



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102001900914349
Data Deposito	08/03/2001
Data Pubblicazione	08/09/2002

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

GENE CCTRA COME STRUMENTO PER PRODURRE PROGENIE DI SOLI MASCHI NELLA MOSCA MEDITERRANEA CERATITIS CAPITATA.
--

RM2001 A 000120

* * * * *

dotti agricoli a causa delle necessarie quarantene imposte dalle organizzazioni di controllo nazionali ed internazionali, quali ad esempio la APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service) negli Stati Uniti (Malavasi et al., 1994). Ad esempio, gli USA, la Nuova Zelanda, il Cile ed il Giappone, che attualmente non hanno infestazioni della medfly, proibiscono l'importazione di frutti freschi da paesi in cui non è stata ancora eradicata. Il danno è causato dalle larve che vivono e si nutrono della polpa nel corpo fruttifero della pianta ospite e dalle punture dell'ovopositore che permettono l'entrata nel frutto di micro-organismi che ne causano il deperimento e la caduta prematura (Mitchel and Saul, 1990). In Centro America, escludendo il Messico e Panama, è stato stimato che la medfly ha causato danni annuali pari a più di 25 milioni di dollari US e nel solo Messico anche fino a 800 milioni di dollari US (Gibbs and Eerde, 1981).

Come strategia di eradicazione della medfly, in alternativa ai pesticidi (il più usato negli Stati Uniti è il malathion) o, a volte, in combinazione con quantità ridotte degli stessi (California, USA), viene utilizzata la Tecnica dell'Insetto Sterile (SIT). La SIT è un metodo di controllo non inquinante per l'ambiente, che si basa sull'allevamento massivo, la sterilizzazione ed il rilascio di un enorme numero di mosche (Knipling, 1955). Inoltre a differenza dei pesticidi, risulta essere specie-specifico, dato che non elimina specie benefiche come gli impollinatori o specie nemiche naturali. L'accoppiamento dei maschi sterili rilasciati con le femmine native determina un decremento delle potenzialità riproduttive della popolazione infestante residente ed una sua eradicazione, quando vengano rilasciati maschi in quantità sufficiente e per un periodo abbastanza lungo. La dimostrazione del

successo della SIT in esperimenti su piccola scala contro la medfly in Hawaii, Costa Rica, Italia ed altre parti del mondo ha portato ad adottarla su scala massiva in Messico, Perù, Guatemala, Chile, Argentina, Florida e California (Boller, 1987).

L'evento chiave che determina il successo della SIT è il trasferimento di spermi irradiati (radiazioni X o gamma) che portano mutazioni letali dominanti dai maschi rilasciati alle femmine selvatiche. Dato che in *Ceratitis*, come nella maggior parte degli insetti, il rapporto tra i due sessi è di 1:1, la SIT viene effettuata rilasciando mosche di entrambi i sessi. Tuttavia le femmine allevate, irradiate e rilasciate insieme con i maschi, non contribuiscono alla soppressione della popolazione infestante: infatti i maschi sono poligami e, dopo il rilascio di mosche sterili, si accoppieranno più volte con le varie femmine disponibili. La poligamia aumenterà le probabilità di incontro tra maschio selvatico e femmina selvatica, piuttosto che con la sterile, annullando l'effetto di soppressione che potrebbero esercitare le femmine sterili. I maschi sterili invece si accoppieranno ciascuno con più femmine selvatiche e determineranno un marcato effetto di soppressione della popolazione residente. Inoltre le femmine rilasciate contribuiscono al danno causato dalla popolazione infestante perforando con l'ovopositore i corpi fruttiferi che possono andare anche in deperimento. Le femmine possono presentare una differente sensibilità alle radiazioni e quindi risultare solo parzialmente sterili rispetto ai maschi irradiati. I maschi sterili, se rilasciati insieme alle femmine sterili, tendono ad accoppiarsi con esse piuttosto che con le selvatiche.

Per potenziare la SIT sono stati, quindi, sviluppati ceppi di *Ceratitis* con cui

è possibile selezionare la progenie maschile, separandola dalla femminile, sterilizzarla e rilasciarla nelle zone infestate. Il controllo generale esercitato con questa strategia sulle infestazioni è più efficace di quello ottenuto con il rilascio di mosche sterili di entrambi i sessi ed inoltre vengono abbattuti i costi di irradiazione e rilascio a parità di numero di mosche (Rendon et al., 2000). I programmi di prevenzione possono essere condotti senza il timore di provocare comunque danni alle colture vegetali a causa delle punture effettuate dalle femmine sterili rilasciate. Sono stati sviluppati ceppi per separare i sessi con metodi genetici e basati sull'utilizzo di traslocazioni cromosomiche che permettono di associare al cromosoma Y e quindi alla mascolinità, particolari geni selezionabili. Mediante irradiazione con raggi X o gamma sono state indotte rotture cromosomiche e traslocazioni nei nuclei delle cellule di *Ceratitis* a stadio pupale o di maschio adulto. Dopo opportuni incroci sono state selezionate linee che portano traslocazioni cromosomiche reciproche Y-A (Cromosoma Y e un Autosoma) identificandole sulla base di una riduzione della fertilità dei maschi oppure utilizzando analisi di pseudo-linkage di marcatori genetici con il cromosoma Y (Fisher, 2000). In tal modo sono stati sviluppati due tipi di ceppi GSS (Genetic Sexing Strain): il primo è basato sull'utilizzo di una mutazione che causa una colorazione bianca della pupa, invece del color marroncino selvatico; il secondo, più recente e più efficiente, è invece basato su una mutazione temperatura-sensibile letale a stadio embrionale (TSL). In entrambi i casi l'allele selvatico è presente in un frammento autosomico traslocato sul cromosoma Y ed il frammento reciproco del cromosoma Y risulta invece traslocato sull'autosoma. La seconda copia dell'autosoma, quella non inte-

ressata alla traslocazione, porta un allele mutante. Questi maschi vengono accoppiati con femmine che hanno l'allele mutato in omozigosi sull'autosoma. In tal modo nel primo ceppo traslocato la progenie maschile ha un colore della pupa scura mentre la femminile ha una pupa chiara. Nel secondo ceppo invece gli embrioni XY riescono a sopravvivere ad un "heat-shock" di 34°C per 24-48 ore perchè hanno un allele selvatico del locus *tsl* associato al cromosoma Y (ed un frammento di Y, che non contiene il fattore M, traslocato in modo reciproco sull'autosoma) mentre le femmine hanno l'allele mutante autosomico in omozigosi (Fisher, 2000).

E' da tenere in debita considerazione tuttavia che l'utilizzo di mutazioni TSL e traslocazioni cromosomiche determina una ridotta fertilità del ceppo allevato massivamente ed una periodica instabilità (cromosomica) del sistema di "sexing". Per tale ragione, in parallelo alle strategie di genetica classica nell'ultimo decennio sono state effettuate ricerche di genetica molecolare per ottenere nuovi sistemi di produzione di soli maschi in *Ceratitis capitata* (Louis et al., 1987; Furia et al., 1992; Saccone et al., 1996; idem, 2000).

I requisiti di un buon metodo di produzione di progenie maschile per *Ceratitis capitata*, come per ogni altro insetto dannoso, sono che la mutazione risulti stabile in condizioni di allevamento massivo e che permetta di evitare la perdita della metà della popolazione allevata (le femmine). Gli autori hanno tentato la strategia di indurre in *Ceratitis* una totale reversione del sesso da femminile a maschile in individui XX e sono da anni impegnati alla ricerca di geni che regolano la determinazione del sesso di *Ceratitis*. A tal fine possono utilizzare una tecnica di trasferimento genico in *Ceratitis* (Loukeris et al., 1995; Zwiebel et al., 1995) che permette di inserire stabil-

mente nel genoma di questa specie frammenti di DNA esogeni. In questo modo gli autori si propongono di produrre ceppi trasformati geneticamente che portano un transgene in grado di indurre o una letalità condizionale femmina-specifica o, meglio ancora, una trasformazione sessuale di femmine in maschi. Dato che i ceppi per il "sexing" di *Ceratitis* basati su traslocazioni e mutazioni risultano essere instabili in condizioni di allevamento massivo, la manipolazione genetica basata sull'utilizzo di trasposoni può risultare una soluzione alternativa e preferibile a quelle note. Infatti è stato dimostrato ad esempio sia in *Drosophila* con il trasposone *P* che in *Ceratitis* con il trasposone *Minos*, che le inserzioni risultano essere stabili di generazione in generazione. La tecnica di trasferimento genico che utilizza il trasposone *Minos* è descritta in US Patent n. 05348874.

Nel modello genetico *D. melanogaster* il sesso dell'individuo viene determinato dal numero di cromosomi X rispetto al numero della serie di Autosomi (*X:A ratio*) ($XX:AA=1$ femmine ed $XY:AA=0,5$ maschi). Il segnale primario "*X:A ratio*" agisce su un unico gene chiave, *Sex-lethal* (*Sxl*), attivandolo solo in embrioni $XX:AA$ (Cline and Meyer, 1996; Keyes et al., 1992). *Sxl* a sua volta attiva allo stadio larvale nelle sole femmine il gene *transformer* (*tra*) e questo modifica l'espressione del gene *doublesex* (*dsx*), in modo da reprimere il differenziamento sessuale maschile e promuovere quello femminile. In embrioni XY la mancata attivazione di *Sxl* e quindi di *tra*, determina una diversa attivazione di *dsx* che, all'opposto, promuove uno sviluppo maschile reprimendo quello femminile (Burtis and Baker, 1989). La determinazione del sesso è basata su una cascata regolativa in cui eventi di splicing alternativo sesso-specifico producono trascritti par-

zialmente differenti nei due sessi a partire dai geni *Sex-lethal* (*Sxl*), *transformer* (*tra*), *transformer-2* (*tra-2*) e *doublesex* (*dsx*). In *Drosophila* è stato possibile isolare ceppi mutanti in questi geni (o transgenici) nei quali è sufficiente un particolare incrocio o un "heat-shock" per produrre progenie unisessuale (McKeown et al., 1988; Polito et al., 1990; Fortier and Belote, 2000). Quindi *Drosophila* rappresenta un punto di riferimento per lo studio delle strategie di controllo di vari insetti dannosi sia all'agricoltura (*Ceratitidis capitata*) che alla salute umana (*Anopheles gambiae*, noto vettore della malaria).

