gal4/*UAS- λ -top* risultano permeabili (fig. 21E), contro lo 0,8% (8 su 1000) delle uova selvatiche (fig. 21D). L'assorbimento del neutral red avviene ai due poli dell'uovo (fig. 21E) e ciò potrebbe dipendere dall'alterata espressione di *VM32E* nei domini anteriori e posteriori dell'epitelio follicolare.

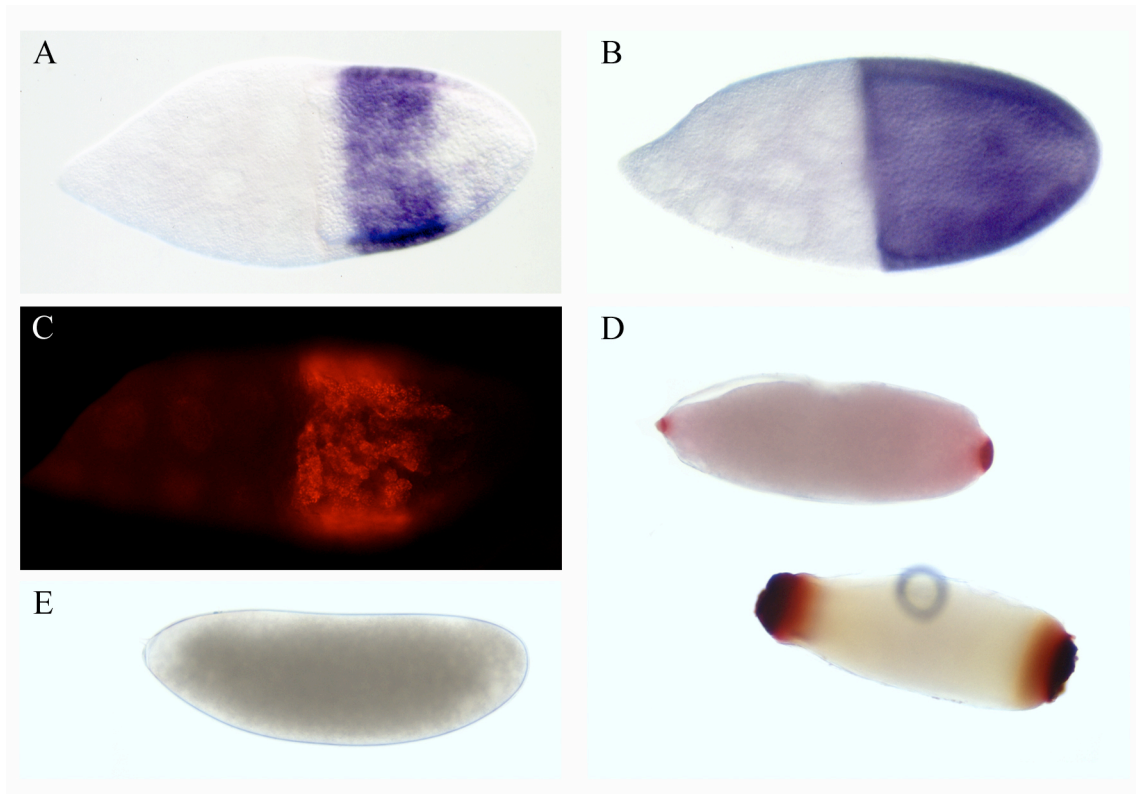


Figura 21: L'attivazione ectopica dell'Egfr altera la trascrizione di *VM32E* e provoca difetti nella membrana vitellina. **A-C:** Profilo di espressione dei geni *VM32E* e *VM26A.2*, rilevato mediante ibridazione in situ, e immunolocalizzazione della proteina VM32E in camere ovariche di stadio 10B che esprimono una forma costitutivamente attiva dell'Egfr. **A:** Il gene *VM32E* è represso in un ampio dominio posteriore e in una larga fascia di cellule follicolari anteriori. **B:** L'espressione del gene *VM26A.2* non è alterata. **C:** La sintesi della proteina VM32E è fortemente alterata nel contesto *CY2Gal4/UAS- λ top*. **D-E:** Immagini a basso ingrandimento di uova sottoposte a colorazione con neutral red. **D:** Uova deposte da femmine selvatiche che risultano impermeabili al colorante. **E:** Uova deposte da femmine *CY2Gal4/UAS-dpp* che mostrano assorbimento del colorante ai poli. In tutti i pannelli le camere ovariche e le uova sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra.

Il complesso EcR/Usp promuove l'espressione di *VM32E*

L'analisi della sequenza del promotore minimo di *VM32E* ha condotto all'identificazione di un putativo sito di legame per la proteina Usp, l'omologo del recettore dell'acido retinoico dei mammiferi RXR (retinoid X receptor) che, dimerizzando con l'EcR, forma il complesso trascrizionale che media la risposta cellulare all'ecdisona. Mediante DNase footprinting è stato successivamente dimostrato il legame di Usp alla sequenza identificata, suggerendo un possibile controllo ormonale della trascrizione di *VM32E*, in analogia a quanto già visto per il gene corionico *Cp15*.

Per dimostrare *in vivo* la capacità di Usp di regolare *VM32E* ho analizzato gli effetti della mutazione perdita di funzione *usp²* (Oro et al., 1990). La formazione dei cloni è stata indotta con il sistema MARCM, che marca positivamente soltanto le cellule omozigoti per l'allele mutato (Lee e Luo, 1999). Negli esperimenti di immunolocalizzazione, oltre all'anticorpo contro la *VM32E*, ho utilizzato anche un anticorpo diretto contro Usp (Christianson et al., 1992), per verificare l'effettiva mancanza della proteina all'interno dei cloni. Nelle cellule prive del fattore trascrizionale Usp si evidenzia repressione del gene *VM32E* (figg. 22A-C). Nello stesso contesto ho esaminato anche la proteina *VM26A.2* che, come si può vedere dalle figg. 22D-F, è sintetizzata a livelli normali all'interno del clone. Questo risultato conferma ulteriormente la peculiarità del controllo trascrizionale di *VM32E* rispetto agli altri geni della membrana vitellina.

