

Il modello Drosophila

Drosophila melanogaster: pro

- Modello per studiare lo sviluppo dello schema spaziale del corpo (embriologia sperimentale)
- Poco costoso
- 4 coppie di cromosomi
- Ca. 14.000 geni (10.000 nucleotidi in media)
- Generalmente presenti in singola copia
- Facile mutagenizzazione
- Libero accesso ai mutanti

Drosophila melanogaster: pro

- Parecchio DNA non codificante → funzione regolatoria
- Screen genetici sistematici → catalogo dei geni, molti mutanti, molti reagenti (x geni o proteine)
- → visibilità dello sviluppo e facile correlazione gene-proteina
- Geni mantenuti nell'evoluzione

Drosophila melanogaster: **contro**

- Embrioni complessi
- Difficili da manipolare
- Non trasparenti

Anni '80

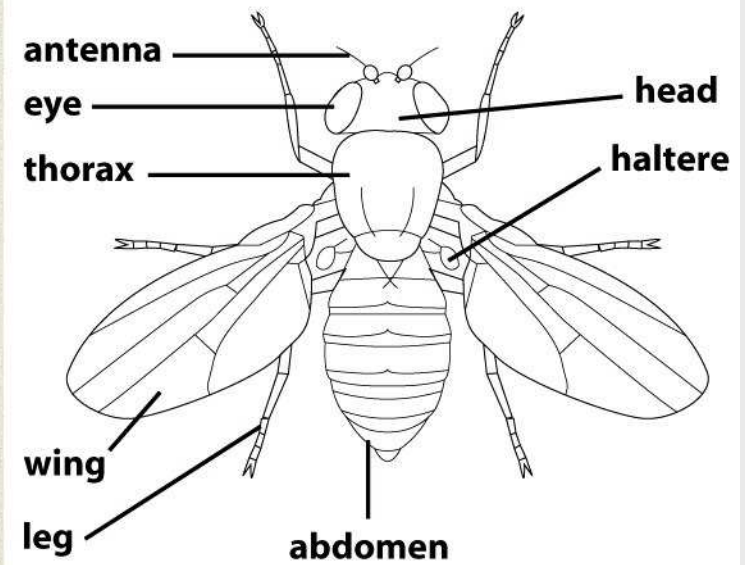
- Biologia molecolare ha rivoluzionato, collegando genetica, embriologia
- Biologia evolutivistica dello sviluppo
- Modello e meccanismi traslati a organismi superiori

Drosophila melanogaster



(A)

Figure 22-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



(B)

Animale con corpo a segmenti ripetuti

Sviluppo

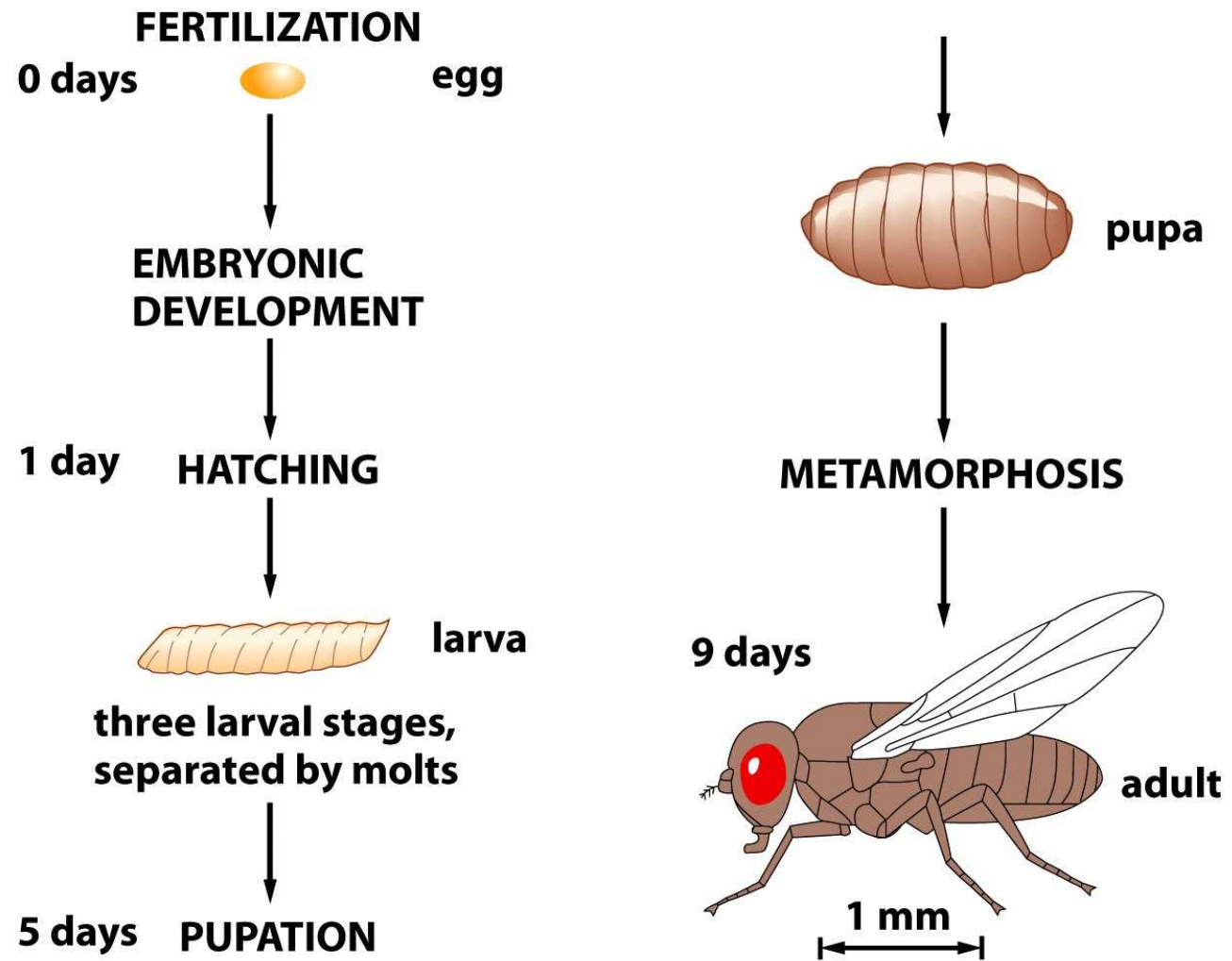
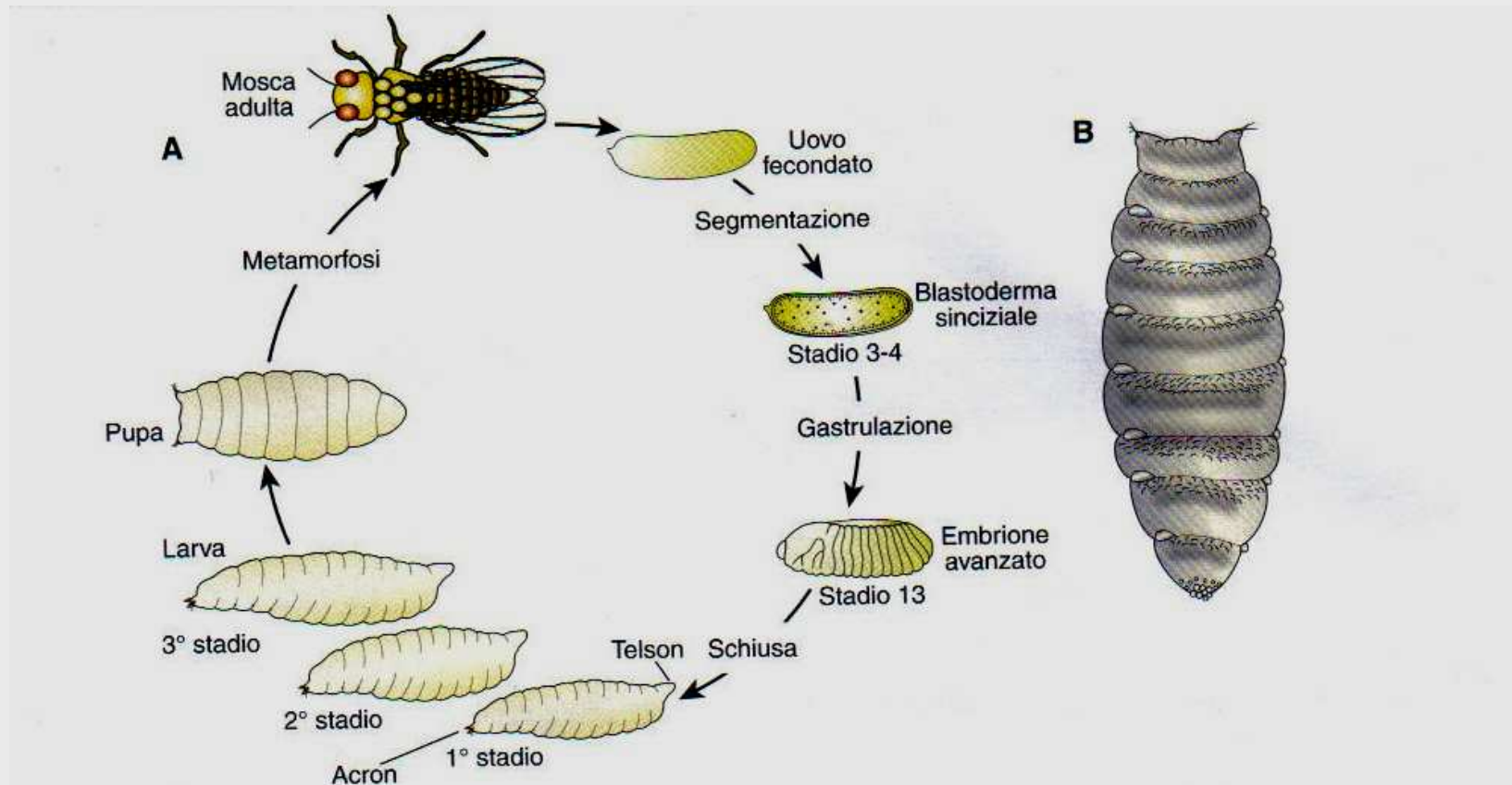