Nonostante la posizione chiave occupata da *Sxl* in questa cascata regolativa, geni omologhi a *Sxl*, isolati in ditteri appartenenti a famiglie diverse dalle *Drosophilidae*, quali ad esempio *Ceratitidis capitata* (Tephritidae), *Musca domestica* (Muscidae) e *Megaselia scalaris* (Phoridae; più di 200 M.A. da *Drosophila*) non presentano una regolazione sesso-specifica conservata (Saccone et al., 1996; Sievert et al., 1997; Meise et al., 1998; Saccone et al., 1998; Schutt and Nothiger, 2000). Tali osservazioni suggeriscono che il ruolo del gene *Sxl* nella determinazione del sesso non sia evolutivamente conservato tra gli insetti.

Anche il segnale primario per la determinazione del sesso di *Ceratitidis capitata* è differente rispetto a quello di *Drosophila*. Infatti esso consiste di uno o più fattori mascolinizzanti localizzati in prossimità del centromero sul braccio lungo del cromosoma Y la cui natura genetico-molecolare non è al momento conosciuta (Willhoeft and Franz, 1996).

A tutt'oggi è quindi irrisolto il problema del comprendere se negli insetti la determinazione del sesso sia un meccanismo genetico evolutivamente

conservato.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione è basata sull'ipotesi che il gene *tra* sia conservato evolutivamente.

L'ipotesi è stata dagli autori provata isolando l'omologo del gene *tra* di *Drosophila* in *Ceratitis* (*Cctra*) e rivelando che esso risulta regolato in modo sesso-specifico mediante splicing alternativo. Si propone quindi che nei ditteri in generale e in *Ceratitis* in particolare sia evolutivamente conservato il segmento regolativo *tra>dsx* della cascata regolativa di *Drosophila*.

Al fine di investigare la funzione *in vivo* svolta dal gene *Cctra* è stata utilizzata la tecnica del silenziamento genico (detta anche "RNA interference") mediato da molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA, double strand RNA) con sequenza specifica del gene *Cctra*.

Iniettando molecole di dsRNA, prodotte artificialmente a partire da un clone di cDNA di *Cctra* da noi isolato e utilizzato come stampo per la trascrizione *in vitro*, dimostriamo che è possibile indurre una reversione del fenotipo sessuale da femminile in maschile. Questo esperimento dimostra inoltre che il gene *tra* di *Drosophila* risulta essere funzionalmente conservato in un dittero appartenente ad una famiglia (Tephritidae) moderatamente distante dal punto di vista filogenetico dalla famiglia delle Drosophilidae (120 M.A; Beverley and Wilson, 1984). L'oggetto della nostra invenzione consiste quindi nell'identificazione ed isolamento di un gene, *Cctra*, di *Ceratitis* che funziona da regolatore principale della determinazione del sesso ed in una sua manipolazione genetica *ad hoc* per utilizzarlo in esperimenti di "gene silencing", tecnica già sviluppata da alcuni anni (Fire et al. 1998,

Kennerdel and Carthew, 1998). Infatti dimostriamo qui di seguito che iniettando molecole di dsRNA complementari alla sequenza di *Cctra* in fasi precoci dello sviluppo embrionale e' possibile trasformare il fenotipo sessuale di *Ceratitis* mascolinizzando in modo apparentemente completo individui dal cariotipo XX (femmine).

Altro scopo dell'invenzione è il metodo per produrre progenie di soli maschi nella mosca mediterranea *Ceratitis Capitata*.

Ulteriori scopi dell'invenzione riguardano i plasmidi e vettori costruiti per perseguire il metodo dell'invenzione, riguardano anche le cellule comprendenti tali vettori e gli animali transgenici non umani comprendenti tali cellule.

Altri scopi risulteranno evidenti dalla descrizione dell'invenzione.

Breve descrizione delle figure

Fig. 1 Analisi per Northern blot dei trascritti prodotti dal gene *Cctra* in maschi e femmine adulti. Si possono osservare due trascritti maschio-specifici di circa 1,9 e 1,7 Kb e due i trascritti femmina-specifici di 3,5 e 1,6 Kb.

Fig. 2. Sequenza nucleotidica Seq. IDN. 1 del cDNA F1 derivato da un trascritto femmina-specifico del gene *Cctra*. E' riportata anche la sequenza aminoacidica Seq. IDN. 2 dedotta corrispondente alla proteina CcTRAF lunga 429 aa. Il simboletto a forma di V indica le posizioni dei bordi intron-esone. Le due frecce indicano le posizioni dei due oligonucleotidi utilizzati per produrre molecole di dsRNA.

Fig. 3. Allineamento delle putative sequenze aminoacidiche delle varie proteine omologhe TRA sia delle Drosophilidae che di *C. capitata*. Le zone più conservate sono indicate con 4 box numerate in cui sono evidenziati in

grassetto gli aminoacidi conservati in tutte le proteine allineate. In azzurro sono indicate le posizioni amminoacidiche comuni a CcTRA, DvTRA e DhTRA. Inoltre le frecce verticali indicano le posizioni degli introni nei geni corrispondenti.

Fig. 4. Analisi per RT-PCR dei trascritti prodotti dal gene *Cctra* in femmine (2) e maschi (4) adulti di *Ceratitis*. In A è mostrato uno schema che individua le posizioni dei due oligonucleotidi utilizzati nella reazione di amplificazione rispetto ai vari esoni di cui è composto il locus *Cctra*. In B è mostrato il risultato di una corsa elettroforetica delle reazioni di RT-PCR effettuate: il frammento di cDNA amplificato in femmine è pari a circa 1,3 Kb, come atteso sulla base della sequenza del clone F1 (vedi Fig. 2); il frammento di cDNA amplificato in maschi risulta più grande e pari a circa 1,6 Kb. Questo prodotto maschio-specifico è stato clonato e ne è stata determinata la sequenza nucleotidica parziale (dati non mostrati), che evidenzia la presenza di due esoni maschio-specifici addizionali riportati in A in colore blu.

Fig. 5. Differenti classi fenotipiche di mosche trattate secondo l'invenzione.

Fig. 6. Linee di corsa elettroforetica di amplificati su DNA genomico.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Nella descrizione le dizioni cDNA F1 e cDNA M1 si riferiscono rispettivamente a cDNA femmina-specifico e maschio-specifico.

I risultati funzionali ottenuti dagli autori possono essere riprodotti anche con sequenze nucleotidiche e/o amminoacidiche aventi un grado di identità del 40% o superiore, preferibilmente del 60% o superiore, più preferibilmente dell'80% o superiore, ancor più preferibilmente del 90% o superiore rispetto alle sequenze qui di seguito indicate (Yang et al., 2000).

Data la bassa conservazione evolutiva della sequenza nucleotidica di *transformer* in varie specie di *Drosophila* (O'Neil and Belote, 1992), abbiamo scelto di tentare l'isolamento dell'omologo in *Ceratitis* evitando di impiegare ibridazioni a bassa stringenza ed utilizzando invece il gene *l(3)73Ah* (sequenza AE003526[ACCN]). Questo gene risulta strettamente associato a *tra* (le regioni 3' non tradotte dei due geni sono parzialmente sovrapposte), questa associazione è conservata in altre specie di *Drosophilidae* ed il gene è altamente conservato per sequenza anche in vertebrati (O'Neil and Belote, 1992; Irminger-Finger and Nothiger, 1995).

Abbiamo quindi isolato una regione dal genoma di *Ceratitis* che risulta contenere l'omologo del gene *l(3)Ah* ed in sua prossimità l'omologo del gene *transformer*, che abbiamo chiamato *Cctra*. Il gene *Cctra*, come in *Drosophila*, produce trascritti sesso-specifici di differente grandezza. Infatti un clone di cDNA (detto F1) isolato successivamente da una genoteca di femmine adulte ed utilizzato come sonda radioattiva in esperimenti di Northern blot identifica in femmine due messaggeri rispettivamente di circa 3,5 Kb e di 1,6Kb ed in maschi due messaggeri di circa 1,7 Kb e 1,9 Kb (Fig. 1). Il cDNA F1 contiene un inserto di 1,6 Kb e potrebbe, quindi, corrispondere al trascritto femmina-specifico di pari grandezza. Il clone F1 analizzato per sequenza presenta uno schema di lettura aperto che codifica per una proteina di 429 aminoacidi, ricca in serine ed arginine (che costituiscono il cosiddetto "motivo" SR) e con brevi regioni di similarità con le proteine TRA delle *Drosophilidae* (Fig. 2 e Fig. 3).

In un esperimento di RT-PCR due oligonucleotidi (F+ e Z1-) hanno amplificato da RNA estratto da maschi e da femmine, due prodotti rispettiva-

mente di circa 1,6 Kb e di 1,3 Kb (Fig. 4). Il prodotto femmina-specifico di 1,3 Kb ha una lunghezza che è pari a quella attesa sulla base della sequenza del clone F1. Il prodotto di 1,6 Kb, che invece risulta più grande, è stato clonato in plasmide (clone M1) e ne è stata determinata la sequenza nucleotidica. Comparando la sequenza del clone M1 con quella del clone F1 è stato possibile stabilire che esso contiene due esoni addizionali, inseriti nella regione codificante e lunghi rispettivamente 40 e 197 nt. Il primo di questi due esoni maschio-specifici introduce un codone di terminazione che determina una possibile traduzione di una proteina CcTRA di soli 59 aminoacidi.