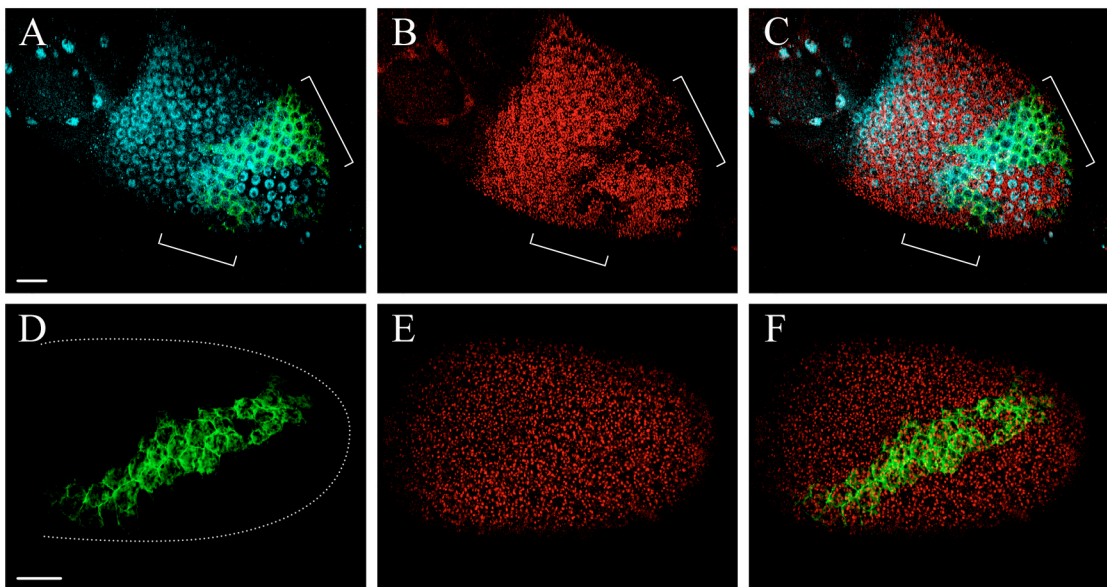


Figura 22: Usp controlla l'espressione di *VM32E*, ma non di *VM26A.2*, nelle cellule follicolari del corpo principale. **A-F:** Sezioni superficiali, ottenute al microscopio confocale, di camere ovariche di stadio 10B che presentano cloni di cellule colonnari omozigoti per la mutazione *usp²*. I cloni sono identificati dall'espressione del marcatore mCD8-GFP (parentesi in A-C). **A-C:** Coimmunolocalizzazione delle proteine *VM32E* (rosso) e Usp (azzurro). **A:** Il livello della proteina Usp all'interno del clone è drasticamente ridotto. **B:** Distribuzione della proteina *VM32E*. **C:** Sovrapposizione di A e B. All'interno del clone la sintesi di *VM32E* è pressoché abolita. **D-F:** Immunolocalizzazione della proteina *VM26A.2*. **D:** Localizzazione del marcatore mCD8-GFP. **E:** Distribuzione della proteina *VM26A.2*. **F:** Sovrapposizione di D ed E. L'espressione di *VM26A.2* non risente della mancanza di Usp. Le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. Le barre corrispondono a 20 μm .

La proteina Usp sembra essere un partner obbligato dell'EcR, con il quale forma un complesso trascrizionale la cui attività è dipendente dall'ecdisone. Il blocco della segnalazione da parte di questo ormone dovrebbe quindi avere gli stessi effetti della mancanza della proteina Usp. Per inibire la risposta cellulare all'ecdisone ho indotto il silenziamento specifico del gene EcR adottando la tecnica dell'RNA interference. La scelta di questo approccio è giustificata dalla posizione pericentromerica del gene, che impedisce l'utilizzo della più classica analisi clonale di alleli perdita di funzione (Schubiger et al., 2005). L'espressione del transgene che promuove il silenziamento è stata indotta in cloni di cellule follicolari utilizzando la già menzionata cassetta Flip-out e le camere ovariche sono state sottoposte a saggi di immunistoichimica per valutare gli effetti sui geni *VM32E* e *VM26A.2*.

In una prima analisi ho indotto il silenziamento di tutte e tre le isoforme dell'EcR utilizzando un transgene che contiene, ripetuta e invertita, una sequenza comune a *EcRA*, *EcRB1* ed *EcRB2* (Colombani et al., 2005). Nei cloni di cellule che esprimono tale costrutto la sintesi di VM32E è pressoché abolita (figg. 23A-C), come si vede confrontando il livello del segnale con le cellule adiacenti nelle quali non è stato indotto il silenziamento. In accordo con l'analisi clonale del mutante *usp²*, la sintesi di VM26A.2 non risente del blocco della segnalazione a opera dell'ecdisone (figg. 24A-C). Per confermare l'avvenuto silenziamento dell'EcR ho condotto esperimenti di coimmunolocalizzazione utilizzando un anticorpo che riconosce una regione comune a tutte le isoforme del recettore (Talbot et al., 1993). I risultati ottenuti, illustrati nelle figg. 23D-F e 24D-F, mostrano una netta corrispondenza tra la mancanza del recettore e l'inibizione di *VM32E* e confermano inoltre che l'espressione di *VM26A.2* non è sotto il controllo dell'ecdisone.

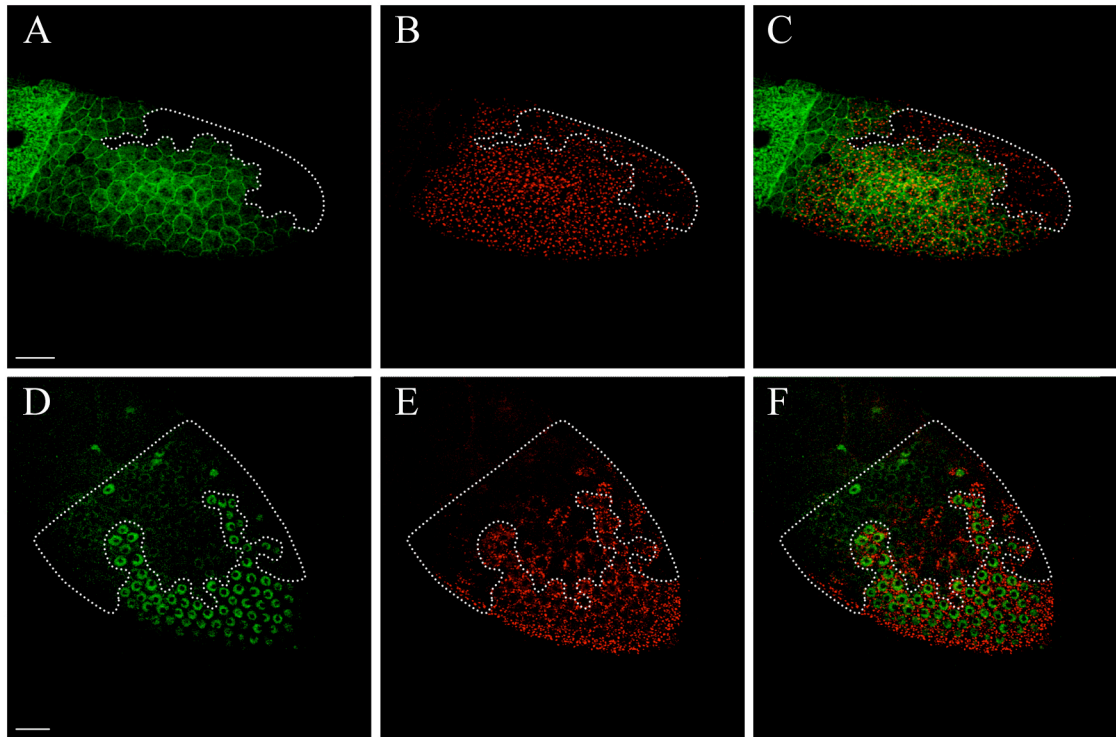


Figura 23: Nelle cellule follicolari del corpo principale l'EcR controlla l'espressione del gene *VM32E*. **A-F:** Sezioni superficiali, ottenute al microscopio confocale, di camere ovariche di stadio 10B nelle quali è stato indotto il silenziamento clonale di tutte le isoforme dell'EcR. **A-C:** Coimmunolocalizzazione delle proteine CD2 (verde) e VM32E (rosso). **A:** L'assenza del marcatore CD2 (area tratteggiata) identifica il clone di cellule follicolari che esprimono il costrutto *UAS-EcR^{dsRNA}*. **B:** Localizzazione della proteina VM32E. **C:** Sovrapposizione di A e B. All'interno del clone la sintesi di VM32E è notevolmente ridotta. **D-F:** Coimmunolocalizzazione di VM32E (rosso) e delle tre isoforme dell'EcR (verde), rilevate mediante un anticorpo che riconosce la regione comune. **D:** Clone di cellule follicolari nelle quali è assente l'EcR (area tratteggiata). **E:** Distribuzione della proteina VM32E. **F:** Sovrapposizione di E e F. L'espressione di VM32E è abolita o notevolmente ridotta nelle cellule prive dell'EcR. In tutti i pannelli le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. Le barre corrispondono a 20 μm .

