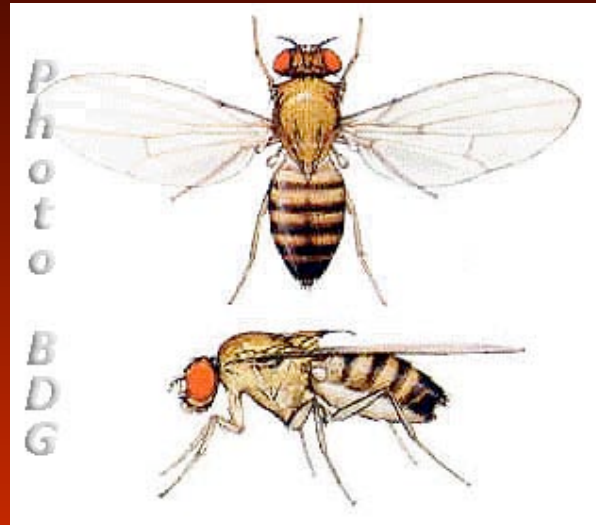


Transgenesi in *Drosophila*

Testi di riferimento:

- Watson J.D., Gilman M. Witkowski J. and Zoller M. "DNA ricombinante": estratti dei Capitoli 10 e 20
- Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W. Et al. "Biologia molecolare del gene" : estratti dei Capitoli 20 e 22

Drosophila melanogaster



Moscerino della frutta (lunghezza 3mm), viene utilizzato da circa 100 anni come sistema modello per la genetica e la biologia dello sviluppo.

Ha consentito il conferimento del premio Nobel in medicina e fisiologia a **Ed Lewis, Christiane Nusslein-Volhard** ed **Eric Wieschaus** nel 1995.

Perché lavorare con la *Drosophila*?

- Animale molto piccolo, con un breve ciclo vitale è semplice ed economico da mantenere in laboratorio in elevato numero di esemplari
- Ne è stato interamente sequenziato il genoma
- Ne esistono mutanti in quasi tutti i geni espressi

Ciclo vitale di *Drosophila*

- La cellula uovo è lunga 0.5 mm;
 - L'embrione si sviluppa in larva in 24 ore circa dalla fecondazione;
 - La larva si trasforma in pupa, attraverso 3 stadi, in circa 2 giorni;
 - Dal completo rimodellamento della pupa si genera la forma adulta in 4 giorni;
 - Il moscerino diventa fertile dopo ulteriori 24 ore.
- Estrema semplicità e velocità di manipolazione!

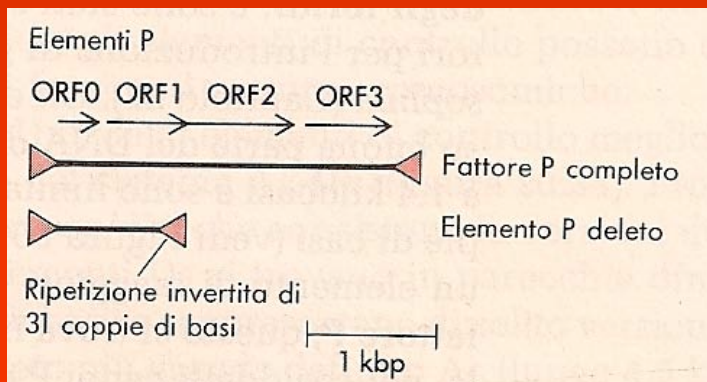
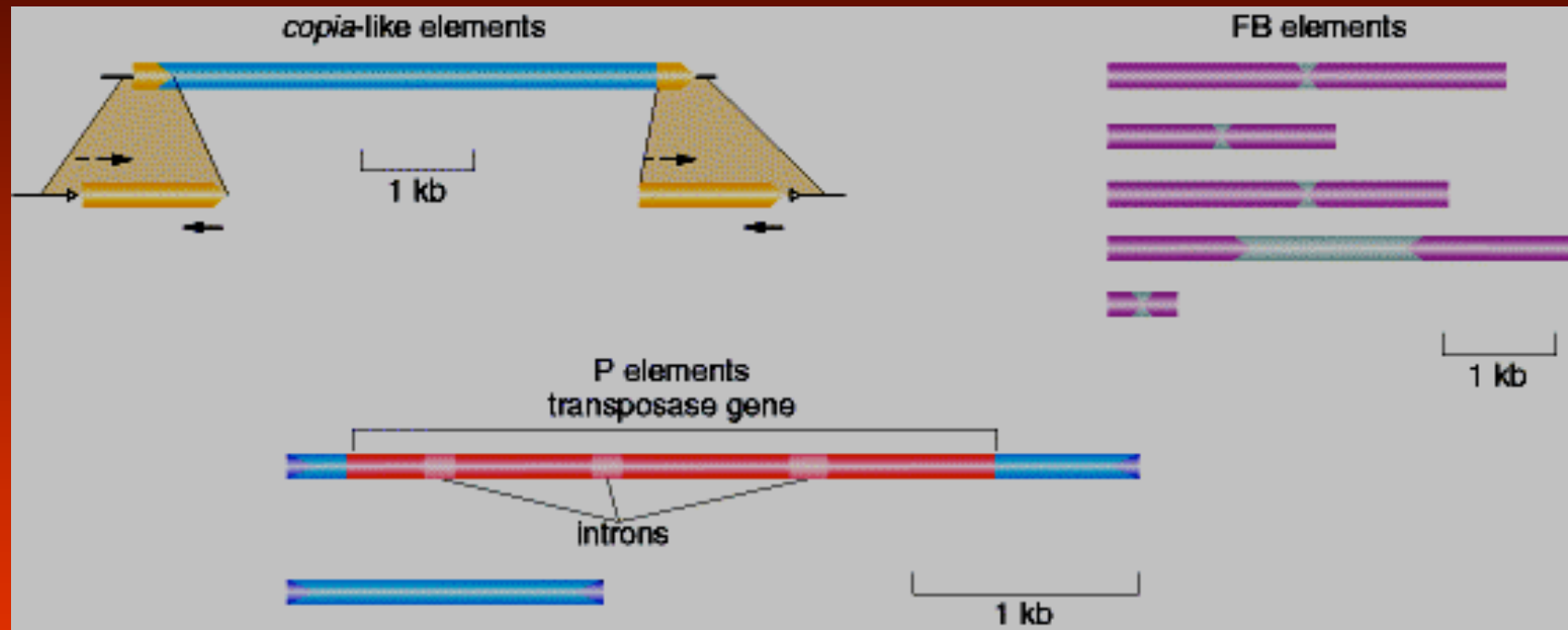
Genoma di Drosophila

4 paia di cromosomi

14000 geni

165 milioni di basi

Gli elementi trasponibili in *Drosophila*



La trasposasi ed il meccanismo di trasposizione

La trasposasi è una proteina di legame al DNA di 87 KDa che riconosce il sito interno sull'elemento P adiacente alle 31 bp ripetute invertite (IR) consentendo la trasposizione delle sequenze incluse tra queste

REGOLAZIONE DELLA TRASPOSIZIONE DELL'ELEMENTO P

Due tipi di regolazione:

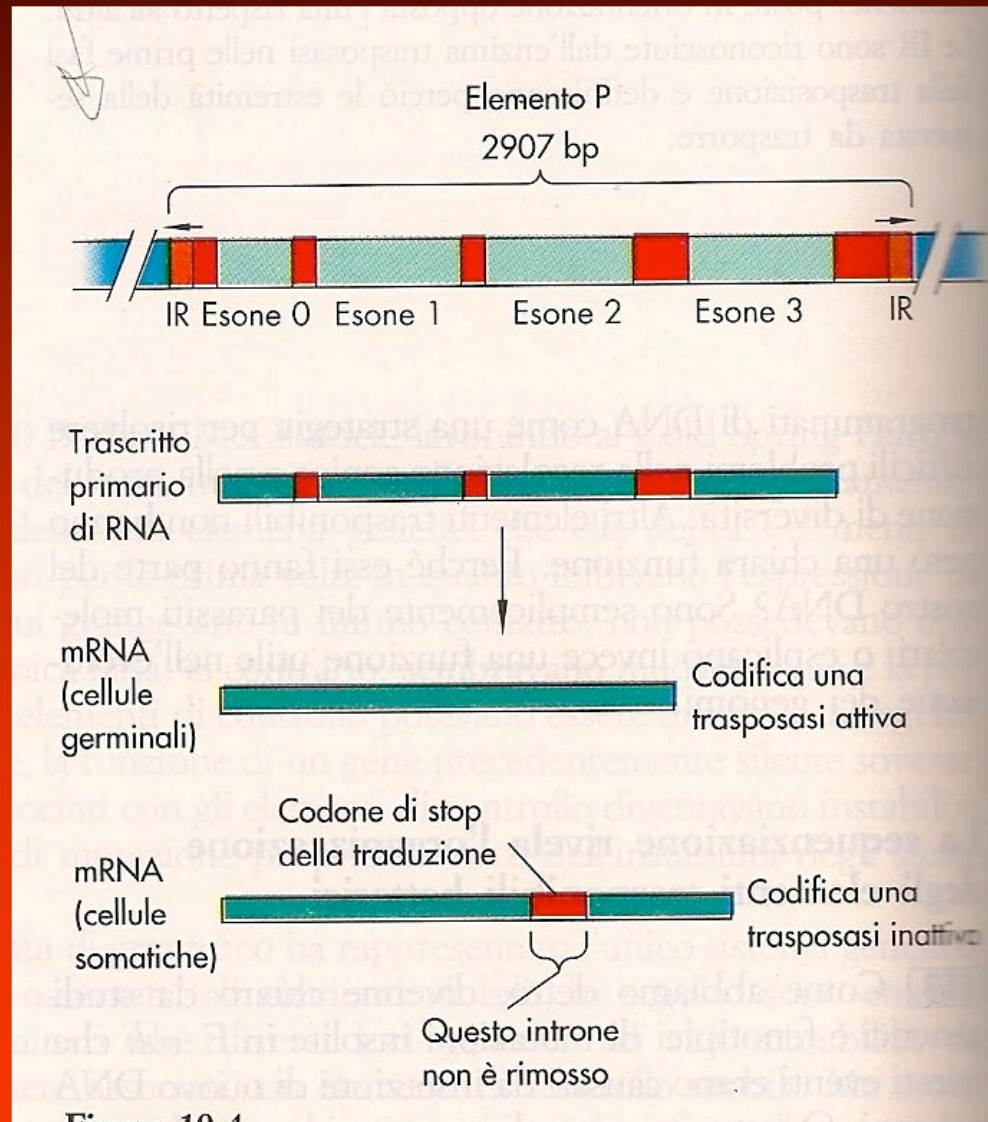
a) genetica :

