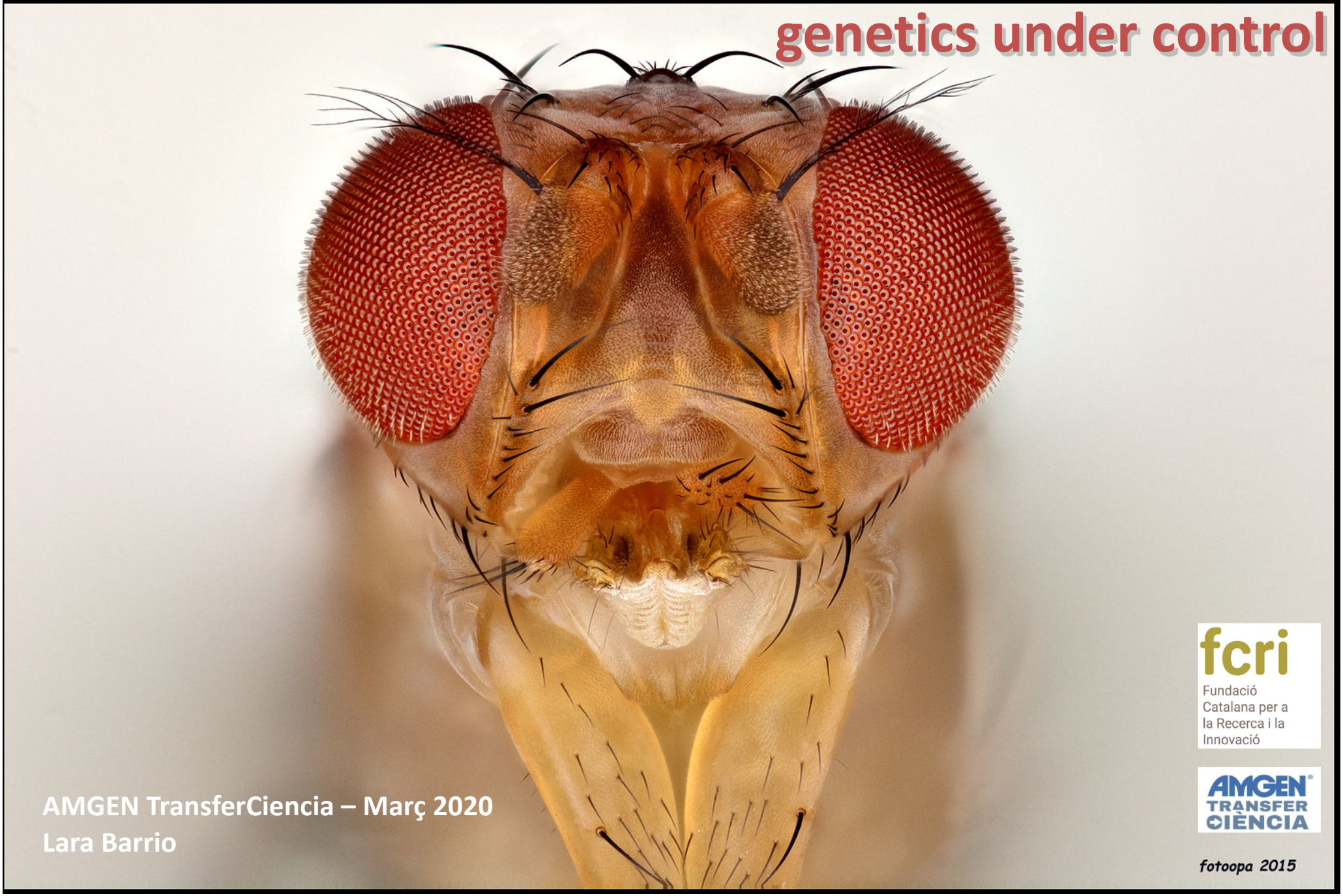
Drosophila com a organisme model: genetics under control

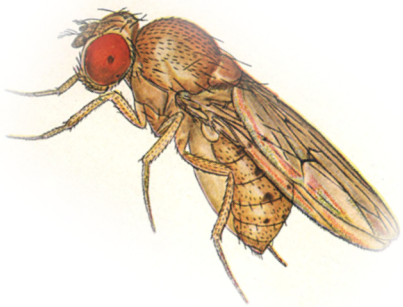


AMGEN TransferCiencia – Març 2020
Lara Barrio

fcri
Fundació Catalana per a la Recerca i la Innovació

AMGEN TRANSFER CIÈNCIA

IRB BARCELONA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA



I. Conceptes bàsics de genètica (kahoot)

Definicions

Genètica mendeliana

II. *Drosophila* melanogaster: molt més que una mosca!

El perquè de les mosques en investigació

Resum històric

III. Genètica i biotecnologia amb *Drosophila*

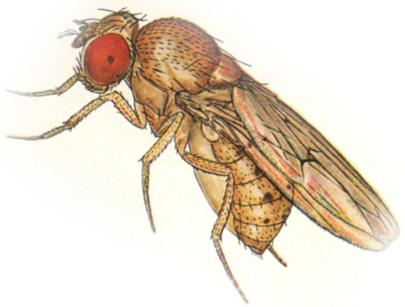
Del fenotip al gen

Mutagènesis

Sistema Gal4/UAS

IV. *Drosophila* com a model per entendre la biologia humana

IRB BARCELONA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA



I. Conceptes bàsics de genètica (kahoot)

Definicions

Genètica mendeliana

II. *Drosophila* melanogaster: molt més que una mosca!

El perquè de les mosques en investigació

Resum històric

III. Genètica i biotecnologia amb *Drosophila*

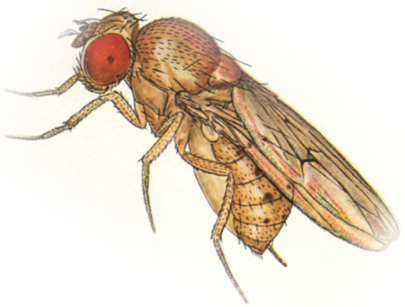
Del fenotip al gen

Mutagènesis

Sistema Gal4/UAS

IV. *Drosophila* com a model per entendre la biologia humana

IRB BARCELONA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA



I. Conceptes bàsics de genètica (kahoot)

Definicions

Genètica mendeliana

II. *Drosophila* melanogaster: molt més que una mosca!

El perquè de les mosques en investigació

Resum històric

III. Genètica i biotecnologia amb *Drosophila*

Del fenotip al gen

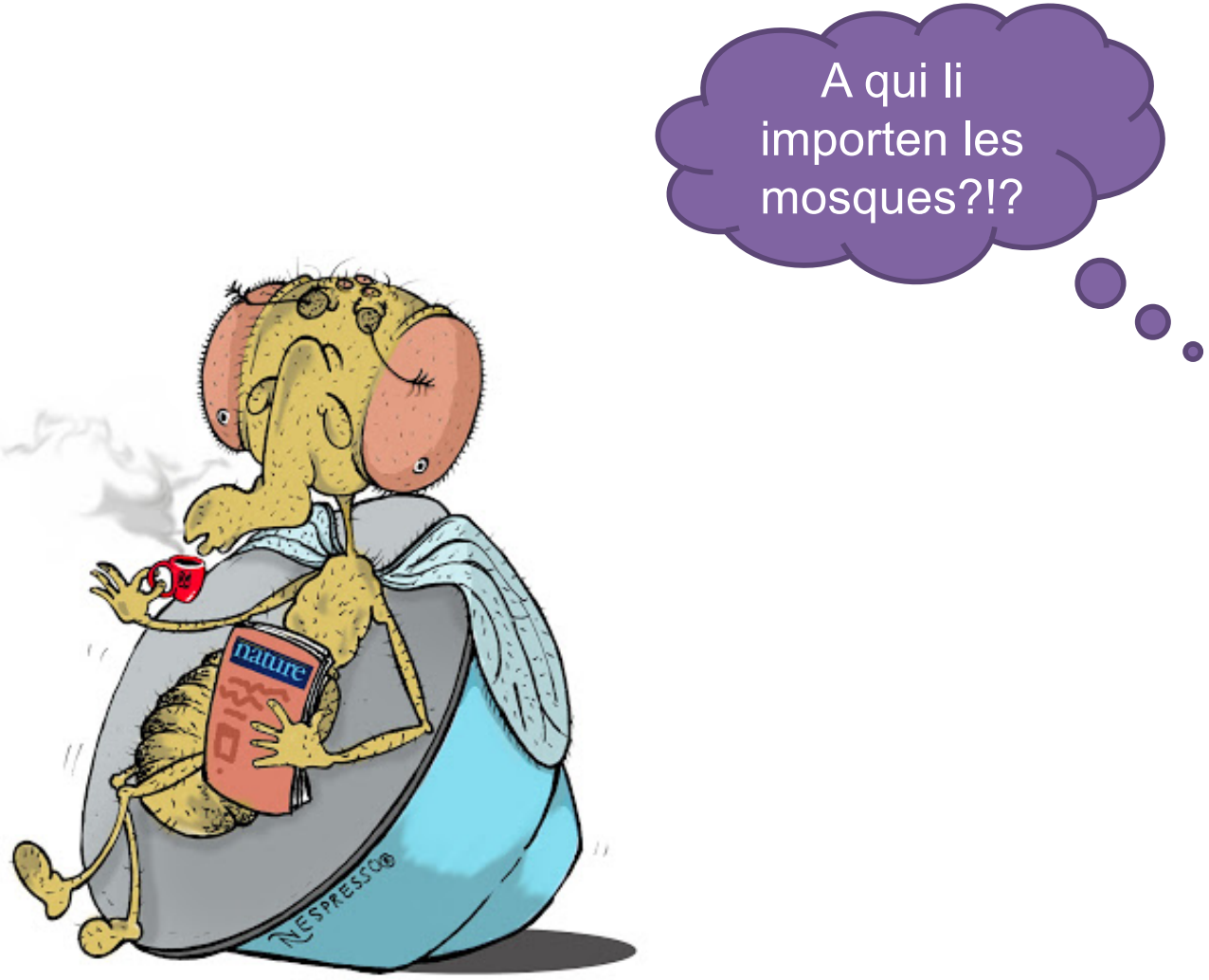
Mutagènesi

Transgènesi

Sistema Gal4/UAS

IV. *Drosophila* com a model per entendre la biologia humana

II. *Drosophila melanogaster*: molt més que una mosca!



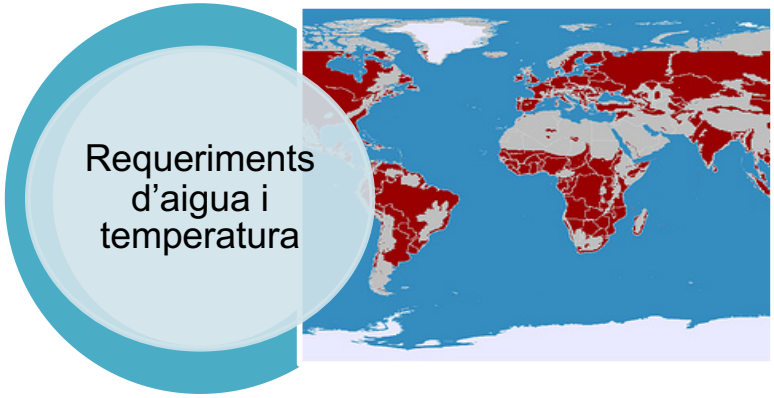
Drosophila melanogaster

Mosca de la fruita

Droso= humitat // ***Phila*** = amant
Melano= pigmentat // ***gaster***= abdomen

Econòmic i fàcil de manipular

Econòmic i fàcil de manipular

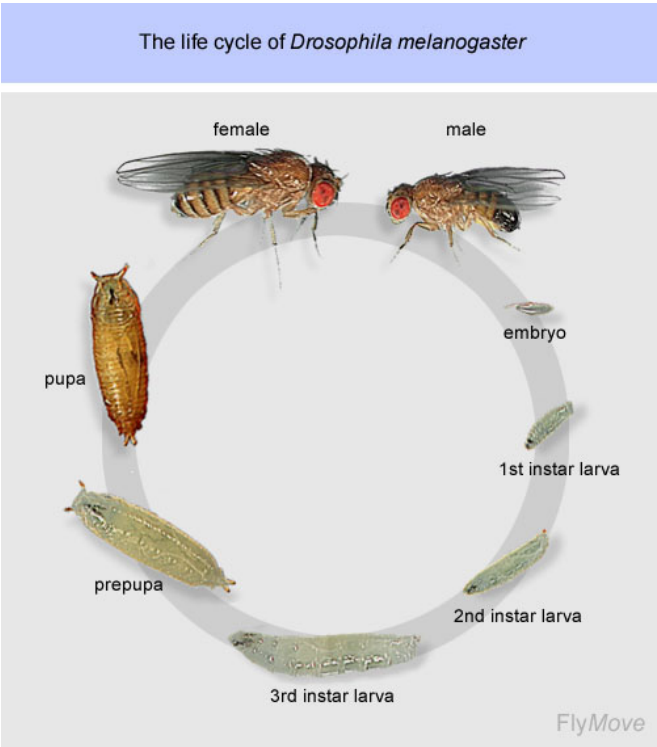


I. Conceptes bàsics de genètica

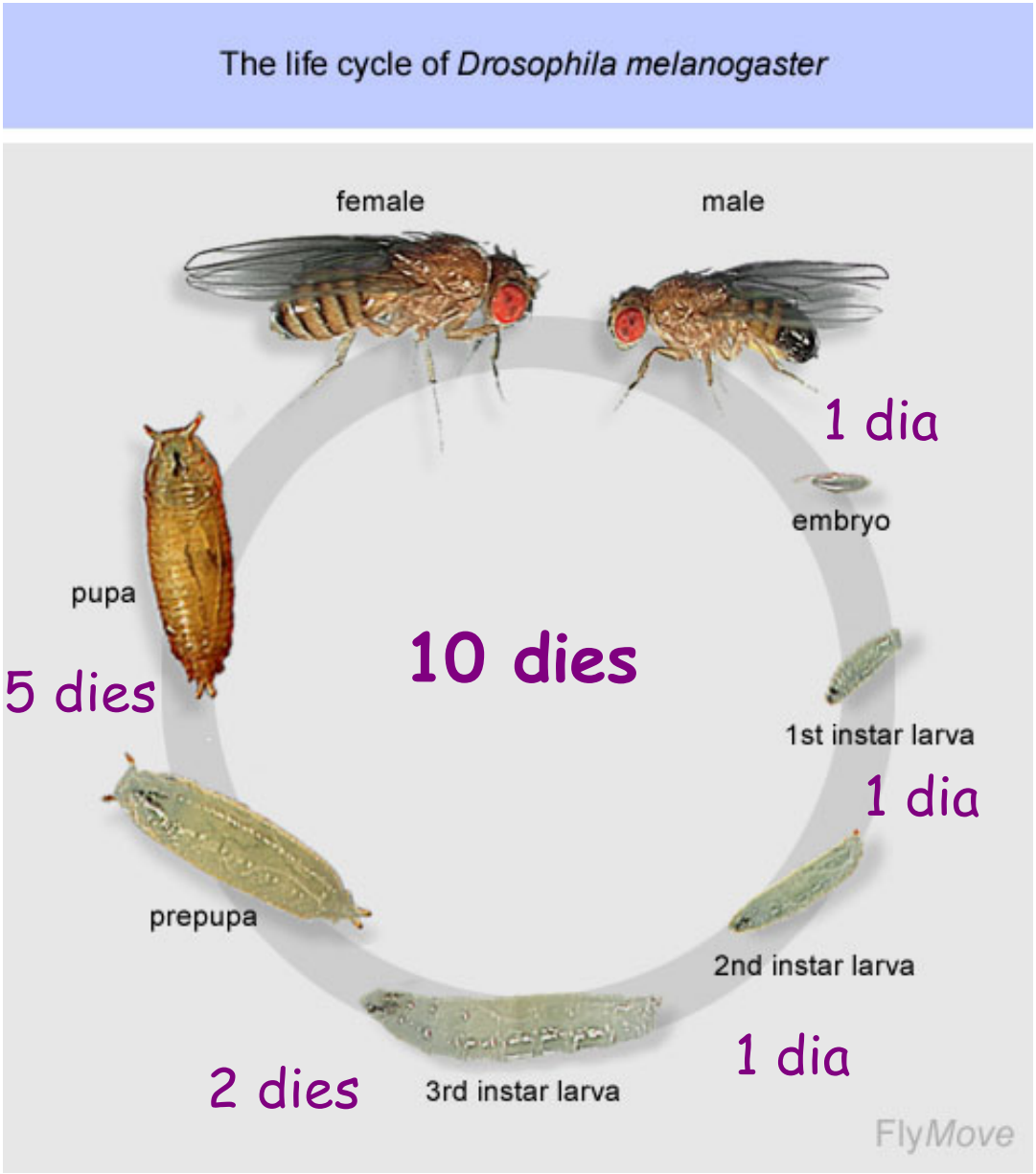
Cicle vital curt i elevada descendència

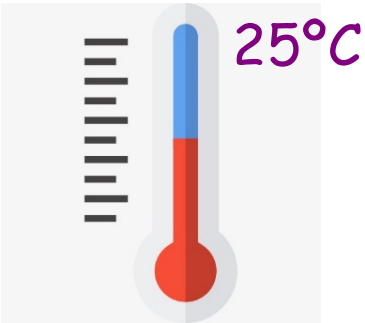
Quants dies creieu que dura el cicle vital de *Drosophila*?