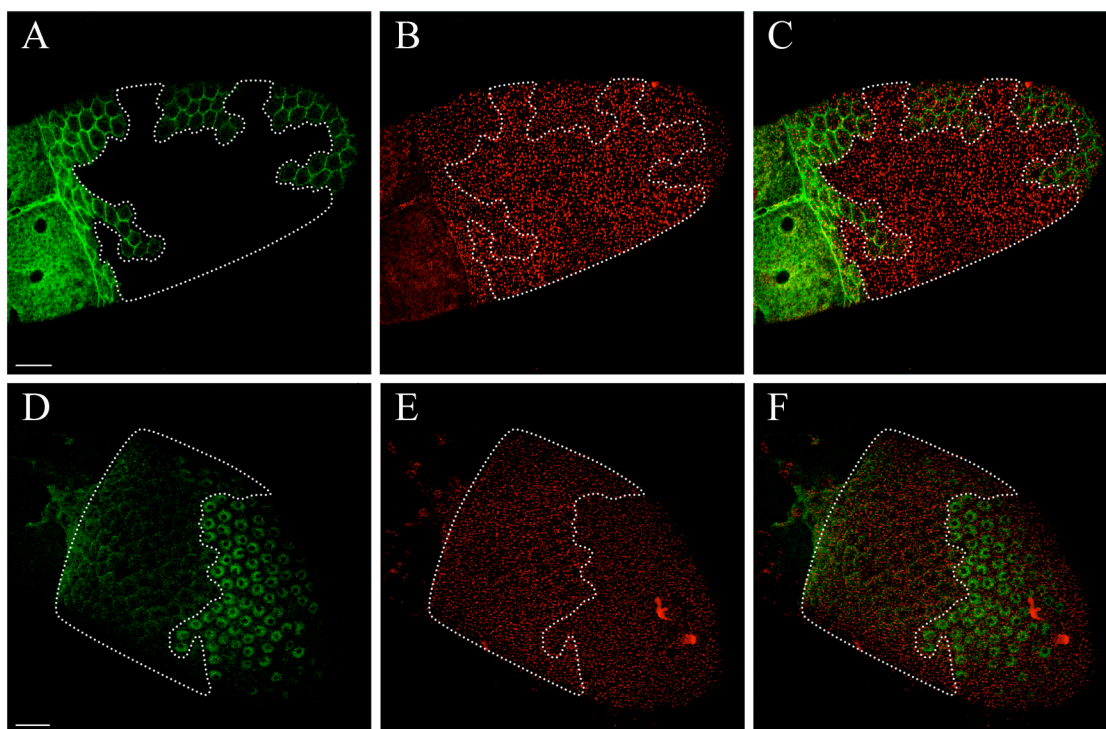


Figura 24: L'espressione del gene *VM26A.2* non è controllata dall'EcR. **A-F:** Sezioni superficiali, ottenute al microscopio confocale, di camere ovariche di stadio 10B nelle quali è stato indotto il silenziamento clonale di tutte le isoforme dell'EcR. **A-C:** Coimmunolocalizzazione delle proteine CD2 (verde) e VM26A.2 (rosso). **A:** Clone di cellule follicolari (area tratteggiata), marcato negativamente dalla proteina CD2, nel quale è stato indotto il silenziamento genico dell'*EcR*. **B:** Localizzazione della proteina VM26A.2. **C:** Sovrapposizione di G e H. L'espressione di *VM26A.2* all'interno del clone non è alterata. **D-F:** Coimmunolocalizzazione dell'EcR (verde) e di VM26A.2 (rosso). **D:** Clone di cellule follicolari che non esprimono le tre isoforme dell'EcR. **E:** Distribuzione della proteina VM26A.2. **F:** Sovrapposizione di J e K. L'assenza dell'EcR non altera la sintesi di VM26A.2. In tutti i pannelli le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. Le barre corrispondono a 20 μm .

Sia l'EcRA che l'EcRB sono espressi durante l'oogenesi (Carney e Bender, 2000). Per identificare quale isoforma media la risposta di *VM32E* alle segnalazione ormonale ho indotto, separatamente, il silenziamento selettivo dell'*EcRA* e dell'*EcRB1*. L'espressione clonale di un costrutto contenente, ripetuta e invertita, una sequenza specifica dell'isoforma A (Roignant et al., 2003), non altera l'espressione di *VM32E* (figg. 25A-C). La coimmunolocalizzazione con l'anticorpo diretto contro l'EcRA (Talbot et al., 1993) conferma l'efficacia del costrutto nel silenziare il gene (figg. 25D-F), dimostrando che la repressione di *VM32E* non avviene per mezzo di questa isoforma dell'EcR. Di contro, il silenziamento dell'*EcrB1* abolisce l'espressione di *VM32E* nelle cellule in cui è indotto. Come mostrato nelle figg. 26A-F la proteina VM32E non è sintetizzata nelle cellule che esprimono il costrutto.

Dai risultati illustrati si evince che nella regolazione trascrizionale di *VM32E* è coinvolta anche la segnalazione ormonale dell'ecdisione mediata dal complesso trascrizionale EcRB/Usp.

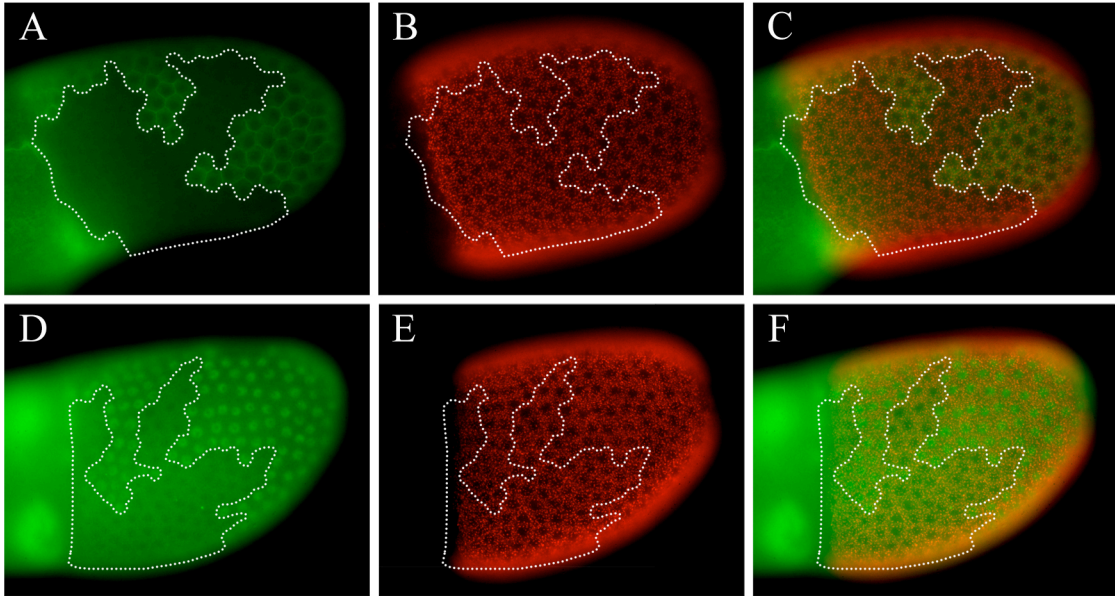


Figura 25: L'isoforma A dell'EcR non controlla l'espressione di VM32E. **A-F:** Visioni superficiali, ottenute al microscopio ottico a fluorescenza, di camere ovariche di stadio 10B nelle quali è stato indotto il silenziamento clonale dell'EcRA. **A-C:** Coimmunolocalizzazione delle proteine CD2 (verde) e VM32E (rosso). **A:** L'assenza del marcatore CD2 (area tratteggiata) identifica un clone di cellule follicolari che esprimono il costrutto *UAS-EcR^{AdsRNA}*. **B:** Localizzazione della proteina VM32E. **C:** Sovrapposizione di A e B. L'espressione di VM32E all'interno del clone non è alterata. **D-F:** Coimmunolocalizzazione delle proteine EcRA (verde) e VM32E (rosso). **D:** Clone di cellule follicolari che non esprimono l'isoforma A dell'EcR. **E:** Distribuzione di VM32E. **F:** Sovrapposizione di D ed E. Il silenziamento dell'EcRA non altera l'espressione di *VM32E*. Nei pannelli le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra.