La parziale determinazione della sequenza nucleotidica di un clone genomico e la comparazione con le sequenze dei cloni F1 ed M1 ha permesso di stabilire che il locus *Cctra* è costituito da 5 esoni di cui 2 sono maschio-specifici (Fig. 4A).

L'analisi funzionale del gene *transformer* di *Ceratitis capitata* e' stata condotta mediante esperimenti *in vivo* basati sulla tecnica della "RNA interference" (RNAi) (Fire et al., 1998). Per questo scopo molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) corrispondenti a regioni esoniche del gene *Cctra* sono state iniettate in embrioni di *Ceratitis capitata*. In particolare la regione scelta per la RNAi si estende dalla posizione 154 (esone1) alla posizione 893 (esone 5) del cDNA femmina-specifico di *Cctra* F1 (Fig 5) e corrisponde a regioni esoniche presenti nel clone di cDNA F1 e nel clone di cDNA M1.

Per produrre il dsRNA di *Cctra* sono stati disegnati quattro oligonucleotidi sintetici denominati: 154+, 154+/T7, 893- e 893-/T7 in base alla sequenza

del cDNA *Cctra F1*. Gli oligonucleotidi 154+/T7 e 893-/T7 presentano al 5' la sequenza del promotore per l'RNA polimerasi del fago T7. Usando tali oligonucleotidi nella combinazione 154+ con 893-/T7 e 164+/T7 con 893- ed il cDNA *Cctra F1* come stampo, sono stati amplificati per PCR frammenti di DNA di circa 0.8 Kb che differiscono solo per la posizione del promotore artificiale.

Successivamente a partire da tali frammenti é stata eseguita una reazione di trascrizione *in vitro* che ha permesso di ottenere i due RNA a singolo filamento senso e antisenso complementari (ssRNA). Infine quantita' equimolari dei due ssRNA sono state poste in soluzione di annealing in modo da ottenere gli RNA a doppio filamento e il dsRNA é stato poi trasferito nel buffer di iniezione. Sono stati iniettati, con il dsRNA prodotto, 300 embrioni di mosche del ceppo *white eye*, nel polo posteriore, e 210 embrioni di mosche del ceppo selvatico Benakeion nel polo anteriore. Dagli embrioni iniettati si sono sviluppate 149 larve appartenenti al ceppo *white eye* (tasso di sopravvivenza embrionale del 49,6%) e 89 larve del ceppo Benakeion (tasso di sopravvivenza embrionale del 42,3%) (Tab. 1). Sono state successivamente raccolte 84 pupe *white eye* (tasso di sopravvivenza larvale del 56,3%) e 68 pupe Benakeion (tasso di sopravvivenza larvale del 76,4%). Infine sono nate 69 mosche *white eye* (tasso di sopravvivenza degli adulti rispetto agli embrioni iniettati del 23%) e 48 mosche Benakeion (tasso di sopravvivenza degli adulti rispetto agli embrioni iniettati del 22,8%). Le mosche adulte possono essere suddivise nelle classi fenotipiche riportate in Tab. 1.

Tabella 1

69 mosche ceppo <i>white eye</i> nate da embrioni iniettati al polo posteriore	48 mosche ceppo Benakeion nate da embrioni iniettati al polo anteriore
61 mosche di fenotipo maschile	29 mosche di fenotipo maschile
6 mosche di fenotipo maschile prive di antenne	10 mosche di fenotipo femminile ma con antenne
1 mosca di fenotipo femminile con genitali fusi	6 mosche di fenotipo maschile senza genitali
1 mosca di fenotipo femminile	3 mosche di fenotipo femminile

Il rapporto fra i sessi delle mosche nate dai due esperimenti risulta essere chiaramente sbilanciato in favore del sesso maschile. Nelle mosche nate dalle iniezioni al polo posteriore di embrioni del ceppo *white eye*, la percentuale di maschi nati rispetto alle femmine è del 98,3%, mentre per le mosche nate dalle iniezioni nel polo anteriore di embrioni del ceppo selvatico Benakeion, la percentuale di maschi nati rispetto alle femmine è del 90,6%. Tali percentuali potrebbero essere dovute ad una letalità femmina-specifica oppure ad una completa mascolinizzazione delle mosche XX di sesso femminile (le percentuali sono state calcolate considerando solo le mosche dei due sessi con fenotipo normale). Sono inoltre presenti mosche con fenotipi intermedi, che possiamo definire intersessi. Questi intersessi mostrano una trasformazione sessuale parziale, limitata alla regione prossima al polo di iniezione. Infatti dalle iniezioni al polo posteriore di embrioni del ceppo *white eye* sono state ottenute sei mosche intersessi con apparato riproduttore maschile, ma con la testa di tipo femminile (occhi con riflessi verdi ed assenza delle antenne). Dalle iniezioni al polo anteriore di embrioni del ceppo selvatico Benakeion, invece, si sono sviluppate dieci mosche intersessi con apparato riproduttore femminile, ma con la testa di tipo maschile (presenza di antenne e riflessi sull'occhio di colore blu elettri-

co). Sono state ottenute inoltre 7 mosche su 117 (1 femmina e 6 maschi), con malformazioni dell'apparato riproduttivo esterno, che risulta solo abbozzato o quasi completamente assente.

In figura 5 sono riportate le differenti classi fenotipiche ottenute. Nella figura 5A, sono mostrate rispettivamente in basso una femmina selvatica (*Benakion*) ed in alto una mosca iniettata (*Benakion*) che presenta un fenotipo a mosaico intersesso, con l'addome femminile e la testa maschile (vedi antenne maschio-specifiche). In 5B e 5C sono mostrati rispettivamente un maschio dal fenotipo sessuale normale (ceppo *white eye*) ed uno privo di antenne (ceppo *white eye*; iniezione posteriore), un tratto fenotipico interpretabile come incompleta mascolinizzazione della testa. In fig. 5D sono ritratte in alto una femmina (ceppo *white eye*) ed in basso una femmina iniettata che ha un anomalo apparato riproduttivo esterno. In Fig. 5E infatti si può osservare questa zona ingrandita che ha un aspetto chiaramente differente dalla forma selvatica femminile (Fig. 5F) ed è priva del caratteristico ovopositore.

Il maschio di *Ceratitis* presenta nell'occhio un riflesso blu (Fig. 5H) che invece è assente nella femmina (Fig. 5G) ma che è presente in intersessi iniettati al polo anteriore che hanno testa "mascolinizzata" ed apparato riproduttivo femminile (Fig. 5I e 5A in alto).

Nelle poche mosche intersessi la correlazione tra sito di iniezione (anteriore-posteriore) in embrioni ed effetto locale sul fenotipo sessuale dell'adulto (testa-addome) è spiegabile con il fatto che lo sviluppo dei ditteri è basato su un sistema di coordinate antero-posteriori e dorso-ventrali in parte attivo già nell'uovo e poi nell'embrione che stabilisce a questi stadi precoci "quali"

siano i vari gruppi cellulari che daranno origine alle varie strutture dell'adulto (Carroll, 1998).

I dati raccolti suggeriscono fortemente che l'iniezione del dsRNA specifico interferisca con la normale espressione del gene *Ccra*, reprimendo, come atteso, la sua funzione negli individui iniettati. La disparita' osservata nel numero di individui dei due sessi puo' essere spiegata con due ipotesi alternative: 1) il "silenziamiento" di *transformer* e' letale per le femmine che quindi non arrivano allo spupamento; 2) le femmine iniettate col dsRNA vanno incontro a reversione sessuale e si sviluppano in maschi apparentemente normali ma con cariotipo XX. Per discernere tra le due ipotesi abbiamo stabilito il cariotipo di dieci mosche di fenotipo maschile nate dall'iniezione al polo posteriore di embrioni del ceppo *white eye*. DNA genomico estratto da singola mosca e' stato sottoposto ad esperimenti di PCR basati sull'uso di oligonucleotidi che amplificano specificamente una regione del cromosoma Y di circa 1Kb (Anleitner and Haymer, 1991). Come controllo positivo di tale esperimento sono stati inclusi nella PCR i DNA genomici estratti da maschi e femmine del ceppo *white eye* dei due sessi. I risultati di tale esperimento sono mostrati in fig. 6A.

Nelle linee di corsa elettroforetica da 1 a 10 si osserva l'amplificato su DNA genomico delle mosche derivanti dall'esperimento di RNAi sul ceppo *white eye*. Nelle linee di corsa elettroforetica 11 e 12 si osserva l'amplificato su DNA genomico estratto da femmine *white eye*. Nelle linee di corsa 13 e 14 e' riportato il risultato della PCR su maschi *white eye*. Nella linea 16 e' presente il controllo negativo. Si puo' notare che soltanto 4 individui (1-2-6-7) generano il pattern di amplificazione caratteristico

(frammento Y-specifico di 1,1 Kb atteso; le altre bande sono dovute ad amplificazione di altre copie dell'elemento ripetuto) dei maschi *white eye* (11-12, due maschi *white eye* non iniettati), mentre i restanti 6 (3-4-5-8-9-10) mostrano un pattern femmina specifico paragonabile a quello in 13-14 (due femmine *white eye* non iniettate). Nella linea di corsa elettroforetica 15 si osserva l'amplificato su DNA genomico estratto da mosche di sesso femminile e di sesso maschile del ceppo *white eye*. In fig. 6B e' mostrato un esperimento di controllo volto ad accertare la presenza di DNA genomico in ciascuno dei campioni analizzati in Fig. 6A. In questo caso sono stati utilizzati come inneschi due oligonucleotidi sintetici, *Cctra* 154+ e *Cctra* 1113- che amplificano un frammento genomico di circa 2.2 Kb del gene *Cctra*. Pertanto si può concludere che dei 10 maschi esaminati soltanto 4 hanno un cariotipo XY, mentre gli altri hanno un cariotipo XX. Questi ultimi sono da considerarsi delle femmine revertite in maschi apparentemente normali. Questi dati indicano, quindi, che lo sbilanciamento in favore dei maschi osservato in tab. 1 è spiegabile con una reversione sessuale fenotipicamente completa di individui con cariotipo femminile XX piuttosto che con una letalità femmina-specifica.