a) 5 dies
b) 10 dies
c) 15 dies
d) 20 dies



Cicle vital curt i elevada descendència

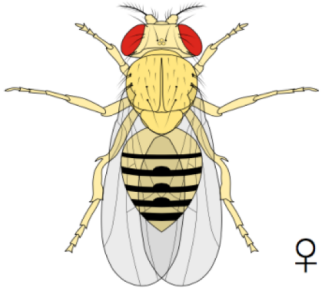




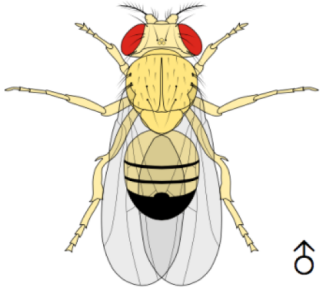
Els humans tenim 23 parells de cromosomes, però… quants parells de cromosomes té *Drosophila*?

a) 4
b) 6
c) 10
d) 12

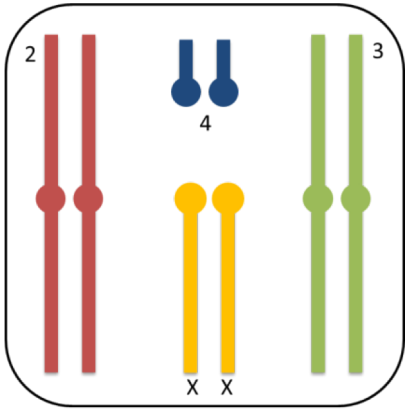
Genoma petit i seqüenciat

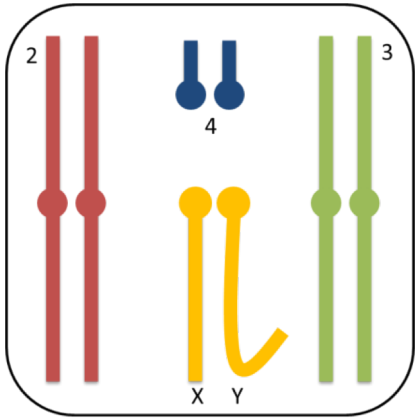


Femella (XX)



Mascle (XY)





4 parells de cromosomes (3 autosòmics i 1 sexual)

Genoma petit i seqüenciat

Genoma seqüenciat l'any 2000

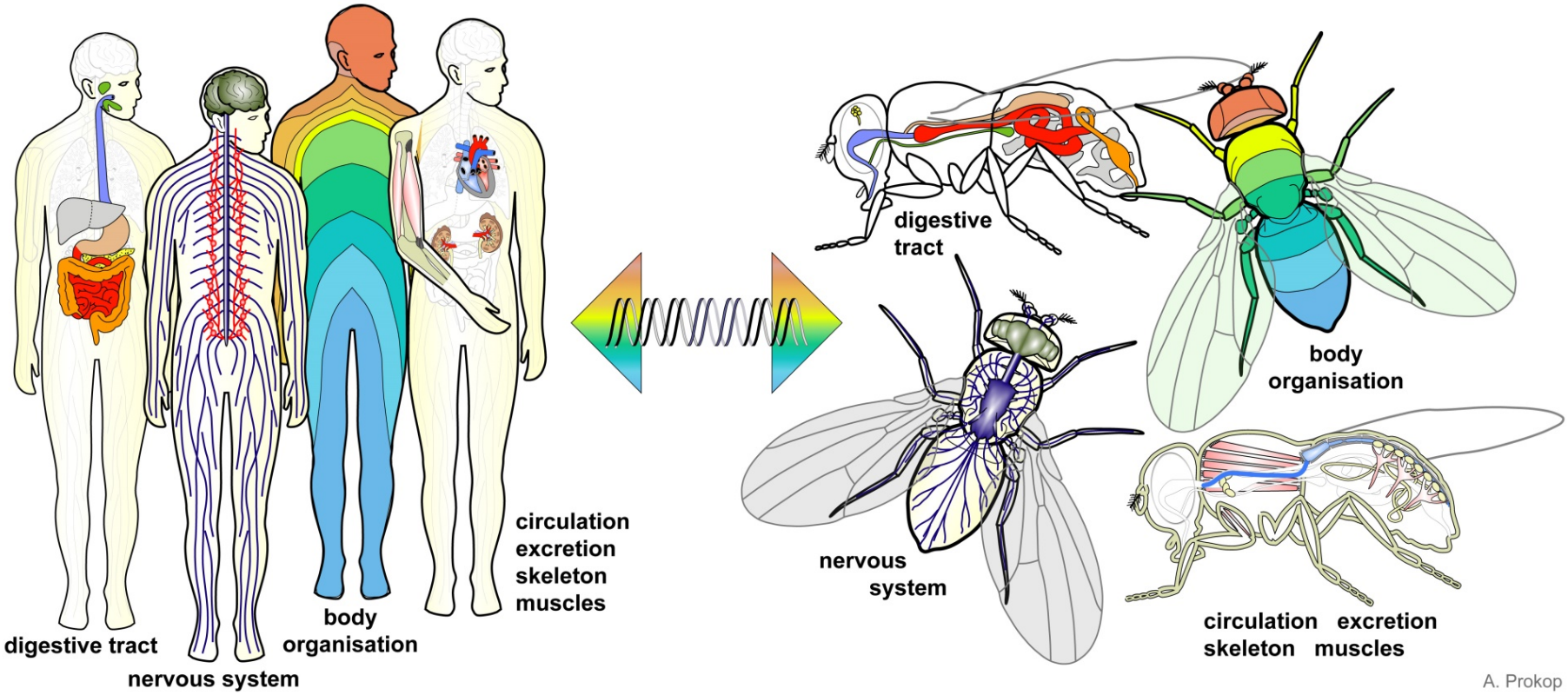
Organisme	Tamany genoma (bases)	Gens estimats
Humà (*Homo sapiens*)	3 bilions	30,000
Ratolí (*Mus musculus*)	2.6 bilions	30,000
Cuc nemàtode (*C. elegans*)	97 milions	19,000
Mosca de la fruita (*D. melanogaster*)	137 milions	13,000
Llevat (*S. cerevisiae*)	12.1 milions	6,000
Bacteri (*E. coli*)	4.6 milions	3,200

x10 **x2**

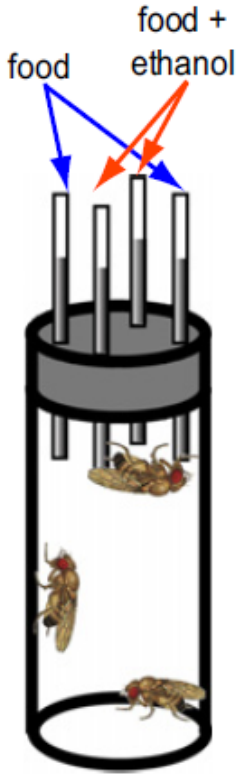
Similars als humans

drosophiladrawings.blogspot.com

Similars als humans



Similars als humans



Similars als humans

Quin percentatge de gens que causen malalties en humans, estan conservats a *Drosophila*?

a) 35%
b) 50%
c) 65%
d) 75%

Similars als humans

Quin percentatge de gens que causen <u>malalties</u> en humans, estan conservats a *Drosophila*?

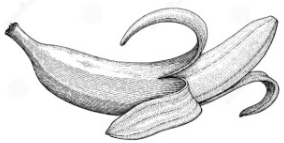
a) 35%
b) 50%
c) 65%
d) 75%

96%

90%

80%

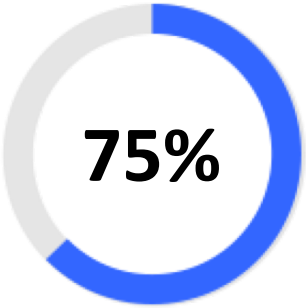
65%


60%

Similars als humans

Table 1 | **Categories of human disease genes well suited to analysis in *Drosophila melanogaster*** *

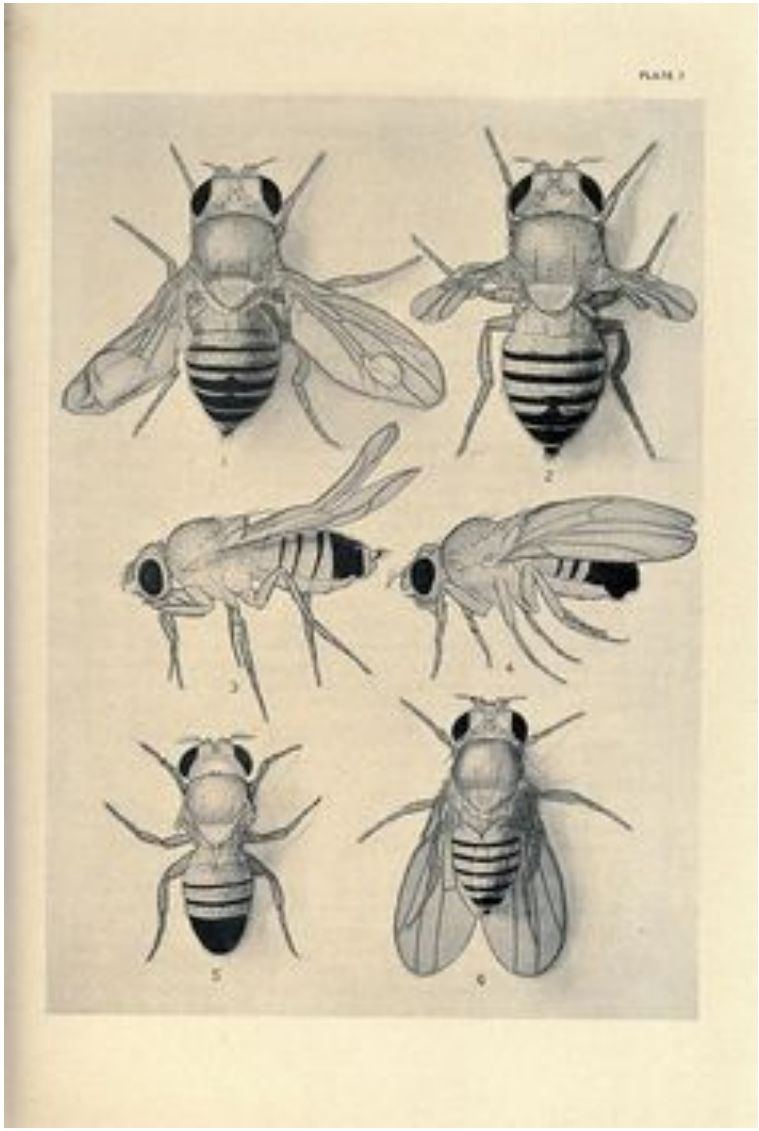
Disease	Human gene symbol	Fly gene symbol	Gene product	References
Dysmorphology				
Synpolydactyly	*HOXD13*‡	*Abd-B*§	Transcription factor	140–142
Single bone in zeugopod	*HOXD3–HOXD13* (heterozygous deletion)	*Abd-B*§	Transcription factor	143,144
Hand-foot-genital syndrome	*HOXA13* or heterozygous *HOXA11–13* deletion	*Abd-B*§	Transcription factor	145–149
Aniridia	*PAX6*	*ey*§, *toy*§	Transcription factor	150–153
Townes-Brocks syndrome	*SALL1*	*salm*§, *salr*§	Transcription factor	154–156
Saethre-Chotzen syndrome	*TWIST1*	*twi*§	Transcription factor	133
Pfieffer syndrome	*FGFR1*, *FGFR2*	*htl*§	RTK	157
Apert syndrome	*FGFR2*	*htl*§	RTK	157
Crouzon syndrome	*FGFR3*	*htl*§	RTK	157
Saethre-Chotzen syndrome-like	*FGFR3*, gain-of-function?	*htl*§	RTK	133
Alagille syndrome	*JAG1*	*Ser*§, *Dl*§	Notch ligand	158
Spondylocostal dysostosis	*DLL3*	*Dl*§	Notch ligand	159
Primary congenital glaucoma	*CYP1B1*	*Cyp18a1*§	Cytochrome P450	108,109
Cardiac disease				
Congenital heart disease	*NKX2-5* *GATA4*	*tin*§ *pnr*§	Transcription factor Transcription factor	160–163 163–165
Holt–Oram syndrome	*TBX5*	*Doc1–Doc3*§	Transcription factor	166–168
DiGeorge syndrome	*TBX1*	*org-1*§, *bi*§	Transcription factor	169
Venous malformations	*TEK*	*htl*§	RTK	170
Neurological				
Spinocerebellar ataxia	*SCA1* (also known as *ATXN1*) *SCA2* (also known as *ATXN2*) *SCA6* (also known as *CACNA1A*) *SCA14* (also known as *PRKCG*) *SCA17* (also known as *TBP*)	*CG4547* *CG5166* *cac*§, *Ca-α1D*§ *inaC*§, *Pkc53E* *Tbp*§	Transcription cofactor? Unknown Ca^{2+} ion channel Ca^{2+}-dependent PKC TATA binding protein	27,30,171
Huntington disease	*HD*	*huntingtin*§	Axonal transport?	30,172–174
Spinal and bulbar muscular atrophy 3	*AR*	*ERR*, *svp*§	Androgen receptor	27,171
Parkinson disease	*PARK2* *PARK5* (also known as *UCHL1*) *PARK7* *NR4A2* *MAPT* *PINK1* *SNCA*	*park*§ *Uch* *dj-1β*, *CG6646* *Hr38*§ *tau*§ *CG4523*§ None known	E3-ubiquitin ligase Ubiquitin pathway Androgen-R regulator? Nuclear hormone receptor Microtubule binding PTEN-induced kinase Dopamine transmission?	49–51 28–30 30,175 176 28–30
Alzheimer disease	*PSEN1*, *PSEN2* *APP*	*Psn*§ *Appl*§	γ-Secretase Signalling, axonal transport?	27–30,66
Fragile X syndrome	*FMR1*	*Fmr1*§	Translational regulator	72,177,178
Angelman syndrome	*UBE3A*	*dube3A*§	E3-ubiquitin ligase	179,180
Cancer				
Tuberous sclerosis	*TSC1*, *TSC2*	*tsc1*§, *tsc2*§	GAP for RHEB in TOR pathway	86,181–184
Endometrial carcinoma	*PTEN*	*Pten*§	Negative regulator PI3K	86,92
No known disease mutations in homologue	*LATS1*	*wts*§ (also known as *lats*)	Cyclin regulation?	94,95
Renal cancer lines	*SAV1*	*sav*§	Cyclin regulation?	96
No known disease mutations in homologue	*MST1*, *MST2* (also known as *STK3*)	*hpo*§	Cyclin regulation?	97
Bladder and colorectal cancer	RAS family genes	*Ras85D*§	RTK signalling	185
No known disease mutations in homologues	*SCRIB*, *LLGL1*, *DLG1*	*scrib*§, *l(2)gl*§, *dlg1*§	Cell polarity, metastasis in the presence of RAS-V12	
B-cell leukaemia	*CCND1*	*CycD*§	Cell cycle	93
Melanoma	*CDK4*	*Cdk4*§	Cell cycle	
Retinoblastoma	*RB1*	*Rbf*§, *Rbf2*	Cell cycle	
Hepatocellular carcinoma	*TP53*	*hth*§ ($e<10^{-10}$)	Cell cycle	
Ectodermal dysplasia	*TP73L*	*hth*§ ($e<10^{-7}$)	Cell cycle	



II. El perquè de les mosques en investigació

- Econòmic de mantenir al laboratori
- Idònia per estudis *in vivo*
- Elevada descendència
- Cicle biològic curt
- Genoma petit i seqüenciat
- Molta informació disponible i fàcil de manipular
- Similitud amb humans

Drosophila i ciència: resum històric



II. Resum històric

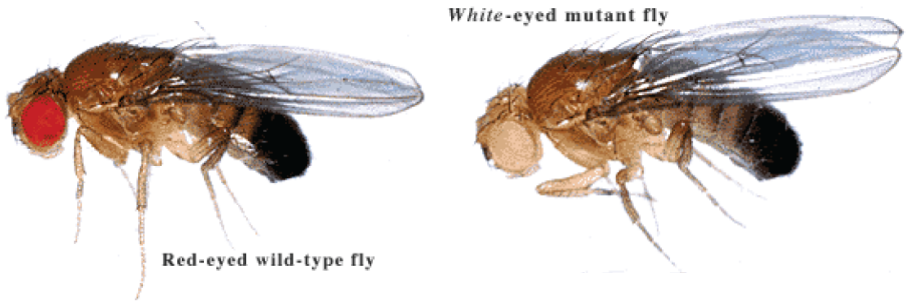
Thomas Hunt Morgan (1866 - 1945)

1908 – Comença a treballar amb *Drosophila*

1910 – Primera mutació identificada (*white*)

1911 – Els gens es troben als cromosomes

1933 – Nobel Prize in Physiology or Medicine pel paper dels cromosomes com a unitats d'herencia



Morgan va rebre el primer premi Nobel en Medicina o fisiologia, però sabríeu dir el total de premis destinats a investigacions amb *Drosophila* fins a dia d'avui?