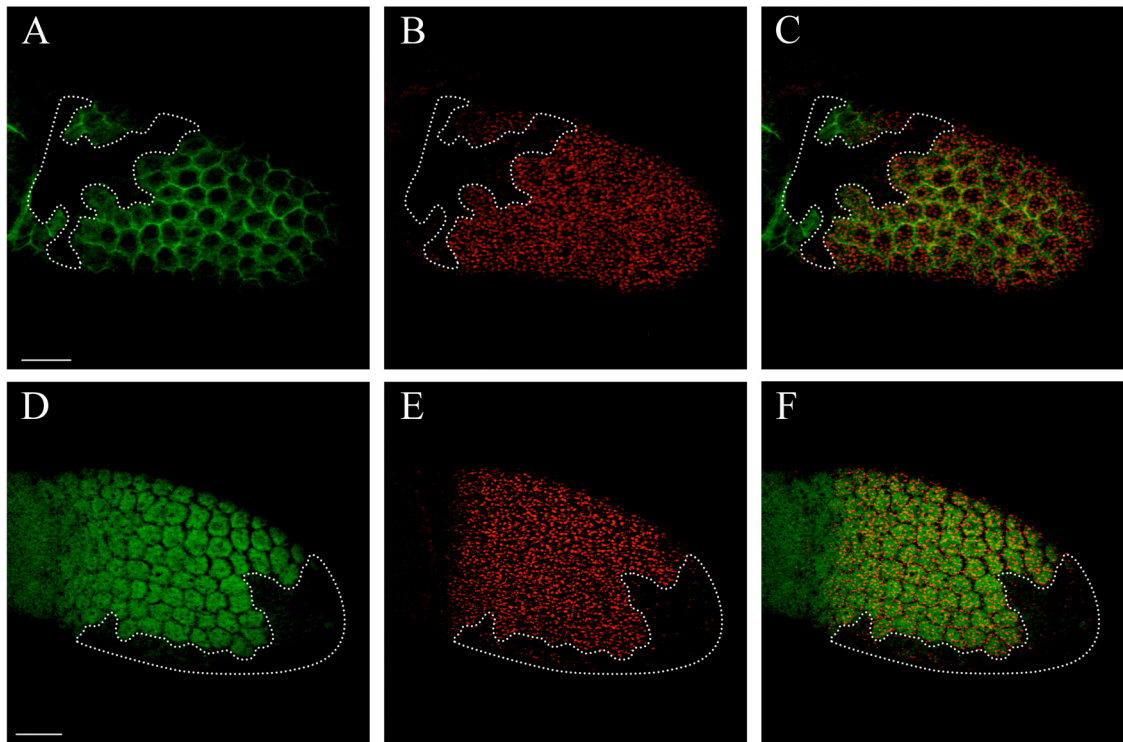


Figura 26: L'isoforma B1 dell'EcR è coinvolta nell'attivazione di *VM32E* nelle cellule follicolari del corpo principale. **A-F:** Sezioni superficiali, ottenute al microscopio confocale, di camere ovariche di stadio 10B nelle quali è stato indotto il silenziamento dell'isoforma B1 dell'EcR. **A-C:** Coimmunolocalizzazione di CD2 (verde) e VM32E (rosso). **A:** Clone di cellule follicolari (area tratteggiata) che esprime il costrutto *UAS-EcR^{B1,dsRNA}*, identificato dall'assenza del marcatore CD2. **B:** Distribuzione della proteina VM32E. **C:** Sovrapposizione di A e B. Il livello di VM32E all'interno del clone è pressochè nullo. **D-F:** Coimmunolocalizzazione delle proteine EcRB1 (verde) e VM32E (rosso). **D:** Clone di cellule follicolari (area tratteggiata) prive dell'isoforme B1 dell'EcR. **E:** Localizzazione della proteina VM32E. **F:** Sovrapposizione di D e E. L'assenza dell'EcRB1 inibisce la sintesi di VM32E. Le camere ovariche sono orientate con l'estremità anteriore a sinistra. Le barre corrispondono a 20 μm .

DISCUSSIONE

La formazione del guscio dell'uovo in *Drosophila* è un processo complesso e in parte ancora da definire. I costituenti proteici dei vari strati sono sintetizzati nelle cellule follicolari seguendo un ordine temporale ben preciso, che rispecchia la loro localizzazione all'interno del guscio. Le proteine della membrana vitellina, lo strato più interno, sono le prime a essere sintetizzate. Seguono i componenti dello strato corionico interno, dell'endocorion e dell'esocorion. Una volta secrete nello spazio extracellulare compreso tra l'oocita e l'epitelio follicolare, alcune proteine subiscono tagli proteolitici e vengono ridistribuite tra i vari strati. Infine la formazione di legami chimici di varia natura, catalizzata da enzimi in parte ancora ignoti, stabilizza il guscio rendendolo impermeabile. Un altro evento importante nella morfogenesi del guscio è il differenziamento, all'interno dell'epitelio follicolare, delle sottopopolazioni cellulari che originano le strutture corioniche annesse al guscio.

Lavori recenti suggeriscono la possibilità che il guscio dell'uovo, oltre alle normali funzioni di protezione e mediazione degli scambi gassosi, svolga un ruolo importante nello sviluppo dell'embrione, fungendo da sito di accumulo e di ancoraggio di segnali materni che controllano il differenziamento embrionale. Esperimenti di immunolocalizzazione hanno dimostrato la presenza, nella membrana vitellina, della proteina Torsolike (Stevens et al., 2003), un membro della segnalazione che induce la formazione delle strutture terminali dell'embrione. La proteina Nasrat, anch'essa coinvolta nell'attivazione di Torso e richiesta per l'assemblaggio della membrana vitellina (Cernilogar et al., 2001; Jimenez et al., 2002), è stata ritrovata in analisi a spettrometria di massa condotte su frazioni del guscio dell'uovo (Fakhouri et al., 2006). Questi stessi esperimenti hanno rilevato la presenza anche di Nudel, il primo membro della cascata di proteasi che controlla il differenziamento dorso-ventrale (Fakhouri et al., 2006).

Le componenti del guscio sembrano non essere funzionalmente ridondanti, e ciò suggerisce che ognuna svolga un ruolo unico nell'assemblaggio del guscio (Andrenacci et al., 2001). Tra le proteine della membrana vitellina VM32E presenta caratteristiche peculiari. Il gene è espresso tardivamente rispetto agli altri membri della famiglia genica a cui appartiene e la sua trascrizione è soggetta a un fine controllo sia spaziale che temporale. Come mostrato nei risultati un'identica regolazione dell'espressione caratterizza l'ortologo di VM32E in *Drosophila pseudoobscura*. Questa conservazione

del profilo di espressione suggerisce che la fine regolazione trascrizionale del gene sia necessaria per il corretto funzionamento della proteina.