Il gene *transformer* di *Ceratitis capitata* (*Cctra*) come in *Drosophila* risulta strettamente associato e sovrapposto al gene *l(3)Ah*, codifica per una proteina ricca in serine ed arginine, produce trascritti di differente lunghezza nei due sessi mediante splicing alternativo (McKeown et al., 1987) ed è indispensabile per il corretto sviluppo degli individui di sesso femminile ma non di quello maschile (Sturtevant, 1945). Abbiamo dimostrato per la prima volta che la tecnica dell'RNAi funziona anche nella specie *Ceratitis capitata*

e che è un metodo utile per produrre progenie di soli maschi utilizzando sequenze del gene *Cctra*. Infatti l'iniezione, in fasi precoci dello sviluppo embrionale, di molecole di dsRNA corrispondenti a regioni esoniche di *Cctra* induce una trasformazione sessuale di individui XX in maschi fenotipicamente indistinguibili da quelli XY. Al contrario gli embrioni XY iniettati si sviluppano in maschi adulti apparentemente normali. Alcune delle mosche presentano un fenotipo con caratteristiche sia maschili sia femminili. I due tipi di intersessi ottenuti ("femmine con antenne" e "maschi privi di antenne") possono essere stati determinati dalla mancata diffusione del dsRNA in tutto l'embrione dopo l'iniezione. Infatti si può notare che la trasformazione sessuale della parte anteriore o posteriore del corpo degli intersessi e' strettamente correlata al sito di iniezione del dsRNA.

La presenza di alcune femmine normali nella progenie iniettata e' probabilmente spiegabile con errori tecnici-manuali nella fase di iniezione (ad esempio, l'embrione è stato perforato ma non è stata iniettata soluzione). Sulla base dei risultati ottenuti, proponiamo l'utilizzo dell'intera sequenza nucleotidica del cDNA F1 contenente le regioni esoniche del gene *Cctra* (Fig. 2) per eliminare dalla progenie la presenza delle femmine trasformandole in maschi di *Ceratitis*, mediante la strategia da noi utilizzata. Avendo rivelato una conservazione funzionale del gene *transformer* di *Drosophila*, quale regolatore principale della determinazione del sesso anche di *Ceratitis*, proponiamo che la nostra invenzione sia estendibile in molte altre specie di ditteri dannosi per l'agricoltura, per la salute dell'uomo e degli animali da allevamento.

L'utilizzo di molecole a doppio filamento di RNA che contengano sequenze

differenti da quelle da noi utilizzate ma comunque derivate dal gene *Cctra* avranno la capacità di interferire con questa funzione genica e di indurre la trasformazione sessuale di *Ceratitidis*.

Il "silenziamento genico" che si può indurre mediante l'RNAi in *Ceratitidis* può essere effettuato con l'uso di un vettore di trasformazione (Fortier and Belote (2000) con cui introdurre nel genoma di *Ceratitidis* un transgene inducibile che produce molecole di dsRNA specifiche del gene *Cctra*. Con questa metodica la interferenza è ritenuta massima e la progenie sarà costituita esclusivamente da maschi XY ed individui XX completamente mascolinizzati.

Anche altre manipolazioni molecolari operabili su questo gene e/o sui suoi prodotti possono dare risultati simili. E' possibile, ad esempio, che l'iniezione di molecole antisenso di DNA o RNA con la sequenza specifica complementare a quella dei trascritti di *Cctra* o di anticorpi che riconoscono la proteina CcTRAF (antibody blocking) siano in grado di indurre un "knock-out" della funzione genica e, quindi, una mascolinizzazione degli individui XX. L'efficienza di questi sistemi comunque dovrebbe essere minore di quella ottenuta con l'iniezioni di molecole dsRNA *Cctra*.

Per un utilizzo della nostra invenzione su scala industriale volto alla produzione massiva di soli maschi abbiamo ideato i seguenti percorsi di lavoro, alcuni alternativi, altri complementari o integrativi: 1) sviluppo di un ceppo transgenico che produce in modo inducibile dsRNA (Fortier and Belote, 2000; Kennerdell and Carthew, 2000; Lam and Thummel, 2000) con sequenze specifiche del gene *Cctra*; 2) sviluppo di un sistema di trasferimento delle molecole di dsRNA alternativo all'iniezione di singoli embrioni,

mediante ad esempio lipofezione o elettroporazione; 3) sviluppo di transgeni chimerici *Cctra*-GFP per esprimere in modo sesso-specifico proteine fluorescenti di differente colore e separare gli embrioni XX (di un colore) da quelli XY (di un altro colore) mediante dispositivi automatici del tipo "cell-sorting" utilizzati per separare cellule (Sorensen et al., 1999); 4) sostituzione del gene endogeno *Cctra* con una versione modificata, mediante ricombinazione omologa, che permetta di indurre la trasformazione di femmine in maschi (Rong and Golic, 2000). In particolare il punto 3 propone una nostra idea originale di applicare ad embrioni di *Ceratitis* una tecnica di separazione sviluppata per le cellule e basata su una differente colorazione in vivo che possono avere cellule ed organismi se esprimono un transgene esogeno codificante per la proteina Green Fluorescent, GFP.

Il clonaggio del primo omologo del gene *transformer* in una specie non appartenente alle *Drosophilidae* apre la strada all'identificazione di geni omologhi in altre specie. Infatti il clonaggio dell'omologo di *transformer* di *Drosophila* in *Ceratitis capitata* ha permesso di dimostrare una conservazione del gene sia strutturale, che regolativa e funzionale. Tenuto conto che *Drosophila* e *Ceratitis* appartengono a due famiglie di ditteri che nel gruppo *Acalyptratae* (comprendente circa 60 delle 120 famiglie di ditteri) sono tra le più distanti filogeneticamente (120 milioni di anni), proponiamo che il gene *transformer* sia un regolatore chiave della determinazione del sesso in molte altre specie di ditteri anche di interesse economico-sanitario. L'allineamento delle sequenze proteiche e nucleotidiche dei geni *tra* isolati nelle *Drosophilidae* con quelle derivate dal gene *Cctra* ci ha permesso di identificare brevi sequenze aminoacidiche (vedi Fig. 3) partico-

larmente conservate che abbiamo utilizzato per disegnare varie coppie di oligonucleotidi "degenerati" da impiegare nella ricerca di omologhi di *tra* in altri insetti di interesse economico (varie specie di *Bactrocera*) e sanitario (*Glossina*, *Anopheles*, etc.). Ad esempio, già la stessa famiglia delle Tephritidae a cui appartiene *Ceratitis* annovera molte altre specie dannose per le coltivazioni agricole: quali, ad esempio, la *Bractrocera oleae*, anche conosciuta come *Dacus*, che danneggia le olive nell'area del Mediterraneo; in Australia sono famose la *Bactrocera tryoni*, la *Bractrocera musae* (banana fruitfly) e la *Bractrocera papayae* (papaya fruitfly). Il clonaggio di omologhi in queste altre specie permetterà sviluppare la medesima strategia da noi applicata in *Ceratitis* per la produzione di progenie di soli maschi e l'impiego della tecnica del maschio sterile.

Gli esempi seguenti servono a meglio illustrare l'invenzione e non sono da considerare limitativi della portata della medesima.

ESEMPI

Tutte le tecniche standard di biologia molecolare necessarie per "blotting", ibridazione, digestione enzimatica e costruzione di plasmidi chimerici sono essenzialmente quelle descritte in Maniatis et al. (1982).

Esempio 1

Estrazione di DNA genomico da singola mosca

L'estrazione del DNA genomico e' stata condotta come suggerito in Andrew and Thummel (1994) adattando il protocollo ad una singola mosca di *Ceratitis capitata*:

Una singola mosca è stata omogeneizzata manualmente con un pestello in 200 µl di buffer di lisi (20mM Tris, pH 7.5, 0.2 M NaCl, 20 mM EDTA, 2%

SDS) in eppendorf, sono stati aggiunti 20 µl di Proteinasi K (BOEHRINGER MANNHEIM) alla concentrazione finale di 250 µg/ml, la soluzione è stata incubata a 50°C per 1 ora. Sono stati poi aggiunti 100 µl di Fenolo e miscelati al "vortex" per 5 minuti. . Sono stati aggiunti 100 µl di Cloroformio e miscelati al "vortex" per 5 minuti. La soluzione è stata centrifugata per 5 minuti a 13000 rpm e la fase acquosa superiore è stata trasferita in eppendorf. Sono stati aggiunti 200 µl di Cloroformio e miscelati al "vortex" per 5 minuti. Il campione è stato centrifugato per 5 minuti a 13.000 rpm. La fase acquosa è stata trasferita, quindi, in una eppendorf a cui sono stati aggiunti 400 µl di Etanolo 95%. Gli acidi nucleici sono stati precipitati per 2 ore a -20°C e mediante centrifugazione per 5 minuti a 13000 rpm ad una temperatura di 4°C. Eliminato il surnatante e risospeso il pellet in 30 µl di TE 1X, sono state aggiunte 10 unità di Rnasi-DNAsi free (PROMEGA) ed il campione è stato incubato per 2 ore a 37°C.

Esempio 2

Analisi cariotipica mediante PCR

Per la amplificazione di sequenze Y-specifiche é stata utilizzata la Taq DNA Polymerase (AMERSHAM PHARMACIA) e una strumentazione Perkin Helmer Gene Amp 9600. Gli oligonucleotidi sintetici utilizzati come innesco sono:

1-Y-SPECIFIC: 5' GCGTTTAAATATACAAATGTGTG 3' (SEQ. ID. NO.)