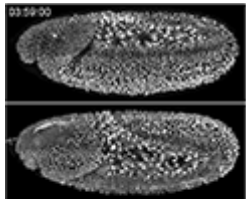
a) 3
b) 5
c) 6
d) 8

6 Premis Nobel per a 10 científics treballant amb *Drosophila*

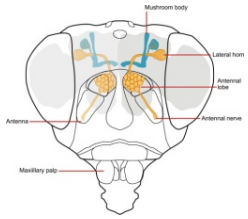
1933 Thomas Hunt Morgan: cromosomes com a unitat d'herència

1946 Hermann Joseph Muller: efecte mutagènic dels raig X

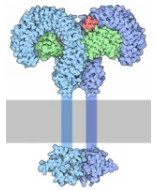
1995 Edward B Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard, i Eric F Wieschaus: control genètic del desenvolupament embrionari



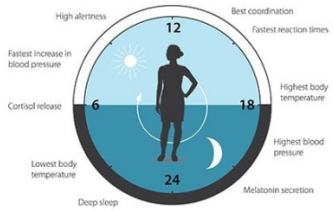
2004 Richard Axel: receptors olfactius i funcionament del sistema olfactiu



2011 Jules A Hoffmann: receptor Toll i funcionament del sistema immunitari innat



2017 Jeffrey C Hall, Michael Rosbash i Michael W Young : mecanisme molecular que controla els ritmes circadians



IRB BARCELONA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA

I. Conceptes bàsics de genètica (kahoot)

Definicions

Genètica mendeliana

II. *Drosophila* melanogaster: molt més que una mosca!

El perquè de les mosques en investigació

Resum històric

III. Genètica i biotecnologia amb *Drosophila*

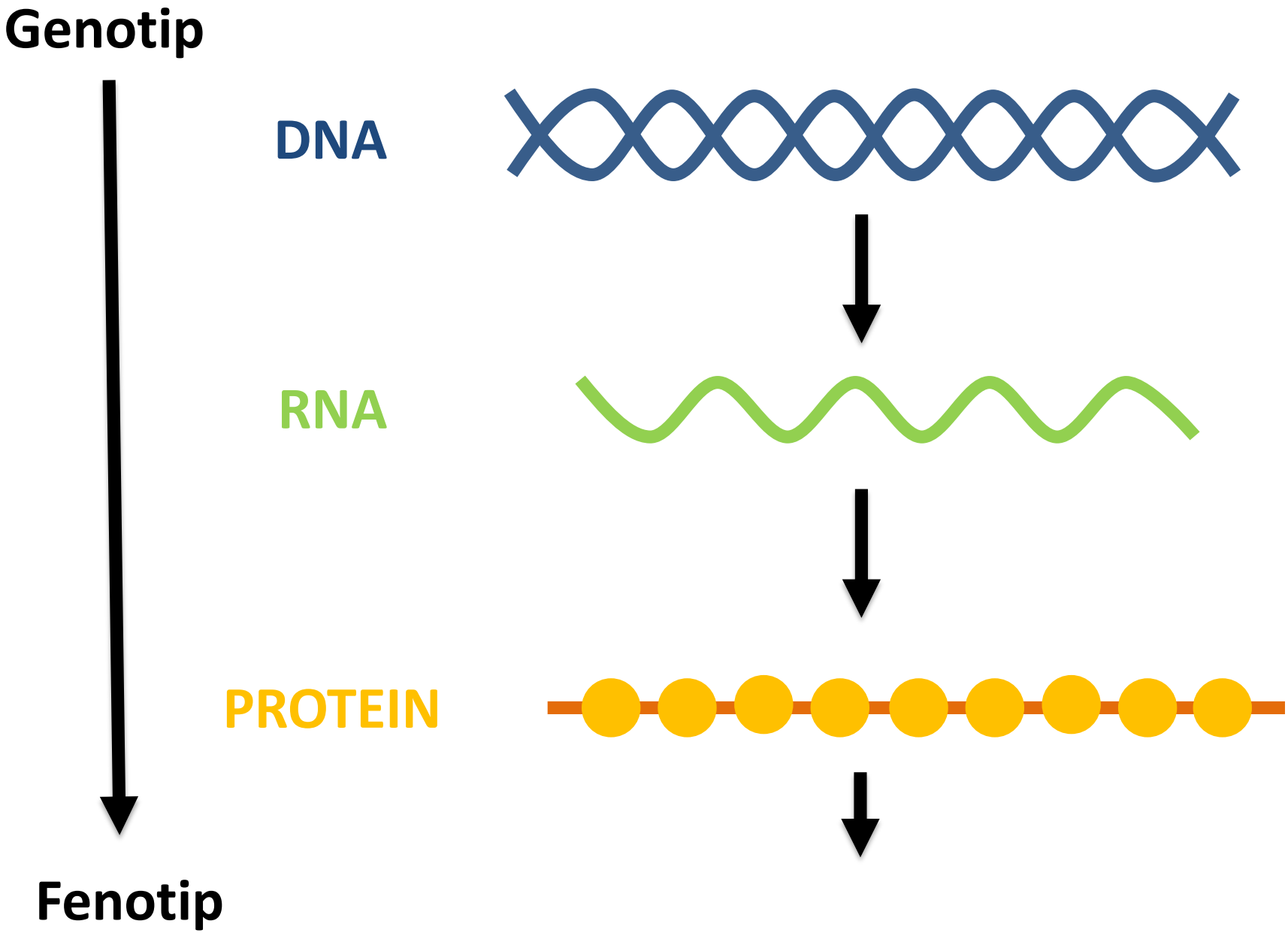
Del fenotip al gen

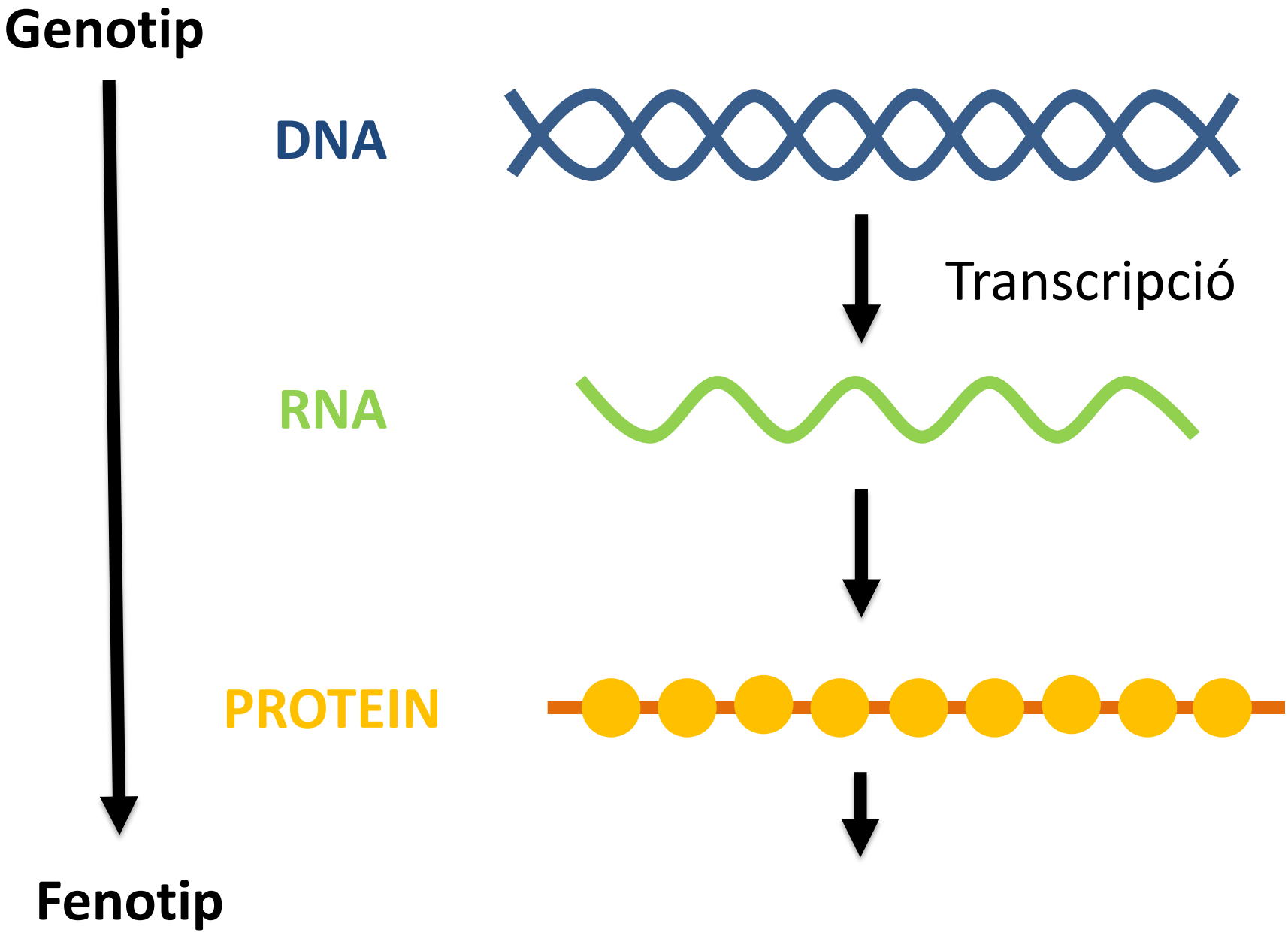
Mutagènesi

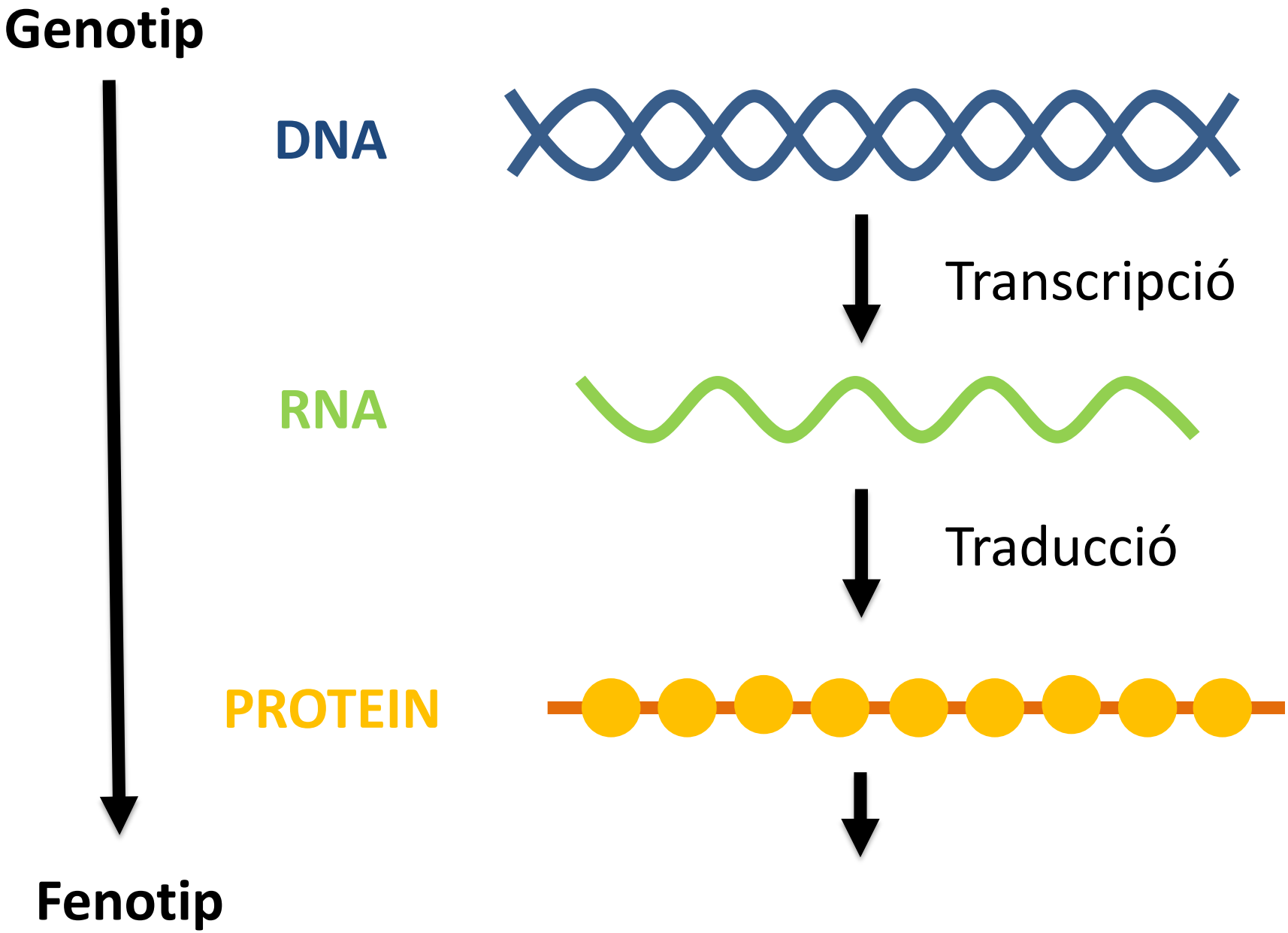
Transgènesi

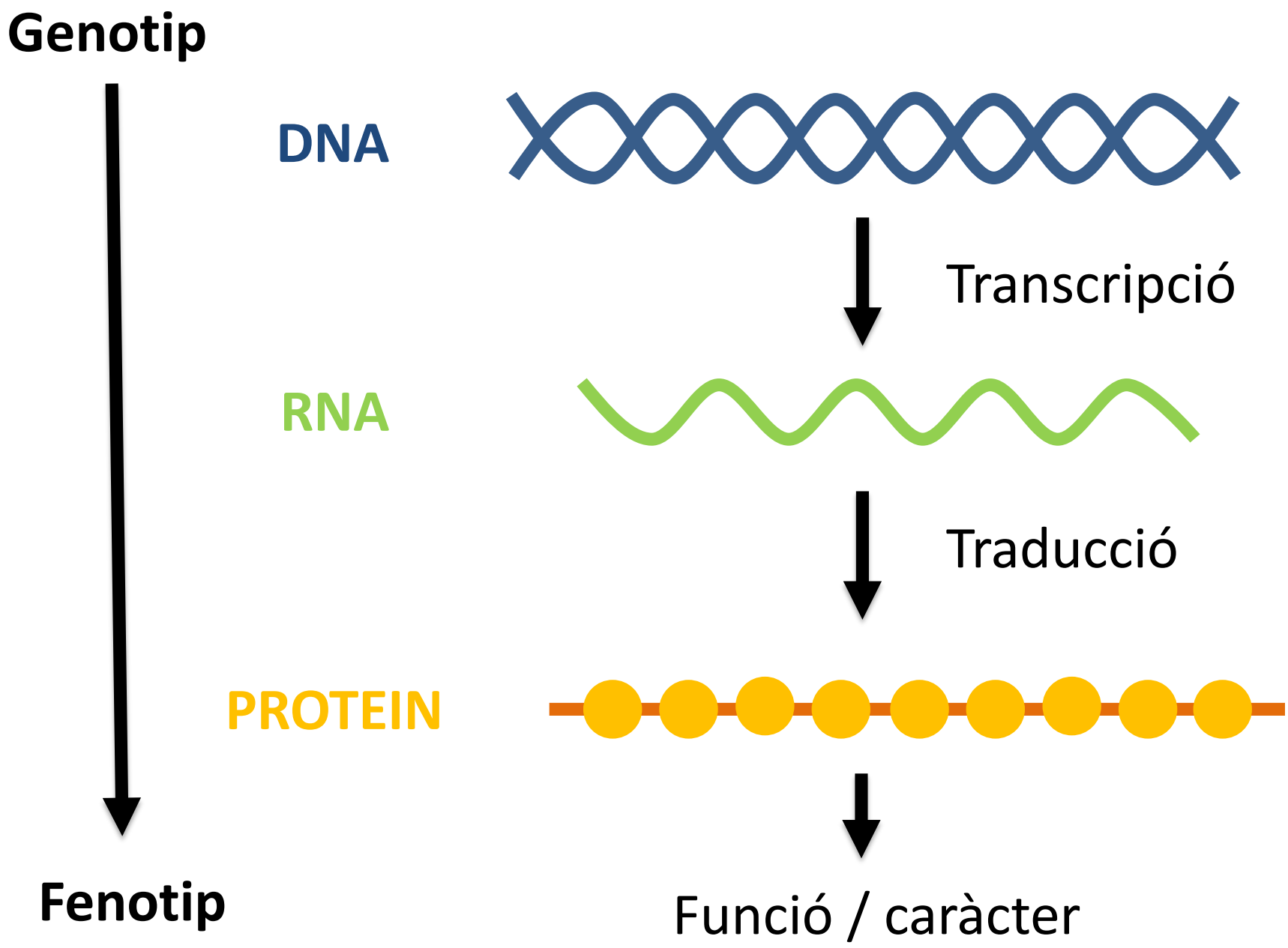
Sistema Gal4/UAS

IV. *Drosophila* com a model per entendre la biologia humana

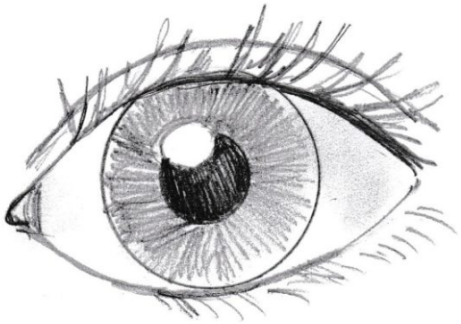

Genotip
DNA
RNA
PROTEIN
Fenotip


Genotip
DNA
Transcripció
RNA
PROTEIN
Fenotip


Genotip
DNA
Transcripció
RNA
Traducció
PROTEIN
Fenotip


Genotip
DNA
Transcripció
RNA
Traducció
PROTEIN
Fenotip
Funció / caràcter

Com podem estudiar la funció d'un gen?



