

S. DE LUCCHINI (*), S. A. GERBI (**)

DNA RIBOSOMALE EXTRACROMOSOMICO IN NUCLEI
POLITENICI DI *SCIARA COPROPHILA* (DITTERI):
ANALISI BIOCHIMICA

Riassunto — In questo lavoro dimostriamo la presenza di rDNA¹ extracromosomico in nuclei politenici di ghiandole salivari di larve di *Sciara coprophila* (Ditteri, fam. Sciaridae). Il DNA è stato analizzato mediante gradienti di sedimentazione di NaCl e gradienti di equilibrio di CsCl/bromuro di etidio.

Tale rDNA extracromosomico è presente in forma di molecole circolari superavvolte, ed è stimato ammontare a circa 1/3 dell'rDNA totale. Si suggerisce che la presenza di amplificazione dell'rDNA nei nuclei politenici di *Sciara* possa essere legata al basso numero di reiterazione dei geni ribosomali in questo organismo.

Abstract — *Extrachromosomal ribosomal DNA in polytene nuclei of Sciara coprophila (Diptera): a biochemical analysis.* We demonstrate the presence of extrachromosomal rDNA in the polytene nuclei of salivary glands in *Sciara coprophila* (Diptera, fam. Sciaridae). *Sciara* DNA was analyzed by means of NaCl sedimentation gradients and CsCl/ethidium bromide equilibrium gradients. We show that this extrachromosomal rDNA consists of supercoiled circular molecules. We estimate the amount of the circular molecules as about 1/3 of the total rDNA. We suggest that the rDNA amplification in polytene nuclei of *Sciara* might be related to the low redundancy of the ribosomal cistrons in this organism.

Key words — *Sciara coprophila*, polytene nuclei; extrachromosomal rDNA.

(*) Brown University, Biomedical Division, Providence, R.I. 02912 (U.S.A.). Indirizzo attuale: Istituto di Istologia ed Embriologia, Via A. Volta 4, 56100 Pisa.

(**) Brown University, Biomedical Division, Providence, R.I. 02912 (U.S.A.).

(1) Abbreviazioni: rDNA = DNA che codifica per il 18S + 28S rRNA, compresi gli « spacers » trascritti e non trascritti; rRNA = RNA ribosomale; NOR = regione nucleolo-organizzatrice; SDS = sodio dodecil solfato; SSC = cloruro di sodio 0,15M, citrato di sodio 0,015M; EDTA = acido etilendiaminotetraacetico.

INTRODUZIONE

A differenza della maggior parte dei Ditteri, il nucleo politenico degli Sciaridi non contiene un tipico nucleolo. Sia in *Sciara* che in *Rhynchosciara*, materiale nucleolare appare associato con l'organizzazione nucleolare, che è situato presso una estremità del cromosoma X, e in forma di « micronucleoli » sparsi (BREUER e PAVAN, 1955; GABRUSEWYCZ-GARCIA e KLEINFELD, 1966; MATTINGLY e PARKER, 1968). GABRUSEWYCZ-GARCIA (1972) esclude che i cosiddetti « micronucleoli » siano dovuti ad artefatti di preparazione. Nel suo approfondito studio sul materiale nucleolare di *Sciara coprophila*, questo Autore osserva che il materiale nucleolare che si forma dal cromosoma X diventa molto ramificato, e può apparire come un grosso aggregato di micronucleoli. In ciascun nucleo politenico, un grande numero di micronucleoli si trova anche in posizione più periferica. Analizzando i micronucleoli al microscopio elettronico, questo stesso Autore dimostra che essi contengono le componenti tipiche del nucleolo. Esperimenti autoradiografici provano che i micronucleoli sono sedi di sintesi di RNA, in quanto incorporano ³H-uridina. Esperimenti di ibridazione *in situ* hanno anzitutto confermato che la regione nucleolo-organizzatrice (NOR) è localizzata presso una estremità del cromosoma X; inoltre hanno fornito prove della presenza di rDNA entro i micronucleoli (PARDUE et al., 1970; GERBI, 1971). Entro i limiti di risoluzione del metodo, questi esperimenti escludono la presenza di rDNA in altri siti cromosomici: questa asserzione si riferisce anche a quei siti cromosomici che, in base a osservazioni citologiche, appaiono essere associati ai micronucleoli (GABRUSEWYCZ-GARCIA e KLEINFELD, 1966). Sembra quindi probabile che tutto il materiale nucleolare dei nuclei politenici origini dalla NOR sul cromosoma X.

Per quanto riguarda l'origine dei micronucleoli, sussistono due interpretazioni. Secondo l'interpretazione prevalente, questi deriverebbero, per frammentazione, da un grosso nucleolo altamente ramificato. Alternativamente, essi potrebbero essere il risultato di una amplificazione dell'rDNA cromosomico, paragonabile a quella che si verifica durante l'ovogenesi di molti organismi (cf. TOBLER, 1975). Se così fosse, la quantità di rDNA dei nuclei politenici dovrebbe essere maggiore di quella propria dei nuclei diploidi, in cui non si verificherebbe amplificazione. Tuttavia, esperimenti di ibridazione molecolare a saturazione non hanno

mostrato differenze tra la quantità di rDNA di carcasse di adulti e di ghiandole salivari, contenenti micronucleoli (GERBI, 1971 e dati non pubblicati). L'interpretazione di questi risultati è tuttavia complicata dal fatto che l'rDNA è sottoreplicato nei nuclei politenici di *Drosophila* (SPEAR e GALL, 1973): se ciò avvenisse anche in *Sciara*, la quantità di rDNA dei nuclei politenici potrebbe essere il risultato netto della diminuzione dovuta a sottoreplicazione, compensata dall'aumento dovuto ad amplificazione.