1Kb Y-SPECIFIC: 5' TACGCTACGAATAACGAATTGG 3'

Per ogni reazione di PCR sono stati usati 0.4 µl di DNA genomico. L'amplificazione e' stata preceduta da un primo step di denaturazione del tem-

plato a 94°C per 5' e successivamente 35 cicli di reazione come descritto di seguito: 94°C per 1'; 60°C per 1'; 72°C per 1'. I prodotti di PCR sono stati analizzati su gel di agarosio.

L'oligonucleotide utilizzato per amplificare un frammento di DNA dal locus *Cctra* ha la seguente sequenza:

***Cctra* 1113- 5' CTGGAAGTGGCACTGGTATTG 3'**

Esempio 3

Northern blot

La preparazione di RNA totale da embrioni, larve e adulti del ceppo Benakion, e' stata effettuata utilizzando Guanidina Isotiocianato (SIGMA) ed ultracentrifugazione in CsCl come descritto in Maniatis et al. (1982); l'arricchimento in poly(A+) e' stato ottenuto mediante cromatografia su colonnine di cellulosa complessate con oligodT (CLONTECH). Per ogni linea elettroforetica sono stati caricati circa 4 µl di RNA poly(A+), poi separati in gel denaturante di formaldeide 2,2 M e buffer RB e trasferiti su membrane di Hybond-NX (AMERSHAM). L'ibridazione e' stata condotta utilizzando come sonda molecolare un frammento del cDNA F1 di *Cctra* (dalla posizione 99 alla 1495). Per marcare la sonda e' stato impiegato ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP (NEN) in reazioni di "nick translation" (GIBCO BRL). Per l'analisi autoradiografica sono state usate lastre fotografiche (KODAK) e rilevazioni mediante Phosphorimager (MOLECULAR DYNAMICS).

Esempio 4

Analisi di trascritti per RT-PCR

La fase di retrotrascrizione della RT-PCR e' stata effettuata utilizzando come innesco oligodT e l'enzima Superscript II (GIBCO BRL). Per la am-

plificazione mediante PCR sono stati utilizzati, come inneschi, i seguenti oligonucleotidi :

F+ = 5' catgaacatgaatattacaaaggc 3'

Z1- = 5'cacgacgcttatagctgttgt 3'

Le posizioni 5' dei due oligonucleotidi sono rispettivamente 88 e 1484 sulla sequenza del clone F1.

L'amplificazione e' stata preceduta da un primo step di denaturazione del template a 94°C per 5' e successivamente 35 cicli di reazione come descritto di seguito: 94°C per 1'; 60°C per 1'; 72°C per 2'30"

I frammenti di cDNA amplificati sono stati clonati nel vettore pUC-18 (AMERSHAM-PHARMACIA-BIOTECH, Sure Clone Ligation Kit) e sequenziati (BYOLABS T7 Sequencing Kit). Gli allineamenti di sequenze sono stati effettuati mediante i programmi Macaw, Blast e FASTA. Per le ricerche in banche dati sono stati usati i programmi: Blast EBI, Blast Japan, Flybase e Blast NCBI.

Esempio 5

Screening di library

Per isolare il clone genomico contenente il gene *transformer* e' stata analizzata una library genomica EMBL3 di *Ceratitis capitata* (preparata a partire da DNA genomico del ceppo Benakion). La sonda molecolare utilizzata in questo esperimento e' una porzione di un cDNA del gene *Ccl(3)* (Pane et al., unp. res.) marcato radioattivamente con ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP.

E' stato effettuato uno screening di una cDNAteca di femmine adulte di *Ceratitis capitata* (preparata a partire da RNA del ceppo Benakion; Saccone et al., 1998). La sonda molecolare adoperata e' una porzione del gene

Cctra ottenuta per digestione enzimatica e marcata con ($\alpha^{32}\text{P}$)dCTP (risultati non pubblicati). L'ibridazione e' stata condotta a 65°C per 14h in una soluzione di 5X SSPE, 0.1% SDS, DENHARDT 5X, DNA carrier (LIFE-TECHNOLOGIES) 0.1 mg/ml. Successivamente i filtri sono stati sottoposti a 3 lavaggi per 15' a temperatura ambiente in SSPE 2X, SDS 0,1%; 1 lavaggio a 37°C per 30' in SSPE 2X, SDS 0.1%; 1 lavaggio a 65°C per 2h in SSPE 2X, SDS 0.1%; 1 lavaggio a 65°C per 30' in SSPE 1X, SDS 0.1%.

Esempio 5

Preparazione del dsRNA di *Cctra* ed iniezione in embrioni di *Ceratitis capitata*

Il dsRNA di *Cctra* é stato ottenuto mediante trascrizione in vitro usando come DNA stampo prodotti di PCR. Per la realizzazione dei DNA stampo sono stati usati i seguenti oligonucleotidi (i numeri indicano le posizioni sulla sequenza del clone F1):

***Cctra* 154+: 5' CAGTGGTTCGGTTCGGAAG 3'**

***Cctra* 893-: 5' TCCATGATGTCGATATTGTCC 3'**

***Cctra* 154+/T7:**

5' TAATACGACTCACTATAGGGCAGTGGTTCGGTTCGGAAG 3'

***Cctra* 893-/T7:**

5' TAATACGACTCACTATAGGGTCCATGATGTCGATATTGTCC 3'

La coppia T7/154+, 893- ha prodotto il substrato per il ssRNA (RNA a singolo filamento) "senso"; mentre la coppia 154+, T7/893- ha fornito il DNA stampo per il ssRNA "antisenso". La reazione di amplificazione e' stata preceduta da un primo step di denaturazione del template a 94°C per 5' ed e' consistita in 35 cicli di reazione come di seguito riportato: 94°C per 1';

60°C per 1'; 72°C per 1'. Il template adottato per questa PCR e' un frammento del cDNA F1 (dalla posizione 154 alla posizione 893). Tutti i passaggi di PCR sono stati condotti utilizzando acqua trattata con DEPC. Successivamente i prodotti di PCR sono stati usati direttamente per la reazione di trascrizione in vitro come suggerito nel protocollo del kit di trascrizione *in vitro* RNA Trascripton Kit (STRATAGENE). Quantita' equimolari dei ssRNA "senso" ed "antisenso" sono state poste in buffer di annealing (1mM Tris pH 7.5; 1 mM EDTA) per 24h in modo da ottenere il dsRNA (RNA a doppio filamento). Il dsRNA e' stato poi trasferito in buffer di iniezione (5 mM KCl; 0.1 mM NaPO₄ pH 7,8) ad una concentrazione finale pari a 5 mM. La tecnica di iniezione del dsRNA e' essenzialmente quella ideata per la trasformazione della linea germinale di *Drosophila melanogaster* (Rubin and Spradling, 1982) con gli adattamenti descritti in Kennerdel and Carthew (1998). Gli embrioni sono stati raccolti ogni ora, poi decorionati a mano, mediante aghi di siringhe da insulina da 1 ml, essiccati per un tempo compreso tra i 60 e 120 secondi, ricoperti con Halo-carbon oil 700 (SIGMA) ed iniettati un gruppo al polo anteriore ed un altro gruppo al posteriore.

Esempio 6

Mantenimento dei ceppi Benakeion e w/w

Le mosche del ceppo Benakeion e di quello *white eye*, utilizzate per ottenere gli embrioni da iniettare, vengono allevate come segue. Gli individui adulti sono mantenuti all'interno di due gabbie separate (40 cm x 40 cm x 32 cm), costruite in modo da permettere la deposizione delle uova all'interno di vaschette contenenti acqua distillata. Queste vaschette vengono

svuotate su un retino che lascia passare l'acqua, ma trattiene gli embrioni che verranno trasferiti in capsule Petri contenenti una particolare "pappa" costituita da un frullato di 400 ml di H₂O, 30 gr di carta, 30 gr di zucchero, 30 gr di un estratto di lievito (Laboratorio Dott. Piccioni, Gessate, Milano), 10 ml "stock colesterolo" (140 ml H₂O, 50 ml EtOH 95%, 10 gr Colesterolo C₂₇H₄₆O, Sigma), 8.5 ml di "stock acido benzoico" (50 gr Acido Benzoico C₇H₆O₂, 300 ml EtOH 95% e 150 ml H₂O) 10 ml di "stock HCl" (384 ml H₂O e 66 ml HCl 37%). Le capsule in cui gli embrioni si sono sviluppati in larve vengono trasferite in contenitori chiusi dove é presente della sabbia. I contenitori sono chiusi, in quanto le larve, attraverso una contrazione del corpo, saltano nella sabbia (che serve ad evitare che le larve aderiscano tra loro) dove formeranno le pupe. Le pupe vengono separate attraverso un setaccio che permette il passaggio solo della sabbia e trasferite in capsule Petri. Dopo circa 10-13 giorni nascono mosche adulte che verranno rilasciate nelle gabbie precedentemente descritte (tutto il ciclo vitale viene attuato in una camera a 25°C e dura circa 1 mese).

La cura delle mosche iniettate con il dsRNA é simile a quella vista in precedenza. Infatti gli embrioni iniettati devono essere trasferiti, appena sviluppati in larve, dall'olio minerale, alle piastre con la "pappa". Tale passaggio viene effettuato allo stereoscopio aiutandosi con delle siringhe da insulina da 1 ml. Il resto del ciclo vitale segue uno sviluppo normale. Gli adulti nati vengono poi analizzati al microscopio, fotografati ed eventualmente congelati a -80°C per essere usati poi per successive analisi molecolari.