- **Eliminant-lo** (anàlisis de falta de funció)

- **Sobre-expressant-lo** (anàlisi de guany de funció)

⬇

Mutagènesi

Com podem estudiar la funció d'un gen?

- **Eliminant-lo** (anàlisis de falta de funció)
  - **Mutacions amorfes**: totalment nuls
  - **Mutacions hipomòrfiques**: reduccció, però no total

- **Sobre-expressant-lo** (anàlisi de guany de funció)
  - **Mutacions hipermòrfiques**: increment de l'activitat
  - **Mutacions neomòrfiques**: nova funció

↓

Mutagènesi

Classificació de les mutacions

On?

- **Cèl·lules somàtiques**
- **Cèl·lules germinals** (hereditàries)

Tipus

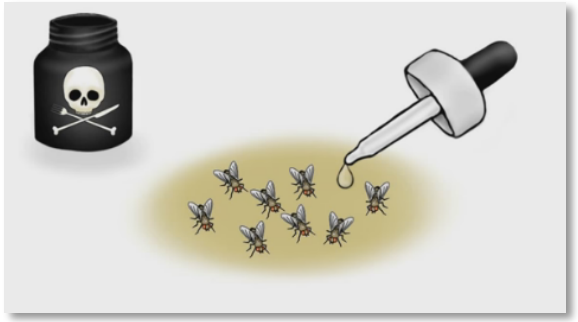
- **Gèniques**: seq. nucleòtids (deleció, addició, substitució)
- **Cromosòmiques**: fragments cromosomes (deleció, duplicació, inversió, translocació)
- **Genòmiques**: nombre de cromosomes (aneuploidïa)

Tècniques de mutagènesi

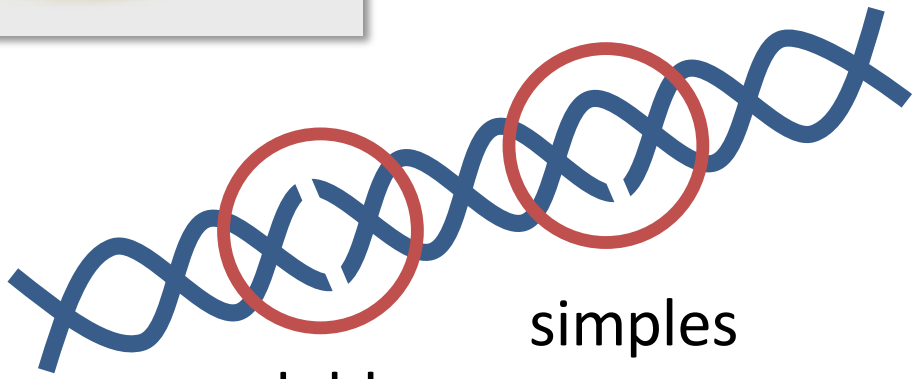
- **A l'atzar**
  - Radiacions (raig X, raig UV)
  - Agents químics
  - Elements P (transposons d'ADN)
- **Dirigida**
  - CRISPR

Tècniques de mutagènesi

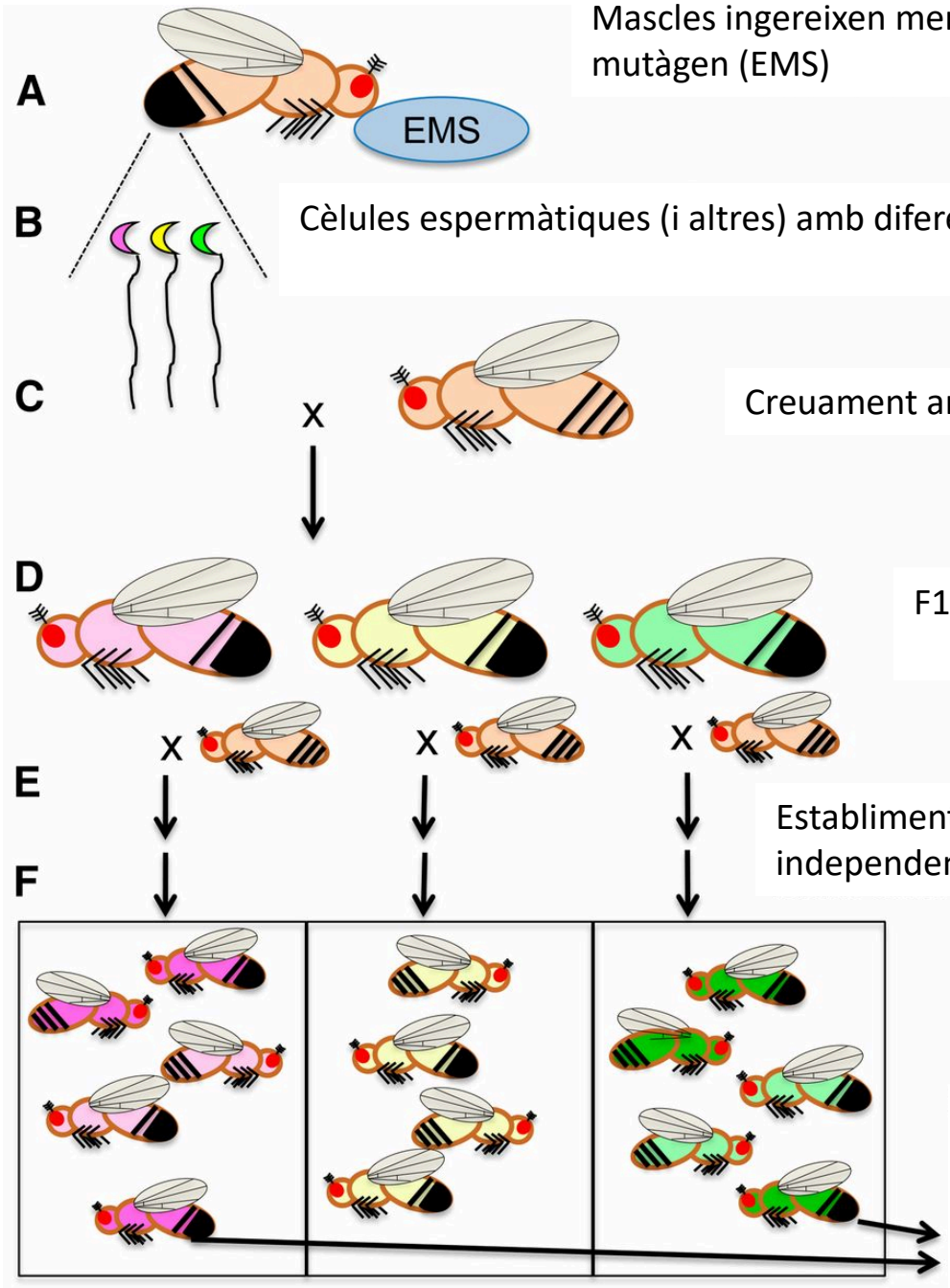
- **A l'atzar**
  - Radiacions (raig X, raig UV)
  - Agents químics



Lesions ADN



Tècniques de mutagènesi



Mascles ingereixen menjar amb agent mutàgen (EMS)

Cèlules espermàtiques (i altres) amb diferents mutacions

Creuament amb femelles normals

F1 amb diferents mutacions

Establiment de línies isogèniques independents

Analitzar mutants homozigots (si sobreviuen) per fenotip d'interès

Tècniques de mutagènesi

- **A l'atzar**

  - **Elements P** (transposons d'ADN): fragments d'ADN que es poden moure d'un lloc a l'altre del genoma (elements mòbils genètics).

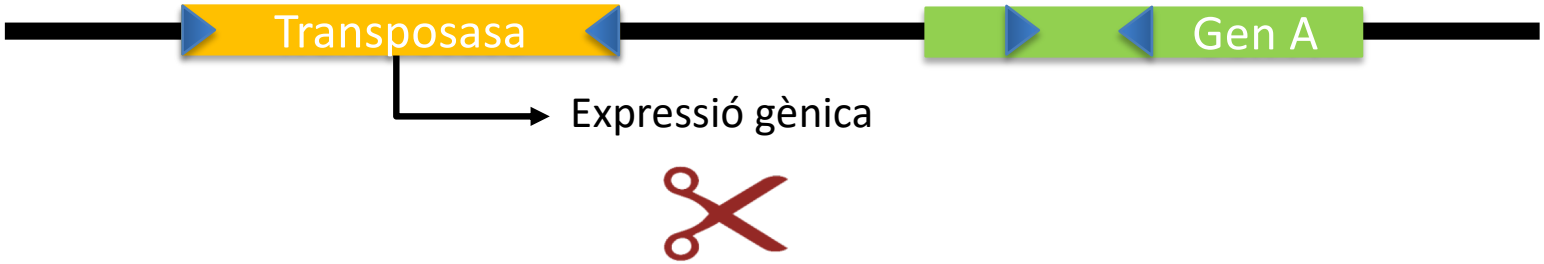
Elements necessàris per a la transposició:

Transposasa (enzim) + **Repeticions Invertides** (RI) seqüencia de ADN

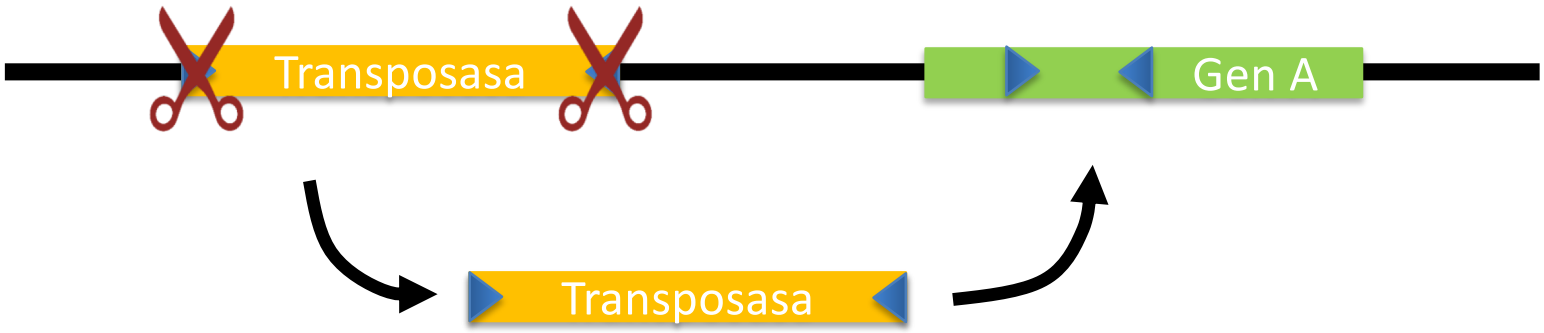
TTCGAnnnnnnnAGCTT

Mecanisme de transposició

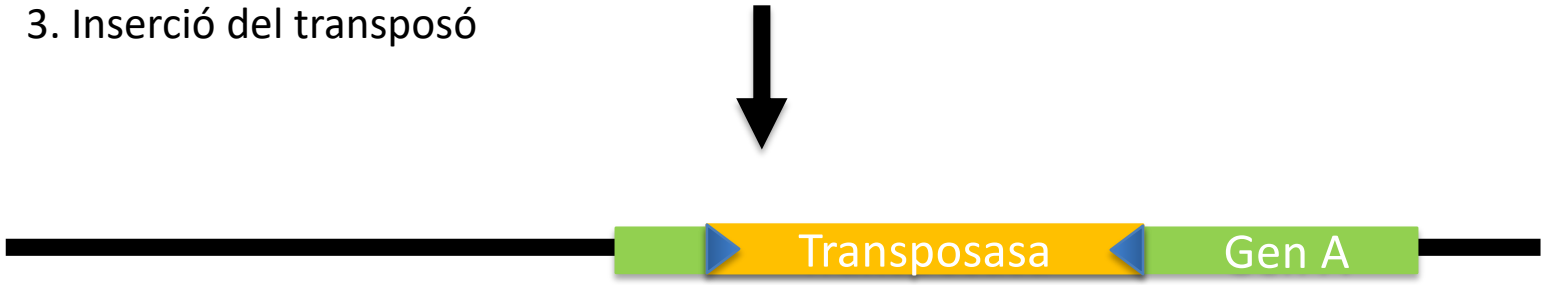
1. Expressió de la Transposasa



2. Escissió del transposó

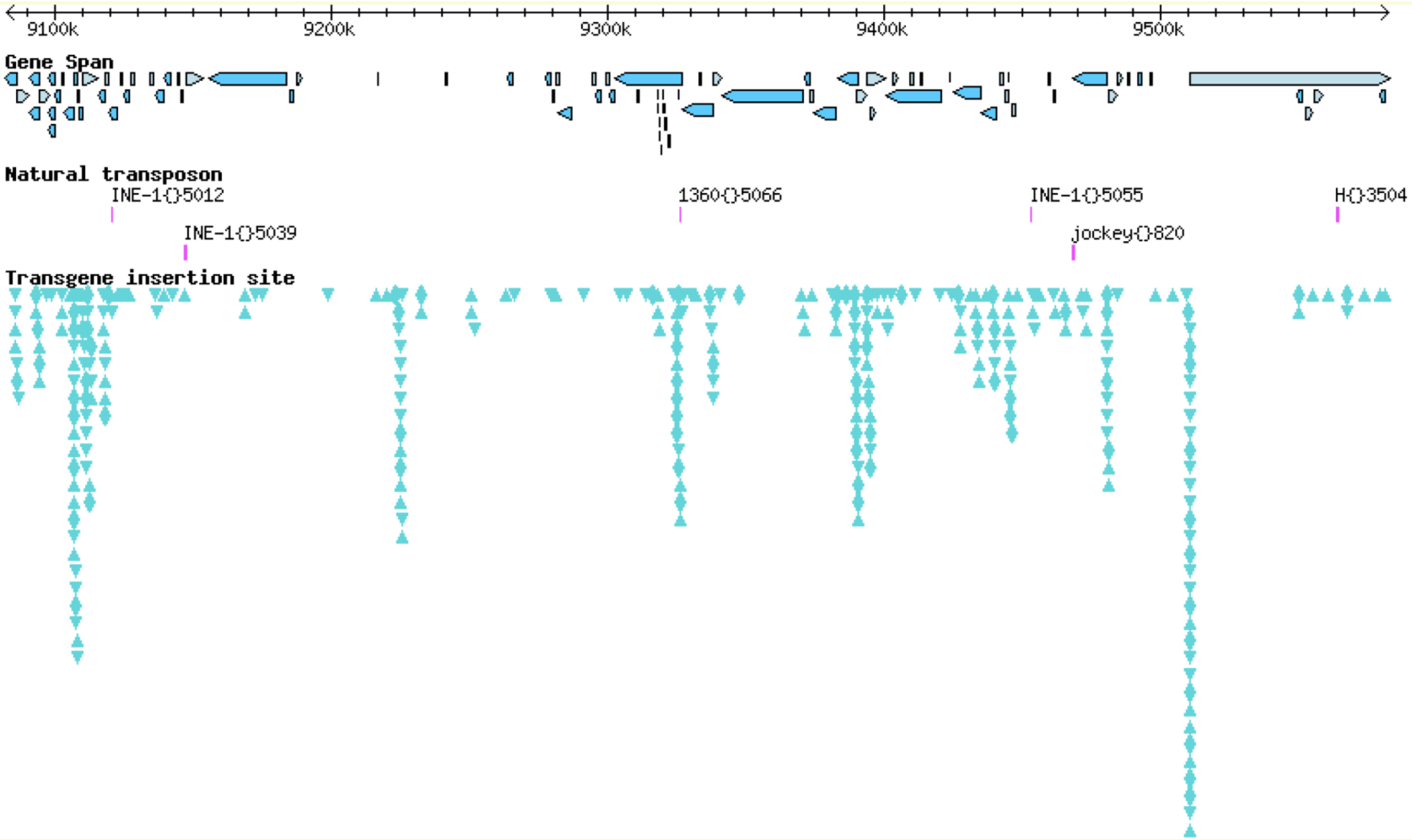


3. Inserció del transposó

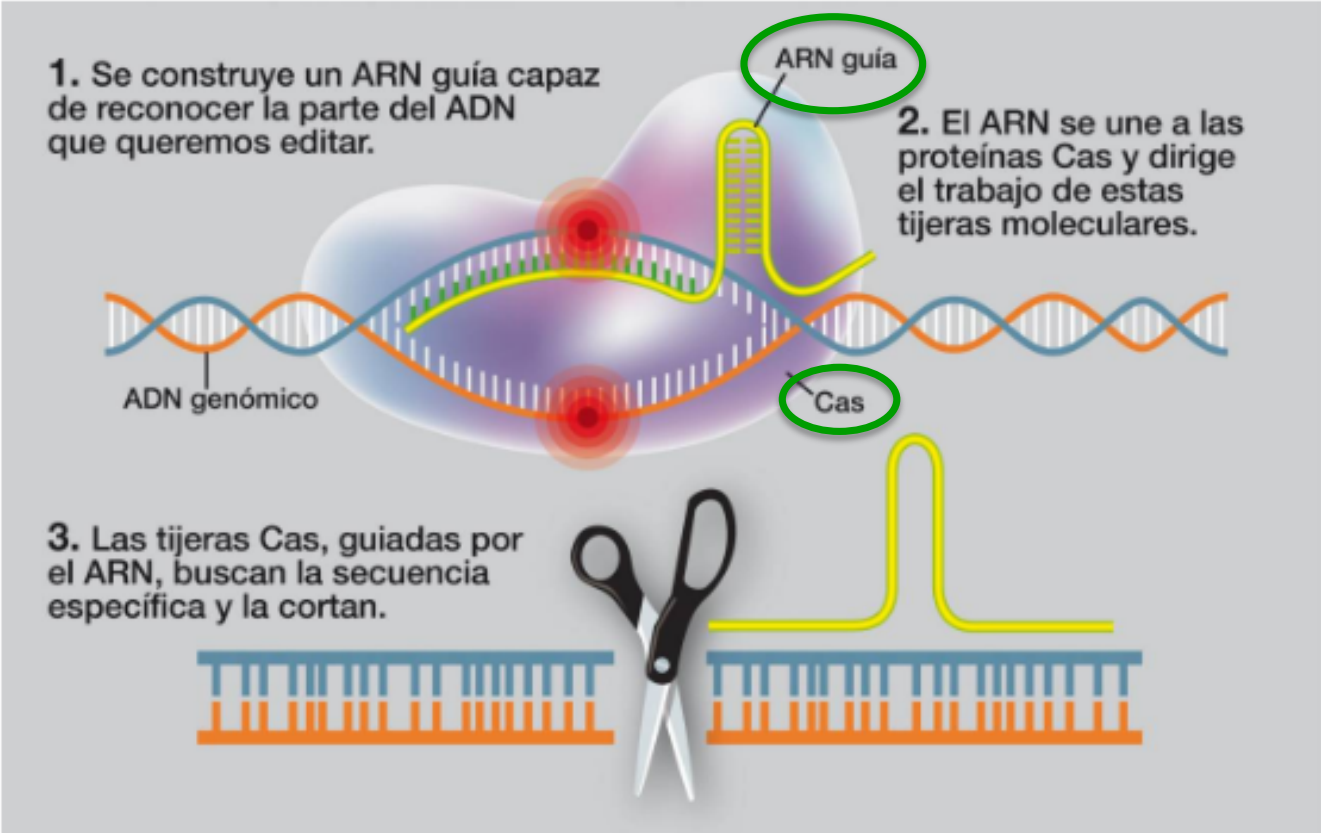


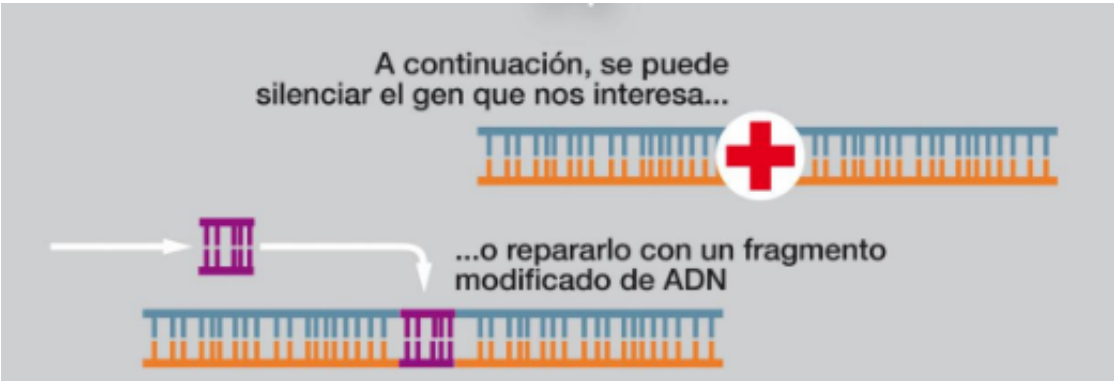
Mutació al gen A

Elements P – milions per tot el genoma de *Drosophila*



- **Dirigida → CRISPR/Cas9**

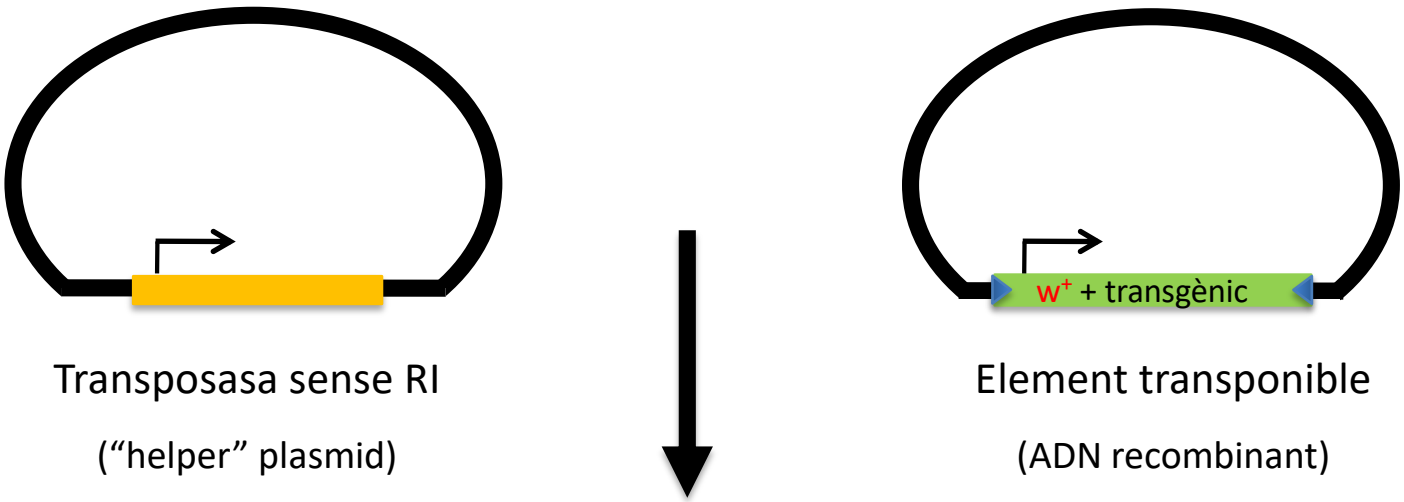


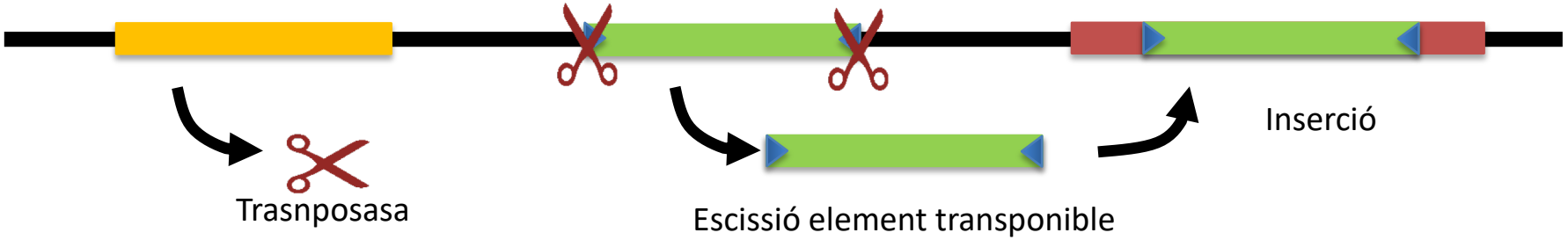


Transgènesi mitjançant Elements P

Transgènesi mitjançant Elements P

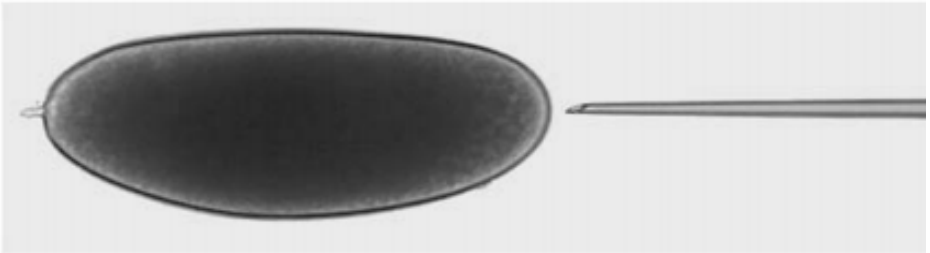
Elements P artificials → vectors de clonatge

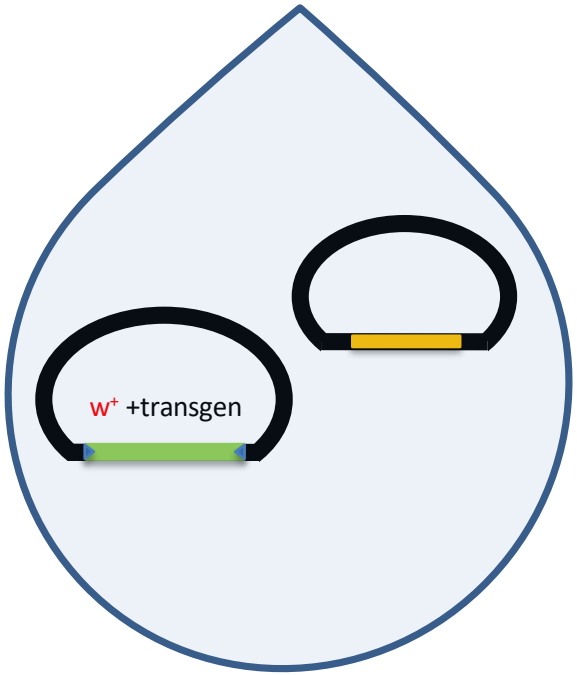




Transgènesi mitjançant Elements P

Microinjecció DNA recombinant + helper

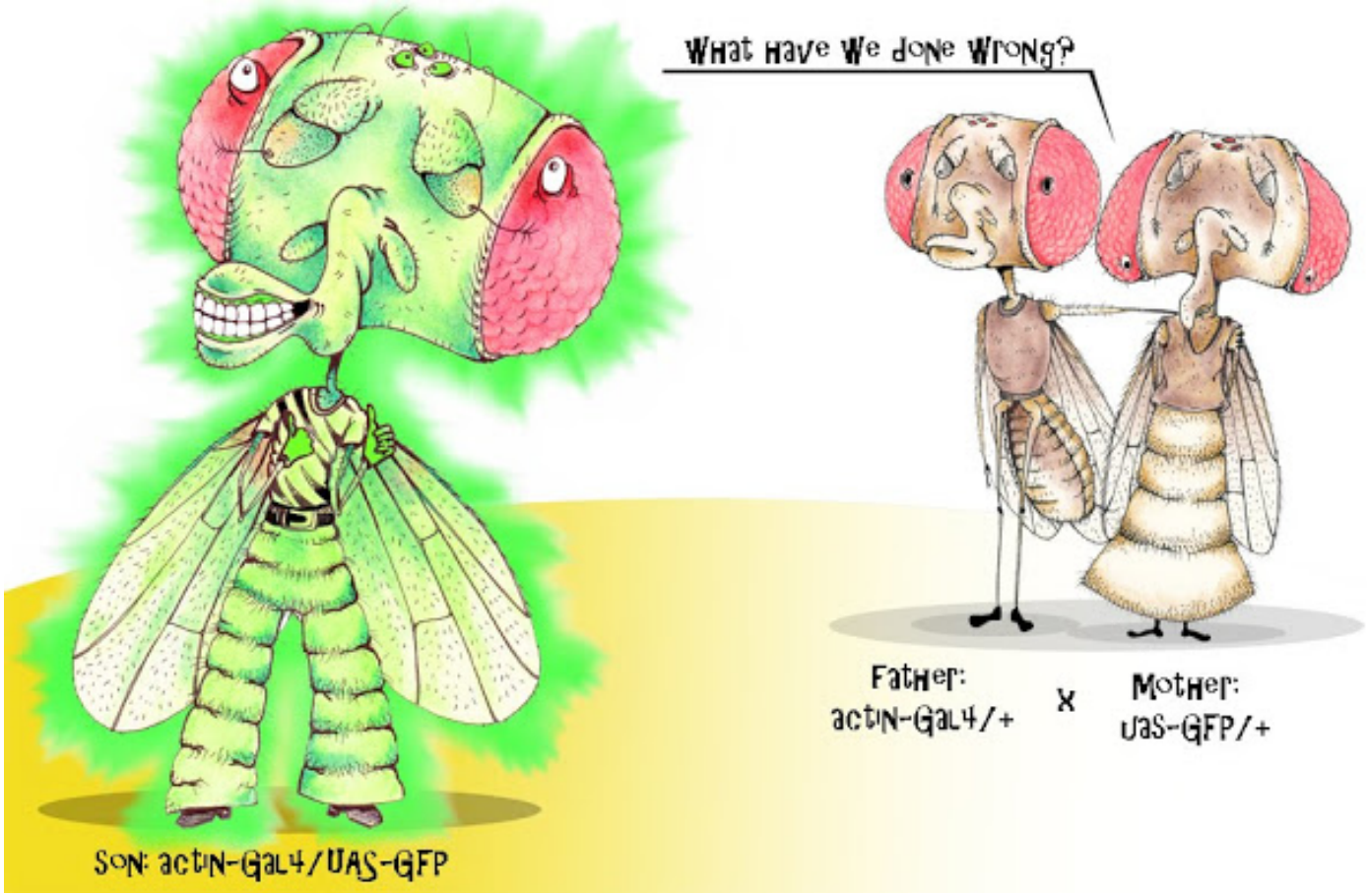




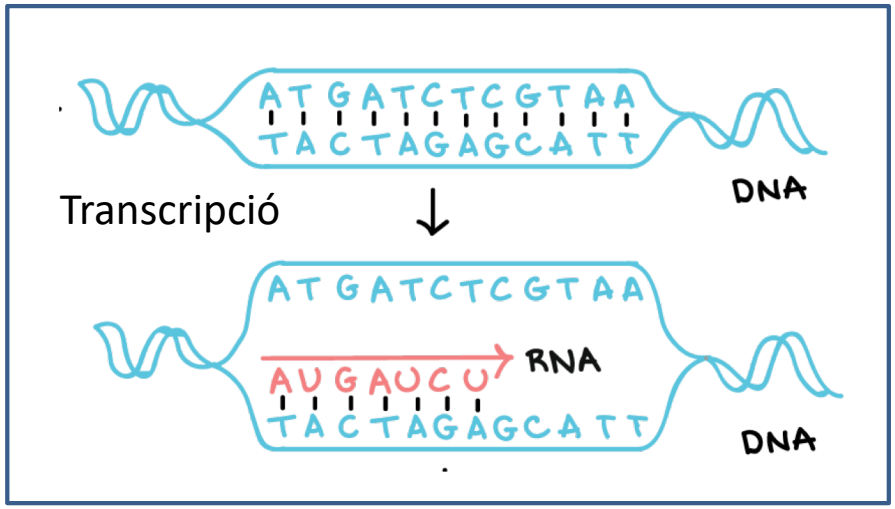
Mosca transgènica, w^+ a la línia germinal

Mosca transgènica, expressant w^+

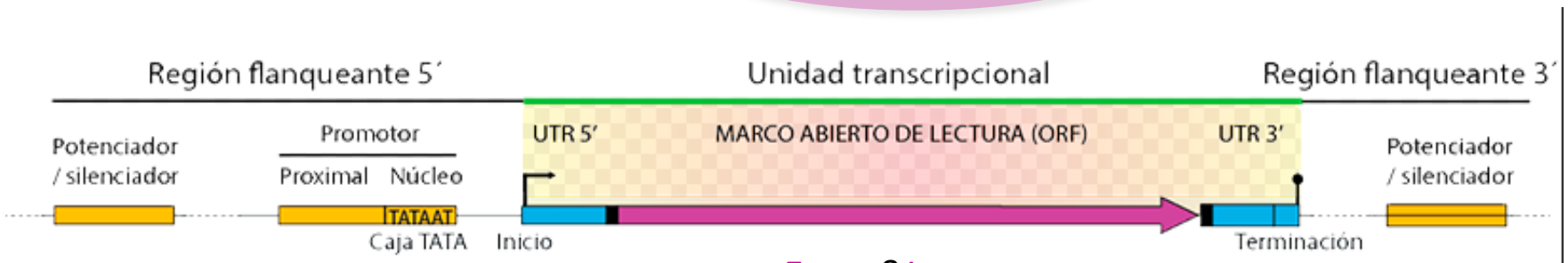
Sistema Gal4/UAS



Regulació de la transcripció



Regió codificant



"Enhancer" Promotor Exons&Introns "Enhancer"