E' stato perciò intrapreso uno studio per verificare la possibilità che i micronucleoli di *Sciara coprophila* contengano rDNA extracromosomico. L'interesse di questo tipo di analisi consiste nel fatto che, mentre il fenomeno dell'amplificazione dell'rDNA è ben noto per la linea germinale di molti organismi (cf. TOBLER, 1975), molto scarse sono le informazioni riguardo alla presenza dello stesso fenomeno in cellule della linea somatica. I pochi dati esistenti si riferiscono ad alcuni sistemi vegetali come il metaxilema di *Allium cepa*, nei cui nuclei politenici è stata descritta l'amplificazione dell'rDNA (AVANZI et al., 1973). Micronucleoli contenenti rDNA sono stati anche descritti nei nuclei politenici del sospenditore di *Phaseolus coccineus*: la presenza di micronucleoli è stata interpretata come prova citologica di amplificazione dell'rDNA (AVANZI et al., 1972).

MATERIALI E METODI

Animali

Per questo lavoro sono state usate larve e adulti di *Sciara coprophila*. In questo organismo i ♂♂ hanno genotipo XO nelle cellule somatiche e le ♀♀ XX (METZ, 1938); per la peculiarità dell'assetto cromosomico di *Sciara* cf. anche CROUSE, 1960.

Estrazione di DNA

Le ghiandole salivari sono state isolate dalle larve dopo dissezione in tampone di Marmur (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, pH 8). Le ghiandole salivari o gli animali interi, sia larve che adulti, sono stati omogeneizzati nello stesso tampone ed i nuclei lisati in SDS all'1% a 65°C per 10 min. Il DNA è stato quindi estratto due volte con egual volume di 24:1 cloroformio/alcool isoamilico: ogni estrazione è stata seguita da centrifugazione in Sorvall per 10 min. a 4°C e 10.000 rpm. In alcuni casi il DNA è stato estratto da nuclei

purificati mediante sedimentazione per 10 min. a 27.000 x g e 5°C attraverso un cuscino di saccarosio 1 M in tampone Tris HCl 50 mM, CaCl₂ 4 mM, pH 7,4. In questi casi i tessuti erano stati precedentemente omogeneizzati nello stesso tampone, con l'aggiunta di saccarosio 0,25 M. Il DNA è stato quindi precipitato in alcool, centrifugato per 30 min. in Sorvall a 10.000 rpm, risospeso in 2 x SSC e successivamente purificato per trattamento con 50 µg/ml di RNasi A, 30 U/ml di RNasi T₁ e 250 µg/ml di α-amilasi per 30 min. a temperatura ambiente. Alla digestione enzimatica è seguita una nuova estrazione con cloroformio/alcool isoamilico 24 : 1. Il DNA contenuto nella fase acquosa è stato centrifugato per 18 h in un rotore Ti 50 a 35.000 rpm a 4°C e il precipitato risospeso in Tris 10 mM a pH 8. Nei casi in cui il DNA è stato successivamente posto in gradienti di CsCl, il trattamento con enzimi è stato omesso e il DNA direttamente risospeso in Tris 10 mM, pH 8, dopo la prima precipitazione.

Centrifugazione in gradienti di sedimentazione

Il DNA, risospeso in Tris 10 mM, pH 8, è stato caricato su gradienti lineari di NaCl dal 5 al 20%, preparati in Tris HCl 25 mM, EDTA 1 mM pH 7,9. I gradienti sono stati centrifugati in un rotore SW 41 a 35.000 rpm e 18°C per 4 h e 30 min. Le frazioni sono state raccolte dal fondo della provetta e per ogni frazione è stata letta l'assorbanza a 260 nm.

Ibridazione molecolare su filtri

L'ibridazione su filtri è stata condotta secondo il metodo precedentemente descritto (GERBI, 1971). I filtri sono stati ibridizzati col clone pBc₂, che contiene l'intera unità di ripetizione dell'rDNA di *Sciara*, come descritto da RENKAWITZ et al. (1979), marcato in vitro con ³²P. I filtri sono stati contati in Omnifluor (NEN) ad uno scintillatore Packard.

Centrifugazioni all'equilibrio

CsCl solido è stato aggiunto al DNA fino ad ottenere una densità di 1,619 g/cm³. A questa soluzione è stato aggiunto bromuro di etidio fino ad una concentrazione di 300 µg/ml. In alcuni casi

sono state aggiunte le forme I e II del DNA di SV₄₀ marcato in vivo con ¹⁴C (dono del Dr. L. Matsumoto). La forma II è stata ottenuta dalla forma I mediante trattamento con bromuro di etidio alla concentrazione di 50 µg/ml in presenza di una fonte di luce incandescente a circa 20 cm, per 15 min. La soluzione è stata centrifugata per 48 h in rotori Ti 50 o SW 50.1 a 20°C e 36.000 rpm. I gradienti sono stati frazionati dal basso o dall'alto. Una aliquota di 20 µl per ciascuna frazione è stata talora contata in Aquasol-2 (NEN). Il bromuro di etidio è stato eliminato mediante dialisi con Dowex-50 (Biorad).