Referenze

Anleitner, J. E. and Haymer, D. S. (1991). Y enriched and Y specific DNA

RIVENDICAZIONI

RM 2001 A 000120

1. Gene *Cctra* di *Ceratitis Capitata* che codifica per la proteina CcTRA in grado di regolare il fenotipo sessuale nei ditteri, in particolare in *Ceratitis Capitata*.
2. cDNA isolato del gene *Cctra* derivato dall'mRNA maschio-specifico.
3. cDNA isolato femmina-specifico indicato come Seq. IDN 1.
4. Sequenza nucleotidica isolata corrispondente al cDNA femmina-specifico indicato come Seq. IDN 1
5. Sequenza nucleotidica secondo la riv. 4 che codifica per un polipeptide o peptide compreso nella sequenza amminoacidica indicata come Seq IDN: 2.
6. Polinucleotide od oligonucleotide isolato comprendente porzioni della sequenza nucleotidica indicata come Seq IDN 1.
7. Polinucleotide od oligonucleotide omologo al 60% o superiore rispetto al polinucleotide od oligonucleotide secondo la riv. 6.
8. Polinucleotide od oligonucleotide omologo all'80% o superiore rispetto al polinucleotide od oligonucleotide secondo la riv. 6.
9. Sequenza amminoacidica isolata indicata come Seq IDN 2.
10. Sequenza nucleotidica di *Cctra* codificante per la regione amminoacidica corrispondente alla box 1 di fig. 3.
11. Sequenza nucleotidica di *Cctra* codificante per la regione amminoacidica corrispondente alla box 2 di fig. 3.
12. Sequenza nucleotidica di *Cctra* codificante per la regione amminoacidica corrispondente alla box 3 di fig. 3.
13. Sequenza nucleotidica di *Cctra* codificante per la regione amminoacidi-

ca corrispondente alla box 4 di fig. 3.

14. Sequenza nucleotidica complementare alle sequenze secondo le riv. 10-13.
15. Polipeptide o peptide omologo al 40% o superiore rispetto alle sequenze amminoacidiche secondo le riv. 10-13.
16. Polipeptide o peptide omologo al 60% o superiore rispetto alle sequenze amminoacidiche secondo le riv. 10-13.
17. Polipeptide o peptide omologo al 80% o superiore rispetto alle sequenze amminoacidiche secondo le riv. 10-13.
18. Oligonucleotide antisenso in grado di ibridarsi con la sequenza di mRNA derivata dal cDNA secondo le riv. 2 e 3.
19. Sequenza polinucleotidica o polipeptidica secondo le riv. precedenti da usare per regolare la determinazione del sesso nei ditteri, in particolare in *Ceratitis Capitata*.
20. Anticorpo contro la proteina CcTRA.
21. Plasmide comprendente il polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 2-8 e 10-13.
22. Plasmide secondo la riv. 21 da impiegare come vettore di clonaggio e di espressione.
23. Vettore comprendente il polinucleotide od oligonucleotide secondo le riv. 2-8 e 10-13.
24. Vettore secondo la riv. 23 comprendente ulteriormente un gene codificante per una proteina fluorescente.
25. Cellula modificata con il plasmide secondo le riv. 21-22.
26. Cellula modificata secondo la riv. 25 in grado di esprimere la proteina

CcTRA o suoi frammenti o suoi omologhi al 40% di omologia o superiore.

27. Organismo pluricellulare, escluso l'uomo, comprendente cellule modificate secondo le riv. 25-26.
28. Animali transgenici non umani "knock out" in cui il gene *Cctra* è inattivato parzialmente o totalmente.
29. Impiego di una sequenza nucleotidica o polipeptidica secondo le riv. 2-8 e 10-13, o di parti di detta sequenza/e, come regolatrice della determinazione del sesso in ditteri.
30. Impiego di una sequenza nucleotidica o polipeptidica secondo le riv. 2-8 e 10-13, o di parti di detta sequenza/e, come regolatrice della determinazione del sesso in *Ceratitis Capitata*.
31. Procedimento di silenziamento genico mediato da molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) con sequenza specifica del gene *Cctra* secondo la riv. 1.
32. Procedimento secondo la riv. 31 condotto iniettando molecole di dsRNA, prodotte artificialmente a partire da un clone di cDNA di *Cctra* in embrioni di ditteri per indurre una reversione del fenotipo sessuale da femminile in maschile.
33. Procedimento secondo la riv. 32 in cui gli embrioni sono di *Ceratitis capitata*.
34. Procedimento secondo la riv. 31 in cui la regione scelta per il silenziamento si estende dalla posizione 154 (esone1) alla posizione 893 (esone 5) del cDNA femmina-specifico Seq. IDN 1 di *Cctra* e corrisponde a regioni esoniche presenti nel clone di cDNA F1 e nel clone di cDNA

M1.

35. Procedimento di silenziamento genico secondo le riv. 31-34 effettuato con l'uso di un vettore di trasformazione con cui introdurre nel genoma di *Ceratitis* un transgene inducibile che produce molecole di dsRNA specifiche del gene *Cctra*.
36. Procedimento di silenziamento secondo le riv. 32-35 in cui vengono iniettate molecole antisenso di DNA o RNA con la sequenza specifica complementare a quella dei trascritti di *Cctra* o di anticorpi che riconoscono la proteina CcTRAF.
37. Procedimento secondo la riv. 32 in cui l'iniezione è sostituita con tecniche scelte fra lipofezione ed elettroporazione.
38. Gene *Cctra* secondo la riv. 1 comprendente 5 esoni di cui 2 sono maschio-specifici.
39. Processo per produrre il dsRNA di *Cctra* caratterizzato dal fatto che si utilizzano quattro oligonucleotidi sintetici denominati: 154+, 154+/T7, 893- e 893-/T7 con la sequenza del cDNA *Cctra* F1 come stampo.
40. Processo secondo la riv. 39 in cui gli oligonucleotidi 154+/T7 e 893-/T7 presentano al 5' la sequenza del promotore per l'RNA polimerasi del fago T7.
41. dsRNA prodotto secondo le riv. 39-40 da iniettare in embrioni di ditteri nel polo posteriore o nel polo anteriore per ottenere una selezione sesso-specifica.
42. Impiego della sequenza nucleotidica del cDNA F1 contenente le regioni esoniche del gene *Cctra* per eliminare dal progenie di ditteri, in particolare di *Ceratitis*, la presenza delle femmine trasformandole in maschi.

43. Ceppo transgenico che produce in modo inducibile dsRNA con sequenze specifiche del gene *Cctra*.
44. Transgene chimerico *Cctra*-GFP codificante per una proteina fluorescente.
45. Procedimento per separare embrioni XX da embrioni XY caratterizzato dal fatto che si impiega il transgene della riv. 44 che esprime in modo sesso-specifico proteine fluorescenti di differente colore.
46. Processo di amplificazione di sequenze Y-specifiche mediante Taq DNA Polymerase caratterizzato dal fatto che si utilizza un oligonucleotide di innesco scelto fra:
- 1-Y-SPECIFIC:** 5' GCGTTTAAATATACAAATGTGTG 3'
- 1Kb Y-SPECIFIC:** 5' TACGCTACGAATAACGAATTGG 3'
47. Processo di amplificazione di un frammento di DNA dal locus *Cctra* mediante la seguente sequenza:
- Cctra* 1113-** 5' CTGGAACTGGCACTGGTATTG 3'
48. Processo di amplificazione di un frammento di RNA da ditteri maschi e femmine mediante PCR caratterizzato dal fatto che si sono utilizzati, come inneschi, i seguenti oligonucleotidi :
- F+** = 5' catgaacatgaatattacaaaggc 3'
- Z1-** = 5'cacgacgcttatagctgtgtg 3'
49. Oligonucleotide scelto fra:
- Cctra* 154+:** 5' CAGTGGTTCGGTTCGGAAG 3'
- Cctra* 893-:** 5' TCCATGATGTCGATATTGTCC 3'

Cctra 154+/T7:

5' TAATACGACTCACTATAGGGCAGTGGTTCGGTTCGGAAG 3'

Cctra 893-/T7:

5' TAATACGACTCACTATAGGGTCCATGATGTCGATATTGTCC 3'

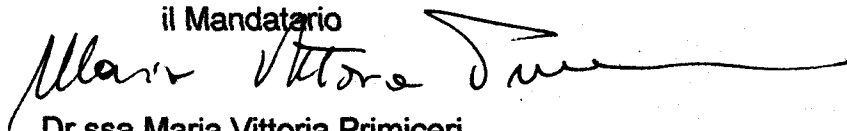
per ottenere il dsRNA di Cctra.

Roma, 08 Marzo 2001

/PV

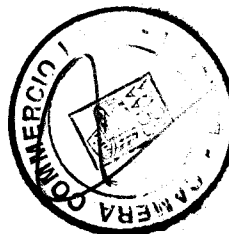
Per Università degli Studi di Napoli FEDERICO II