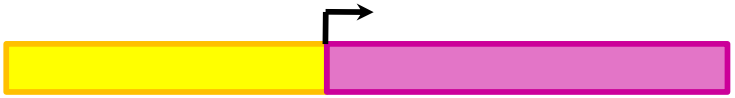
Regions reguladores

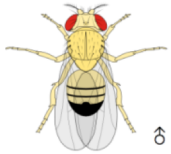
Sistema Gal4/UAS

N. Perrimon

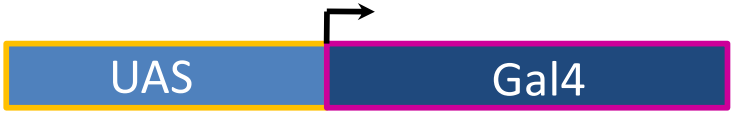
A. Brand

•Separar els dos elements del sistema

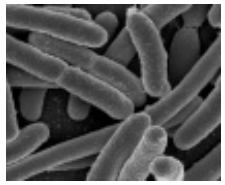




•Utilitzar un intermediari (provinent dels llevats)

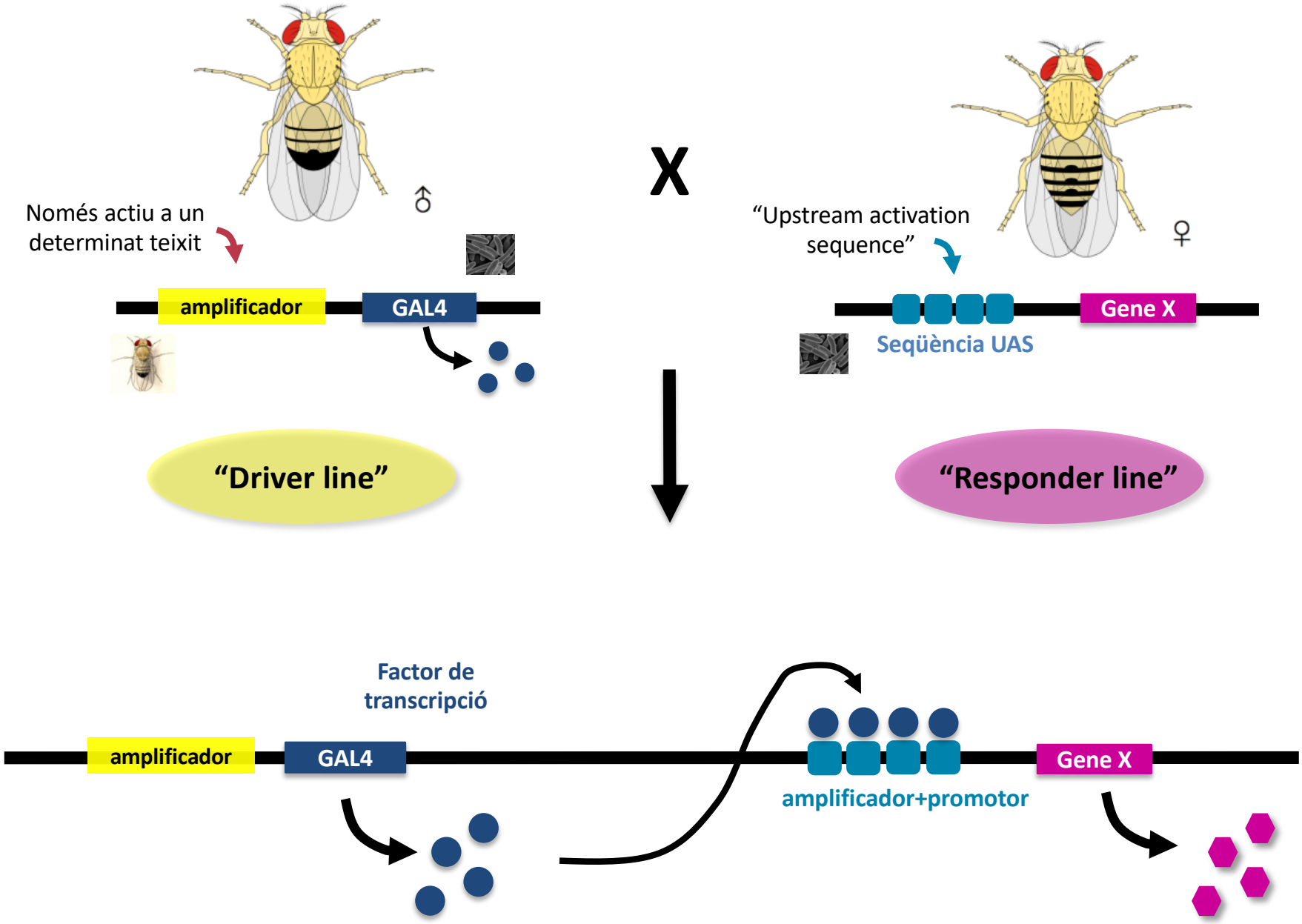


Factor de transcripció



Només actiu a un determinat teixit

Sistema Gal4/UAS



Sistema Gal4/UAS

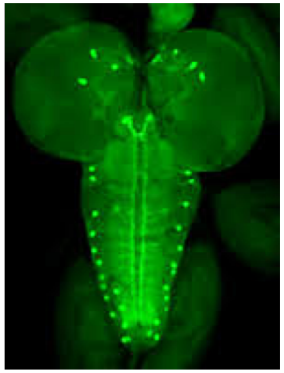
Què podem expressar amb aquest sistema?

UAS - …

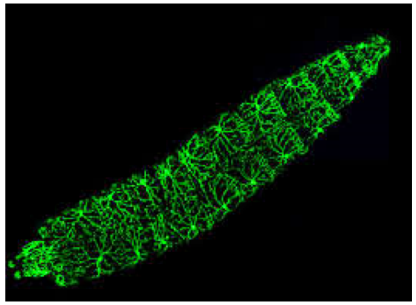
-Gen d'interès (de la mosca, humà, modificat,…)

-Proteïnes fluorescents (GFP, RFP,…)

-RNA d'interferència (inhibir producció de proteïnes)



Cervell larvari



Larva

Mosca adulta

Sistema Gal4/UAS

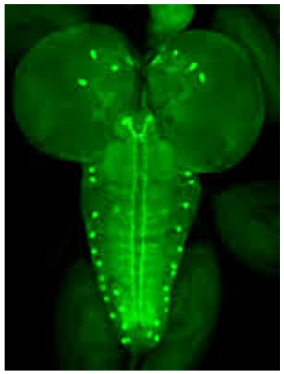
Què podem expressar amb aquest sistema?

UAS - …

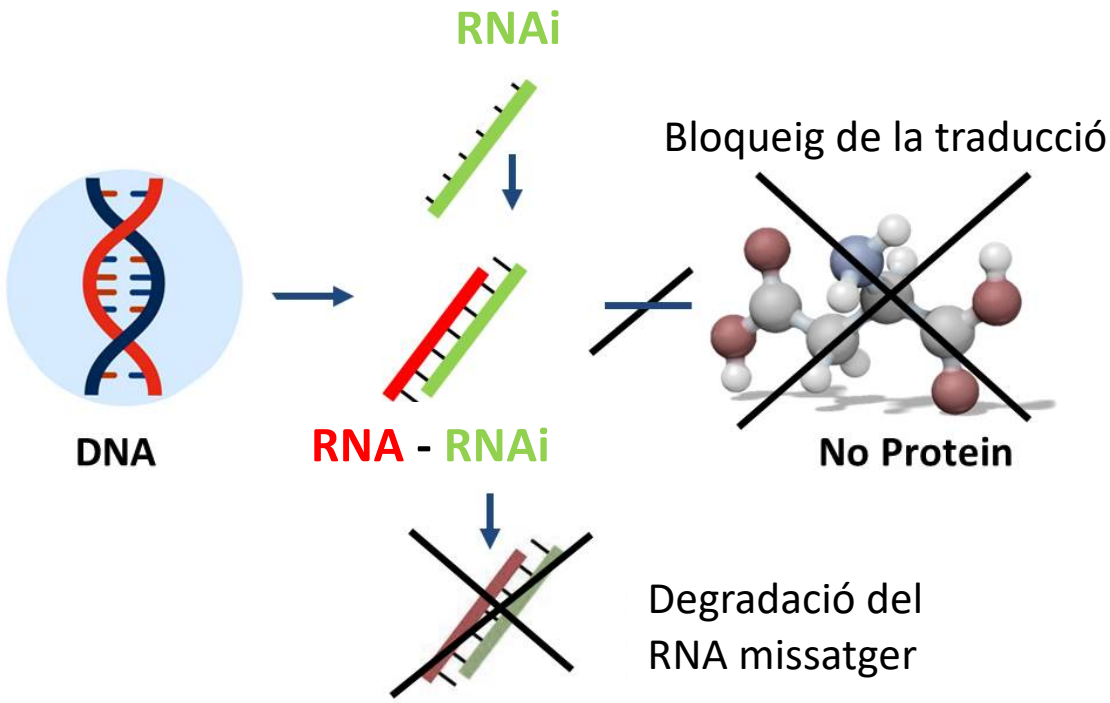
-Gen d'interès (de la mosca, humà, modificat,…)

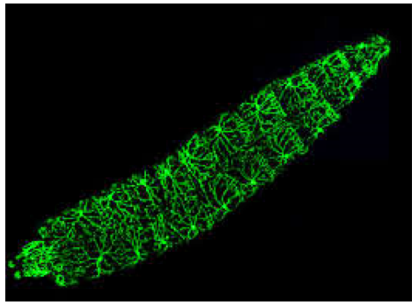
-Proteïnes fluorescents (GFP, RFP,…)

-RNA d'interferència (inhibir producció de proteïnes)



Cervell larvari





Larva

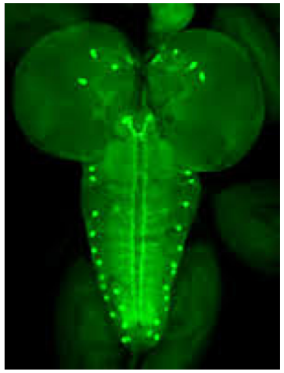
Mosca adulta

Sistema Gal4/UAS

Què podem expressar amb aquest sistema?

UAS - …

-Gen d'interès (de la mosca, humà, modificat,…)
-Proteïnes fluorescents (GFP, RFP,…)
-RNA d'interferència (inhibir producció de proteïnes)

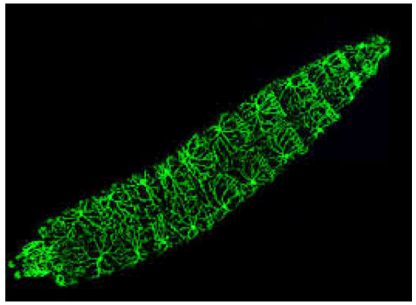


Cervell larvari

Què podem controlar de l'expressió?

… - Gal4

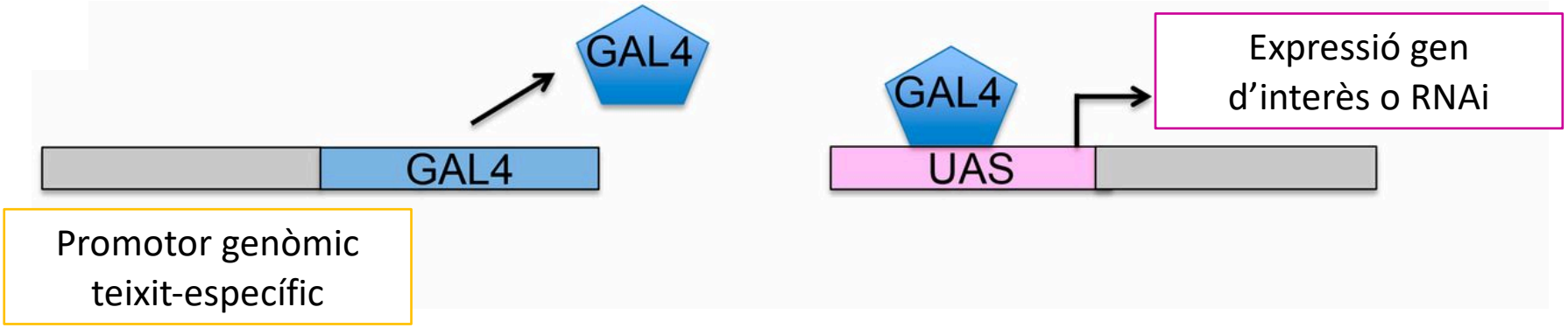
-Lloc (diferents teixits, parts específiques,…)
-Quan (cicle vital, regulable per temperatura)

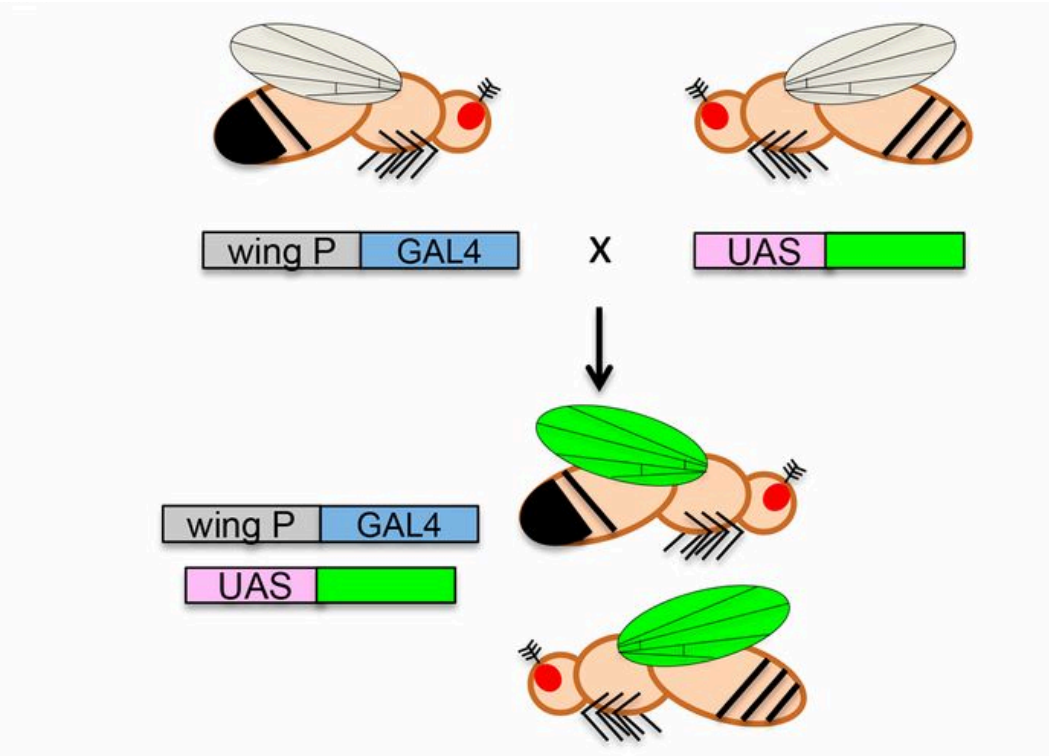


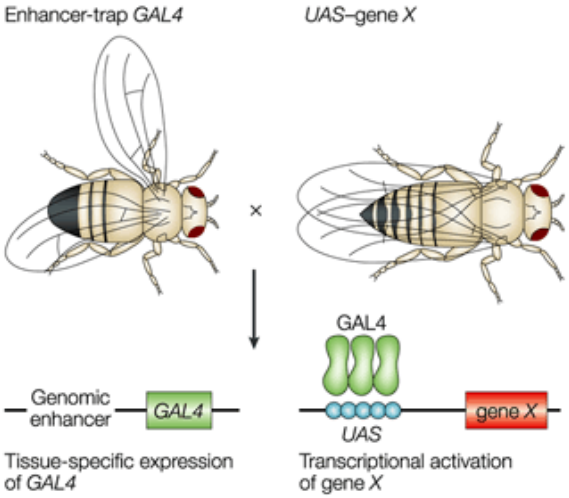
Larva

Mosca adulta

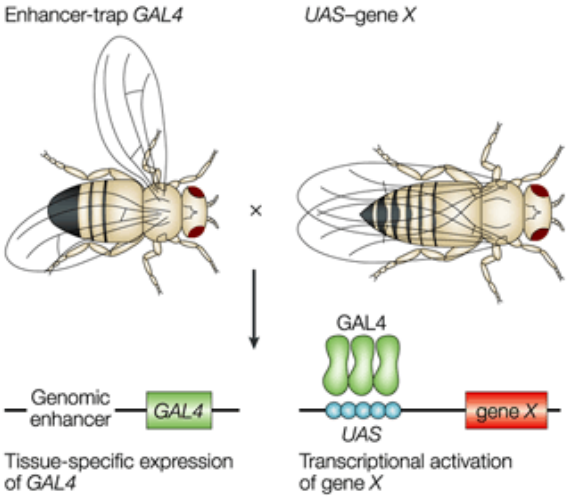
Sistema Gal4/UAS





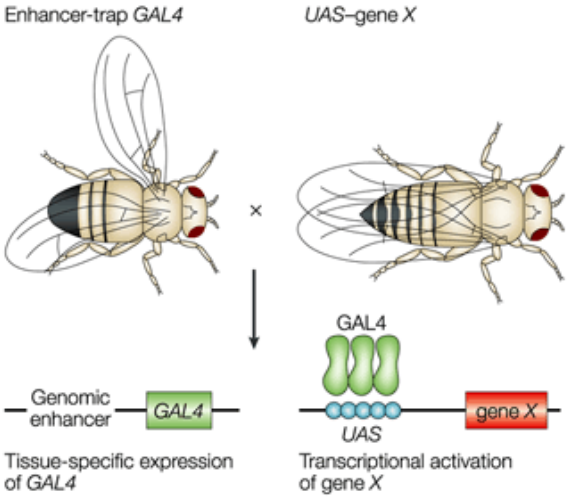


Sospitem que el gen "eyeless" té una funció molt important en la formació dels fotoreceptors dels ulls a *Drosophila*. Utilitzant el sistema Gal4/UAS, quin experiment podríeu pensar per comprovar-ho?