Figure 22-25 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

IL ciclo vitale di *Drosophila melanogaster*



- Uovo meroblastico centrolecitico
- Segmentazione superficiale
- sincizio fino al 13° ciclo divisione (energidi) → blastoderma sinciziale
- → blastoderma cellulare
- gastrulazione

Sviluppo dei segmenti corporei

2h: blastoderma
sinciziale

gastrulazione

5-8h: banda
germinale

10h: segmenti
ben definiti

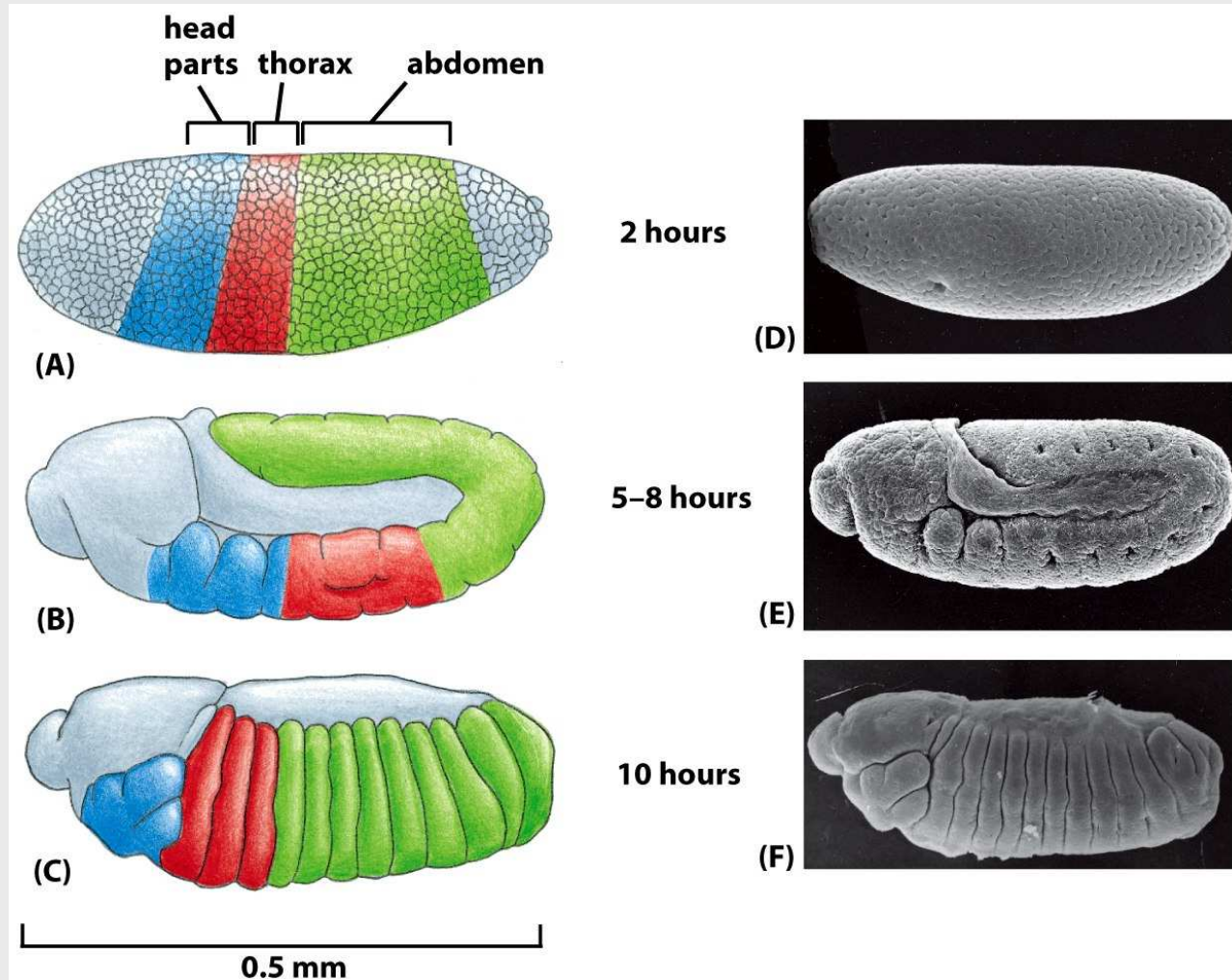


Figure 22-26 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Primi eventi

Invaginazione dell'intestino

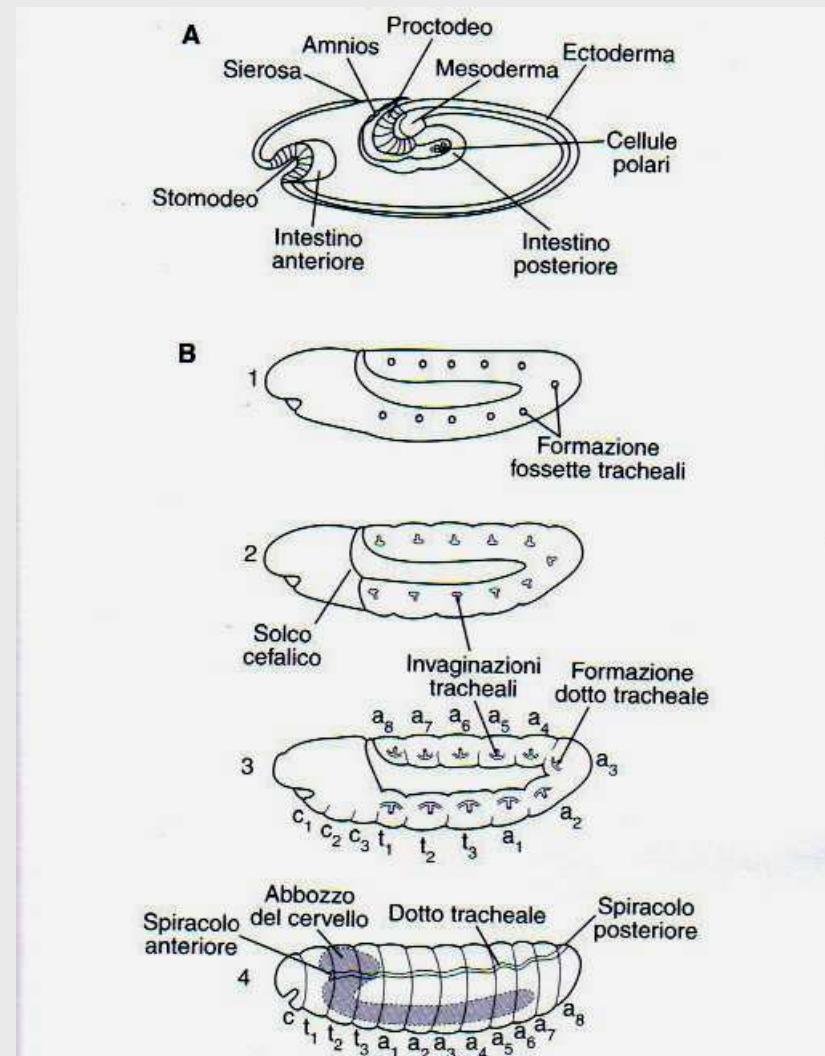
Banda germinale

Estensione della banda (6h)