ceppi P (portatori di fattori P) e ceppi M (privi di fattori P)

b) tessuto-specifica :

la trasposizione può avvenire soltanto nella linea germinale

Regolazione tessuto-specifica



Regolazione genetica: disgenesi degli ibridi

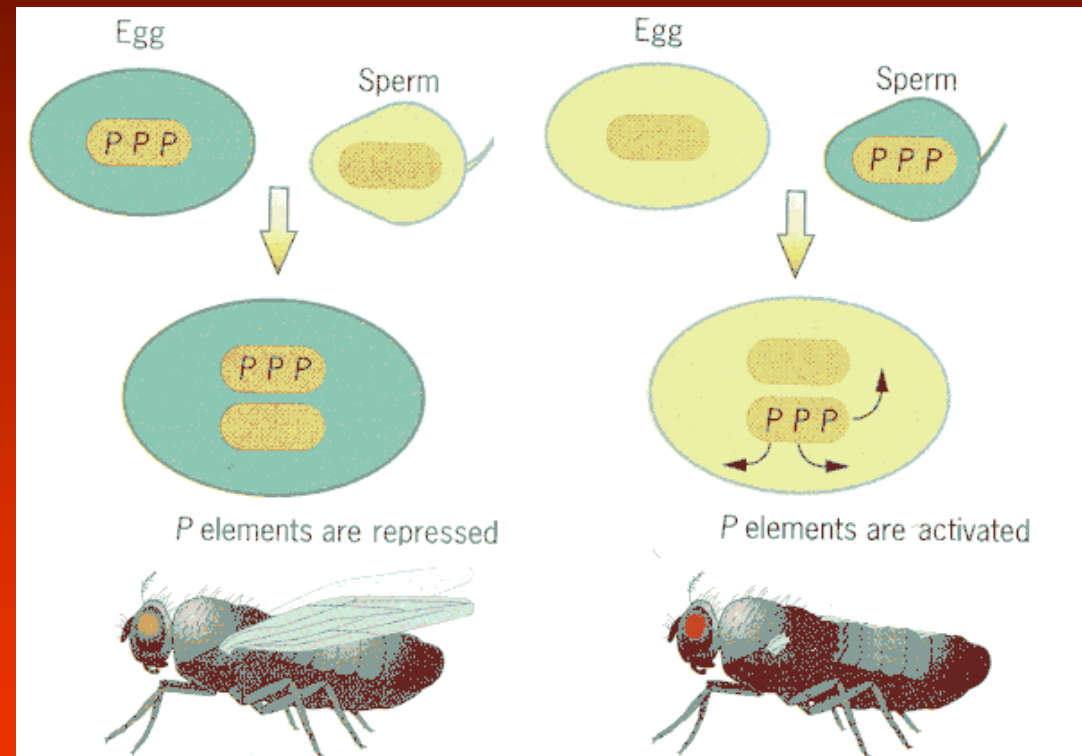
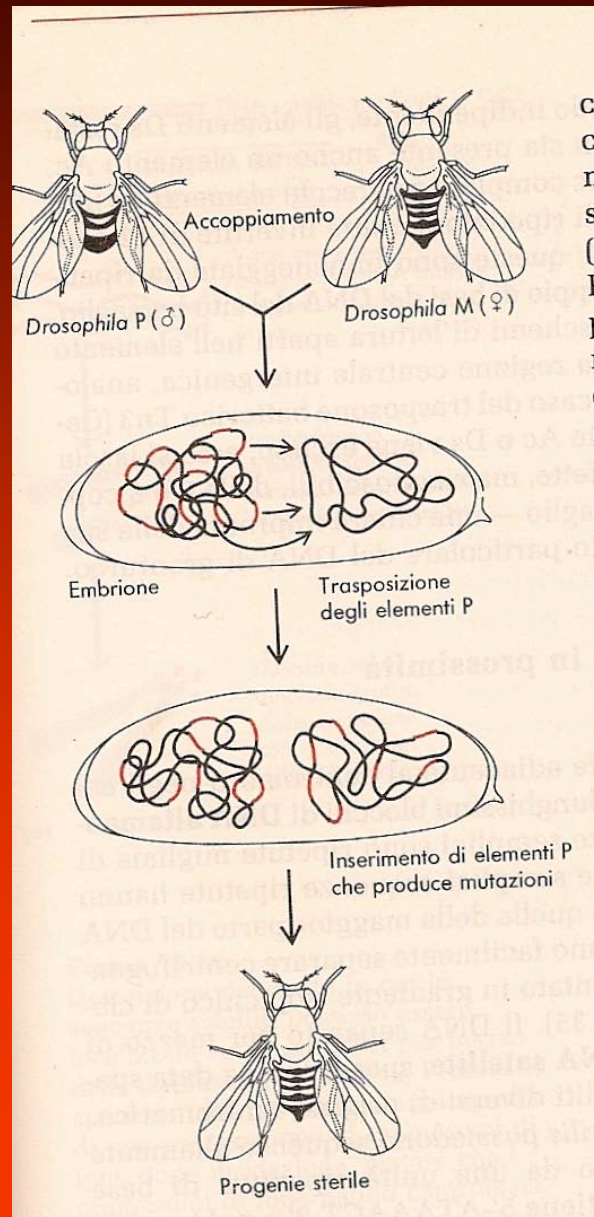
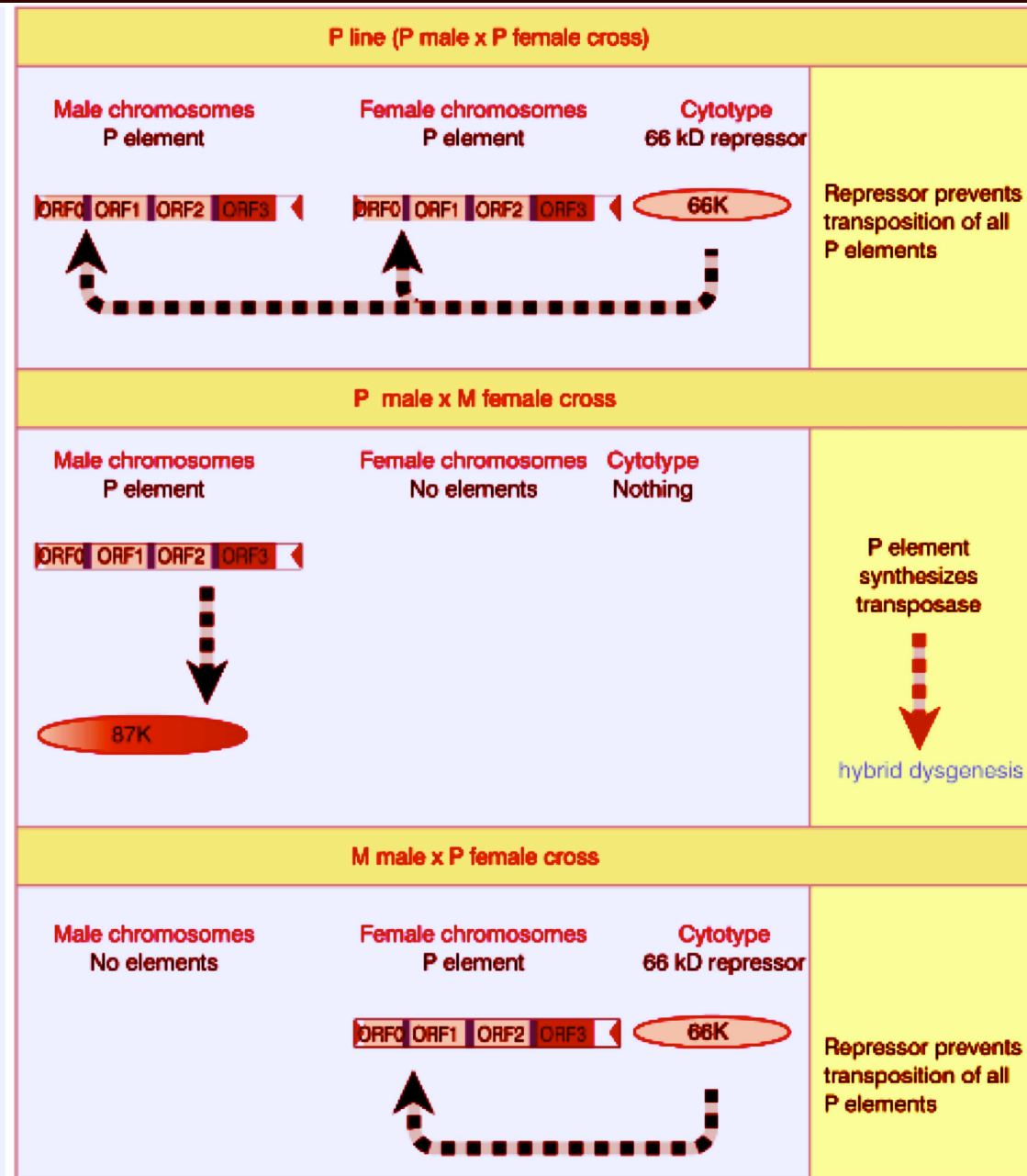


Figure 15.27 Hybrid dysgenesis is determined by the interactions between P elements in the genome and 66 kD repressor in the cytotype.