il Mandatario



Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA



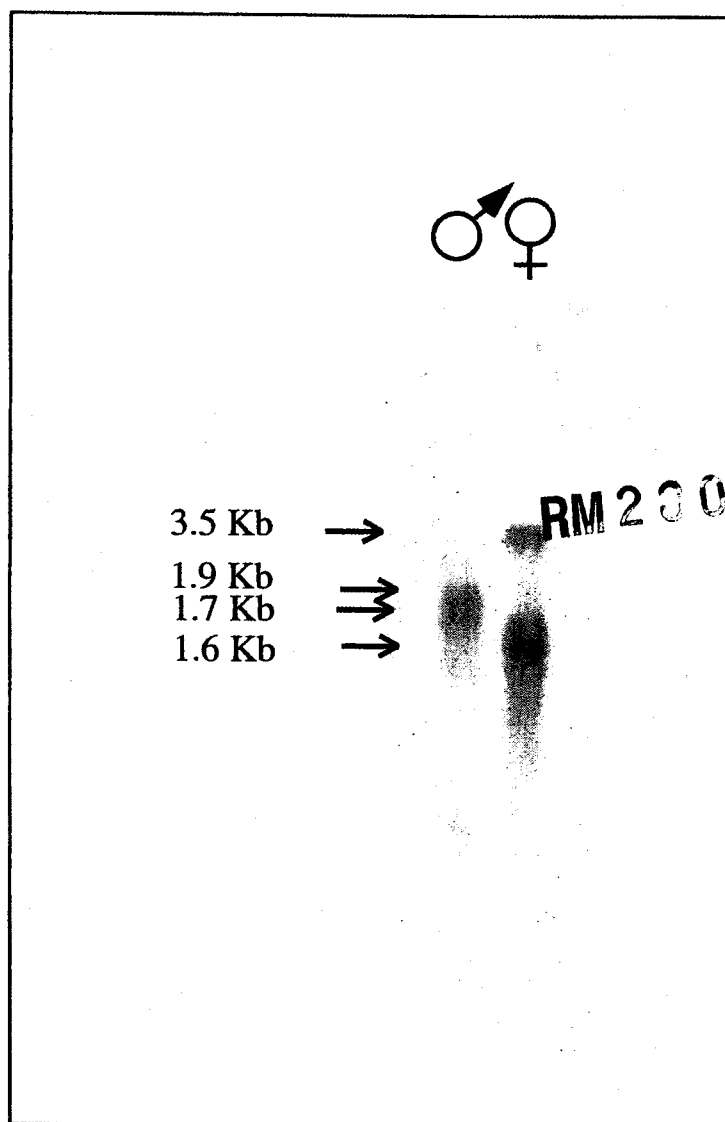
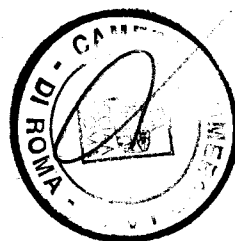
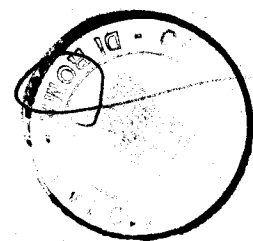


Fig. 1



1/1
aat tgg taa aga aaa gca aca tta aac aac agg caa cgc ata ttg agt tga aga aac cta
61/21
tca agt cac ttc gtt gac atc tct caa cat gaa cat gaa tat tac aaa ggc ttc ggc aac
met asn met asn ile thr lys ala ser ala thr
121/41
aac tag gaa aat acg aat tga aca aaa tgt acc cag tgg ttc ggt tgc gaa ggg tcc tta
thr arg lys ile arg ile glu gln asn val pro ser gly ser val arg lys gly pro tyr
181/61
cgc tat aga gcg cag tgt caa tcc aag cga agt tgt tat taa acg tag att tgg tga agg
ala ile glu arg ser val asn pro ser glu val val ile lys arg arg phe gly glu gly
241/81
ctc aaa gcc tct gtt tca acg cga cga cat cgt tgt aaa ccc tga taa tgt tgt aag taa
ser lys pro leu phe gln arg asp asp ile val val asn pro asp asn val val ser asn
301/101
tgt ggg tgc tca ttt tga aac aca gcc taa aga tgc gag taa caa cag taa aga gga ggt
val gly ala his phe glu thr gln pro lys asp arg ser asn asn ser lys glu glu val
361/121
tga aaa tca atg gcg caa aga gcg tca caa atc gac aga ttc cag cag ccc aga acg att
glu asn gln trp arg lys glu arg his lys ser thr asp ser ser ser pro glu arg phe
421/141
tcg taa gca tca ttc tag taa caa aag tga aca ttc aaa cag cgg taa caa tat tac aac
arg lys his his ser ser asn lys ser glu his ser asn ser gly asn asn ile thr thr
481/161
acg aca cac aaa aac gca cca ccc ttc aca aga gaa tct taa cac agc ttc aaa acg ccg
arg his thr lys thr his his pro ser gln glu asn leu asn thr ala ser lys arg arg
541/181
tga ctc ttc acc acc aac taa ccg acg gca cag aac gcc aga gaa agt tcc cta ctt cat
asp ser ser pro pro thr asn arg arg his arg thr pro glu lys val pro tyr phe ile
601/201
aga cga gat tag aga acg cga ccg cat tgc agc taa ata tgg aaa gag atc tac aaa atc
asp glu ile arg glu arg asp arg ile arg arg lys tyr gly lys arg ser thr lys ser
661/221
acc gtc acc ccc agt tat gtc atc caa gtt tgc tgc cag gcg gag tta ctc aag atc aat
pro ser pro pro val met ser ser lys phe arg arg arg arg ser tyr ser arg ser ile
721/241
ctc tgc ttc aag gtc tca ttc tcc cgc aag aag taa aaa tgc tac aca tgt tta tgg ctc
ser arg ser arg ser his ser pro ala arg ser lys asn arg thr his val tyr gly ser
781/261
act ttc acg acg ctc gtc ttc agt gga tgc tta cat agg cgg tgg tag gaa gcg gcg tgc
leu ser arg arg ser ser ser val asp arg tyr ile gly gly gly arg lys arg arg arg
841/281
aga aaa ttt acg cac cga aag aga ccg gga tgg aca ata tgc aca tca tgg aca cag atc
glu asn leu arg thr glu arg asp arg asp gly gln tyr arg his his gly his arg ser
901/301
gga aga aca gga acg ctc acg tgc tgg tgc cag ccc acc agc acg tac cag atc tgc aac
glu glu gln glu arg ser arg arg gly arg ser pro arg ala arg thr arg ser arg thr
961/321
acg ttc aag aga acg ttc aaa gca tgt tgc tgc acg aaa tga cga gcg taa taa aaa tct
arg ser arg glu arg ser lys his val arg ala arg asn asp glu arg asn lys asn leu
1021/341
cca cgg caa tca tga tga gtt gac aaa tgc cga gct aaa tca aag aaa ttt aac gca acc
his gly asn his asp glu leu thr asn ala glu leu asn gln arg asn leu thr gln pro
1081/361
gca aat aat aac aat acc agt gcc agt tcc agc gga ttt ctt gaa tta tgc ata ttc cac
gln ile ile thr ile pro val pro val pro ala asp phe leu asn tyr ala tyr ser thr
1141/381
ttg gcc aac tca aac aca atg gtc tca tcc aat gac gcc gcc tcc gcg ata tgg tgc tcc
trp pro thr gln thr gln trp ser his pro met thr pro pro pro arg tyr gly ala pro
1201/401
ggc gta tca tat gcc aac cat ttt acc cgc aac tgt tat gcc gcc aat gcg acc tgc gtt
ala tyr his met pro thr ile leu pro ala thr val met pro pro met arg pro ala leu
1261/421
acc gcc tta cgg ctt acc tcc tca gcc tat gcg tta cgg tgg acg tgg att aag att tcc
pro pro tyr gly leu pro pro gln pro met arg tyr gly gly arg gly leu arg phe pro
1321/441
tca gca aca tgg gcc acg tcc gtg gcg tcc taa ttt tgc ccc aaa aac aca caa ata gtg
gln gln his gly pro arg pro trp arg pro asn phe arg pro lys thr his lys AMB
1381/461
gct gat aaa ttt aga tta tag ctc taa tca tat gcc tag ata ata tct aag tag cat gtt
1441/481
ctc atg tat ttt cat ata tta cca caa cag cta taa gcg tgc tga agt aaa aaa gat gat
1501/501
agt ttt aat att taa tgt tct ttt att tac aaa tat ata tat atg tat cta tat ata tga
1561/521
ata gaa caa taa aaa aaa aaa aaa

Fig. 2



NOTARIATO & GERVASI S.p.A.

Ex1 Ex2

CcTRA	mnMNIITKASATTRKriieqnvpsgsvrkgpyaiersvnpsevvikrrfgegskplfqrdd	60
DhTRA	--MDADSSSRSPRdt-----	13
DeTRA	mkMDADSSCGADHRdshgsrsrrrrerehgtrsn-----	35
DmTRA	mkMDADSSGQHRDrgsrsrrrrereyhgrsse-----	34
DrTRA	mkMDADSSGTEHRDrgsrsrswrerehghrtse-----	34
DvTRA	--MDADSSSRSPRdt-----	13

Ex1/Ex2

CcTRA	ivvnpdvvvsvvgahfetgpkdrsnnskeevenqwrkerhkstdssspfrkhhssnks	120
DhTRA	-----	13
DeTRA	-----	35
DmTRA	-----	34
DsTRA	-----	34
DvTRA	-----	34
DvTRA	-----	1

CcTRA	ehsnagnnitrhrtkthhpsqenlntaskrdrssppt	NNRHRTPEKVPIFYDEIREEDRI	180
DhTRA	-----	RTPCARPKVKVPIFADEGHERDRV	36
DeTRA	-----	RDGKKKEHKVPIFYADEVREODRV	58
DmTRA	-----	RDSRKKEHKIPIFYADEVREODRL	57
DsTRA	-----	RDSRKKEHKIPIFYADEVREODRI	57
DvTRA	-----	RRRSROREKMPYFADEVREDRV	36

CcTRA	RRkygkrstkpsppvmaskfRRRRS	Sysrsis-----	RSRS	SHSparsknrthvygsl	232
DhTRA	RRNl-----	RHRKTSitrpttahrgrpm	RARS	RSysaernccqrrrrs	78
DeTRA	R-----	-----	RLAK	RSprst-----	69
DmTRA	RRl-----	RQRAHqstr-----	RTSR	RS-----	75
DsTRA	RSI-----	RQRAHqstr-----	RTSR	RS-----	75
DvTRA	RRlplklkttgkrtptpo-----	RERRS	cherp-----	RSRS	RTSpsqsrccqrrlr
					83

CcTRA	srsssvdryigggkrkrrenlrterdrdgqyrhgh	RSSEQERSRRGRSPRARTSRTR	292
DhTRA	rscerrhcd-----	TRHKLTTATVTQRRRRSRSR	110
DeTRA	-----	RRSASRSQSSDRHHHSRSNN	92
DnTRA	-----	RSQSSIRSRHHRRHQRSSRNN	98
DpTRA	-----	RSQSSDRGRSRRHHHQRSSRNN	98
DvTRA	svvrhrs-----	SRQKTYSSSCSRRRHRSRSR	114