Le peculiarità del profilo di espressione di *VM32E* suggeriscono un coinvolgimento delle vie di Dpp e dell'Egfr nella determinazione dei domini spaziali di attivazione del gene. In particolare l'attività di Dpp allo stadio 10 è limitata, come indicato dalla localizzazione della forma fosforilata di Mad, alle cellule centripete e questa popolazione cellulare coincide con il dominio anteriore dell'epitelio colonnare nel quale il gene *VM32E* è represso. L'attivazione ectopica della via di segnalazione, oltre a inibire l'espressione di *VM32E*, altera l'assemblaggio della membrana vitellina. Il 40% delle uova deposte da femmine che esprimono ectopicamente Dpp risultano permeabili al colorante neutral red. Difetti nell'involucro vitellino si sono riscontrati anche in seguito all'attivazione della via dell'Egfr in tutto l'epitelio follicolare. È interessante notare inoltre che nel contesto *CY2Gal4/UAS-λ-top* i difetti nella strato più interno del guscio sono limitati alle due estremità. Nel contesto selvatico la proteina VM32E non è prodotta nei domini anteriore e posteriore dell'epitelio follicolare, ma una volta secreta migra lentamente verso i poli, distribuendosi uniformemente nella membrana vitellina. Poiché l'attivazione ectopica dell'Egfr blocca l'espressione di *VM32E* in domini più ampi, è possibile che le alterazioni osservate siano dovute alla mancata diffusione della proteina verso le estremità del guscio. L'assenza, in entrambi i contesti genetici analizzati, di un effetto sull'espressione del gene *VM26A.2*, che codifica il componente più abbondante dell'involucro vitellino, pur non escludendo che sia modificata l'espressione di altri geni, indica l'importanza di VM32E nella corretta formazione di questo strato del guscio.

L'analisi clonale di un allele perdita di funzione del gene *Mad* ha confermato che l'espressione di *VM32E* nelle cellule centripete è repressa dalla segnalazione di Dpp. L'inibizione della via in queste cellule, infatti, induce l'espressione ectopica del gene *VM32E*. Questo risultato è molto interessante perché dimostra, per la prima volta, che il ruolo della via di Dpp nella morfogenesi del guscio dell'uovo non è limitato al controllo del differenziamento cellulare, ma coinvolge anche la regolazione trascrizionale di almeno un gene che codifica un componente strutturale del guscio.

Lavori precedenti avevano suggerito la presenza, nella regione centrale del promotore di *VM32E*, di un elemento *in cis* in grado di reprimere l'espressione nelle

cellule centripete. Le analisi condotte hanno dimostrato che l'attività di Dpp agisce specificatamente a livello di tale regione, in quanto soltanto costrutti che la contengono rispondono ad alterazioni della via di segnalazione. L'attività del costrutto -253/-39-*lacZ* è infatti repressa se si induce l'espressione di dpp in tutto l'epitelio follicolare. Di contro, se si inibisce la segnalazione di dpp nelle cellule centripete si ha espressione ectopica del gene reporter. L'assenza, all'interno della regione -253/-113, di un putativo sito di legame per il fattore trascrizionale Mad fa supporre una regolazione indiretta ed esperimenti preliminari indicano una possibile mediazione ad opera della via di Notch. Ulteriori analisi sono in corso al fine di verificare questo modello e di identificare gli effettori finali.

Un'ulteriore peculiarità che contraddistingue VM32E dalle altre proteine della membrana vitellina è la sua parziale rilocalizzazione, negli stadi tardivi dell'oogenesi, nell'endocorion. In analogia con alcuni geni corionici, il promotore di *VM32E* contiene un putativo sito di legame per il fattore trascrizionale Usp che, in associazione con l'EcR, media la risposta cellulare all'ecdisione. La capacità di Usp di legarsi a questo sito è stata dimostrata in esperimenti di DNase footprinting e ciò suggerisce che la trascrizione di *VM32E* possa essere soggetta al controllo ormonale. Le analisi clonali del mutante *usp²* e del silenziamento genico dell'*EcR* confermano la regolazione della trascrizione di *VM32E* da parte dell'ecdisione ed escludono un loro ruolo nel controllo di *VM26A.2*. Il silenziamento selettivo dell'isoforma A e B1 dell'EcR, inoltre, ha permesso di dimostrare che l'attivazione dell'espressione di VM32E da parte dell'ecdisione è mediata sicuramente dall'EcRB1, pur non potendo escludere un possibile coinvolgimento dell'isoforma B2.

Un quesito ancora da risolvere riguarda il meccanismo attraverso il quale il complesso EcR/Usp regola l'espressione di VM32E. Il sito di legame per Usp è infatti compreso nella regione distale del promotore, che dirige la trascrizione nel dominio dorsale dell'epitelio follicolare e aumenta il livello d'espressione nelle cellule ventrali. La mancanza del fattore trascrizionale dovrebbe quindi abolire l'espressione dorsale e abbassarne il livello dal lato ventrale. Contrariamente a ciò, l'assenza di Usp reprime completamente la trascrizione di *VM32E* in tutto l'epitelio colonnare, indipendentemente dalla posizione del clone lungo l'asse dorso-ventrale. Due modelli sono ipotizzabili per spiegare questo risultato. Il primo prevede che, in assenza di Usp,

alla regione distale del promotore si leghi un repressore in grado di bloccare anche l'attività delle altre due regioni. Il secondo modello, invece, prevede un doppio ruolo per Usp, che agirebbe direttamente sulla regione distale del promotore e indirettamente sulla porzione prossimale. In un contesto mutato verrebbero quindi a mancare entrambi i controlli e poiché l'attività della regione prossimale del promotore è indispensabile per l'espressione del gene, l'assenza di Usp bloccherebbe la trascrizione di *VM32E* indipendentemente dalla posizione dorso-ventrale del clone. Esperimenti sono in corso per verificare quale sia l'ipotesi corretta.

Dai risultati ottenuti si evince la complessità del sistema di regolazione che determina la corretta espressione spazio-temporale del gene *VM32E*. Tale sistema coinvolge varie vie di segnalazione che, agendo su diverse regioni del promotore, controllano l'attività del gene nelle differenti popolazioni cellulari dell'epitelio colonnare. In particolare, dalle analisi condotte è emerso che la segnalazione di Dpp reprime l'espressione di *VM32E* nelle cellule centripete, mentre la trascrizione a livello delle cellule follicolari del corpo principale è controllata sia dalla via dell'Egfr che dall'ecdisone. Queste due segnalazioni sembrano avere effetti antagonisti: l'attivazione ectopica dell'Egfr, indotta esprimendo un costrutto codificante una forma costitutivamente attiva del recettore, blocca l'espressione di *VM32E*, mentre l'ecdisone la controlla positivamente. Il complesso trascrizionale EcR/Usp, che media la risposta all'ormone, agisce quindi da attivatore trascrizionale. Sarà ora interessante proseguire l'analisi del ruolo della via dell'Egfr, cercando di identificare i fattori trascrizionali coinvolti, e verificare l'eventuale interazione con la via di segnalazione che fa capo all'ecdisone.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson K., 1995. One signal, two body axes. *Science*, 269:489-490.
- Andrenacci D., Cavaliere V., Cernilogar F. M. and Gargiulo G., 2000. Spatial activation and repression of the *Drosophila* vitelline membrane gene *VM32E* are switched by a complex *cis*-regulatory system. *Dev Dyn*, 218:499-506.
- Andrenacci D., Cernilogar F. M., Taddei C., Rotoli D., Cavaliere V., Graziani F. and Gargiulo G., 2001. Specific domains drive VM32E protein distribution and integration in *Drosophila* eggshell layers. *J Cell Sci*, 114:2819-2829.
- Barnett T., Pachl C., Gergen J. P. and Wensink P. C., 1980. The isolation and characterization of *Drosophila* yolk protein genes. *Cell*, 21:729-738.
- Bergsten S. E. and Gavis E. R., 1999. Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of *nanos* RNA. *Development*, 126:659-669.
- Blaumueller C. M., Qi H., Zagouras P. and Artavanis-Tsakonas S., 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell*, 90:281-291.
- Bownes M., 1989. The roles of juvenile hormone ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. *J. Insect Physiol.*, 35:409-413.
- Bray S. and Furriols M., 2001. Notch pathway: making sense of Suppressor of Hairless. *Curr. Biol.*, 11:R217-R221.
- Brennan M. D., Weiner A. J., Goralski T. J. and Mahowald A. P., 1982. The follicle cells are a major site of vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 89:225-236.
- Bryant Z., Subrahmanyam L., Tworoger M., LaTray L., Liu C. R., Li M. J., van den Engh G. and Ruohola-Baker H., 1999. Characterization of differentially expressed genes in purified *Drosophila* follicle cells: toward a general strategy for cell type-specific developmental analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:5559-5564.