Dal momento che la trasposizione avviene nella linea germinale, la variabilità genetica che ne consegue si osserva solamente da una generazione all'altra, mentre la stabilità genomica del singolo individuo viene assicurata

Altre informazioni sull'elemento P

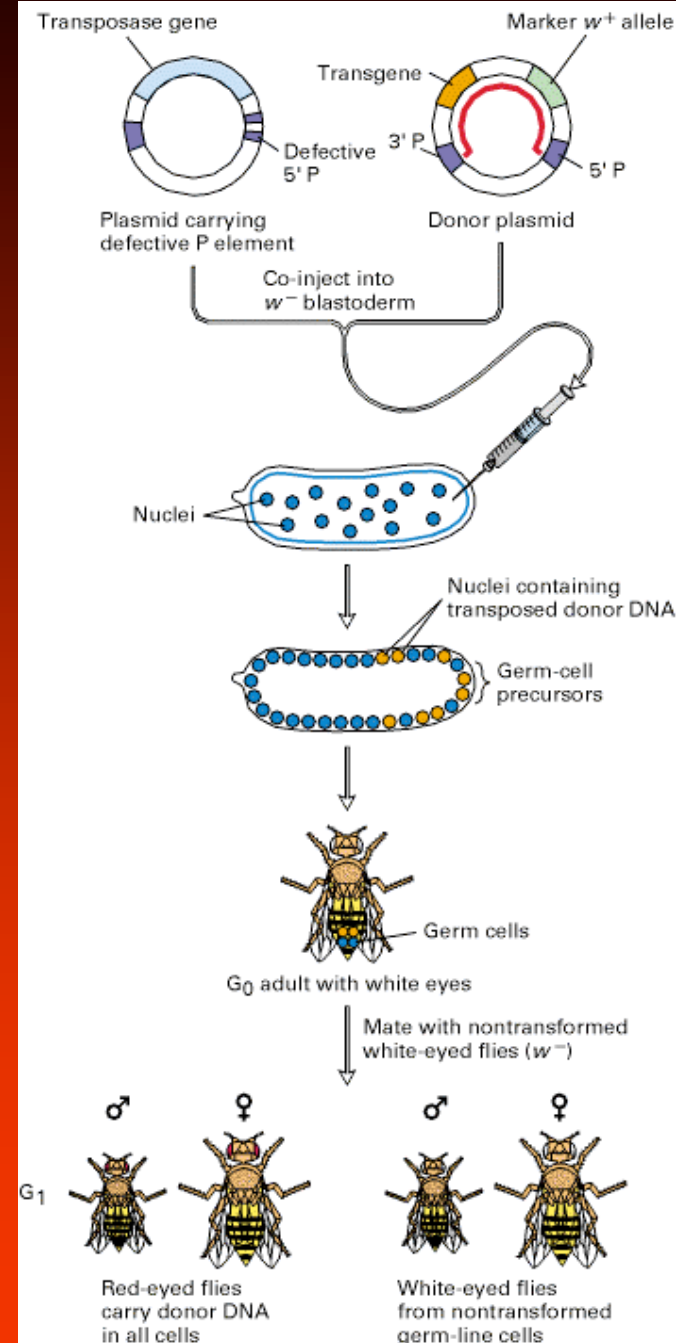
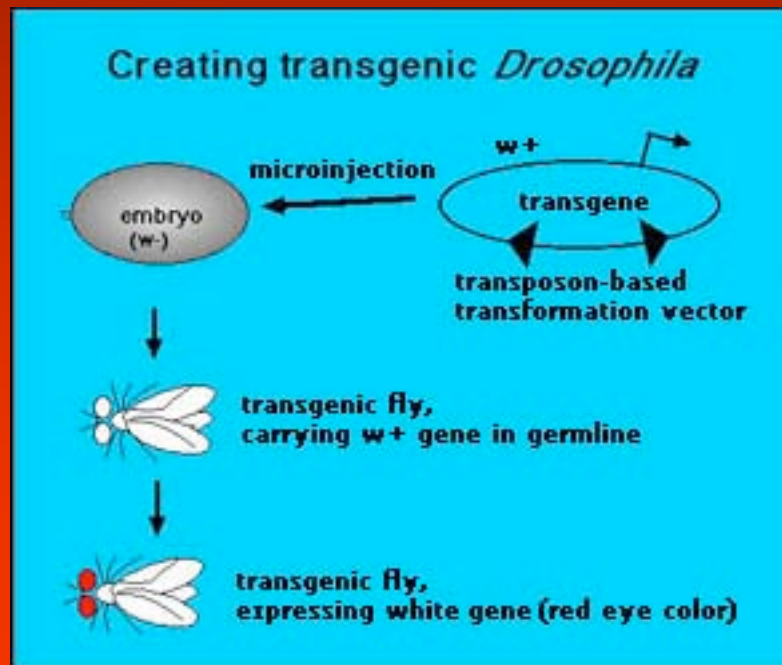
L'elemento P si inserisce casualmente nel genoma con una forte preferenza per l'eucromatina e le regioni 5' e 3' UTR dei geni.

Tende ad inserirsi nelle vicinanze di altri elementi P ed ha una leggera preferenza per per sequenze target GGCCAGAC.

Quando gli elementi P vengono iniettati in un embrione di ceppo M in presenza di trasposasi, salteranno dal DNA iniettato in loci cromosomici, portando qualsiasi altra sequenza che è stata inserita nella porzione interna dell'elemento.

Elemento P come vettore per il trasferimento genico

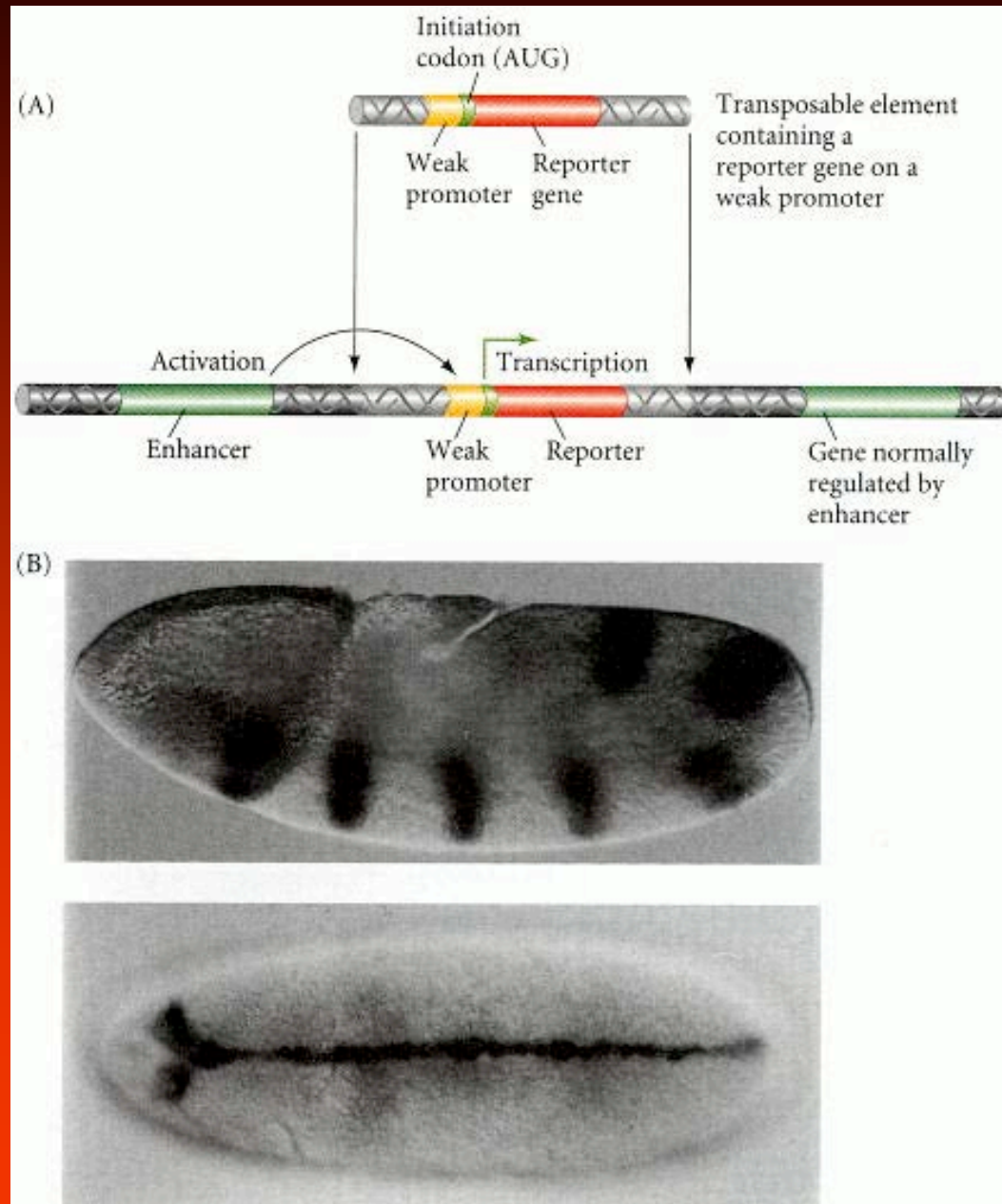
Spradling and Rubin (Science 1982) hanno sviluppato un sistema per l'integrazione delle sequenze clonate nell'elemento P nei cromosomi della linea germinale



L'USO DELL' ELEMENTO TRASPONIBILE P

1. "ENHANCER TRAP"
2. MUTANTI CON PERDITA e/o AUMENTO DELLA FUNZIONE GENICA
3. STUDIO DI PROMOTORI
4. PROGETTO GENOMA

Tecnica dell' Enhancer-trap



1) LINEE "ENHANCER TRAP"

- a) Banche di drosophila con pattern espressione, collezione di oltre 4000 ceppi
- b) Con incroci specifici si possono studiare vari pattern di espressione

P(LacZ) enhancer-trap

La tecnologia dell'elemento P modificato ha permesso lo sviluppo di elementi enhancer-trap.