Elettroforesi, trasferimento su nitrocellulosa e ibridazione

L'elettroforesi su gel di agarosio verticale è stata effettuata usando il tampone di HELLING (1974) a 30 V per circa 16 h. Il trasferimento del DNA su filtri di nitrocellulosa è stato condotto secondo il metodo di SOUTHERN (1975). L'ibridazione con ³²P-pBc₂ è stata eseguita dopo preincubazione nel tampone di DENHARDT (1966) in 2 x SSC e SDS allo 0,1% per 3 h a 65°C. L'ibridazione è stata effettuata usando da 100.000 a 300.000 cpm per filtro per circa 18-20 h nello stesso tampone a 65°C. I filtri sono stati lavati per 3 h con cinque cambi della stessa miscela (2 x SSC, 1 x Denhardt, SDS 0,1%) a 65°C, e un sesto cambio in 1 x SSC, SDS 0,05%, sempre a 65°C. I filtri sono stati quindi asciugati a 65°C per 45 min. e esposti a -70°C sotto lastre per raggi X (Kodak AR-5) con schermi intensificanti (Dupont Cronex). Il tempo di esposizione è stato normalmente intorno alle 48 h.

Marcatura in vitro del DNA

Il DNA plasmidico del clone pBc₂ è stato marcato in vitro tramite « nick-translation » secondo il metodo di MANIATIS et al. (1975). Come nucleotide radioattivo è stato usato [α -³²P]dCTP (NEN, 2000-3000 Ci/mmol) e come enzima la DNA polimerasi I (Miles). Alla reazione non è stata aggiunta DNasi. Si otteneva in genere DNA di attività specifica intorno ai 2 x 10⁷ cpm/µg.

Digestione con enzimi di restrizione

Il DNA cromosomico ed extracromosomico ottenuto da ghan-

dole salivari di *Sciara* è stato digerito con Eco RI (Biolabs). La digestione è stata effettuata per circa 15 h a 37°C nel tampone suggerito per questo enzima.

RISULTATI

Il DNA di *Sciara coprophila*, estratto sia da larve intere, che da ghiandole salivari isolate o da adulti, è stato esaminato in gradienti di sedimentazione di NaCl.

I gradienti sono stati frazionati, e ciascuna frazione ibridata su filtri con il clone pBc₂, marcato in vitro con ³²P mediante « nick-translation ». Tale clone contiene una intera unità di ripetizione dell'rDNA di *Sciara*, che consiste di un frammento lungo 8,4 Kb (cfr. RENKAWITZ et al., 1979). Il profilo di ibridazione mostra dei picchi discreti rispetto al profilo della densità ottica (D.O.): tipicamente, si ottengono tre picchi, oltre al picco principale di ibridazione (Fig. 1). I diversi DNA usati per questi esperimenti, inclusi i DNA provenienti da due diversi genotipi di adulti (X' X_p e X' X_w), mostrano lo stesso « pattern » di ibridazione (cfr. Figg. 1; 2a; 3a).

Questi risultati dimostrano che l'rDNA di *Sciara* non si distribuisce in modo uniforme, rispetto alla D.O., in gradienti di sedimentazione; inoltre si ritrova rDNA anche nelle regioni dei gradienti corrispondenti a DNA a basso peso molecolare. Come verrà discusso in seguito, questi dati suggeriscono che una parte dell'rDNA di *Sciara* non sia integrato nel DNA cromosomico.

Il DNA di ciascun picco di ibridazione è stato analizzato su gel di agarosio, trasferito su filtro di nitrocellulosa mediante « Southern blot » e successivamente ibridato con ³²P pBc₂. Il risultante autoradiogramma (Fig. 2b) presenta tre bande principali (a, b, c). E' stata presa in considerazione la possibilità che la banda più veloce (a) rappresenti la forma « superavvolta » (« supercoiled ») di rDNA, mentre le bande b e c, più lente, rappresenterebbero rispettivamente la forma lineare e a circolo disteso dello stesso DNA. A conferma di questa ipotesi, è da notare che la banda che corrisponderebbe al DNA lineare è più intensa nella regione più alta del gradiente.

Per verificare la correttezza dell'interpretazione relativa alla natura delle tre bande di ibridazione in Fig. 2b, il DNA dei picchi di ibridazione 1 e 2 della Fig. 3a è stato analizzato all'equilibrio in