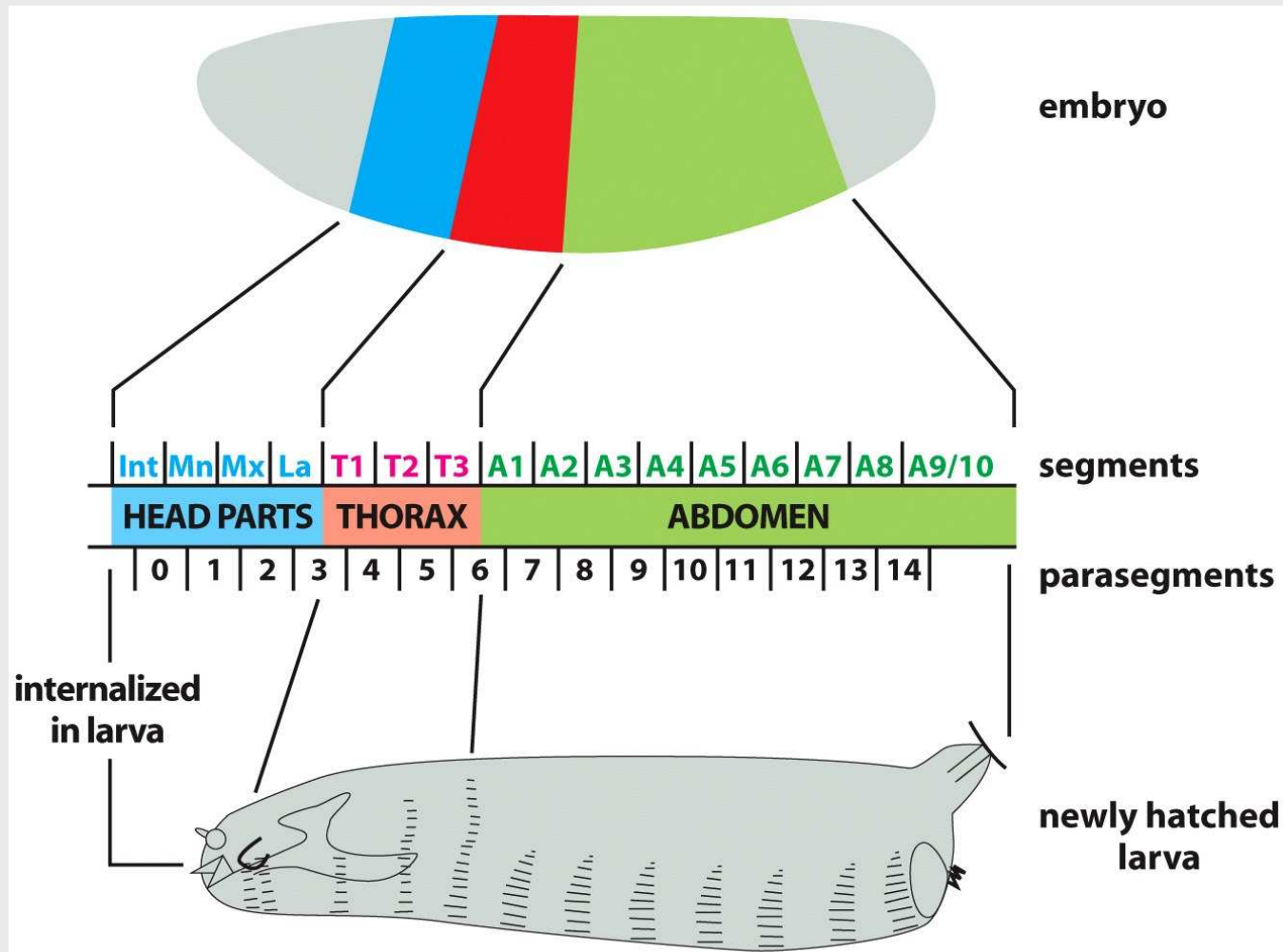
Appaiono i solchi (parasegmenti)

Retrazione della banda (12-14h)

Unico segmento cefalico



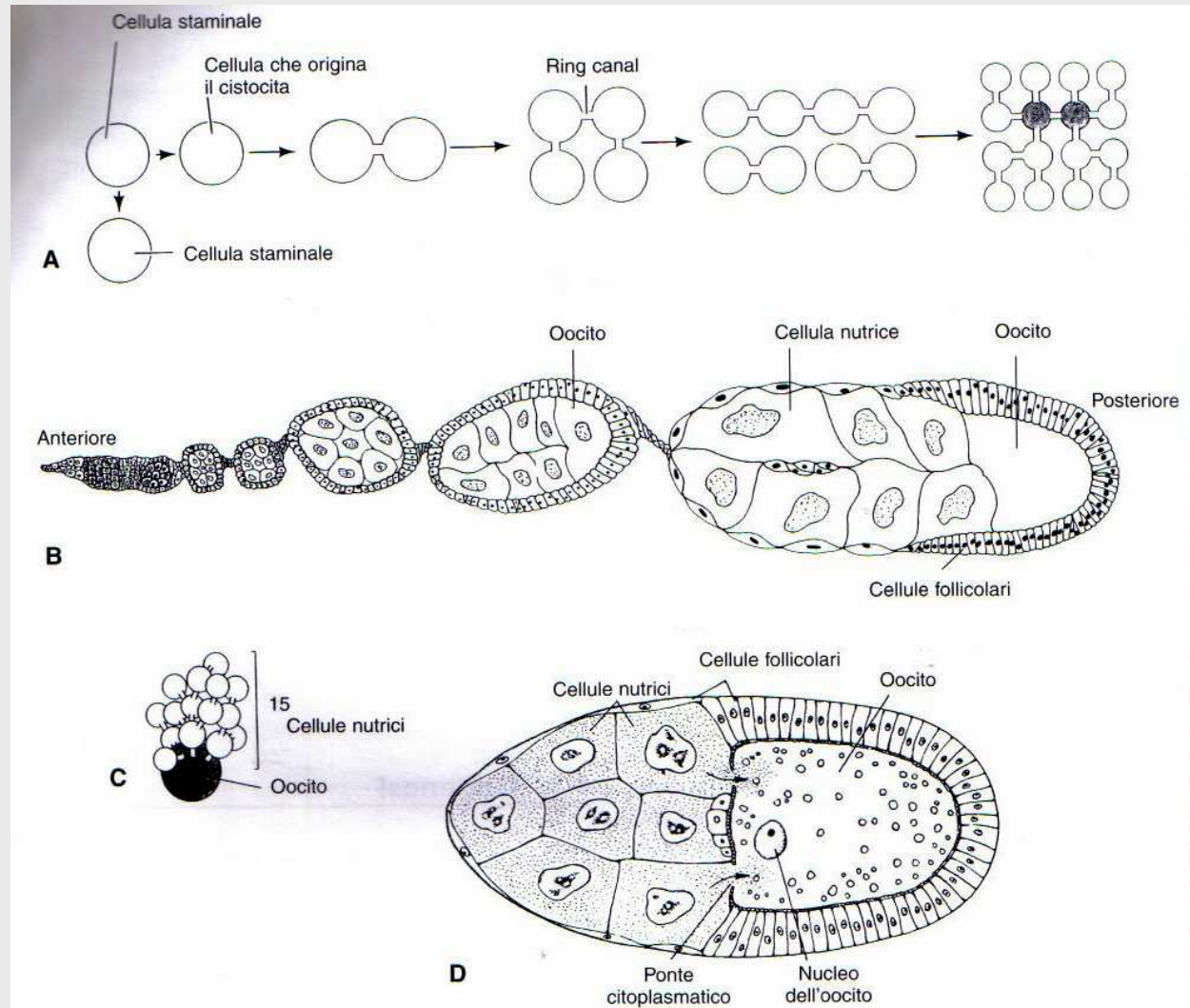
Segmentazione della larva



marcatori
anatomici
→ T1-3; A1-8

→ migliore
corrispondenza
a schema
dell'espressione
genica

Cellule nutrici, cellule follicolari e cellula uovo



Sviluppo di un oocita di Drosophila

1 **cellula polare Pr**

→ 4 divisioni:

16 cellule unite da ponti
citoplasmatici

→ 1 diventa oocita; le altre
saranno cellule nutrici

Cellule follicolari: danno il
segnale per
ventralizzazione

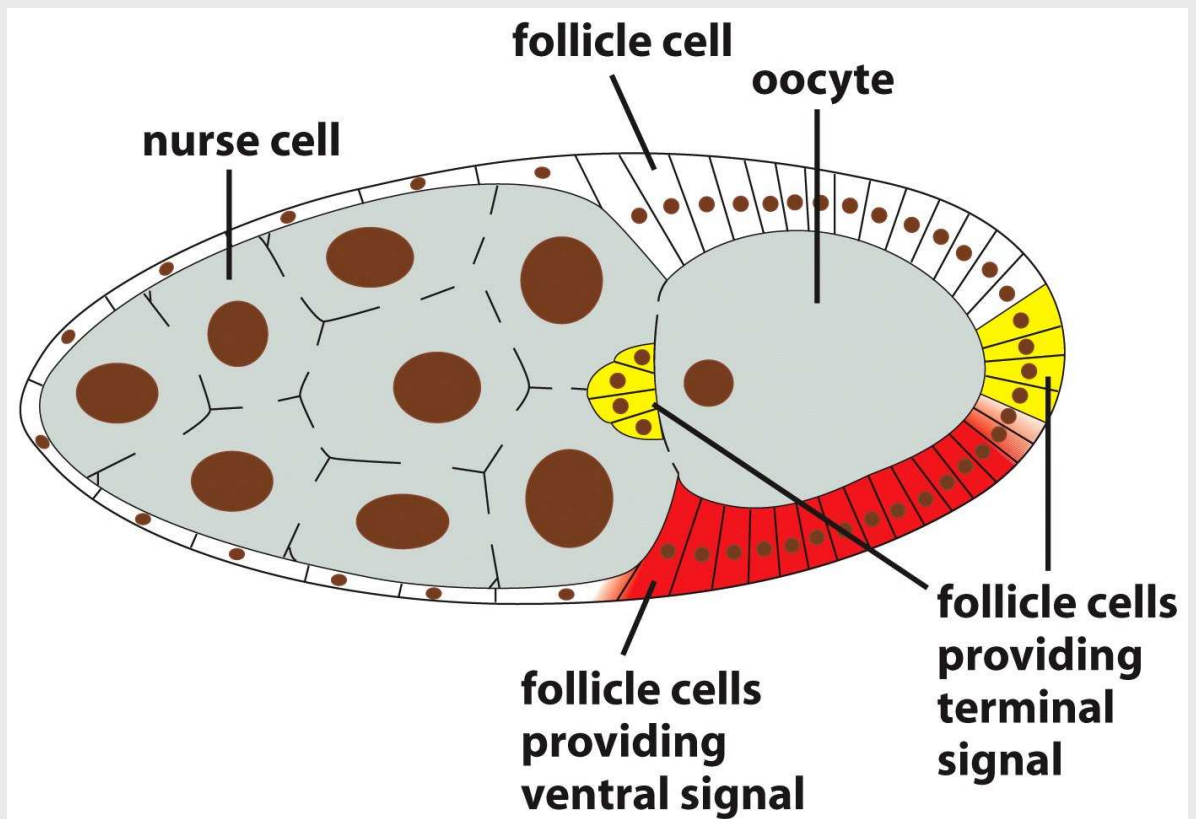


Figure 22-31 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fecondazione e segmentazione

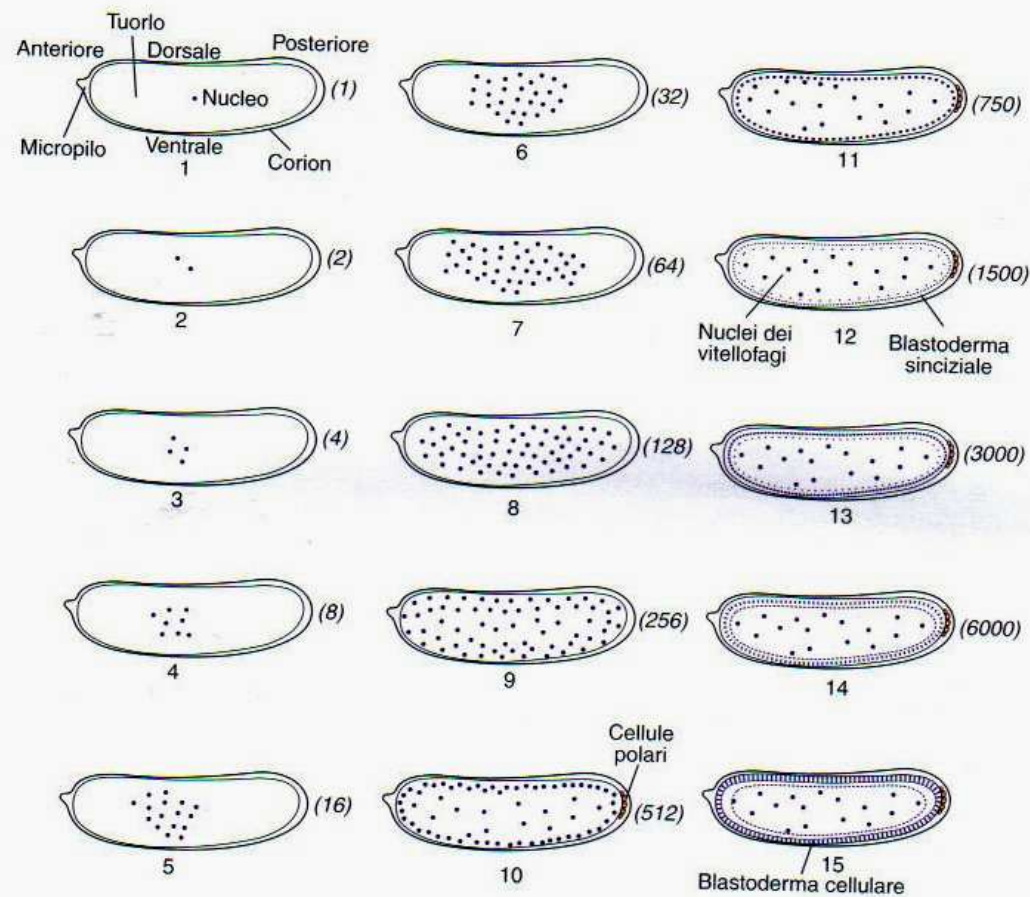
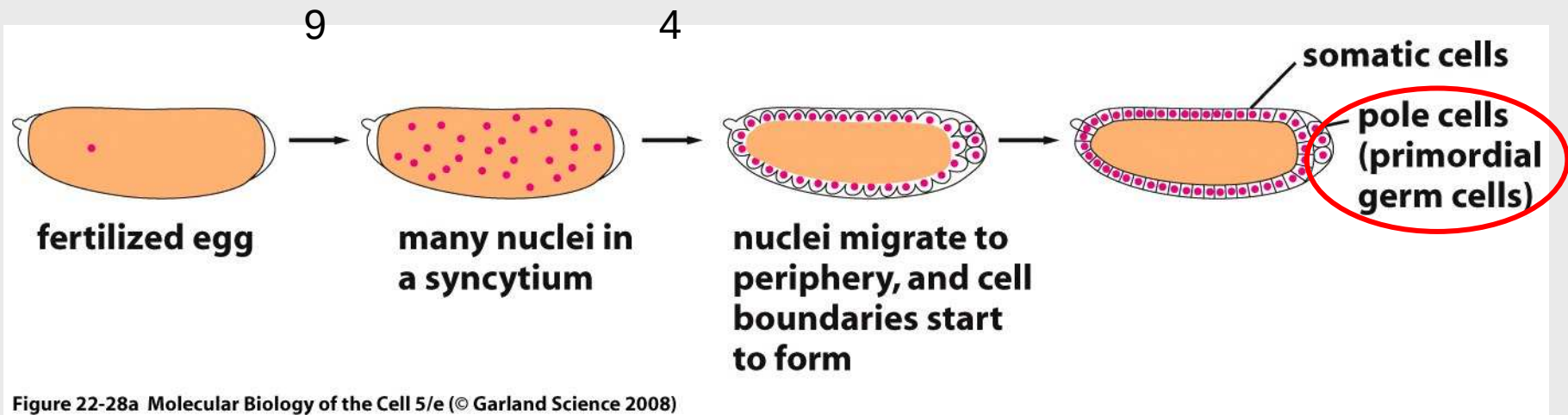