Un enhancer trap contiene un promotore minimo, insufficiente di per sé, per indurre la trascrizione. Se, dopo la trasposizione si inserisce in una regione sotto l'influenza di un enhancer genomico, la sequenza inserita dovrebbe essere trascritta in maniera che riflette l'attività dell'enhancer.

Con l'enhancer trap P(LacZ) che codifica per il gene batterico della beta galattosidasi, l'attività di enhancer veniva poi localizzata tramite tecniche di immunoistochimica oppure semplicemente utilizzando il substrato cromogenico per il beta gal, X-gal.

Questa prima generazione di enhancer avevano alcune limitazioni. Da qui si è andati verso la seconda generazione di enhancer trap: P(GAL4).

Flytrap

Uno dei goals scientifici più ambiziosi di questo secolo è riuscire a correlare la struttura alla funzione del cervello.

Grazie alla sua piccola dimensione, contrapposta alla complessità di comportamento, il cervello della *Drosophila* è largamente accettato come un modello importante per studiarne la funzione.

In *Drosophila*, lo sviluppo del sistema enhancer-trap P(GAL4) ha permesso di sviluppare tali studi.

Stock: P0153

Allele, synonym(s): MA036 - 69.66.7

Genotype: y w P-lacW

Chromosome: X

Insertion: 004A

Viability: hemizygous viable homozygous viable

Expression pattern:

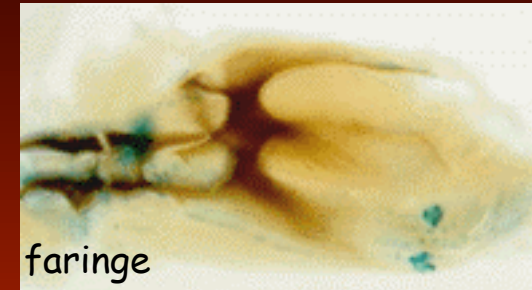
Pattern in embryo: anus?, border between midgut and hindgut, CNS (pattern), gnathal segments (pattern), larval brain hemisphere (pattern), Malpighian tubules, PNS? (single cells), posterior midgut

Pattern in 3rd instar larva: CNS: VNC (ventral nerve cord, diffuse, weak), larval brain hemisphere (diffuse, weak), pharynx (pattern, weak), proventriculus (pattern)

Reference(s):

To order stock send e-mail to: janning@nwz.uni-muenster.de

[Images of stock P0153](#)



faringe



Emisfero cerebrale, Sistema nervoso



Tubuli malpighi



CNS



Proventricolo

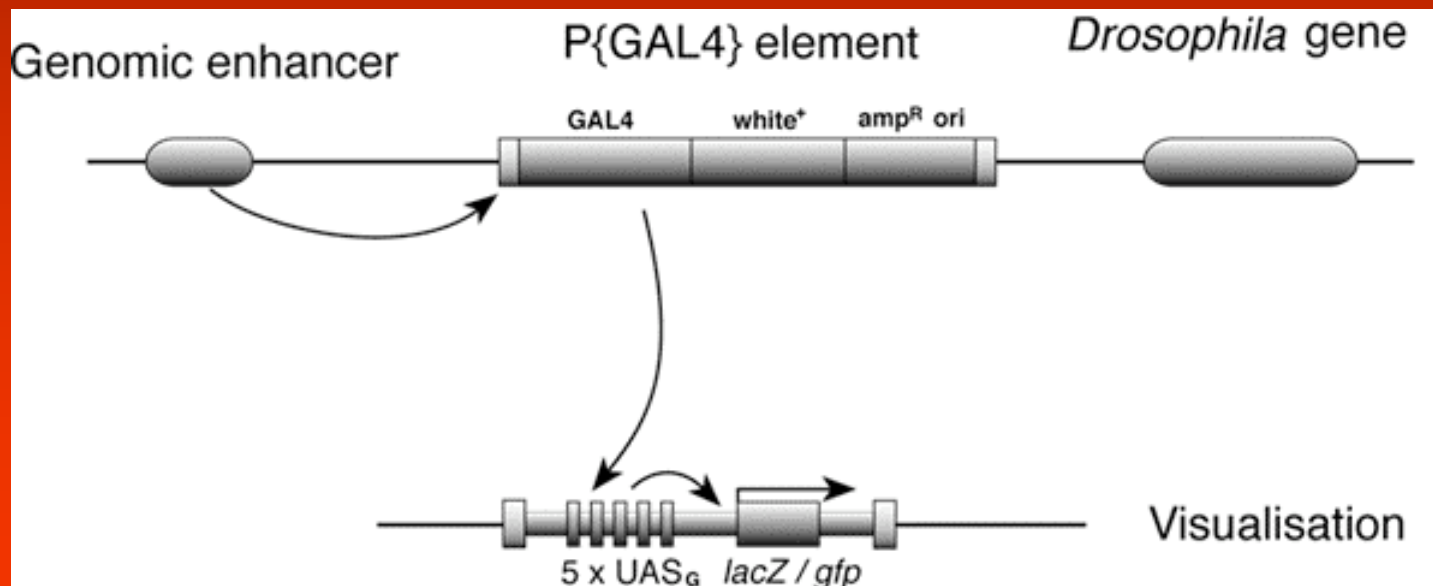


Emisferi cerebrali larvali
CNS

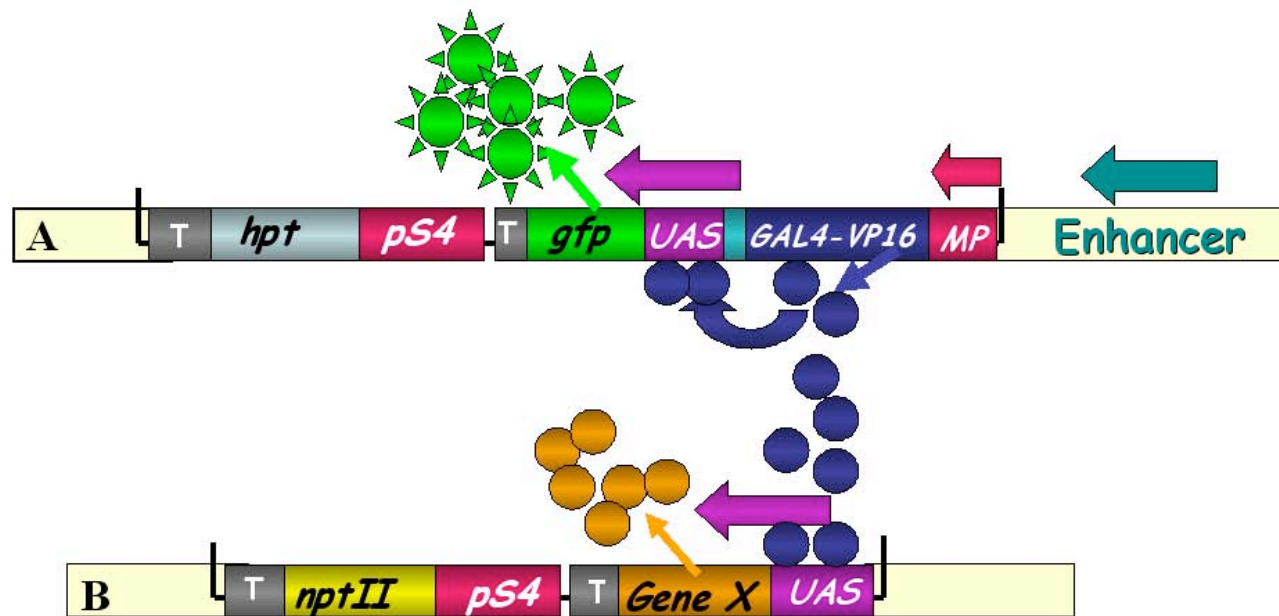
P(GAL4)

Piuttosto che visualizzare direttamente il reporter, viene espresso un fattore trascrizionale di lievito che è funzionale anche in *Drosophila*.