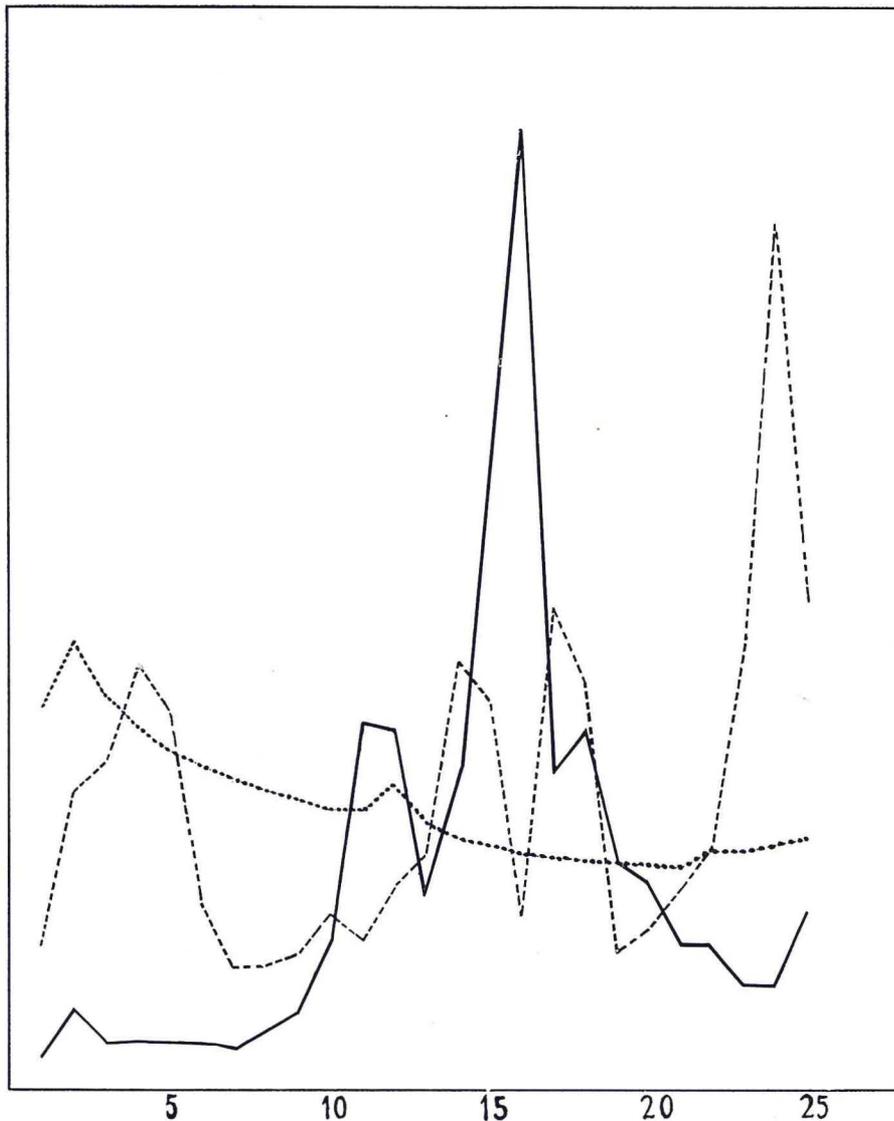


Fig. 1 - Ibridazione delle frazioni di un gradiente di sedimentazione di NaCl con ^{32}P -pBc₂. Il DNA, estratto da ghiandole salivari di larve di *Sciara*, è stato analizzato in un gradiente di NaCl dal 5 al 20% in un rotore Spinco SW 41 a 35000 rpm e 18°C per 4 h e 30 min. Le frazioni sono state raccolte dal fondo della provetta e di ciascuna frazione è stata determinata la densità ottica (linea punteggiata). Le frazioni, poste su filtri di nitrocellulosa, sono state incubate in 2 x SSC contenente ^{32}P -pBc₂ (circa 100.000 cpm) per circa 18 h a 65°C e ne è stata determinata la radioattività (linea tratteggiata). La linea unita indica DNA del fago λ marcato in vitro con ^3H e digerito con Eco RI.