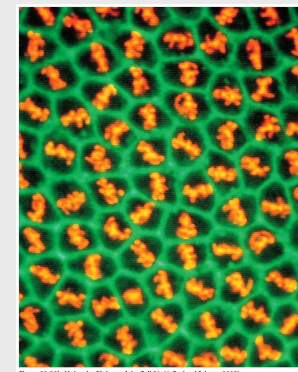
Figura 3

Blastoderma sinciziale → blastoderma cellulare



blastoderma
sinciziale

blastoderma
cellulare
(6000 cellule)



Cromosomi
actina

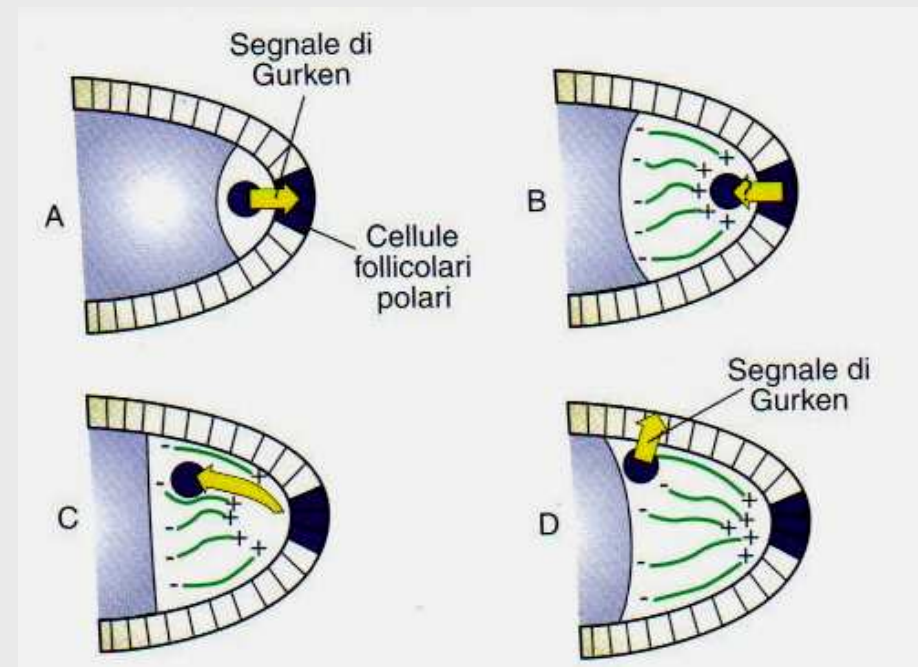
Figure 22-28b: Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Geni attivati in successione

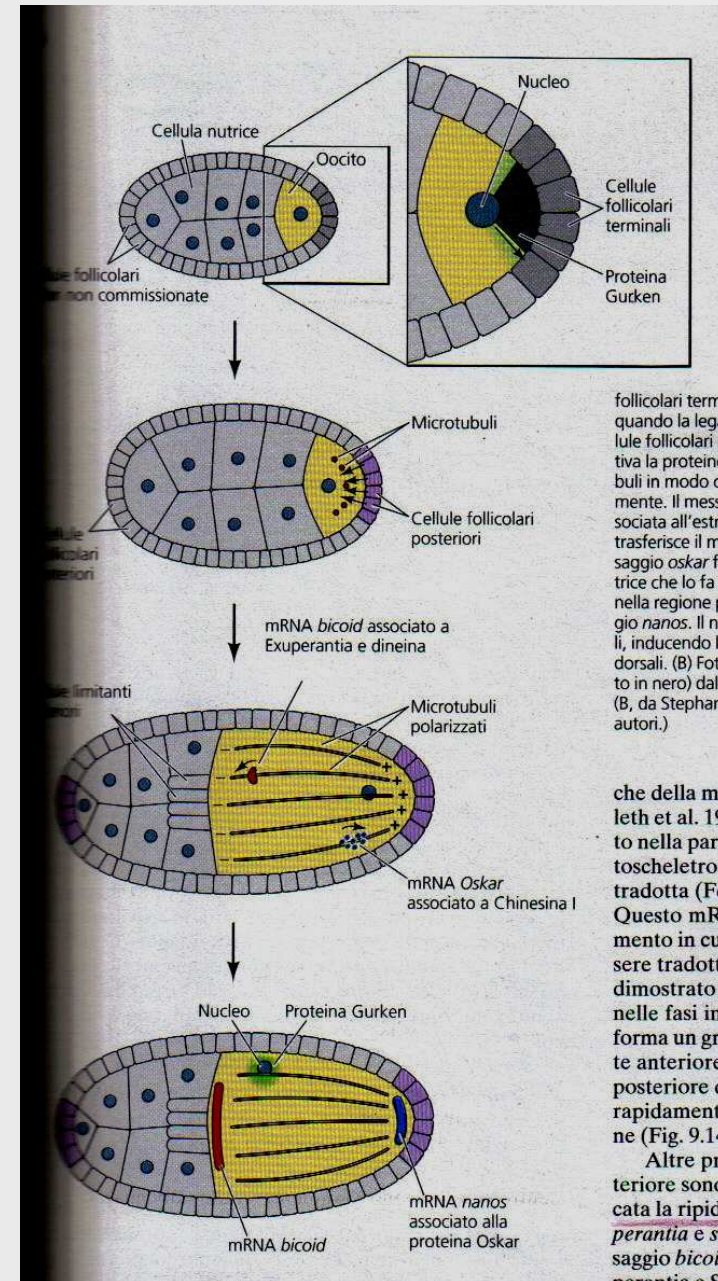
- Geni di origine materna (mRNA immagazzinati)
- Geni zigotici
- Geni per la segmentazione:
 - Gap
 - Pair rule
 - Segment polarity
- Geni per l'identità del segmento corporeo

Compartimentalizzazione di mRNA nell'oocita

- Ruolo dei microtubuli
- Chinesina → post
- Dineina → ant
- Nucleo → ant
- Gurken induce destino delle cellule follicolari



- Ruolo dei microtubuli
 - Dineina → ant
 - Chinesina → post
 - Nucleo → ant
-
- Gurken induce destino delle cellule follicolari



Espressione controllata e gerarchica nel tempo delle diverse classi di geni

Con sonde (cDNA o anticorpi) si può vedere l'espressione

Induzione sequenziale man mano definisce i dettagli

Confronto larva normale/mutante

La maggior parte codifica proteine regolatrici

Gradiente globale nell'uovo →
controlli di posizione progressivamente
+ localizzati
→ schema corporeo sempre più
dettagliato