CcTRA	SRERSKHVrarnrderknlnhgndeltnaelnqrnltp	QIIITIPVFPVPAADFLnyaystw	352
DhTRA	SRSRT	PRITVVPVFPVPAADYpyayawp	137
DeTRA	SRSSRSERrrrqrsprrynpp-----	PKIINYILQVPQDE-----	128
DmTRA	SRSSRSERkrrrqrssrsserrrrrqrsprrynpp-----	PKIINYVQVPQDE-----	147
DsTRA	SRSSRSERrrrqrsprrynpp-----	PKIINYVQVPQDE-----	134
DyTRA	GRSRT	PRITVVPVFPVPAEYsyayawp	141

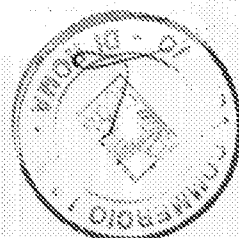
Ex2 ↑ Ex3

CcTRA	ptgtqwhshpmtppprygapayhmptilpatvmpmrpalpp	YGLPPOFMyqgrgl---	408
DhTRA	ppppaqpfqnpmygavp	YGMPSRFVypahpyfapyp	172
DeTRA	-----	YGMSGMQQrfgygrl---	143
DmTRA	-----	YGMSGMQQsfgygrl---	162
DsTRA	-----	YGMPSGMRQsfgygrl---	149
DvTRA	pprphfnpmaygalp	FGMQPRFLnpyfqayar---	172

Ex2 // Ex3

CcTRA	--RFFQQHGPRPWRPNFRpkthk-----	429
DsTRA	rpRLTFFPYRAPFFRPSPR-----FSYRNQRPAPN	201
DeTRA	--PHPPPPPPAPYRFRQRppflgaprFGYRNAWRPPy	178
DmTRA	--PRPPPPPPAPYRYRQRppfigvprFGYRNAGRPPy	197
DsTRA	--PRPPPPPPAPFYRYRQRppimgaprFGYRNAGRPPy	184
DvTRA	--PPFFRYRAGPFRPSPR-----YSYRNDRQAPN	199

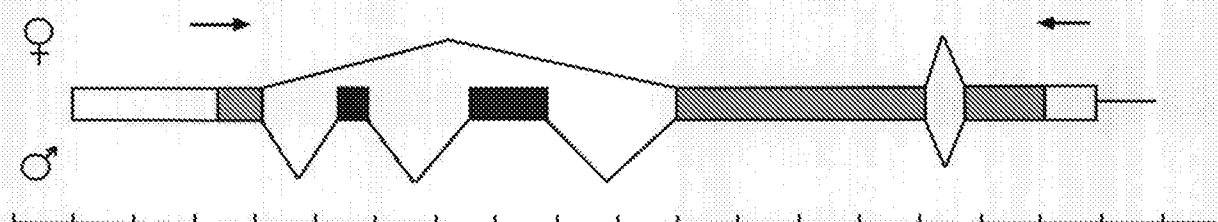
Feb. 2



200 bp

RM2001 A 000120

A



B

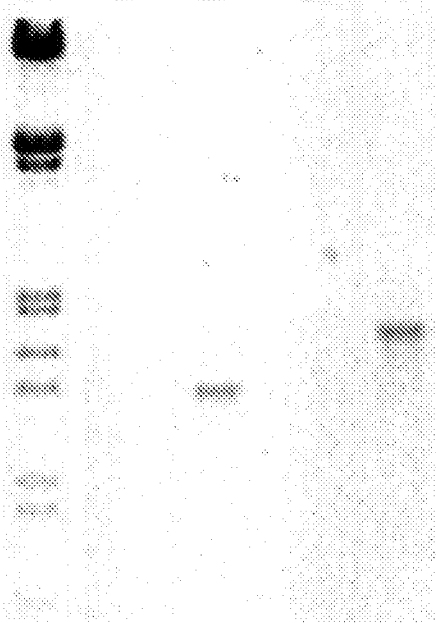
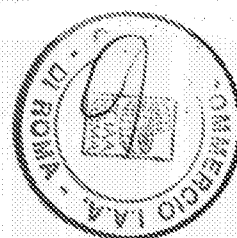
 λ 1 2 3 4

Fig. 4



RIPZUT A 000120

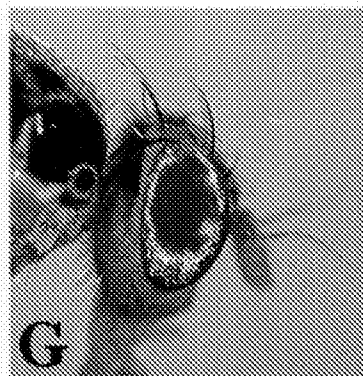
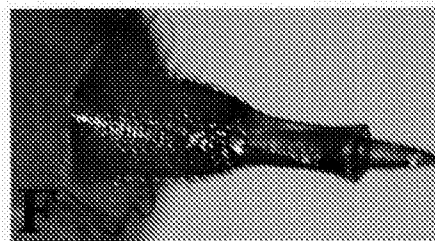
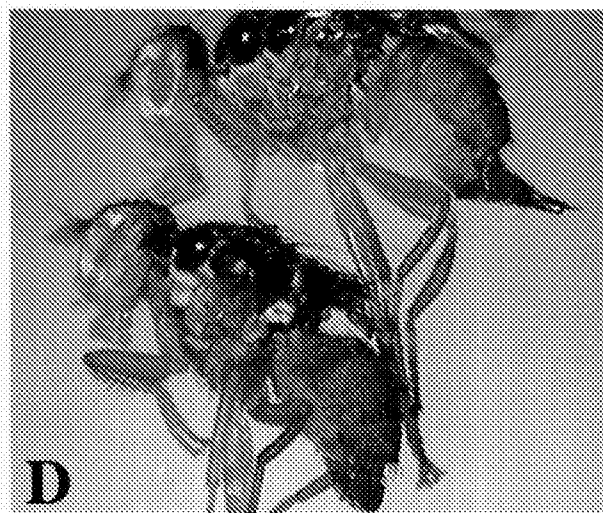
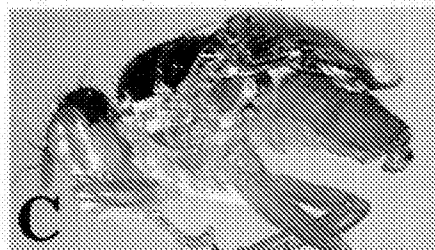
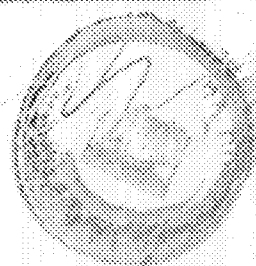


Fig. 5



RM 2001 A 000120

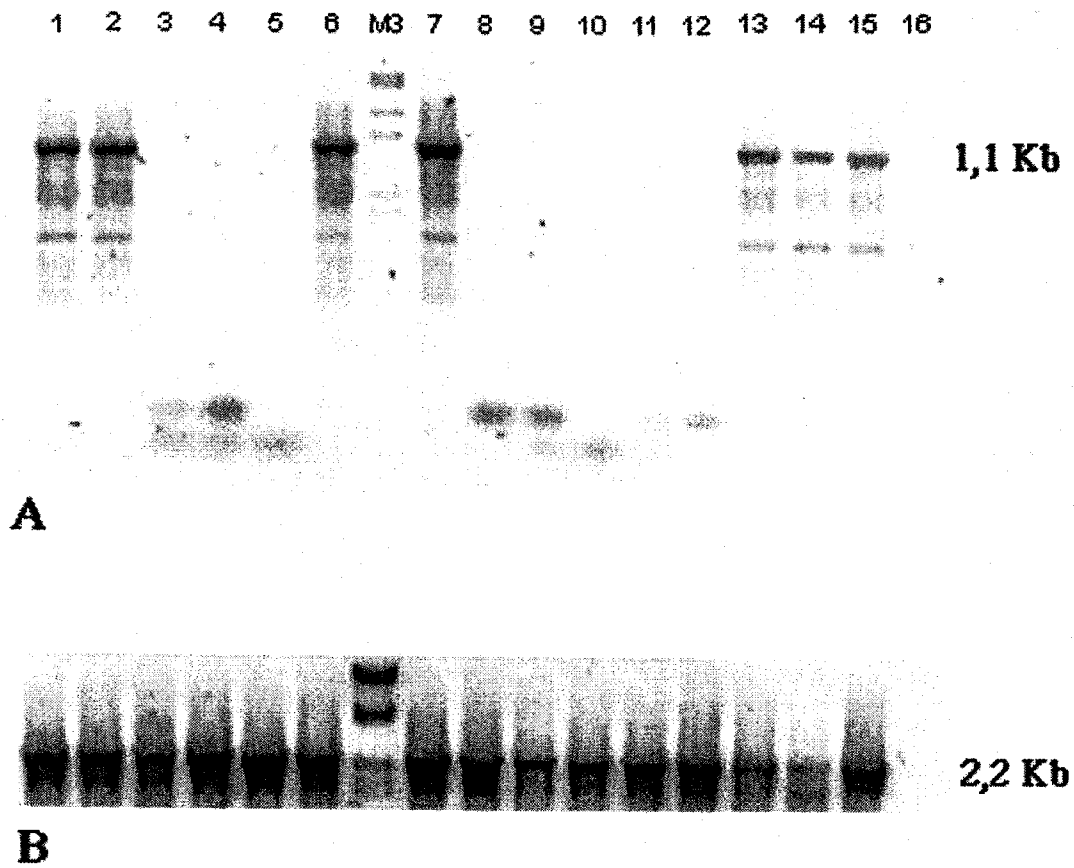


Fig. 6