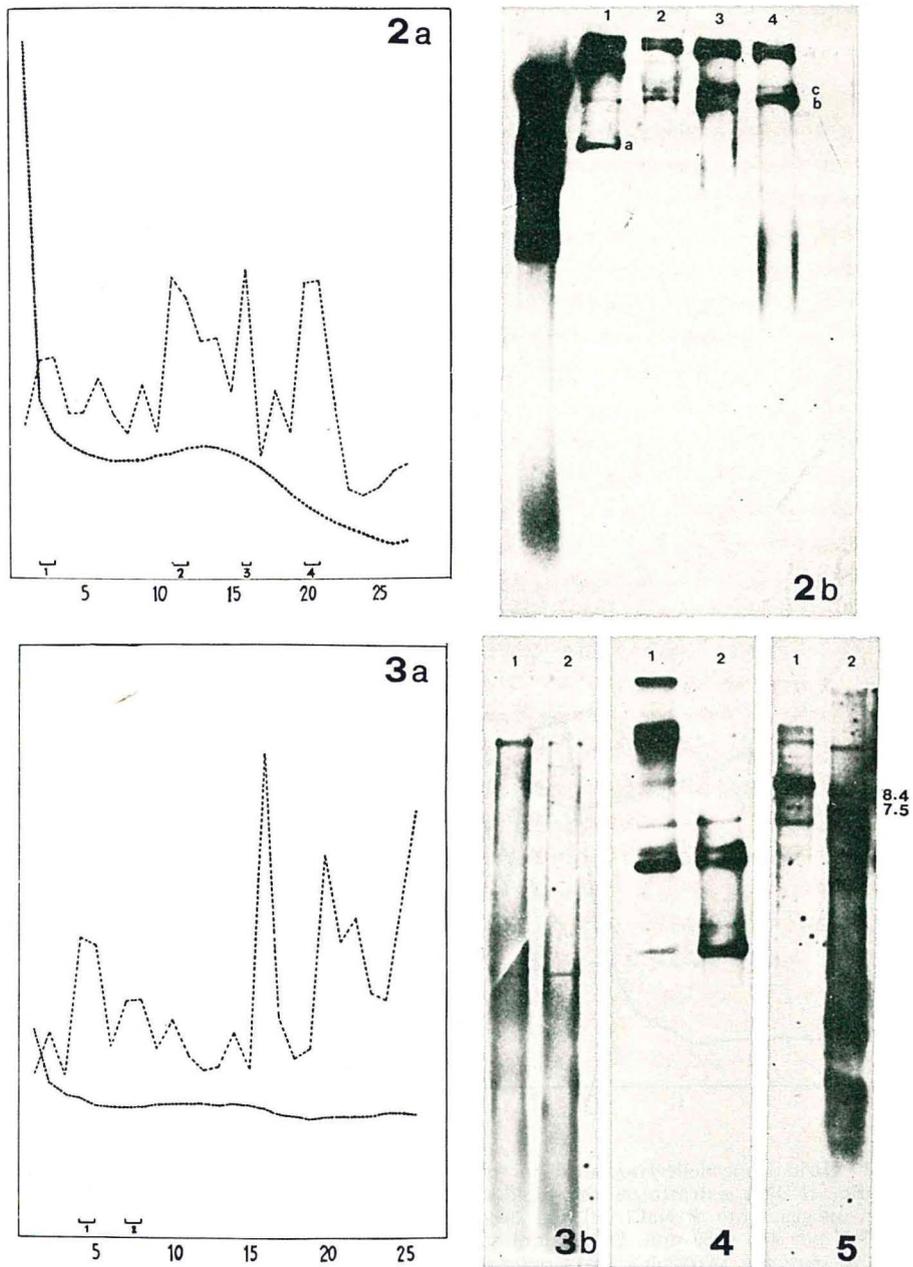


Fig. 2 - a. Profilo di densità ottica (linea punteggiata) e di ibridazione (linea tratteggiata) di un gradiente di sedimentazione di NaCl. Condizioni sperimentali come in Fig. 1. Il DNA è stato estratto da adulti (genotipo $X'X_p$). b. Autoradiogramma

gradienti di densità di CsCl/bromuro di etidio, insieme alla forma I del DNA di SV₄₀, marcato in vivo con ¹⁴C. La regione del gradiente contenente DNA in forma « superavvolta », rivelata dalla presenza del ¹⁴C DNA di SV₄₀, è stata analizzata su gel di agarosio, e il DNA trasferito su filtro di nitrocellulosa e ibridato con ³²P pBc₂. L'autoradiogramma risultante mostra ibridazione positiva con l'rDNA: in particolare si notano due bande di ibridazione, di cui quella a più elevata mobilità elettroforetica corrisponde alla forma superavvolta di molecole di rDNA, mentre la banda a più bassa mobilità può corrispondere a circoli distesi durante la procedura (Fig. 3b).

Un metodo simile è stato applicato al DNA estratto da nuclei purificati di ghiandole salivari di larve allo stadio di macchia oculare. Tale DNA è stato analizzato all'equilibrio in gradienti di densità di CsCl/bromuro di etidio, usando le forme I e II di SV₄₀, marcate in vivo con ¹⁴C, come indicatori delle frazioni contenenti rispettivamente DNA superavvolto e lineare. Il DNA contenuto nelle due bande è stato quindi sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio, trasferito su filtro di nitrocellulosa ed ibridato con

dopo « Southern blot » e successiva ibridazione con ³²P - pBc₂ (circa 140.000 cpm) delle porzioni 1, 2, 3, 4 del gradiente in *a*, raccolte come indicato e frazionate su gel di agarosio all'1%. Per commenti sul significato delle bande *a*, *b*, *c*, vedere discussione nel testo. Il primo campione a sinistra in Fig. 2b rappresenta DNA del fago λ digerito con Eco RI e marcato in vitro con ³²P: i pesi molecolari dei frammenti sono 25,18; 21,8; 7,55; 5,93; 5,54; 4,80; 3,38 Kb. Esposizione: 44 h, con schermi intensificanti.

Fig. 3 - *a*. Profilo di densità ottica (linea punteggiata) e di ibridazione (linea tratteggiata) di un gradiente di sedimentazione di NaCl. Condizioni sperimentali come in Fig. 1. Il DNA usato è stato estratto da larve. *b*. Autoradiogramma dopo « Southern blot » e ibridazione con ³²P - pBc₂ (circa 140.000 cpm) delle porzioni 1 e 2 del gradiente in *a*, successivamente analizzate separatamente in gradienti di CsCl/bromuro di etidio. Le frazioni corrispondenti a DNA in forma superavvolta sono state ulteriormente analizzate su gel di agarosio all'1%. Esposizione: 43 h, con schermi intensificanti.

Fig. 4 - Autoradiogramma dopo « Southern blot » e successiva ibridazione con ³²P - pBc₂ (circa 200.000 cpm). Il DNA era stato estratto da nuclei purificati di ghiandole salivari di larve e frazionato su gradiente di equilibrio di CsCl/bromuro di etidio. Le frazioni corrispondenti a molecole lineari e superavvolte sono state ulteriormente analizzate su gel di agarosio all'1% (rispettivamente 1 e 2). Esposizione: 47 h, con schermi intensificanti.