- Burke T., Waring G. L., Popodi E. and Minoo P., 1987. Characterization and sequence of follicle cell genes selectively expressed during vitelline membrane formation in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 124:441-450.
- Buszczak M., Freeman M. R., Carlson J. R., Bender M., Cooley L. and Segraves W. A., 1999. Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development*, 126:4581-4589.
- Casali A. and Casanova J., 2001. The spatial control of Torso RTK activation: a C-terminal fragment of the Trunk protein acts as a signal for Torso receptor in the *Drosophila* embryo. *Development*, 128:1709-1715.
- Casanova J., Furriols M., McCormick C. A. and Struhl G., 1995. Similarities between trunk and *spätzle*, putative extracellular ligands specifying body pattern in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 9:2539-2544.
- Cavaliere V., Spanò S., Andrenacci D., Cortesi L. and Gargiulo G., 1997. Regulatory elements in the promoter of the vitelline membrane gene *VM32E* of *Drosophila melanogaster* direct gene expression in distinct domains of the follicular epithelium. *Mol Gen Genet*, 254:231-237.
- Cavaliere V., Taddei C. and Gargiulo G., 1998. Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.*, 208:106-112.
- Cernilogar F. M., Fabbri F., Andrenacci D., Taddei C. and Gargiulo G., 2001. *Drosophila* vitelline membrane cross-linking requires the *fs(1)Nasrat*, *fs(1)polehole* and *chorion* genes activities. *Dev Genes Evol*, 211:573-580.
- Cha B. J., Koppetsch B. S. and Theurkauf W. E., 2001. In vivo analysis of *Drosophila bicoid* mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway. *Cell*, 106:35-46.
- Christianson A. M. K., King D. L., Hatzivassiliou E., Casas J. E., Hallenbeck P. L., Nikodem V. M., Mitsialis S. A. and Kafatos F. C., 1992. DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor

1/ultraspiracle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11503-11507.

- Clarkson M. and Saint R., 1999. A His2AvDGFP fusion gene complements a lethal His2AvD mutant allele and provides an in vivo marker for *Drosophila* chromosome behavior. DNA Cell Biol., 18:457-462.
- Claycomb J. M., Benasutti M., Bosco G., Fenger D. D. and Orr-Weaver T. L., 2004. Gene amplification as a developmental strategy: isolation of two developmental amplicons in *Drosophila*. Dev. Cell, 6:145-155.
- Colombani J., Bianchini L., Layalle S., Pondeville E., Dauphin-Villemant C., Antoniewski C., Carre C., Noselli S. and Leopold P., 2005. Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. Science, 310:667-670.
- Dej K. J. and Spradling A. C., 1999. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis. Development, 126:293-303.
- Deng W. M., Althausen C. and Ruohola-Baker H., 2001. Notch-Delta signaling induces a transition from mitotic cell cycle to endocycle in *Drosophila* follicle cells. Development, 128:4737-4746.
- DiBello P. R., Withers D. A., Bayer C. A., Fristrom J. W. and Guild G. M., 1991. The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. Genetics, 129:385-397.
- Dobens L. L., Jaeger A., Peterson J. and Raftery L. A., 2005. Bunched sets a boundary for Notch signaling to pattern anterior eggshell structures during *Drosophila* oogenesis. Dev Biol, 287:425-437.
- Dobens L. L. and Raftery L. A., 2000. Integration of epithelial patterning and morphogenesis in *Drosophila* ovarian follicle cells. Dev Dyn, 218:80-93.
- Driever W. and Nüsslein-Volhard C., 1988. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. Cell, 54:83-93.

- Duffy J. B. and Perrimon N., 1994. The torso pathway in *Drosophila*: Lessons on receptor tyrosine kinase signaling and pattern formation. *Dev. Biol.*, 166:380-395.
- Edwards M. J., 1996. The vitelline membranes of *Aedes aegypti* and *Drosophila melanogaster*: A comparative review. *Invert. Reprod. Dev.*, 30:255-264.
- Edwards M., Severson D. and Hagedorn H., 1998. Vitelline envelope genes of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.*, 28:915-925.
- Fakhouri M., Elalayli M., Sherling D., Hall J., Miller E., Sun X., Wells L. and LeMosy E., 2006. Minor proteins and enzymes of the *Drosophila* eggshell matrix. *Dev Biol*, 293:127-141.
- Frohnhofer H. G. and Nüsslein-Volhard C., 1986. Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene bicoid. *Nature*, 324:120-125.
- Garabedian M. J., Hung M. C. and Wensink P. C., 1985. Independent control elements that determine yolk protein gene expression in alternative *Drosophila* tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1396--1400.
- Garabedian M. J., Shirras A. D., Bownes M. and Wensink P. C., 1987. The nucleotide sequence of the gene coding for *Drosophila melanogaster* yolk protein 3. *Gene*, 55:1-8.
- Garen A., Kauvar L. and Lepesant J. A., 1977. Roles of ecdysone in *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5099-5103.
- Gargiulo G., Gigliotti S., Malva C. and Graziani F., 1991. Cellular specificity of expression and regulation of *Drosophila vitelline membrane protein 32E* gene in the follicular epithelium: identification of cis-acting elements. *Mech Dev*, 35:193-203.
- Gavis E. R. and Lehmann R., 1994. Translational regulation of *nanos* by RNA localization. *Nature*, 369:315-318.

- Gigliotti S., Graziani F., de Ponti L., Rafti F., Manzi A., Lavorgna G., Gargiulo G. and Malva C., 1989. Sex-, tissue-, and stage-specific expression of a vitelline membrane protein gene from region 32 of the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet*, 10:33-41.
- Godt D. and Tepass U., 1998. *Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion. *Nature*, 395:387-391.
- Golic K. G., 1991. Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science*, 252:958-961.
- Gonzalez-Reyes A. and St. Johnston R. D., 1994. Role of oocyte position in establishment of anterior-posterior polarity in *Drosophila*. *Science*, 266:639-642.
- Gonzalez-Reyes A. and St. Johnston R. D., 1998a. The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte. *Development*, 125:3635-3644.
- Gonzalez-Reyes A. and St. Johnston R. D., 1998b. Patterning of the follicle cell epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 125:2837-2846.
- Govind S. and Steward R., 1991. Dorsoventral pattern formation in *Drosophila*: signal transduction and nuclear targeting. *Trends Genet.*, 7:119-125.
- Grammont M. and Irvine K. D., 2001. fringe and Notch specify polar cell fate during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 128:2243-2253.
- Grammont M. and Irvine K. D., 2002. Organizer activity of the polar cells during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 129:5131-5140.
- Griffin-Shea R., Thireos G. and Kafatos F. C., 1982. Organization of a cluster of four chorion genes in *Drosophila* and its relationship to developmental expression and amplification. *Dev. Biol.*, 91:325-336.