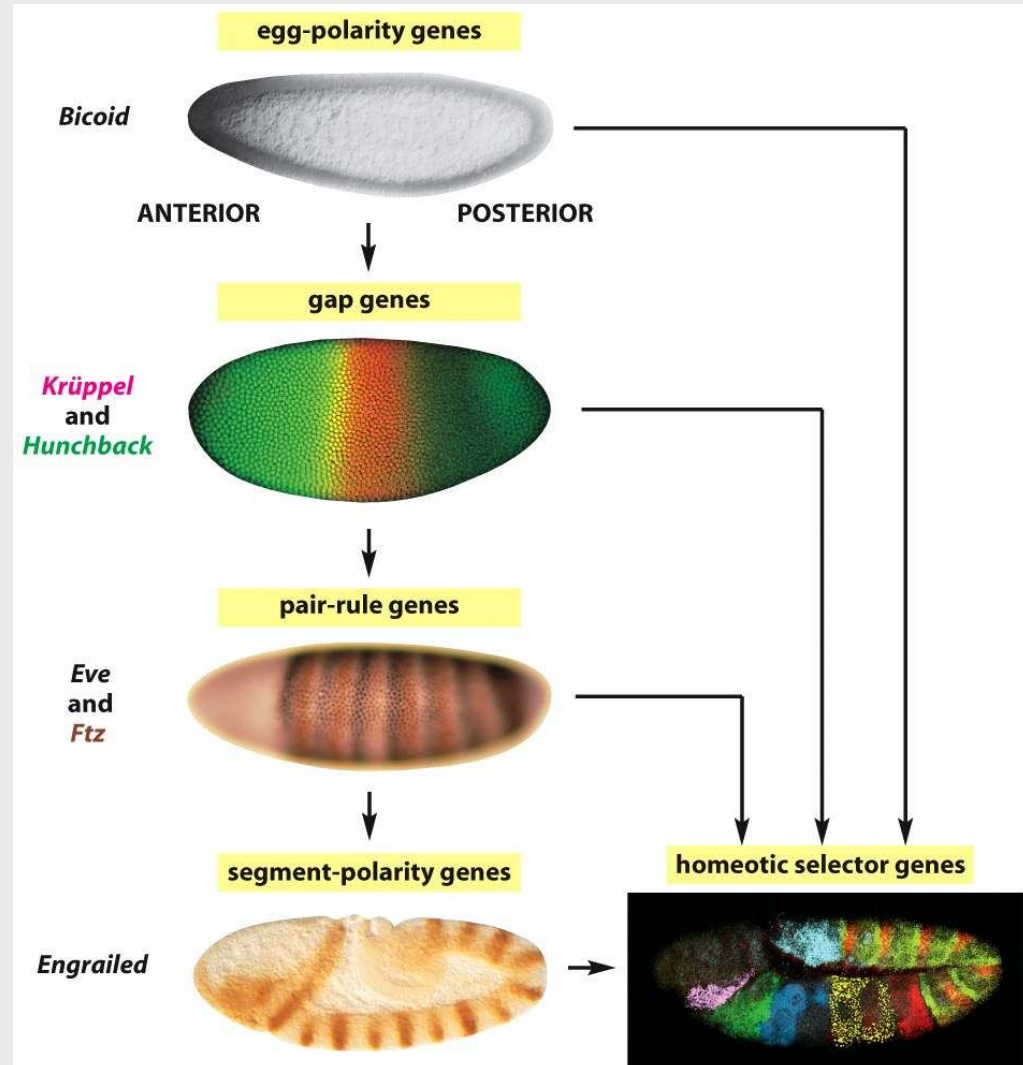
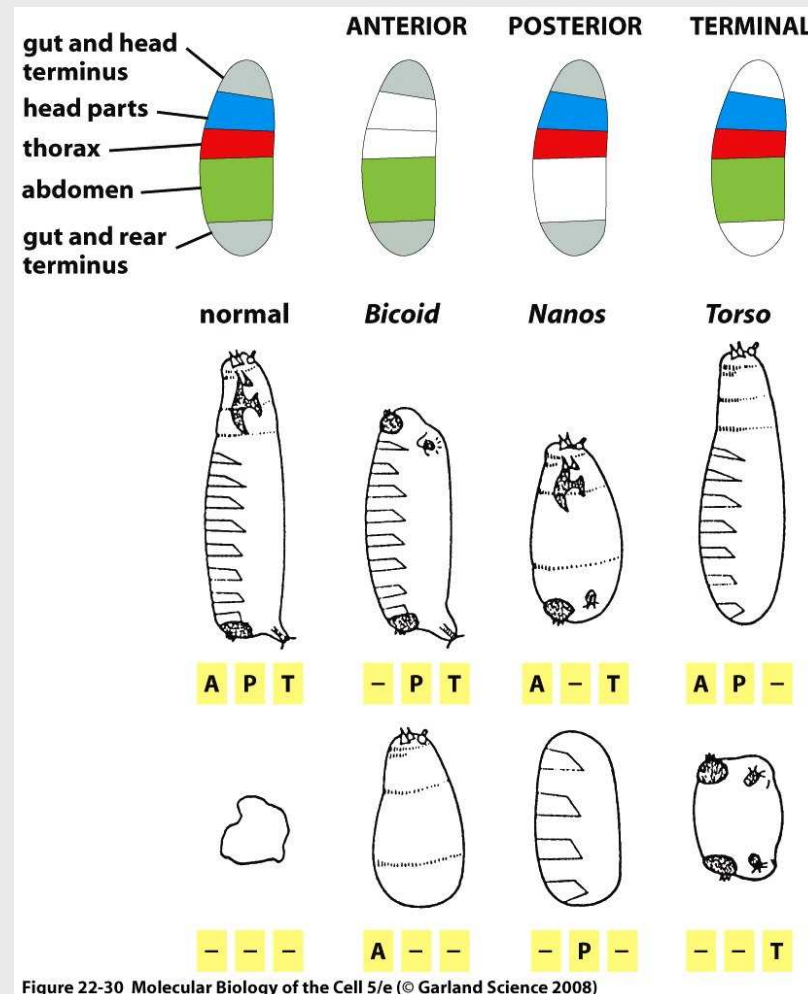


Figure 22-38 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Catalogo dei geni secondo fenotipo mutante (esempio: x asse ant-post)

- Mutazione (inattivazione) a carico di un particolare sistema genico → perdita delle strutture di quel tratto corporeo



Catalogo dei geni secondo fenotipo mutante

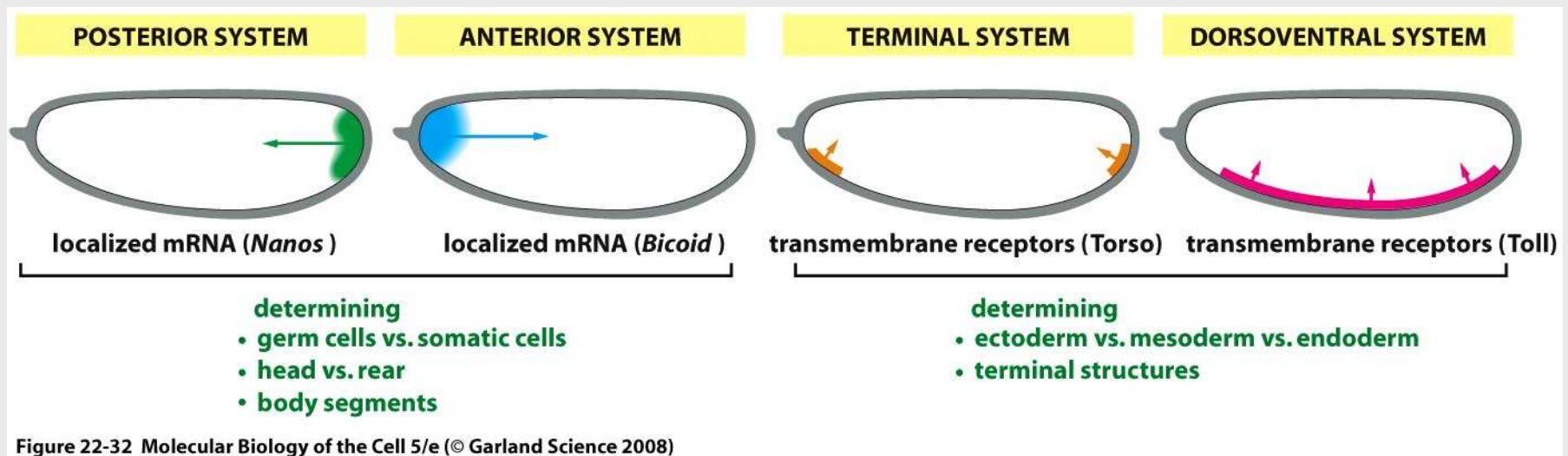
- Gruppo di geni con fenotipi mutanti simili codifica serie di proteine coinvolte in una particolare funzione
- → raggruppamento dei geni in classi in base ai fenotipi mutanti

Geni attivati in successione

- Geni di origine materna (mRNA immagazzinati)
- Geni per la segmentazione:
 - Gap (geni zigotici)
 - Pair rule
 - Segment polarity
- Geni per l'identità del segmento corporeo

Determinazione della polarità dell'uovo

(distribuzione asimmetrica di mRNA di origine **materno**)