Sospitem que el gen "eyeless" té una funció molt important en la formació dels fotoreceptors dels ulls a *Drosophila*. Utilitzant el sistema Gal4/UAS, quin experiment podrieu pensar per comprovar-ho?

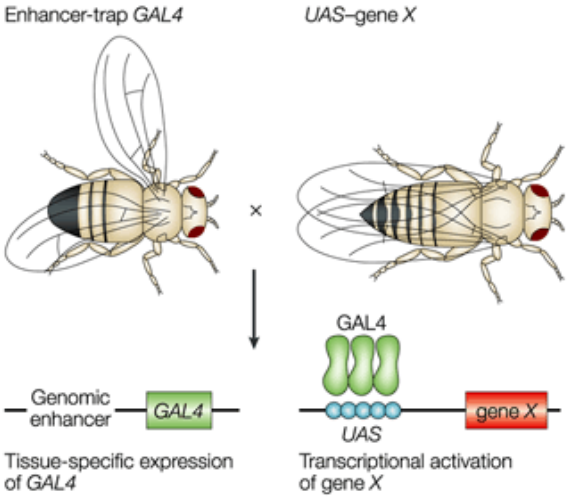
Pista 1: Al laboratori hem pogut clonar el gen de Drosophila "eyeless" en un vector, i amb aquest, hem generat una linia transgènica "UAS-eyeless"



Sospitem que el gen "eyeless" té una funció molt important en la formació dels fotoreceptors dels ulls a *Drosophila*. Utilitzant el sistema Gal4/UAS, quin experiment podrieu pensar per comprovar-ho?

Pista 1: Al laboratori hem pogut clonar el gen de Drosophila "eyeless" en un vector, i amb aquest, hem generat una linia transgènica "UAS-eyeless"

Pista 2: Cercant per la bibliogràfia, hem trobat que el gen "dpp" s'expressa de forma específica a les potes de la mosca.

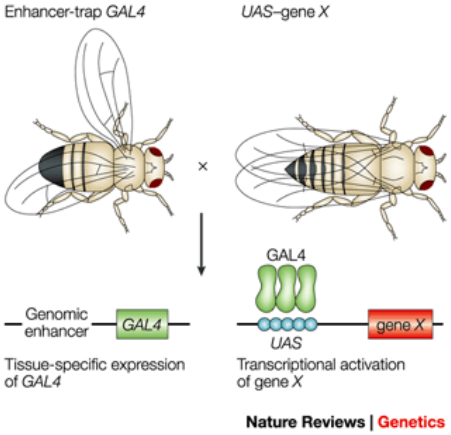


Sospitem que el gen "eyeless" té una funció molt important en la formació dels fotoreceptors dels ulls a *Drosophila*. Utilitzant el sistema Gal4/UAS, quin experiment podrieu pensar per comprovar-ho?

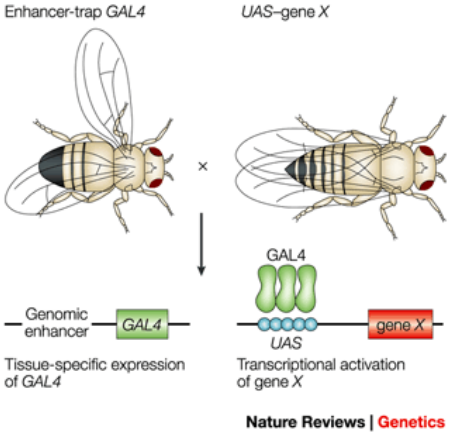
Pista 1: Al laboratori hem pogut clonar el gen de Drosophila "eyeless" en un vector, i amb aquest, hem generat una linia transgènica "UAS-eyeless"

Pista 2: Cercant per la bibliogràfia, hem trobat que el gen "dpp" s'expressa de forma específica a les potes de la mosca.

Pista 3: Al laboratori veí estudien el desenvolupament de les potes, i ens han pogut deixar una linia transgènica "dpp-gal4"

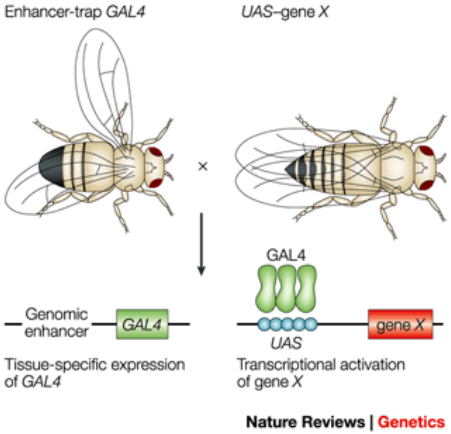


Mosca adulta expressant el gen *eyeless* a les potes

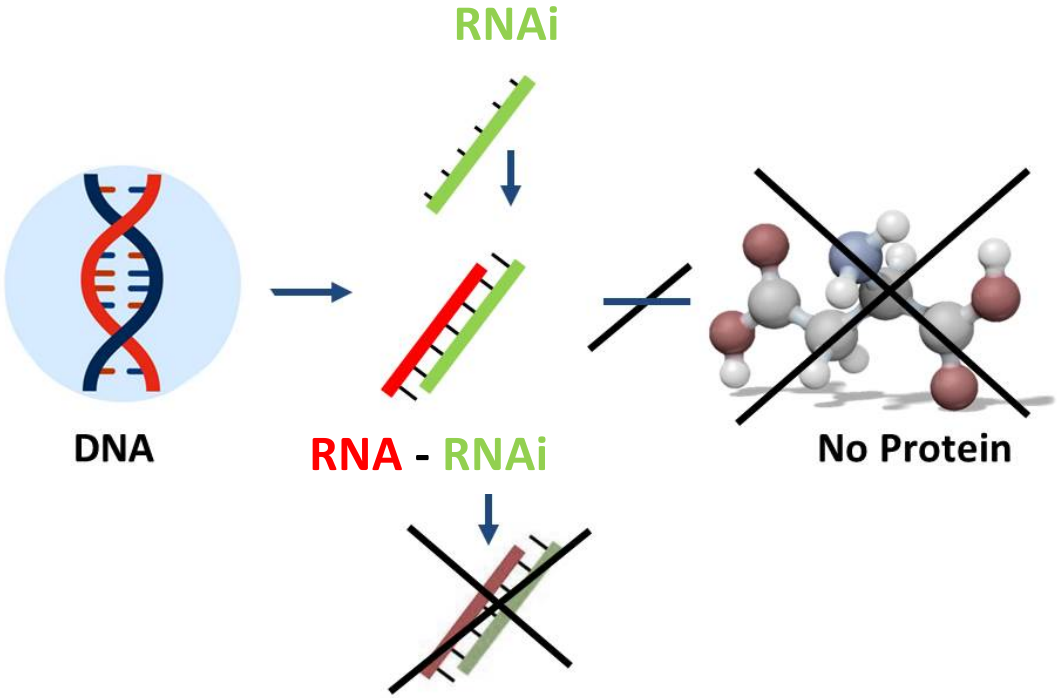


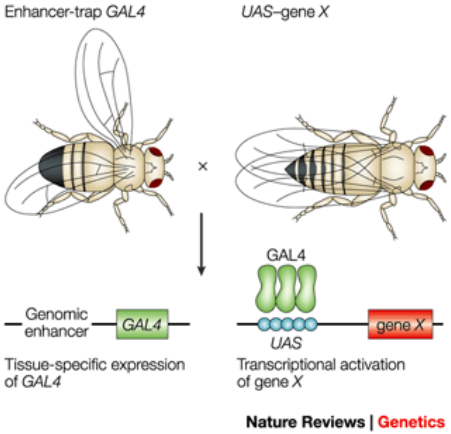
ALTERNATIVA OPOSADA?

Mosca adulta expressant el gen *eyeless* a les potes



ALTERNATIVA OPOSADA?

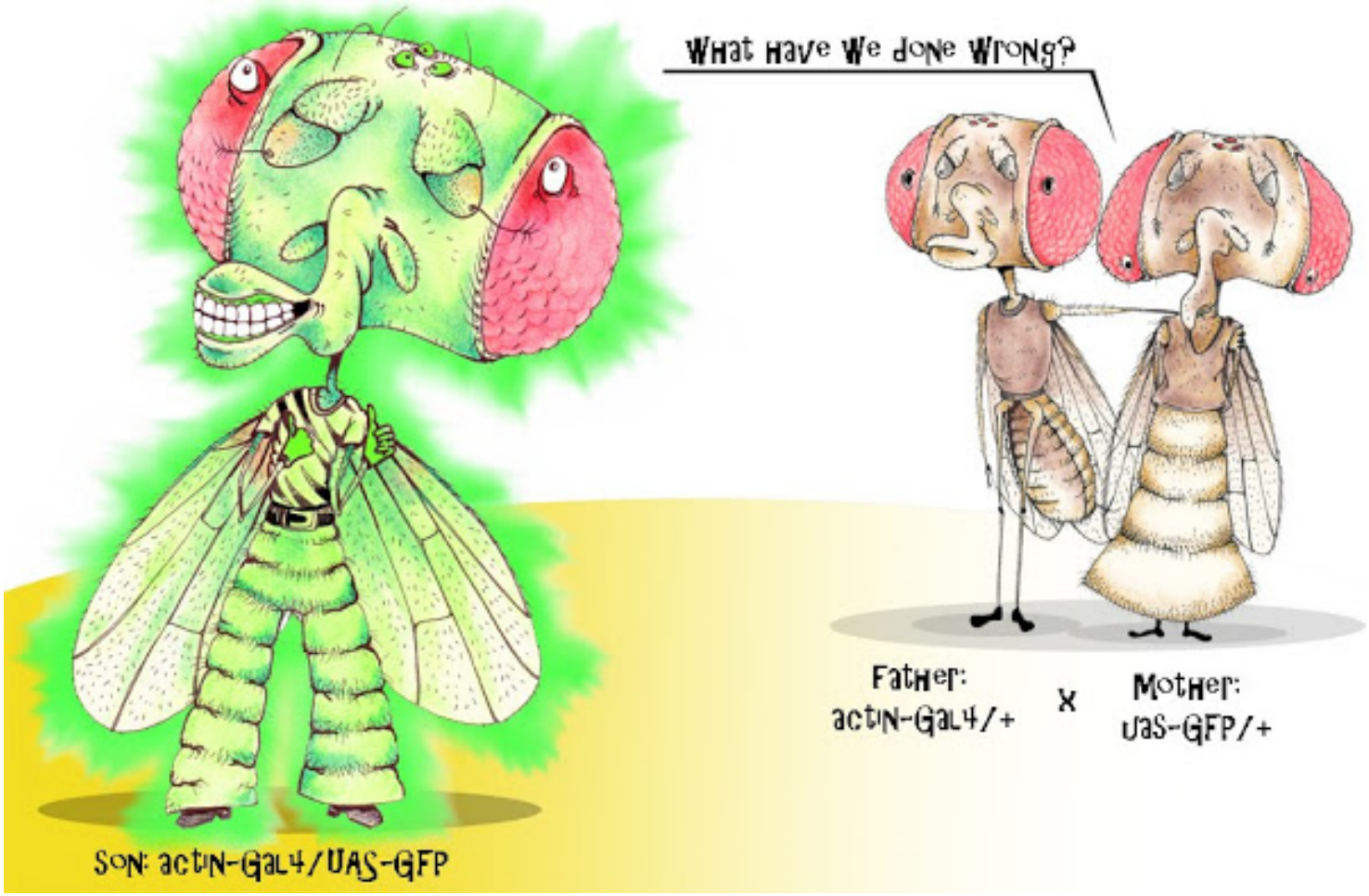




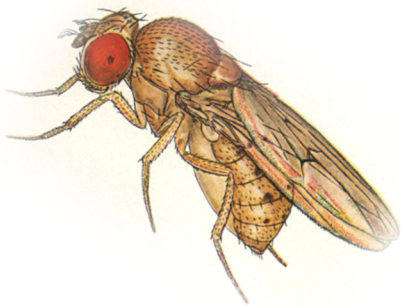
ALTERNATIVA OPOSADA?

Mosca adulta reprimint el gen *eyeless* als ulls

Sistema Gal4/UAS



IRB BARCELONA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA



I. Conceptes bàsics de genètica (kahoot)

Definicions

Genètica mendeliana

II. *Drosophila* melanogaster: molt més que una mosca!

El perquè de les mosques en investigació

Resum històric

III. Genètica i biotecnologia amb *Drosophila*

Del fenotip al gen

Mutagènesis

Sistema Gal4/UAS

IV. *Drosophila* com a model per entendre la biologia humana

IRB BARCELONA
INSTITUT DE RECERCA BIOMÈDICA

IV. *Drosophila* com a model per entendre la biologia humana

Identificar el gen/al·lel causant o involucrat en una enfermetat

Generar un model genètic a *Drosophila*

(creació de mosques transgèniques que expressin la mateixa mutació)

- Análisis fenotípic i molecular de la malaltia
- Cerca de mutacions secundaries modificadores (reduïr/incrementar)
- Testejar fàrmacs