- Gupta T. and Schüpbach T., 2003. Cct1, a phosphatidylcholine biosynthesis enzyme, is required for *Drosophila* oogenesis and ovarian morphogenesis. *Development*, 130:6075-6087.
- Hammond M. P. and Laird C. D., 1985. Chromosome structure and DNA replication in nurse and follicle cells of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 91:267-278.
- Horne-Badovinac S. and Bilder D., 2005. Mass transit: epithelial morphogenesis in the *Drosophila* egg chamber. *Dev. Dyn.*, 232:559-574
- Hu X., Yagi Y., Tanji T., Zhou S. and Ip Y. T., 2004. Multimerization and interaction of Toll and Spätzle in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:9369-9374.
- Hulskamp M., Pfeifle C. and Tautz D., 1990. A morphogenetic gradient of hunchback protein organizes the expression of the gap genes *Kruppel* and *knirps* in the early *Drosophila* embryo. *Nature*, 346:577-580.
- Hung M. C. and Wensink P. C., 1983. Sequence and structure conservation in yolk proteins and their genes. *J. molec. Biol.*, 164:481-492.
- Isaac P. G. and Bownes M., 1982. Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Europ. J. Biochem.*, 123:527-534.
- Jimenez G., Gonzalez-Reyes A. and Casanova J., 2002. Cell surface proteins Nasrat and Polehole stabilize the Torso-like extracellular determinant in *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.*, 16:913-918.
- Jimenez G., Guichet A., Ephrussi A. and Casanova J., 2000. Relief of gene repression by torso RTK signaling: role of capicua in *Drosophila* terminal and dorsoventral patterning. *Genes Dev.*, 14:224-231.
- Jin J. and Petri W. H., 1993. Developmental control elements in the promoter of a *Drosophila* vitelline membrane gene. *Dev. Biol.*, 156:557-565.
- Kelley R. L., 1993. Initial organization of the *Drosophila* dorsoventral axis depends on an RNA-binding protein encoded by the *squid* gene. *Genes Dev.*, 7:948-960.

- Keramaris K. E., Stravopodis D. and Margaritis L. H., 1991. A structural protein that plays an enzymatic role in the eggshell of *Drosophila melanogaster*. Cell Biol. Int. Rep., 15:151-159.
- Kidd S., 1992. Characterization of the *Drosophila cactus* locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. Cell, 71:623-635.
- King R. C., 1970. Ovarian Development in *Drosophila melanogaster*. New York: Academic Press.
- King R. C. and Vanoucek E. G., 1960. Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. X. Studies on the behavior of the follicle cells. Growth, 24:333-338.
- Konrad K. D., Wang D. and Marsh J. L., 1993. Vitelline membrane biogenesis in *Drosophila* requires the activity of the α -methyl dopa hypersensitive gene (*l(2)amd*) in both the germline and follicle cells. Insect Molec. Biol., 1:179-187.
- Konstandi, 2005. The enzymatic component of *Drosophila melanogaster* chorion is the Pxd peroxidase. Insect Biochem. Molec. Biol., 35:1043-1057.
- Lee T. and Luo L., 1999. Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. Neuron, 22:451-461.
- LeMosy E. K., Kemler D. and Hashimoto C., 1998. Role of nudel protease activation in triggering dorsoventral polarization of the *Drosophila* embryo. Development, 125:4045-4053.
- LeMosy E. K. and Hashimoto C., 2000. The nudel protease of *Drosophila* is required for eggshell biogenesis in addition to embryonic patterning. Dev. Biol., 217:352-361.
- LeMosy E.K., 2003. Pattern formation: the eggshell holds the cue. Curr. Biol., 13:R508-510.
- Lieberfarb M. E., Chu T., Wreden C., Theurkauf W., Gergen J. P. and Strickland S., 1996. Mutations that perturb poly(A)-dependent maternal mRNA activation

block the initiation of development. *Development*, 122:579-588.

- Lilly M. A. and Spradling A. C., 1996. The *Drosophila* endocycle is controlled by Cyclin E and lacks a checkpoint ensuring S-phase completion. *Genes Dev.*, 10:2514-2526.
- Lin Y., Hamblin M. T., Edwards M. J., Barillas-Mury C., Kanost M. R., Knipple D. C., Wolfner M. F. and Hagedorn H. H., 1993. Structure, expression, and hormonal control of genes from the mosquito, *Aedes aegypti*, which encode proteins similar to the vitelline membrane proteins of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 155:558-568.
- Logeat F., Bessia C., Brou C., LeBail O., Jarriault S., Seidah N. and Israel A., 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:8108-8112.
- Lopez-Schier H. and St. Johnston D., 2001. Delta signaling from the germ line controls the proliferation and differentiation of the somatic follicle cells during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.*, 15:1393-1405.
- MacDougall N., Lad Y., Wilkie G. S., Francis-Lang H., Sullivan W. and Davis I., 2001. Merlin, the *Drosophila* homologue of neurofibromatosis-2, is specifically required in posterior follicle cells for axis formation in the oocyte. *Development*, 128:665-673.
- Manogaran A. and Waring G. L., 2004. The N-terminal prodomain of sV23 is essential for the assembly of a functional vitelline membrane network in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 270:261-271.
- Margaritis L. H., Kafatos F. C. and Petri W. H., 1980. The eggshell of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci*, 43:1-35.
- Margaritis L.H., 1985. The egg-shell of *Drosophila melanogaster*. *Tissue Cell*, 17:553-560.
- Margolis J. and Spradling A., 1995. Identification and behaviour of epithelial stem cells

in the *Drosophila* ovary. *Development*, 121:3797-3807.

- Marquez R. M., Singer M. A., Takaesu N. T., Waldrip W. R., Kraytsberg Y. and Newfeld S. J., 2001. Transgenic analysis of the Smad family of TGF-beta signal transducers in *Drosophila melanogaster* suggests new roles and new interactions between family members. *Genetics*, 157:1639-1648.
- Mauzy-Melitz D. and Waring G. L., 2003. *fc177*, a minor dec-1 proprotein, is necessary to prevent ectopic aggregation of the endochorion during eggshell assembly in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 255:193-205.
- McGregor J. R., Xi R. and Harrison D. A., 2002. JAK signaling is somatically required for follicle cell differentiation in *Drosophila*. *Development*, 129:705-717.
- Micklem D. R., Adams J., Grunert S. and St. Johnston D., 2000. Distinct roles of two conserved Stauf domains in *oskar* mRNA localization and translation. *EMBO J.*, 19:1366-1377.
- Mindrinos M. N., Petri W. H., Galanopoulos V. K., Lombard M. F. and Margaritis L. H., 1980. Crosslinking of the *Drosophila* chorion involves a peroxidase. *Roux Arch. dev. Biol.*, 189:187-196.
- Mindrinos M. N., Scherer L. J., Garcini F. J., Kwan H., Jacobs K. A. and Petri W. H., 1985. Isolation and chromosomal location of putative vitelline membrane genes in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.*, 4:147-153.
- Montell D. J., Rorth P. and Spradling A. C., 1992. *slow border cells*, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila* C/EBP. *Cell*, 71:51-62.
- Morisato D. and Anderson K. V., 1994. The *spätzle* gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell*, 76:677-688.
- Moussian B. and Roth S., 2005. Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo – shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr. Biol.*, 15:R887-899.

- Nellen D., Burke R., Struhl G. and Basler K., 1996. Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell*, 85:357-368.
- Neuman-Silberberg F. S. and Schüpbach T., 1993. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein. *Cell*, 75:165-174.
- Newfeld S. J., Chartoff E. H., Graff J. M., Melton D. A. and Gelbart W. M., 1996. *Mothers against dpp* encodes a conserved cytoplasmic protein required in DPP/TGF-beta responsive cells. *Development*, 122:2099-2108.
- Nogueron M. I. and Waring G. L., 1995. Regulated processing of *dec-1* eggshell proteins in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 172:272-279.
- Norvell A., Kelley R. L., Wehr K. and Schupbach T., 1999. Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis. *Genes Dev.*, 13:864-876.
- Oro A. E., McKeown M. and Evans R. M., 1990. Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature*, 347:298-301.
- Papassideri I., Margaritis L. H. and Gulik-Krzywicki T., 1993. The eggshell of *Drosophila melanogaster*. VIII. Morphogenesis of the wax layer during oogenesis. *Tissue Cell*, 25:929-936.
- Parks S. and Spradling A., 1987. Spatially regulated expression of chorion genes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.*, 1:497-509.
- Parks S., Wakimoto B. T. and Spradling A., 1986. Replication and expression of an X-linked cluster of *Drosophila* chorion genes. *Dev. Biol.*, 117:294-305.
- Pascucci T., Perrino J., Mahowald A. P. and Waring G. L., 1996. Eggshell assembly in *Drosophila*: Processing and localization of vitelline membrane and chorion proteins. *Dev. Biol.*, 177:590-598.