Fig. 5 - Autoradiogramma dopo « Southern blot » e ibridazione con ³²P - pBc₂ (circa 300.000 cpm). Il DNA dei campioni 1 e 2 proviene rispettivamente dalle frazioni « lineare » e « superavvolta » di un gradiente di CsCl/bromuro di etidio. Il DNA delle due frazioni è stato digerito con Eco RI e frazionato su gel di agarosio all'1%. Sono indicati i pesi molecolari, in Kb, dei frammenti ottenuti per digestione dalla frazione superavvolta. Esposizione: 20 h, con schermi intensificanti.

^{32}P pBc₂. Il risultante autoradiogramma è mostrato in Fig. 4. La banda a più elevata mobilità elettroforetica del campione 2 rappresenta DNA ribosomale extracromosomico in forma superavvolta. Una interpretazione univoca sulle altre bande, derivate dallo stesso campione 2, non è per il momento possibile: esse possono essere dovute sia ad una popolazione eterogenea di molecole presenti in forma superavvolta, che ad un diverso numero di avvolgimenti nelle stesse molecole.

Il DNA proveniente dalle due frazioni, lineare e superavvolta, di gradienti di CsCl/bromuro di etidio, è stato anche analizzato dopo digestione con l'enzima di restrizione Eco RI. Questo enzima ha un solo sito di riconoscimento nella unità di ripetizione dell'rDNA di *Sciara*, che viene tagliato in frammenti di 8,4 Kb (cfr. RENKAWITZ et al., 1979). Come mostrato in Fig. 5, la digestione con questo enzima dell'rDNA extracromosomico produce, oltre al frammento atteso di 8,4 Kb, un frammento a mobilità elettroforetica corrispondente a 7,5 Kb: ciò suggerisce che non tutte le unità di ripetizione della forma extracromosomica siano complete. Il « pattern » di restrizione della frazione lineare dell'rDNA mostra invece che la grande maggioranza delle unità di ripetizione è omogenea e misura 8,4 Kb.

Per stabilire quale percentuale dell'rDNA di *Sciara* sia presente in forma extracromosomica, il DNA estratto da ghiandole salivari, frazionato in gradiente di CsCl/bromuro di etidio, è stato separato nelle due forme, lineare e superavvolta. Le frazioni corrispondenti a queste due forme sono state ibridate su filtri con ^{32}P pBc₂. La quantità di ibridazione propria del DNA della frazione extracromosomica è risultata essere di circa il 50% rispetto a quella della forma lineare. Questo valore deve tuttavia essere considerato una sottostima, in quanto occorre tener conto del fatto che la frazione lineare può contenere anche le forme a circolo disteso e lineari delle stesse molecole superavvolte. E' tuttavia rilevante notare che una frazione non certo trascurabile del DNA ribosomale di *Sciara*, e precisamente almeno 1/3 dell'rDNA totale nelle ghiandole salivari, è presente in forma extracromosomica.

DISCUSSIONE

I dati presentati in questo lavoro dimostrano che una frazione non trascurabile dell'rDNA totale (circa 1/3) è presente in copie extracromosomiche nei nuclei politenici di ghiandole salivari di

larve di *Sciara coprophila*. Questi dati indicano che lo stesso fenomeno si riscontra anche in DNA estratto da adulti. Poiché tessuti politenici sono presenti anche in individui adulti, è lecito supporre che l'rDNA extracromosomico degli adulti provenga da nuclei politenici anche se non è possibile per il momento escludere una sua provenienza da cellule diploidi. Esperimenti condotti su cervelli isolati, che contengono quasi esclusivamente cellule diploidi, potrebbero chiarire questo punto.

L'esistenza di copie extracromosomiche di rDNA è ben nota in due sistemi particolari, e precisamente nella linea germinale (in particolare nella ovogenesi) di molti organismi animali (cfr. TOBLER, 1975) e nel macronucleo di alcuni Ciliati (GALL, 1974; YAO et al., 1974). In ambedue i casi la produzione di copie extracromosomiche di rDNA comporta una replicazione differenziale dell'rDNA stesso, detta « amplificazione genica ». L'amplificazione genica propria della ovogenesi è stata particolarmente studiata in *Xenopus*, in cui si verifica al pachitene della I divisione meiotica. Anche se le prime copie di rDNA extracromosomico si formano a partire da geni ribosomali cromosomici, il grosso della produzione dell'extra rDNA avviene per replicazione, mediante « rolling-circles », delle extracopie circolari di rDNA già formate (HOURCADE et al., 1973; ROCHAIX et al., 1974). Nel macronucleo di *Tetrahymena* l'amplificazione avviene con un meccanismo completamente diverso: è stato trovato che il singolo gene cromosomico per l'rDNA dà origine a rDNA extracromosomici palindromici (YAO e GALL, 1977).

Ben poco è invece noto circa la presenza di amplificazione dell'rDNA in cellule somatiche. AVANZI et al. (1972; 1973) hanno descritto amplificazione dei geni ribosomali in nuclei politenici di due sistemi vegetali: il metaxilema in diversi stadi di sviluppo di *Allium cepa*, e il sospensore di *Phaseolus coccineus*. Questi autori riportano valori di saturazione per l'rDNA diversi tra cellule del metaxilema e cellule del meristema in *Allium*, e ritengono che la presenza di micronucleoli in cellule politeniche del sospensore di *Phaseolus* rappresenti una prova citologica di un processo di amplificazione nelle stesse cellule.