IV. *Drosophila* com a model per entendre la biologia humana

Drosophila Models of Human Disease

www.flydiseasemodels.blogspot.com

Alzheimer's

Obesity

Cancer

Huntington's

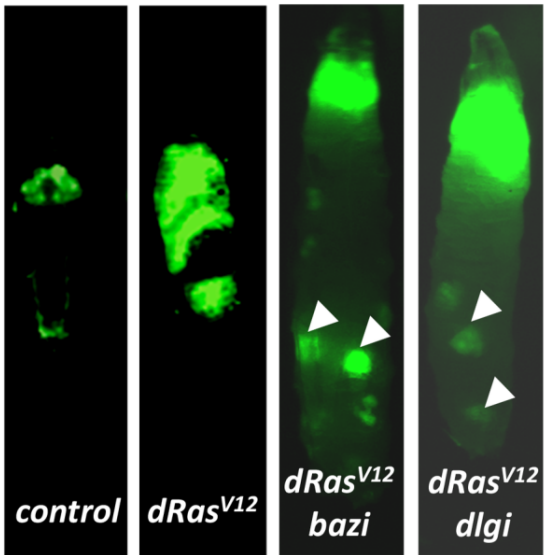
Diabetes

Parkinson's

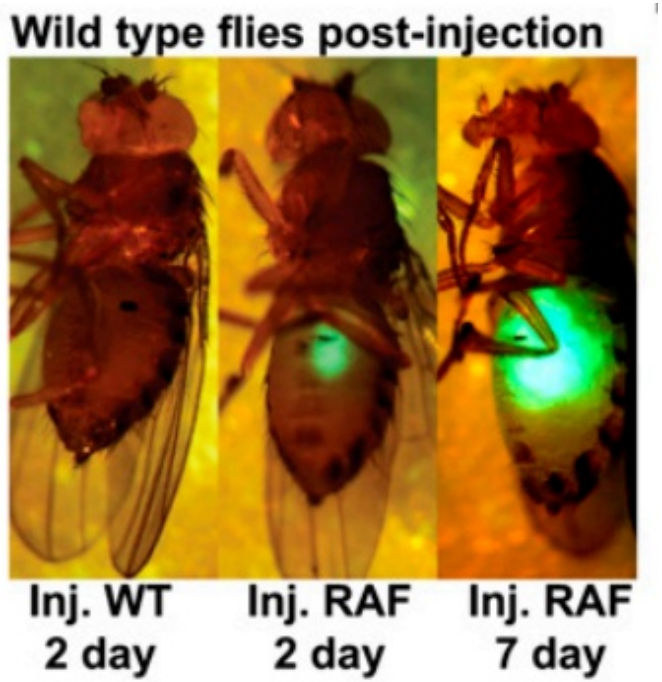
Deformacions congènites: Polidactilia

Malalties: càncer

Larva

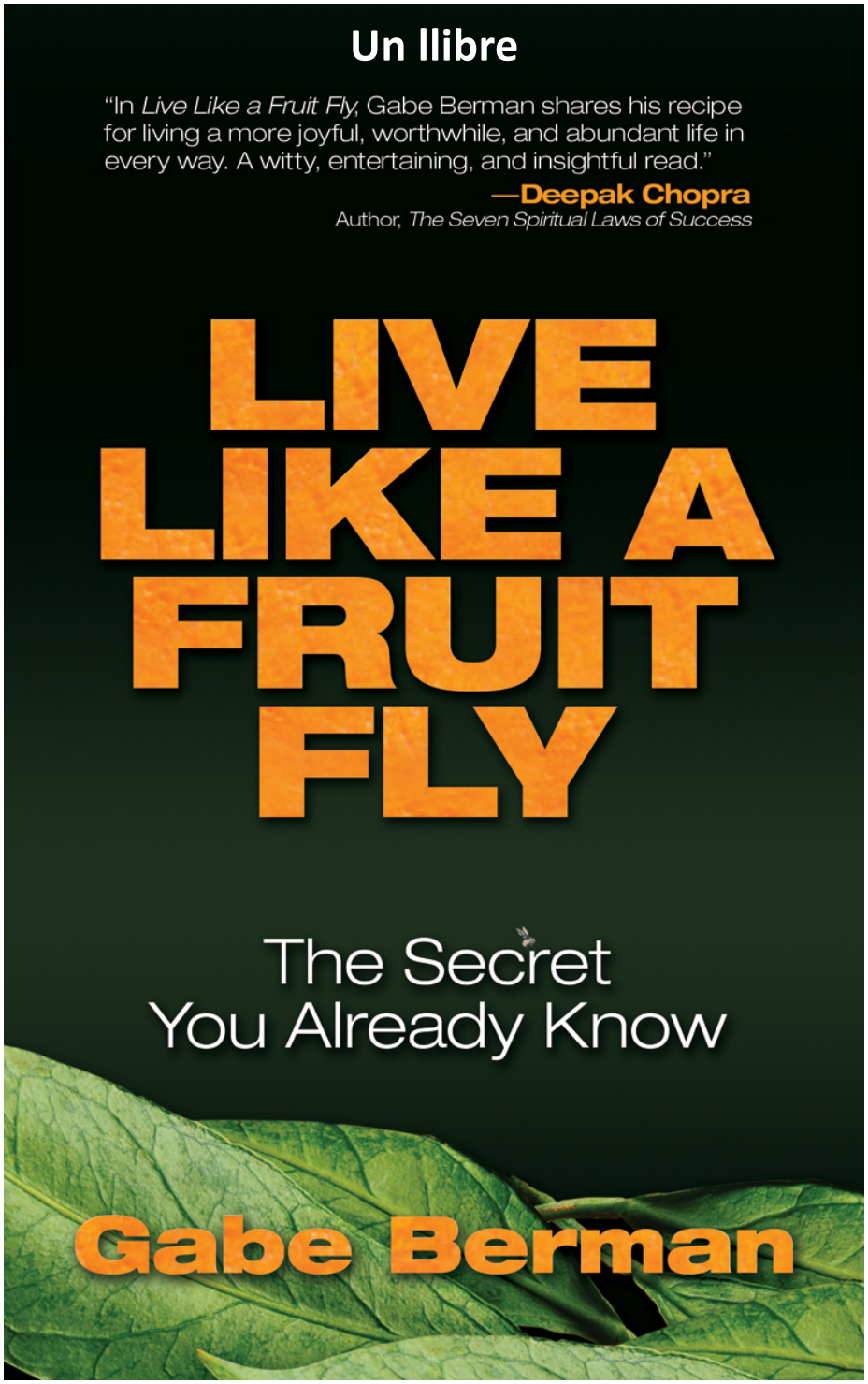


Adult



Tumour suppressors	Oncogenes
Hyperplastic • *warts* • *salvador* • *hippo* • *pten* • *tsc1* • *tsc2* • *expanded* • *merlin* • *fat* • *hyd* • *ago* • *mbt* **Neoplastic** • *lgl* • *scrib* • *dlg* • *tid* • *brat* **Neoplastic** • *lgl* • *scrib* • *dlg* • *brat* • *mbt*	**Hyperplastic** • *Ras^{ACT}* • *Notch^{ACT}* • *Src* **Neoplastic** • *Pvr^{ACT}*

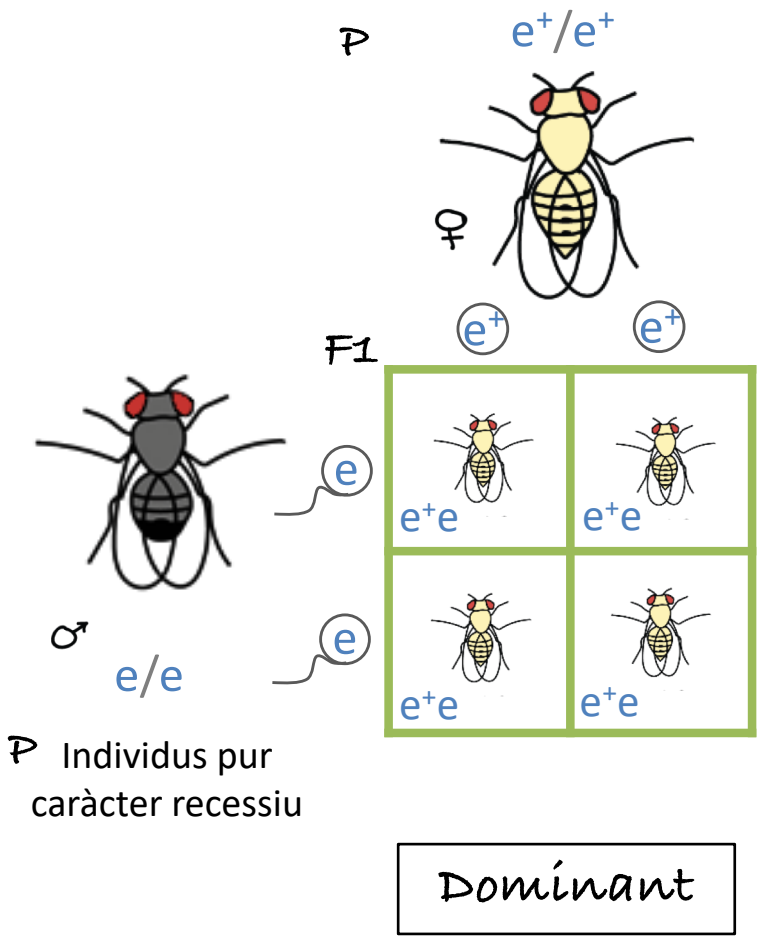
Una pel·lícula
A Film by Alexis Gambis
THE
FLY
ROOM


Un llibre
"In Live Like a Fruit Fly, Gabe Berman shares his recipe for living a more joyful, worthwhile, and abundant life in every way. A witty, entertaining, and insightful read."
—Deepak Chopra
Author, The Seven Spiritual Laws of Success
LIVE LIKE A FRUIT FLY
The Secret You Already Know
Gabe Berman

Les lleis de Mendel

"Llei de la uniformitat dels híbrids de la primera generació filial"

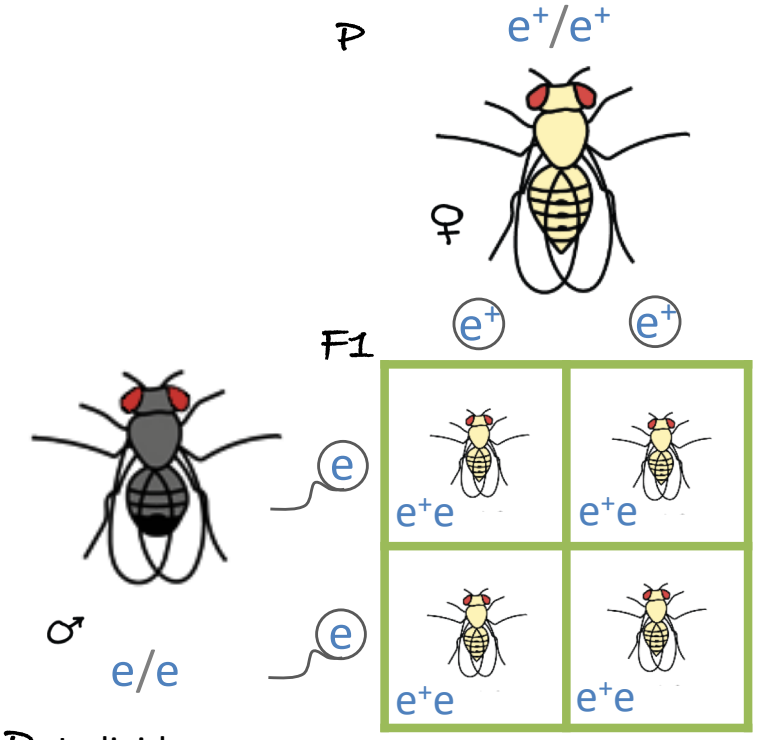
Individus pur, caràcter dominant



Les lleis de Mendel

"Llei de la uniformitat dels híbrids de la primera generació filial"

Individus pur, caràcter dominant

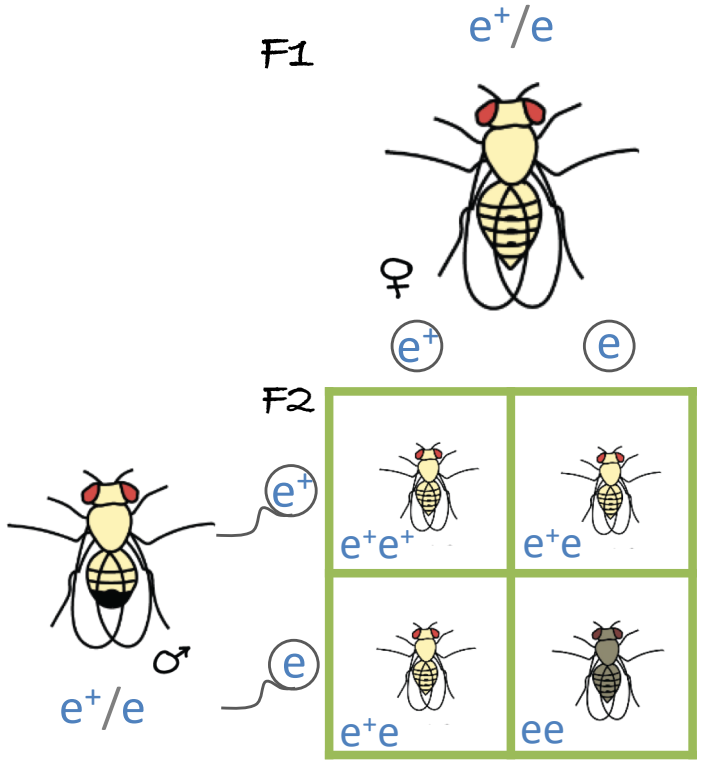


P Individus pur caràcter recessiu

Dominant

"Llei de la segregació de la generació filial"

Individu híbrid



Individu híbrid

3 : 1

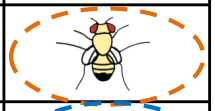
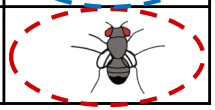
Les lleis de Mendel

"Llei de l'herència independent dels caràcters

P ♂ x ♀

e/e ; vg/vg ↓ e^+/e^+ ; vg^+/vg^+

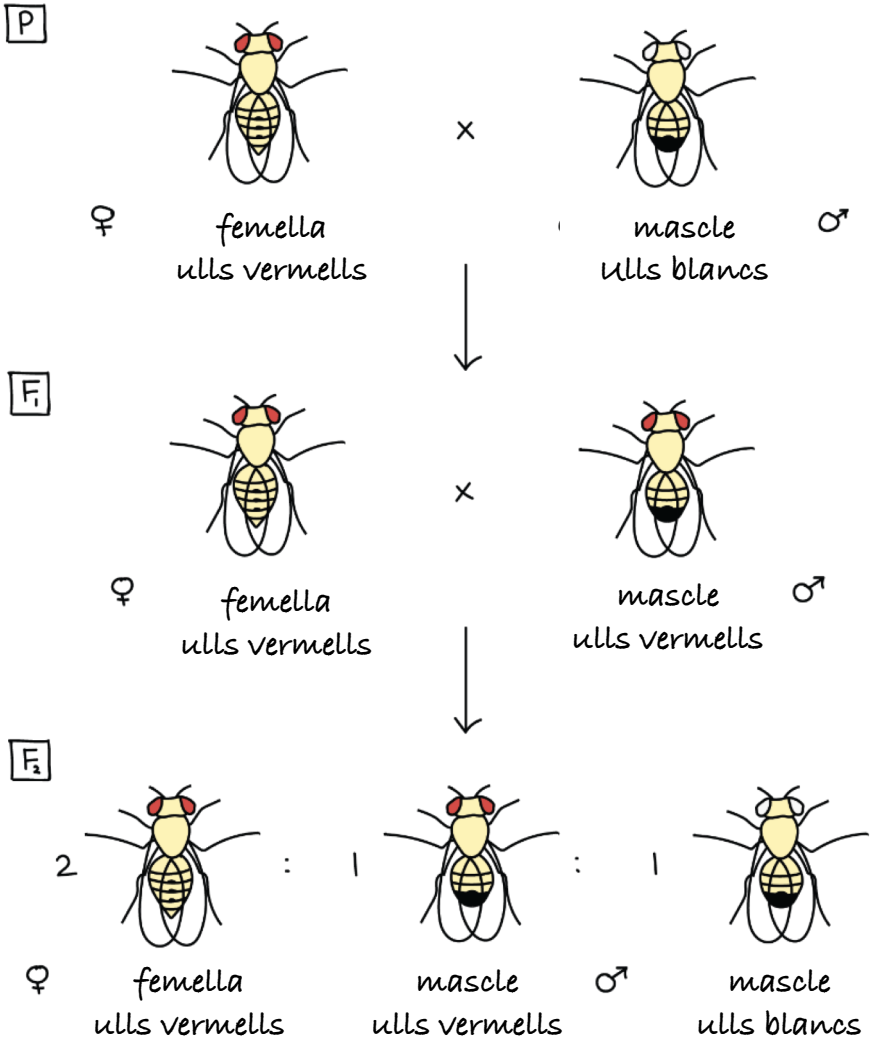
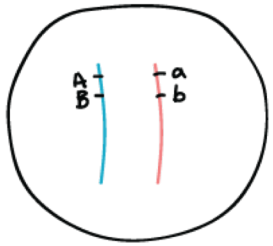
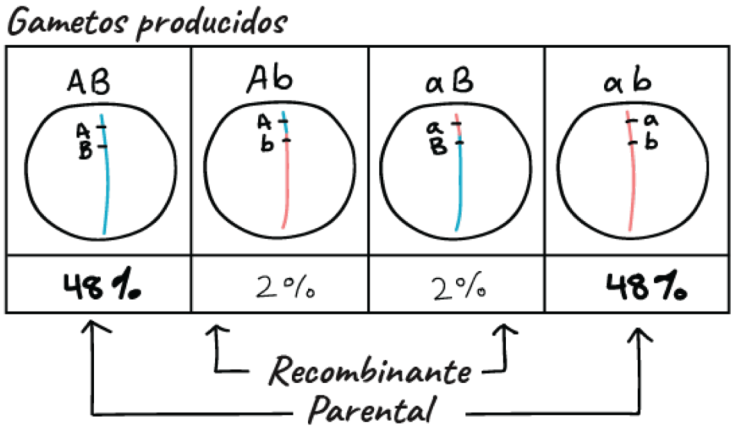
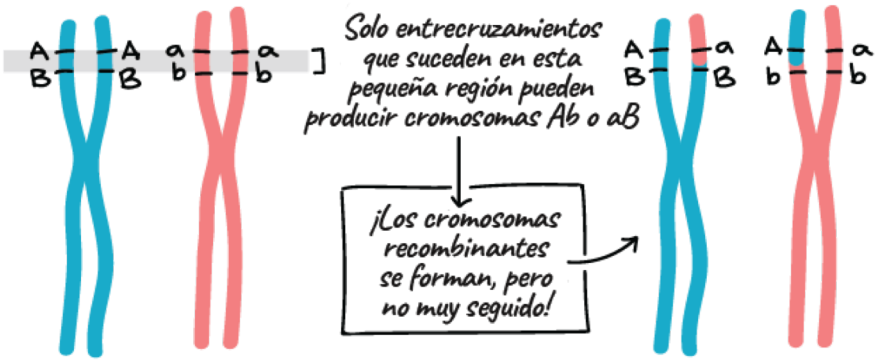
F1 e^+/e ; vg^+/vg

F2	e^+ ; vg^+	e^+ ; vg	e ; vg^+	e ; vg
e^+ ; vg^+				
e^+ ; vg				
e ; vg^+				
e ; vg				

9 : 3 : 3 : 1

Les lleis de Mendel: Excepcions!

Herencia lligada al sexe
(XY)



Gens lligats
(mateix cromosoma)