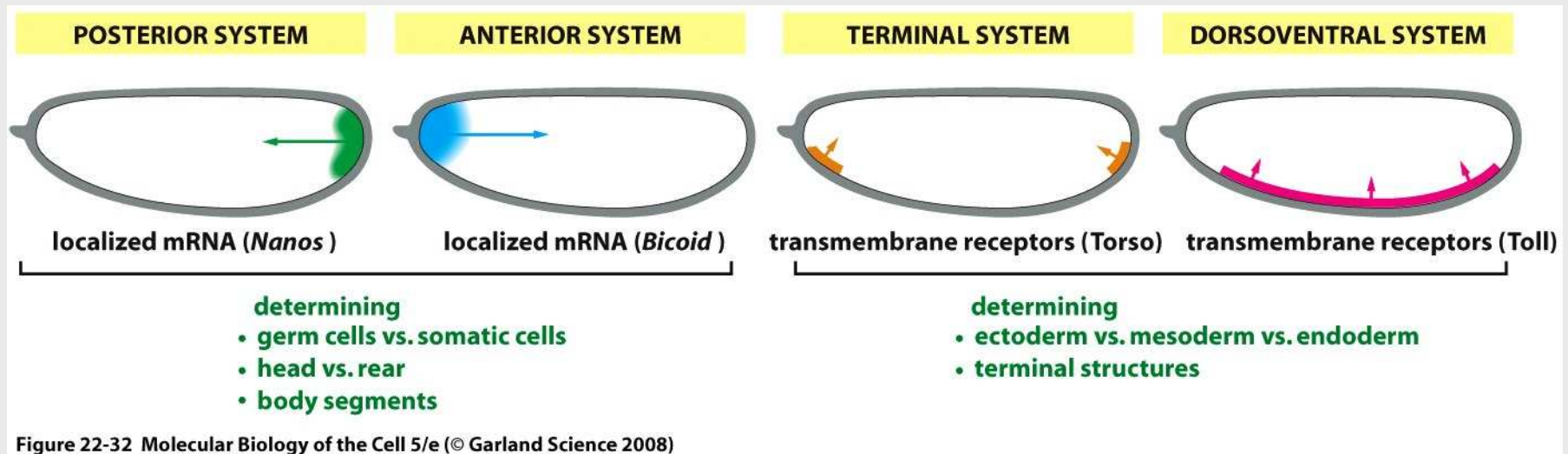
Asse ant-post

Asse dorso-ventr

Nanos usato anche da *C. elegans* → universale; **Toll** usato nell'immunità naturale

Determinazione della polarità dell'uovo

(distribuzione asimmetrica di mRNA di origine **materno**)



Asse ant-post

Asse dorso-ventr

Nanos usato anche da *C. elegans* → universale; **Toll** usato nell'immunità naturale

Bicoid (mRNA e proteina)

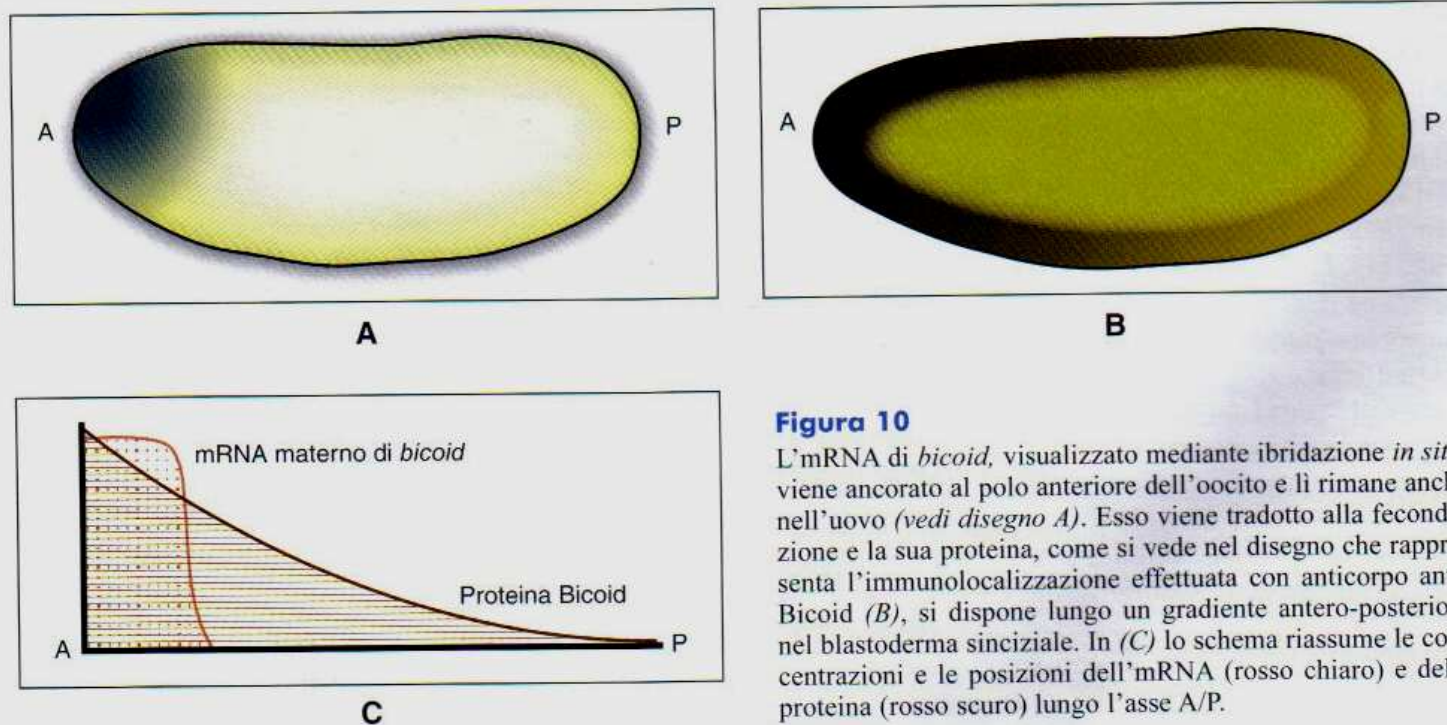
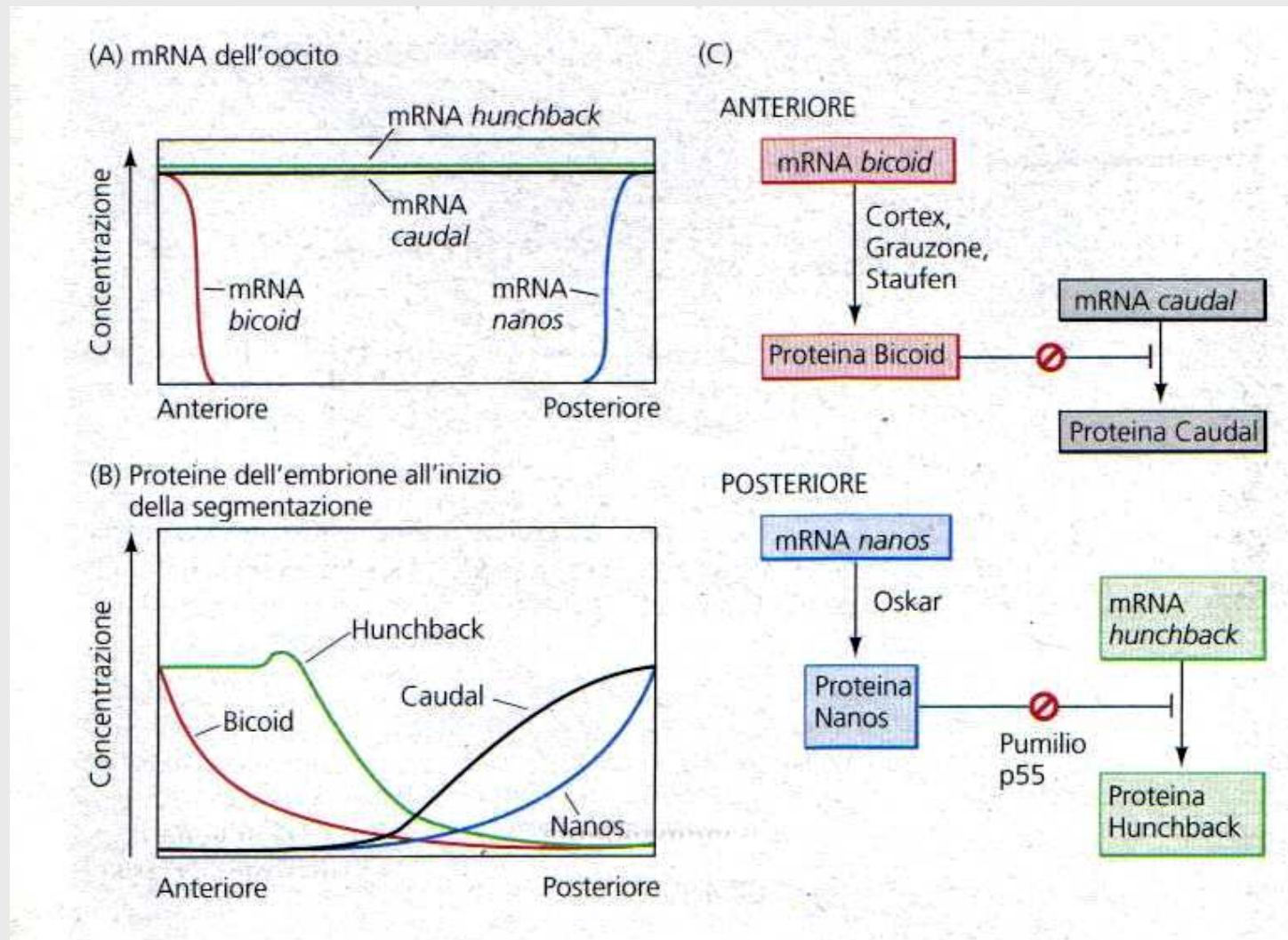