In altri sistemi, la presenza di extracopie di rDNA è stata riportata in pochi casi. In *Xenopus laevis*, rDNA estratto da linee cellulari di fibroblasti e da cellule di sangue in cultura, se esaminato al microscopio elettronico, presenta una bassissima percentuale di molecole circolari, rispettivamente dello 0,15% e dello 0,05% (ROCHAIX e BIRD, 1975). Secondo questi Autori, il fenomeno

dell'amplificazione durante la gametogenesi potrebbe avvenire non per excisione e circolarizzazione di tratti di rDNA cromosomico, ma per replicazione selettiva di molecole circolari, presenti in bassa percentuale in tutte le cellule.

Per quanto riguarda l'amplificazione di geni diversi dai ribosomali, recentemente è stato riportato che linee cellulari selezionate per la resistenza all'ametopterina amplificano i geni per la diidrofolato riduttasi (ALT et al., 1978). Poco noto è però il meccanismo molecolare di questa amplificazione. E' stata inoltre descritta l'amplificazione dei geni per le proteine del corion in cellule follicolari di *Drosophila*. Questo fenomeno non implica la formazione di extracopie circolari, ma sembra dovuto ad una sintesi differenziale di DNA che comincia prima dell'ultimo ciclo di replicazione del genoma e continua dopo che è cessata la replicazione delle altre sequenze. In questo senso, questo meccanismo si avvicina di più a quello che porta alla formazione dei DNA « puffs » nei cromosomi politenici degli Sciaridi che a quello classico dell'amplificazione propria della linea germinale (SPRADLING, 1981).

E' difficile immaginare un possibile significato funzionale dell'amplificazione dell'rDNA in nuclei politenici di *Sciara coprophila*. I risultati ottenuti mediante esperimenti di ibridazione a saturazione, confermati successivamente dall'esame al microscopio elettronico dei geni per l'rDNA mediante la tecnica del « Miller spreading » (MILLER e BEATTY, 1969), hanno dimostrato che il genoma di *Sciara* contiene solo 45 cistroni per organizzatore nucleolare. Questo è il più basso valore di reiterazione dell'rDNA trovato in un Eucariote multicellulare (GERBI e CROUSE, 1976; RENKAWITZ et al., 1979). Nei nuclei politenici di *Drosophila* l'rDNA è sottoreplicato (SPEAR e GALL, 1973). Se questo fosse vero anche per *Sciara*, si potrebbe ipotizzare che la produzione di extracopie di rDNA serva a portare il numero di geni per l'rDNA a livello di completa politenia: questo spiegherebbe il dato per cui i valori di saturazione dell'rDNA risultano uguali sia per ghiandole salivari che per tessuti di individui adulti. Questo processo sarebbe tanto più necessario dato il basso numero di reiterazione dei geni ribosomali in *Sciara*, pari a circa 5 volte meno delle 250 copie di *Drosophila* (RITOSSA et al., 1966). La possibilità che esistano, nei Ditteri, meccanismi di correzione di situazioni anomale riguardo al numero dei geni ribosomali è convalidata dalla descrizione di fenomeni quali la compensazione o la magnificazione in *Drosophila* (RITOSSA,

1968; ATWOOD, 1969; TARTOF, 1971; BONCINELLI et al., 1972). Mentre tuttavia evidenze recenti di ENDOW e GLOVER (1979) e di ENDOW (1980) sembrano escludere l'esistenza di meccanismi di compensazione, nei testicoli di maschi di *Drosophila* sottoposti al fenomeno della magnificazione è stata dimostrata la produzione di extracopie circolari di rDNA (GRAZIANI et al., 1977). Almeno in un caso, quindi, la correzione di una situazione anomala riguardo al numero di geni per l'rDNA è correlata alla produzione di extracopie circolari di rDNA.

Sono attualmente in corso analisi al microscopio elettronico dell'rDNA amplificato di *Sciara coprophila*. Ci ripromettiamo di chiarire se le molecole amplificate contengano multipli interi di una unità genica e se costituiscano una popolazione omogenea per grandezza. Intendiamo inoltre stabilire se il meccanismo di replicazione di queste molecole è quello a « rolling-circle », come dimostrato per l'amplificazione in ovociti di *Xenopus*, o se sussiste un altro meccanismo. Questi dati dovrebbero contribuire a chiarire la struttura e la possibile funzione dell'rDNA amplificato di *Sciara coprophila*.