- Perrimon N. and Gans M., 1983. Clonal analysis of the tissue specificity of recessive female sterile mutations of *Drosophila melanogaster* using a dominant female-sterile mutation. *Dev. Biol.*, 100:365-373.
- Perrimon N., Mohler D., Engstrom L. and Mahowald A. P., 1986. X-linked female-sterile loci in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 113:695-712.
- Pignoni F. and Zipursky S. L., 1997. Induction of *Drosophila* eye development by Decapentaplegic. *Development*, 124:271-278.
- Popodi E., Mino P., Burke T. and Waring G. L., 1988. Organization and expression of a second chromosome follicle cell gene cluster in *Drosophila*. *Dev Biol*, 127:248-256.
- Powell J. R., 1996. Progress and prospects in evolutionary biology. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Prost E., Deryckere F., Roos C., Haenlin M., Pantesco V. and Mohier V., 1988. Role of the oocyte nucleus in determination of the dorsoventral polarity of *Drosophila* as revealed by molecular analysis of the *K10* gene. *Genes Dev.*, 2:891-900.
- Queenan A. M., Ghabrial A. and Schüpbach T., 1997. Ectopic activation of *torpedo/Egfr*, a *Drosophila* receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo. *Development*, 124:3871-3880.
- Riechmann V. and Ephrussi A., 2001. Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11:374-383.
- Roignant J. Y., Carre C., Mugat B., Szymczak D., Lepasant J. A. and Antoniewski C., 2003. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. *RNA*, N.Y., 9:299-308.
- Ronaldson E. and Bownes M., 1995. Two independent cis-acting elements regulate the sex- and tissue-specific expression of *yp3* in *Drosophila melanogaster*. *Genet. Res.*, 66:9-17.

- Roth S., Jordan P. and Karess R., 1999. Binuclear *Drosophila* oocytes: consequences and implications for dorsal-ventral patterning in oogenesis and embryogenesis. *Development*, 126:927-934.
- Roth S. and Schupbach T., 1994. The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development*, 120:2245-2257.
- Santos A.C. and Lehmann R., 2004. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr. Biol.*, 14:R578-589.
- Savant S. S. and Waring G. L., 1989. Molecular analysis and rescue of a vitelline membrane mutant in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 135:43-52.
- Schaeffer V., Althausen C., Shcherbata H. R., Deng W. M. and Ruohola-Baker H., 2004. Notch-dependent Fizzy-related/Hec1/Cdh1 expression is required for the mitotic-to-endocycle transition in *Drosophila* follicle cells. *Curr. Biol.*, 14:625-629.
- Scherer L. J., Harris D. H. and Petri W. H., 1988. *Drosophila* vitelline membrane genes contain a 114 base pair region of highly conserved coding sequence. *Dev. Biol.*, 130:786-788.
- Schnorrer F., Bohmann K. and Nusslein-Volhard C., 2000. The molecular motor dynein is involved in targeting *swallow* and *bicoid* RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nature Cell Biol.*, 2:185-190.
- Schonbaum C. P., Lee S. and Mahowald A. P., 1995. The *Drosophila* *yolkless* gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1485-1489.
- Schubiger M., Carre C., Antoniewski C. and Truman J., 2005. Ligand-dependent de-repression via EcR/USP acts as a gate to coordinate the differentiation of sensory neurons in the *Drosophila* wing. *Development*, 132:5239-5248.
- Schüpbach T. and Wieschaus E., 1989. Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations.

Genetics, 121:101-117.

- Sekelsky J. J., Newfeld S. J., Raftery L. A., Chartoff E. H. and Gelbart W. G., 1995. Genetic characterization and cloning of *Mothers against dpp*, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 139:1347-1358.
- Sen J., Goltz J. S., Stevens L. and Stein D., 1998. Spatially restricted expression of *pipe* in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorsal-ventral polarity. *Cell*, 95:471-481.
- Sen J., Goltz J. S., Konsolaki M., Schüpbach T. and Stein D., 2000. Windbeutel is required for function and correct subcellular localization of the *Drosophila* patterning protein Pipe. *Development*, 127:5541-5550.
- Soller M., Bownes M. and Kubli E., 1999. Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. *Dev. Biol.*, 208:337-351.
- Spradling A. C., 1981. The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. *Cell*, 27:193-201.
- Spradling A. C. 1993. Developmental genetics of oogenesis. In *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1-70 pp.
- Spradling A. C. and Mahowald A. P., 1980. Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1096-1100.
- Stevens L. M., Beuchle D., Jurcsak J., Tong X. and Stein D., 2003. The *Drosophila* embryonic patterning determinant torsolike is a component of the eggshell. *Curr. Biol.*, 13:1058-1063.
- Talbot W. S., Swyryd E. A. and Hogness D. S., 1993. *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 73:1323-1337.

- Tanimoto H., Itoh S., ten Dijke P. and Tabata T., 2000. Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Molec. Cell*, 5:59-71.
- Tepass U., 2003. Claudin complexities at the apical junctional complex. *Nature Cell Biol.*, 5:595-597.
- Terashima J. and Bownes M., 2004. Translating available food into the number of eggs laid by *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167:1711-1719.
- Terashima J. and Bownes M., 2005. A microarray analysis of genes involved in relating egg production to nutritional intake in *Drosophila melanogaster*. *Cell Death Differ*, 12:429-440.
- Terashima J. and Bownes M., 2006. E75A and E75B have opposite effects on the apoptosis/development choice of the *Drosophila* egg chamber. *Cell Death Differ*, 13:454-464.
- Tracey W. D., Ning X., Klingler M., Kramer S. G. and Gergen J. P., 2000. Quantitative analysis of gene function in the *Drosophila* embryo. *Genetics*, 154:273-284.
- Twombly V., Blackman R. K., Jin H., Graff J. M., Padgett R. W. and Gelbart W. M., 1996. The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development*, 122:1555-1565.
- Vogel C., Teichmann S. A. and Chothia C., 2003. The immunoglobulin superfamily in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* and the evolution of complexity. *Development*, 130:6317-6328.
- Waring G. L., Hawley R. J. and Schoenfeld T., 1990. Multiple proteins are produced from the *dec-1* eggshell gene in *Drosophila* by alternative RNA splicing and proteolytic cleavage events. *Dev. Biol.*, 142:1-12.
- Waring G. L., 2000. Morphogenesis of the eggshell in *Drosophila*. *Int. Rev. Cytol.*, 198:67-108.
- Wasserman J. D. and Freeman M., 1998. An autoregulatory cascade of EGF receptor

signaling patterns the *Drosophila* egg. *Cell*, 95:355-364.

Wieschaus E., Marsh J. L. and Gehring W. J., 1978. fs(1)K10, a germline-dependent female sterile mutation causing abnormal chorion morphology in *Drosophila melanogaster*. *Roux Arch. dev. Biol.*, 184:75-82.

Xi R., McGregor J. R. and Harrison D. A., 2003. A Gradient of JAK Pathway Activity Patterns the Anterior-Posterior Axis of the Follicular Epithelium. *Dev. Cell*, 4:167-177.

Zarani F. E. and Margaritis L. H., 1986. The eggshell of *Drosophila melanogaster*. V. Structure and morphogenesis of the micropylar apparatus. *Canad. J. Zool.*, 64:2509-2519.

Zhu X., Sen J., Stevens L., Goltz J. S. and Stein D., 2005. *Drosophila* Pipe protein activity in the ovary and the embryonic salivary gland does not require heparan sulfate glycosaminoglycans. *Development*, 132:3813-3822.