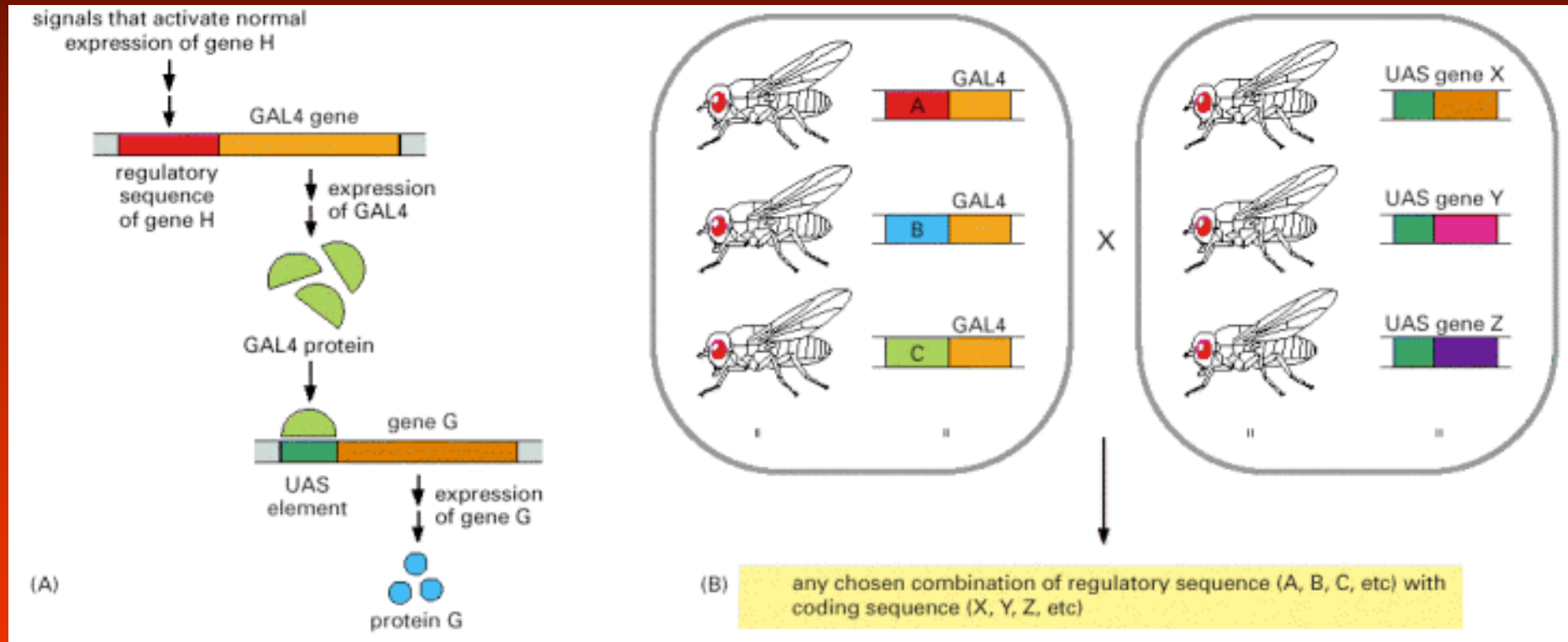
GAL4 può essere utilizzato per attivare l'espressione di qualsiasi gene reporter posto a valle del segnale UASG.



Gal4-UAS-GFP Enhancer Trapping system



P(GAL4)



Gene expression systems in Drosophila

Gene expression System	Inducer	Basis for operation	Control in time?	Control in space?	Reversible expression?
Heat-shock promoter (hsp)	Heat shock	Heat-inducible promoter	Yes	No	Yes
Defined promoter	–	Defined promoter	Yes, as selected for	Yes, as selected for	No
GAL4–UAS	–	Yeast transcription factor GAL4 and binding sites (UAS)	No	Yes, as selected for	No
hsp-FLP–FRT	Heat shock	Heat shock inducible yeast flipase recombinase and its genomic target sites (FRT) to excise transcription termination cassette	Yes	Incomplete	No
GAL4–UAS-hsp FLP	Heat shock	Yeast transcription factor GAL4 and binding sites (UAS) combined with heat shock inducible flipase	Yes	Incomplete	No
Tet-ON or Tet-OFF	Doxycycline	Doxycycline responsive transcription factor and genomic binding sites (Tet operator)	Yes	Yes	Yes
Ligand inducible GAL4 chimeras	RU486 DESE Estradiol Heat shock	GAL4 DNA binding domain combined with heterologous activation domain and ligand binding domain Heat sensitive repressor of GAL4 (GAL80 ^{ts})	Yes Yes	Yes Yes	Yes Yes

2)MUTANTI CON PERDITA e/o AUMENTO DELLA FUNZIONE GENICA

Una strategia utilizzata per modulare l'espressione genica fa uso di promotori

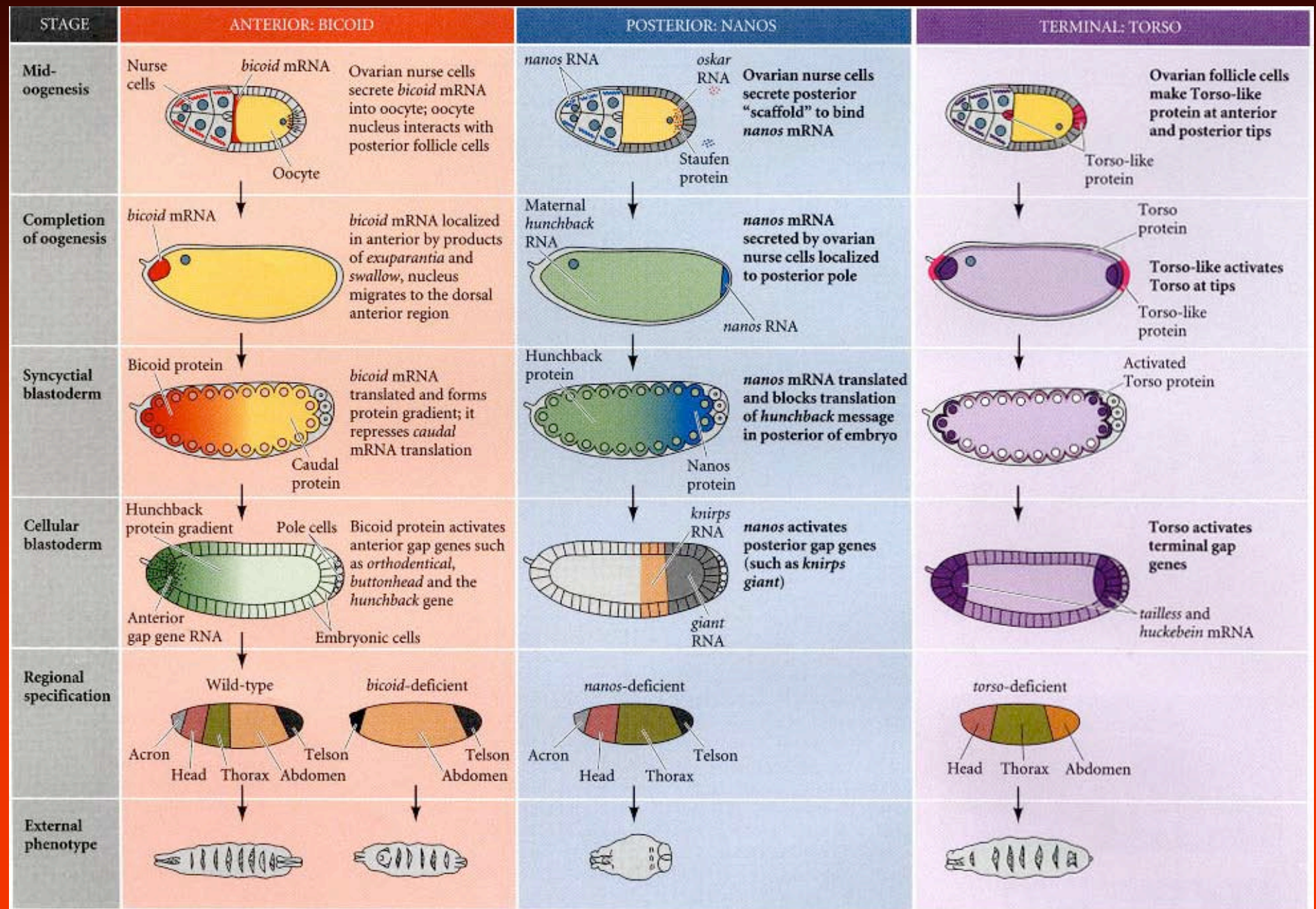
"heat shock" (P-hsp70-cDNA-hsp)

hsp-70 è attivo in 15min a 37°C. Ne consegue un'espressione ectopica del costrutto

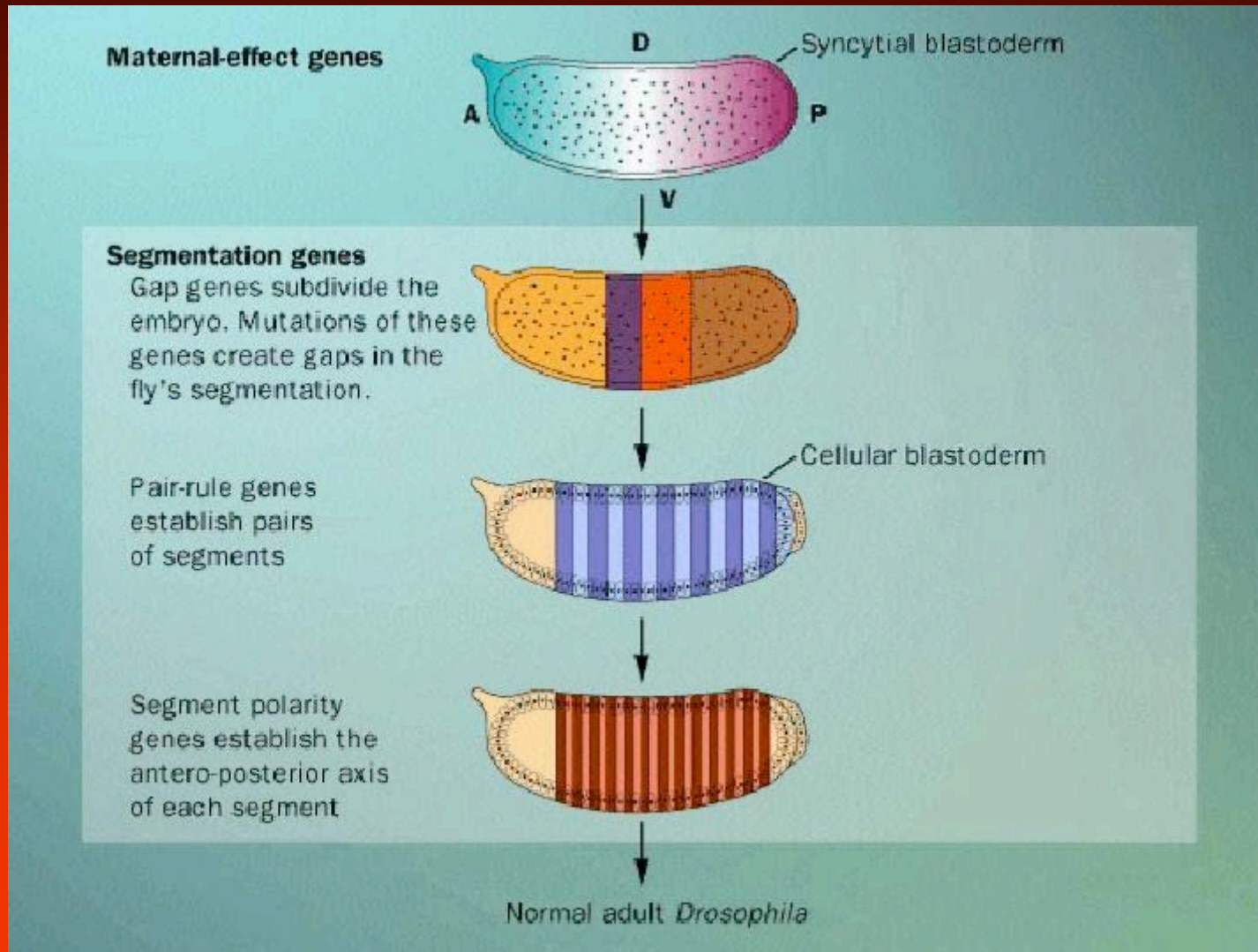
per:

- a)Inattivazione parziale o totale del gene con perdita della funzione (mRNA antisenso)
- b)Aumento del dosaggio genico (mRNA senso)
- c)Complementazione di un fenotipo mutante

Formazione dell'asse antero-posteriore di *Drosophila*

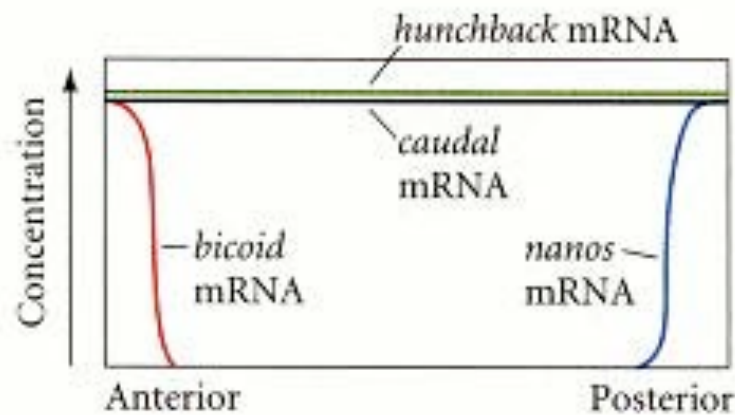


SVILUPPO DELL'ASSE ANTERO-POSTERIORE

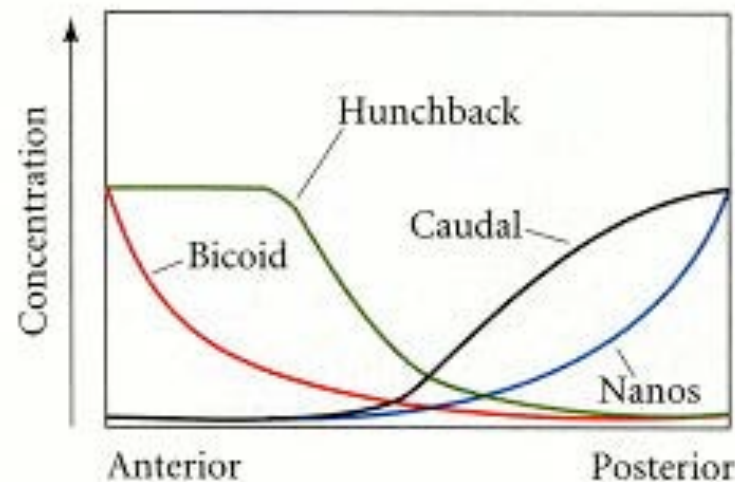


Effetti dei geni materni nella generazione dell'asse antero-posteriore

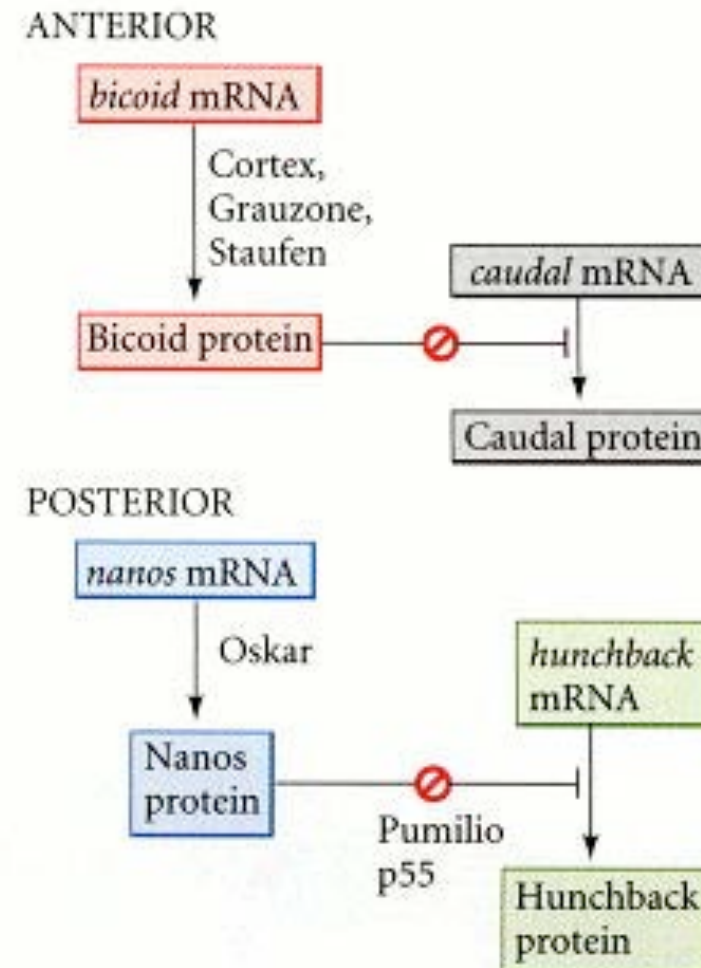
(A) Oocyte mRNAs



(B) Early cleavage embryo proteins

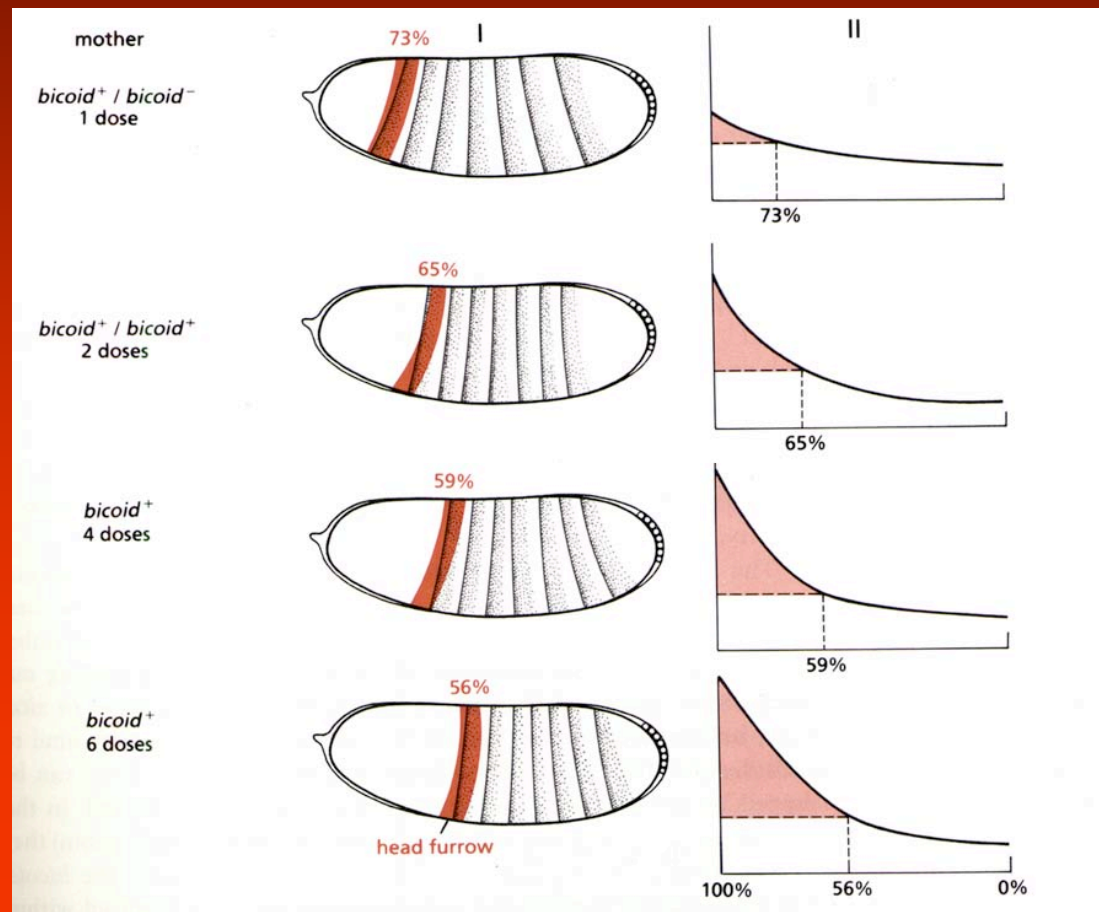


(C)