BIBLIOGRAFIA

- ALT F. W., KELLEMS R. E., BERTINO J. R., SCHIMKE R. T. (1978) - Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant, variants of cultured murine colls. *J. Biol. Chem.*, **253**, 1357-1370.
- ATWOOD K. C. (1969) - Some aspects of the *bobbed* problem in *Drosophila*. *Genetics*, **61** (suppl. 1 part 2), 319-327.
- AVANZI S., DURANTE M., CIONINI P. G., D'AMATO F. (1972) - Cytological localization of ribosomal cistrons in polytene chromosomes of *Phaseolus coccineus*. *Chromosoma* (Berl.), **39**, 191-203.
- AVANZI S., MAGGINI F., INNOCENTI A. M. (1973) - Amplification of ribosomal cistrons during the maturation of metaxylem in the root of *Allium cepa*. *Protoplasma*, **76**, 197-210.
- BONCINELLI E., GRAZIANI F., POLITO L., MALVA C., RITOSSA F. (1972) - rDNA magnification at the *bobbed* locus of the Y chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Cell Diff.*, **1**, 133-142.
- BREUER M. E., PAVAN C. (1955) - Behavior of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* (Berl.), **7**, 371-386.
- CROUSE H. V. (1960) - The nature of the influence of X-translocations on sex of progeny in *Sciara coprophila*. *Chromosoma* (Berl.), **11**, 146-166.
- DENHARDT D. T. (1966) - A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, **23**, 641-646.
- ENDOW S. A. (1980) - On ribosomal gene compensation in *Drosophila*. *Cell*, **22**, 149-155.

- ENDOW S. A., GLOVER D. M. (1979) - Differential replication of ribosomal gene repeats in polytene nuclei of *Drosophila*. *Cell*, **17**, 597-605.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA N. (1972) - Further studies of the nucleolar material in salivary glands nuclei of *Sciara coprophila*. *Chromosoma* (Berl.), **38**, 237-254.
- GABRUSEWYCZ-GARCIA N., KLEINFELD R. G. (1966) - A study of the nucleolar material in *Sciara coprophila*. *J. Cell Biol.*, **29**, 347-359.
- GERBI S. A. (1971) - Localization and characterization of the ribosomal RNA cistrons in *Sciara coprophila*. *J. Mol. Biol.*, **58**, 499-511.
- GERBI S. A., CROUSE H. V. (1976) - Further studies on the ribosomal RNA cistrons of *Sciara coprophila* (Diptera). *Genetics*, **83**, 81-90.
- GALL J. G. (1974) - Free ribosomal genes in the macronucleus of *Tetrahymena*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3078-3081.
- GRAZIANI F., CAIZZI R., GARGANO S. (1977) - Circular ribosomal DNA during ribosomal magnification in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, **112**, 49-63.
- HELLING R. B., GOODMAN H. M., BOYER H. W. (1974) - Analysis of Endonuclease R. Eco RI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.*, **14**, 1235-1244.
- HOURCADE D., DRESSLER D., WOLFSON J. (1973) - Amplification of ribosomal genes involves a rolling circle intermediate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2926-2930.
- MANIATIS T., JEFFREY A., KLEID D. G. (1975) - Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ . *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1148-1188.
- MATTINGLY E., PARKER C. (1968) - Sequence of puff formation in *Rhynchosciara* polytene chromosomes. *Chromosoma* (Berl.), **23**, 255-270.
- METZ C. W. (1938) - Chromosome behavior, inheritance, and sex determination in *Sciara*. *Amer. Naturalist*, **72**, 485-520.
- MILLER O. L., BEATTY B. R. (1969) - Visualization of nucleolar genes. *Science*, **164**, 955-957.
- PARDUE M. L., GERBI S. A., ECKHARDT R. A., GALL J. G. (1970) - Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. *Chromosoma* (Berl.), **29**, 269-290.
- RENKAWITZ R., GERBI S. A., GLATZER K. H. (1979) - Ribosomal DNA of the fly *Sciara coprophila* has a very small and homogeneous repeat unit. *Molec. gen. Genet.*, **173**, 1-13.
- ROCHAIX J. D., BIRD A. P., BAKKEN A. (1974) - Ribosomal RNA gene amplification by rolling circles. *J. Mol. Biol.*, **87**, 473-487.
- ROCHAIX J. D., BIRD A. P. (1975) - Circular ribosomal DNA and ribosomal DNA: replication in somatic amphibian cells. *Chromosoma* (Berl.), **52**, 317-327.
- RITOSSA F. M., ATWOOD K. C., LINDSLEY D. L., SPIEGELMAN S. (1966) - On the chromosomal distribution of DNA complementary to ribosomal and soluble RNA. *Nat. Cancer Inst. Mono.*, **23**, 449-471.
- RITOSSA F. M. (1968) - Unstable redundancy of genes for ribosomal RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 509-516.
- SOUTHERN E. M. (1975) - Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **93**, 503-517.
- SPEAR B. B., GALL J. G. (1973) - Independent control of ribosomal gene replication in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1359-1363.

- SPRADLING A. C. (1981) - The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. *Cell*, **27**, 193-201.
- TARTOF K. D. (1971) - Increasing the multiplicity of ribosomal RNA genes in *Drosophila melanogaster*. *Science*, **171**, 294-297.
- TOBLER H. (1975) - The occurrence and developmental significance of gene amplification. In *Biochemistry of Animal Development*, 3, R. Weber, ed. (New York: Academic Press), pp. 91-143.
- YAO M. C., KIMMEL A. R., GOROVSKY M. A. (1974) - A small number of cistrons for ribosomal RNA in the germinal nucleus of a eukaryote, *Tetrahymena pyriformis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3082-3086.
- YAO M. C., GALL J. G. (1977) - A single integrated gene for ribosomal RNA in a eukaryote, *Tetrahymena pyriformis*. *Cell*, **12**, 121-132.

(ms. pres. il 7 giugno 1982; ult. bozze il 19 ottobre 1982)