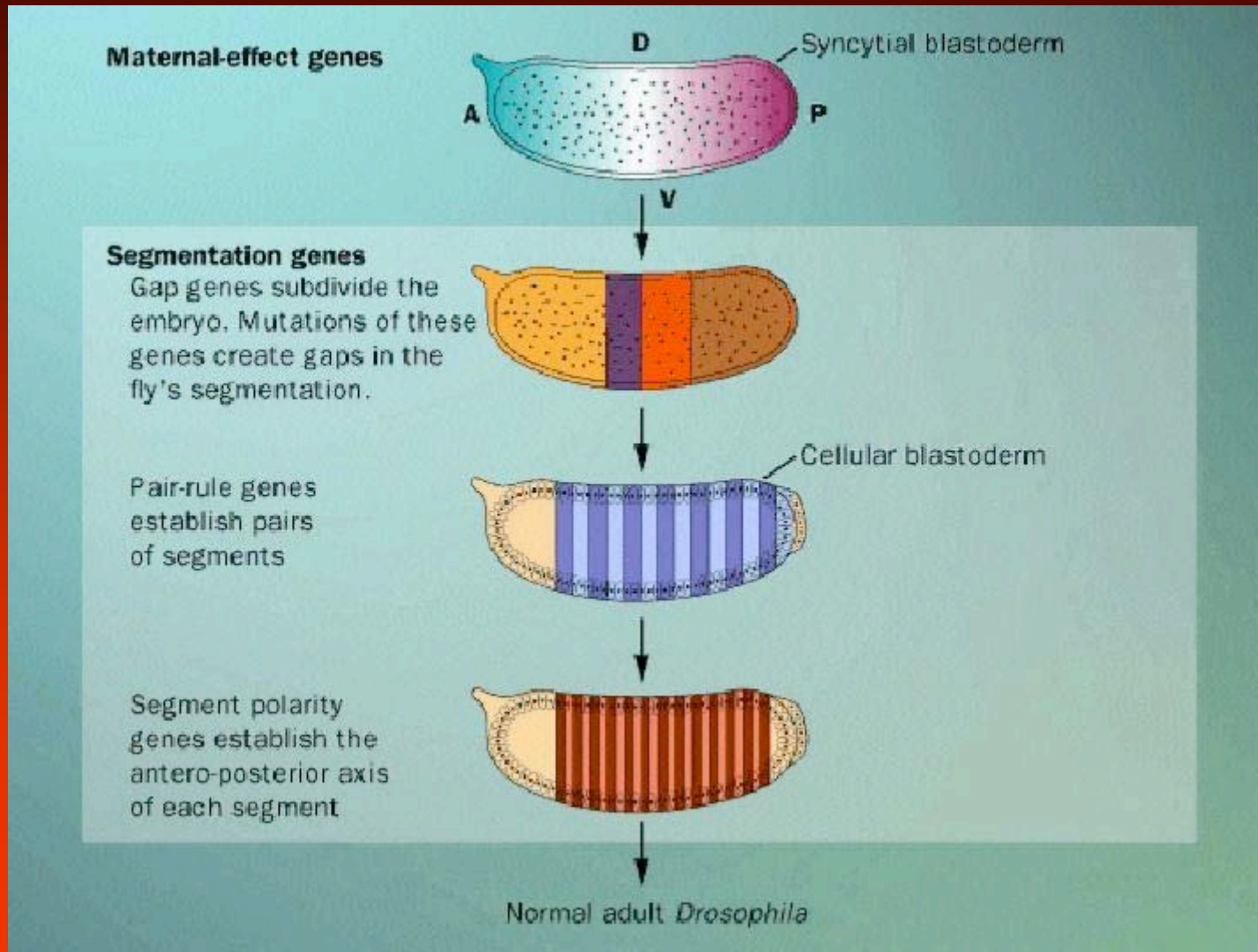


ESPERIMENTI DI DOSAGGIO NEL CITOPLASMA HANNO DIMOSTRATO IL RUOLO DI MORFOGENO DI BICOID

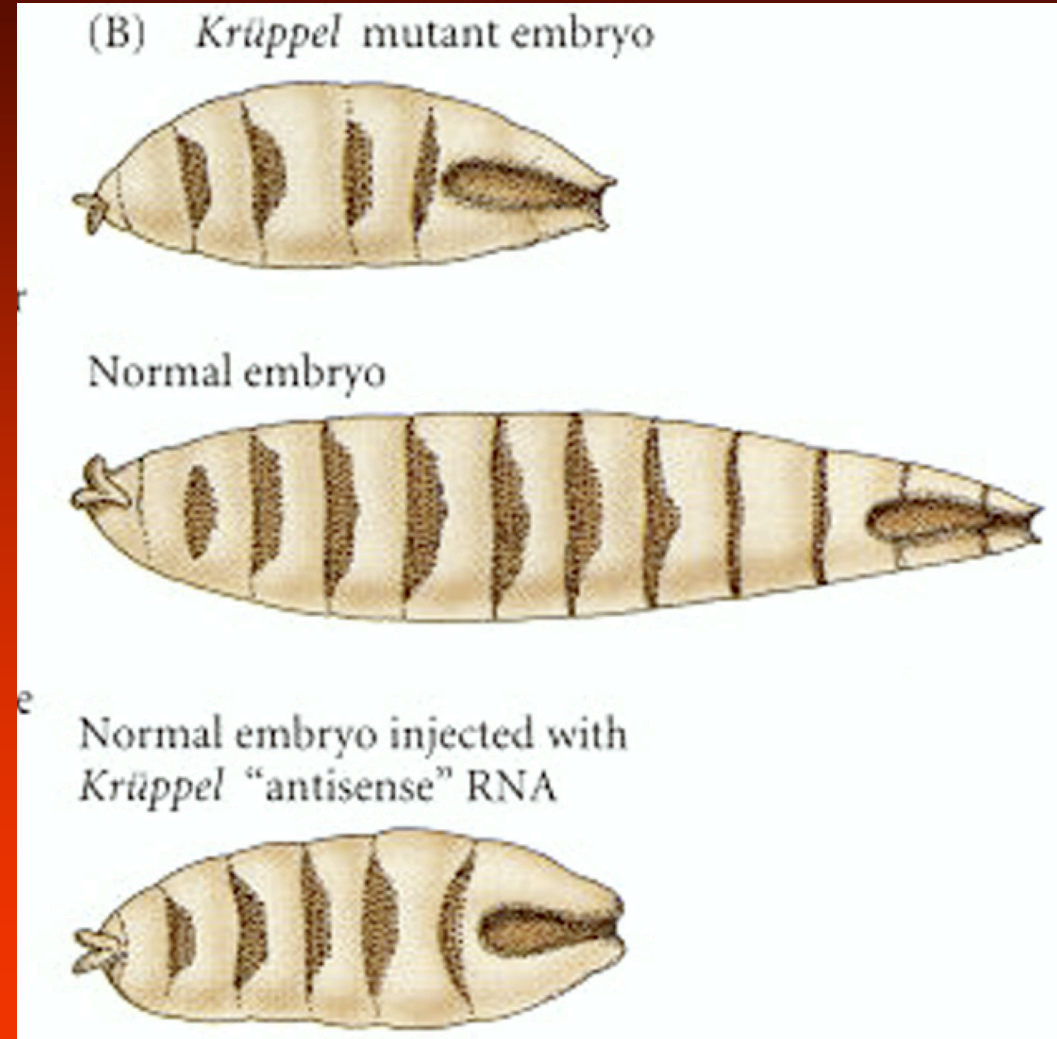
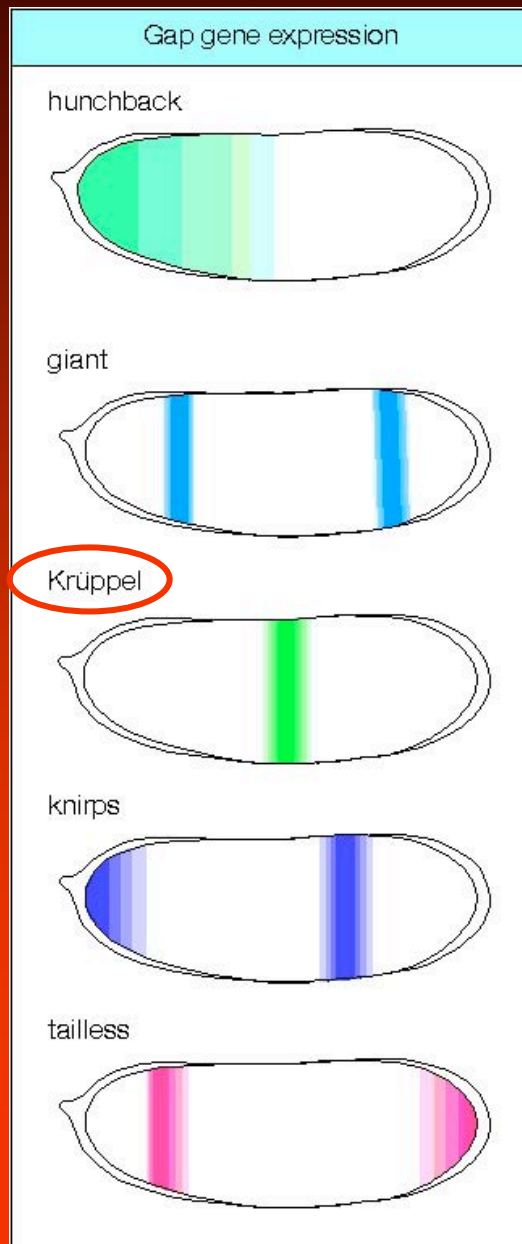
All'aumentare delle dosi di bicoid, l'embrione acquista maggiori strutture anteriori a spese di quelle posteriori.



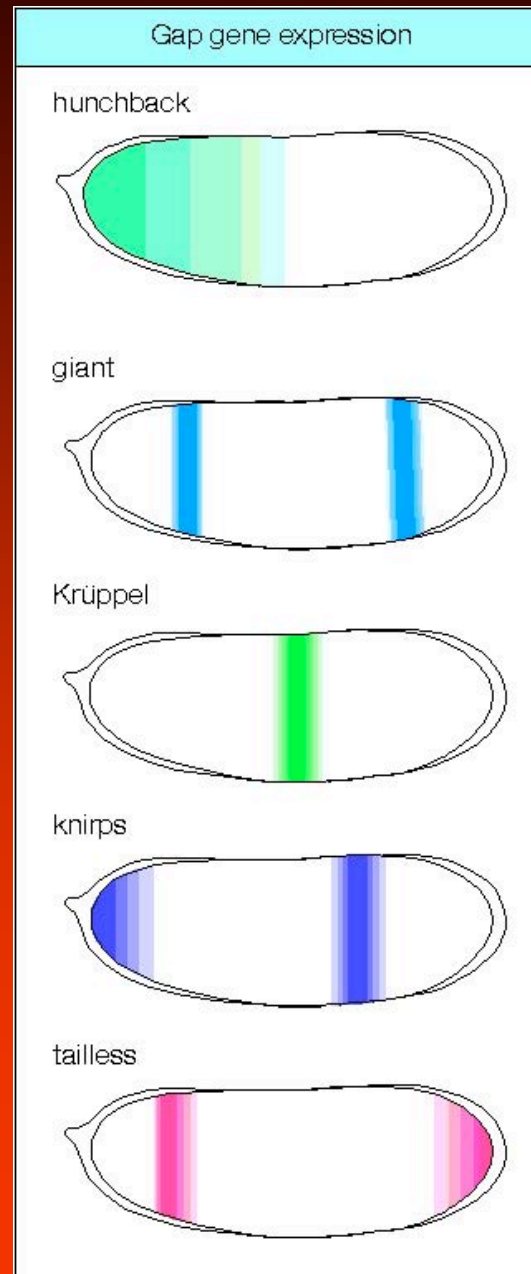
SVILUPPO DELL'ASSE ANTERO-POSTERIORE



Generazione di un fenotipo mutante



GENI GAP

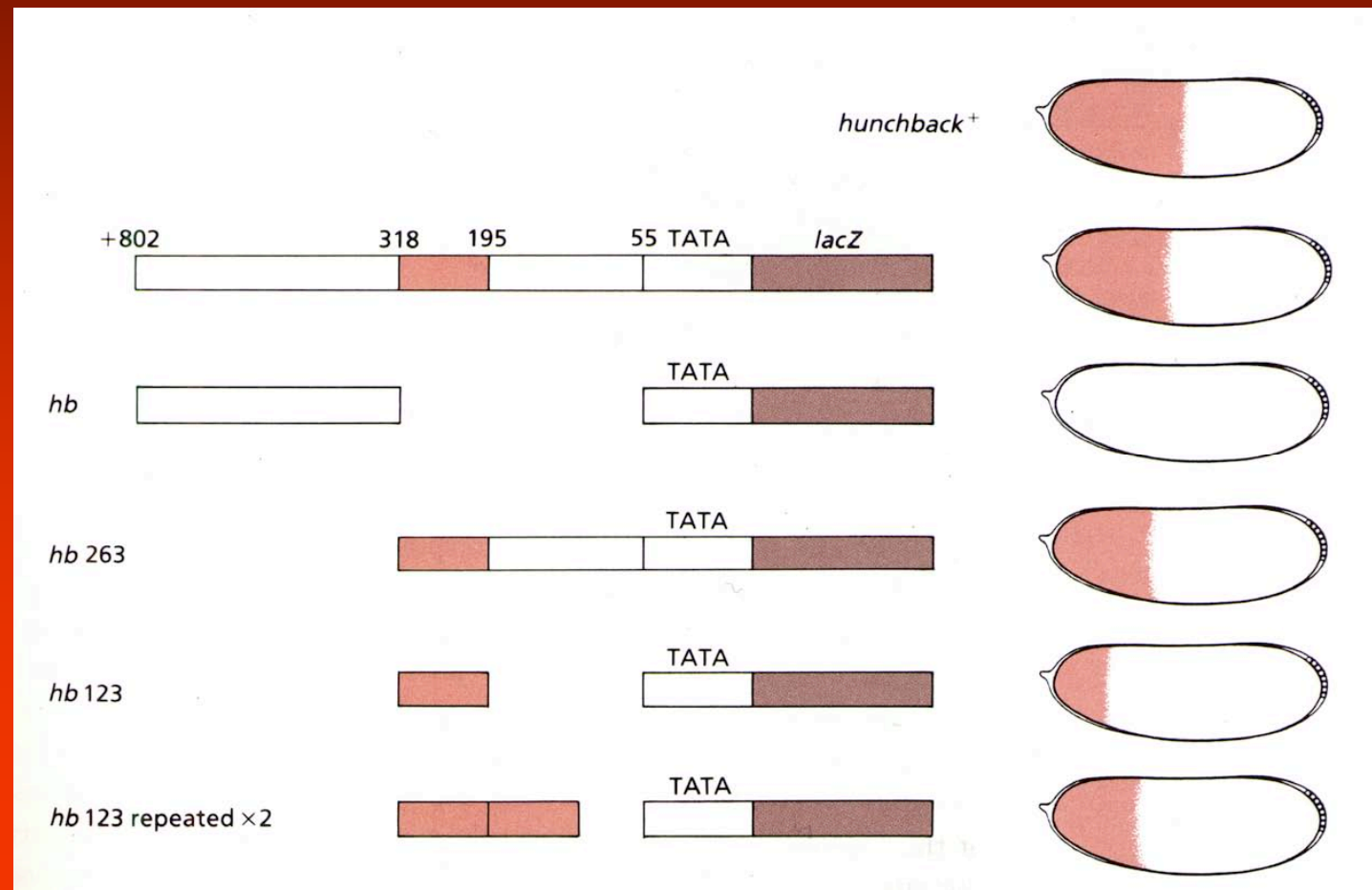
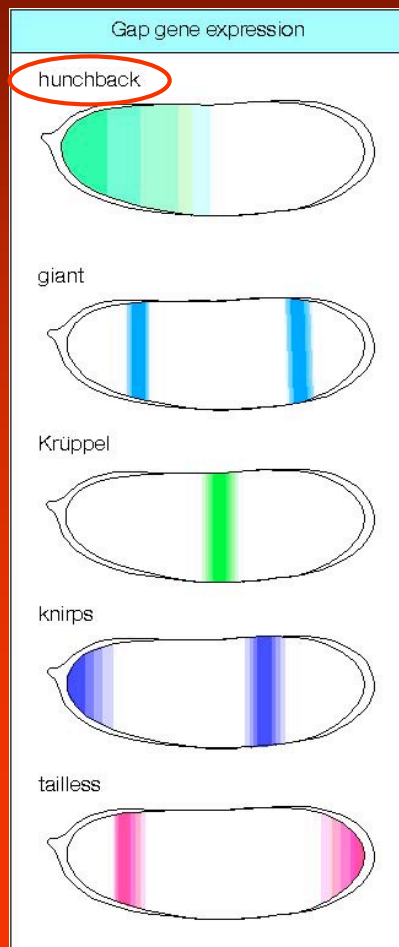


3)STUDIO DI PROMOTORI

E' possibile determinare, tramite delezioni, la regione del promotore di un particolare gene.

CARATTERIZZAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE *hunchback*

La ipotetica regione del promotore (per intero o in parte) viene fusa al gene *lacZ* ed inserita in un trasposone P. Il gene ibrido viene inserito nei moscerini e ne viene saggiata l'attività b-galattosidasi.



4)PROGETTO GENOMA

I "genome projects" che studiano la *Drosophila*

Box 1. *Drosophila* Genome Projects

The Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP)

(<http://fruitfly.berkeley.edu>)

The BDGP is a consortium of the following laboratories: UC Berkeley (Gerald Rubin, Suzanna Lewis, Gregg Helt, Nomi Harris and Sima Misra); Lawrence Berkeley National Labs (Bruce Kimmel, Susan Celniker, Roger Hoskins, Richard Galle, Reed George); and Carnegie Institution of Washington (Allan Spradling). Baylor College of Medicine (Richard Gibbs and David Nelson) is expected to join the BDGP as of 1 December 1998.

The European *Drosophila* Genome Project (EDGP)

(<http://edgp.ebi.ac.uk/>)

The EDGP is a consortium of the following laboratories: Univ. of Dundee (David Glover, Robert Saunders and Peter Deak); EBI, Hinxton (Michael Ashburner and Takis Benos); Univ. of Rennes (Francis Galibert); Univ. of Montpellier (Jacques Demaille, Alain Bucheton and Concepcion Ferraz); Univ. of Madrid (Juan Modolell); Univ. of Heraklion (Christos Louis, Babis Savakis and Inga Siden-Kiamos); Sanger Centre, Hinxton (Bart Barrell and David Harris); EMBL, Heidelberg (Fotis Kafatos) and Univ. of Goettingen (Herbert Jaekle and Ulrich Schaefer).

Mutagenesi inserzionale:

chiamato anche "gene-disruption projects" è una tecnica basata sulla mutagenesi dovuta all'inserzione dell'elemento P

La localizzazione di 500 inserzioni è stata determinata tramite ibridazione in situ sui cromosomi politenici. La distribuzione dei siti, sebbene non totalmente casuale, avviene ad una ampia varietà di siti.

99% degli inserti è inserito in regioni eucromatiniche

Sequenze cromosomiche che fiancheggiano l'inserzione esercitano frequentemente un effetto quantitativo sull'espressione del gene trasformato. Es ry^+ inserts aumentano la quantità di prodotto di circa 5 volte.

Mappa che mostra i siti di inserzione di 475 geni trasformati