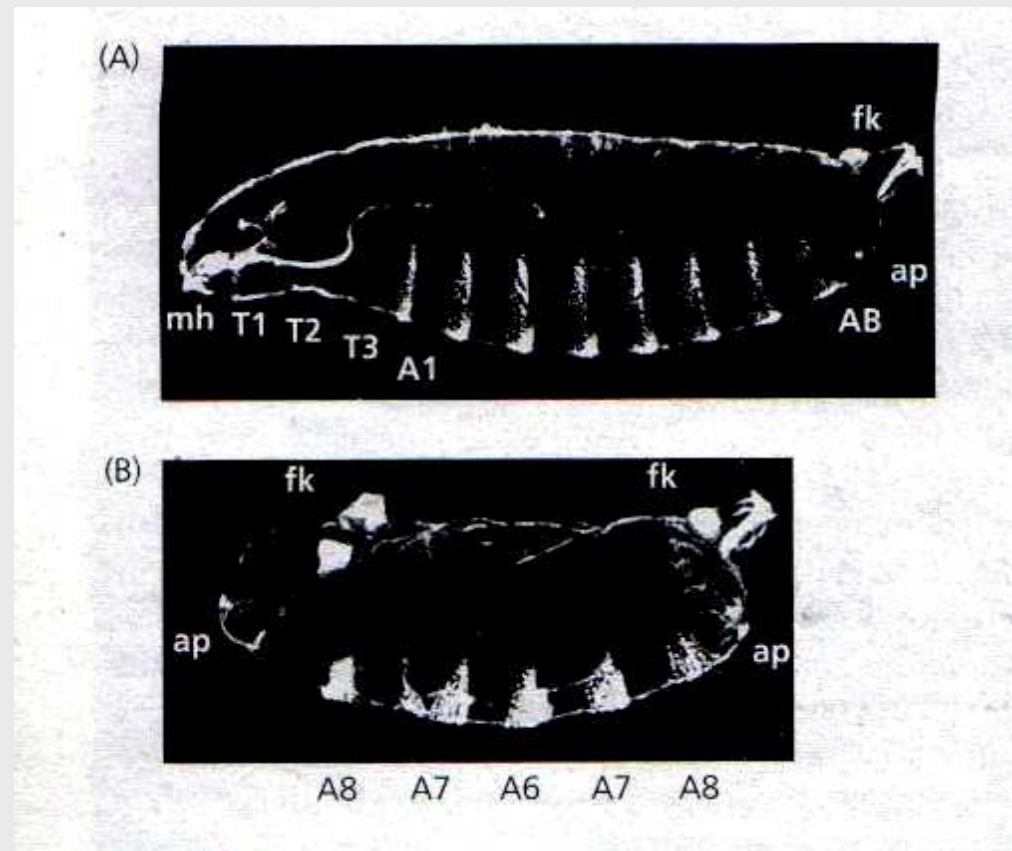
Figura 10

L'mRNA di *bicoid*, visualizzato mediante ibridazione *in situ*, viene ancorato al polo anteriore dell'oocito e lì rimane anche nell'uovo (vedi disegno A). Esso viene tradotto alla fecondazione e la sua proteina, come si vede nel disegno che rappresenta l'immunolocalizzazione effettuata con anticorpo anti-Bicoid (B), si dispone lungo un gradiente antero-posteriore nel blastoderma sinciziale. In (C) lo schema riassume le concentrazioni e le posizioni dell'mRNA (rosso chiaro) e della proteina (rosso scuro) lungo l'asse A/P.

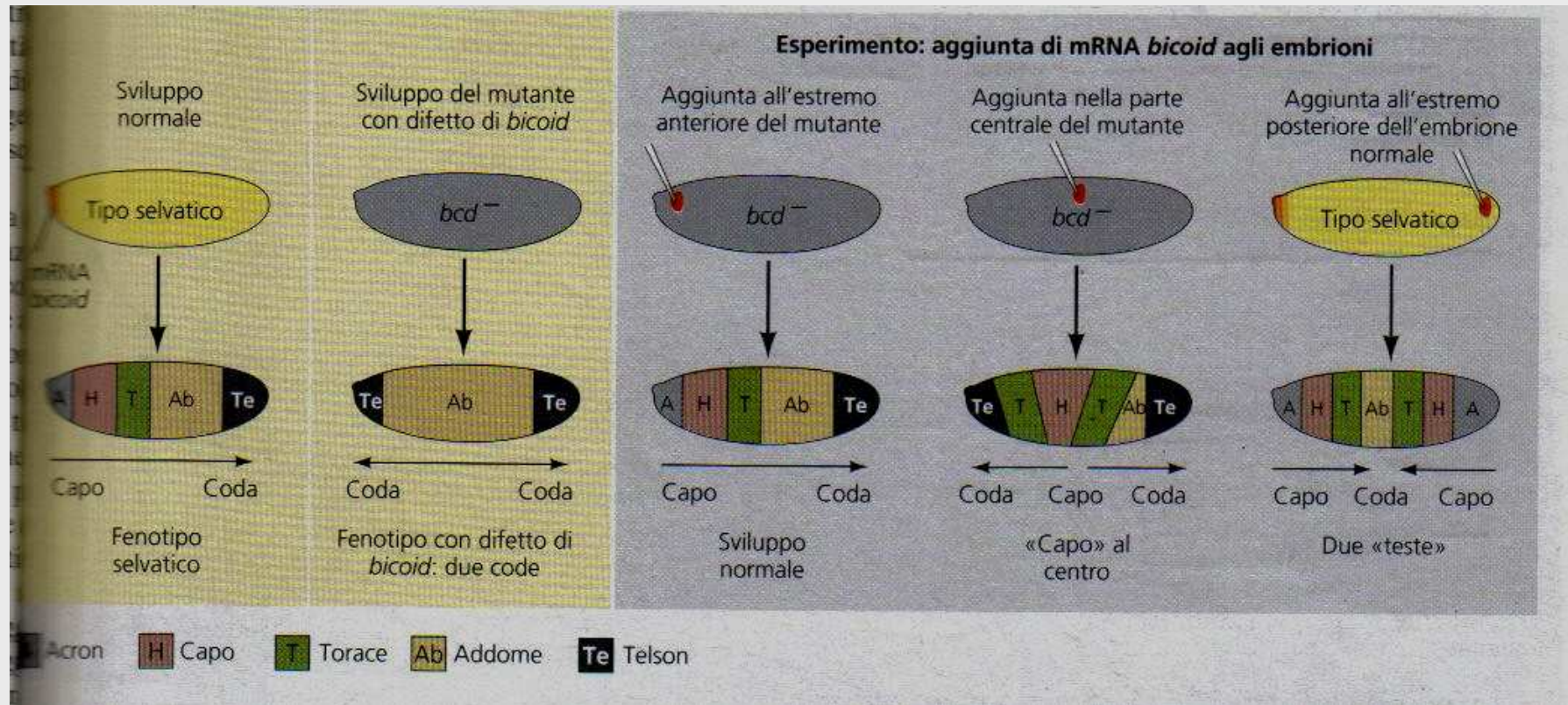
mRNA materni concorrono alla formazione dell'asse ant-post



Mutante bicoid: solo strutture posteriori



Espressione ectopica di Bicoid esogeno nel mutante

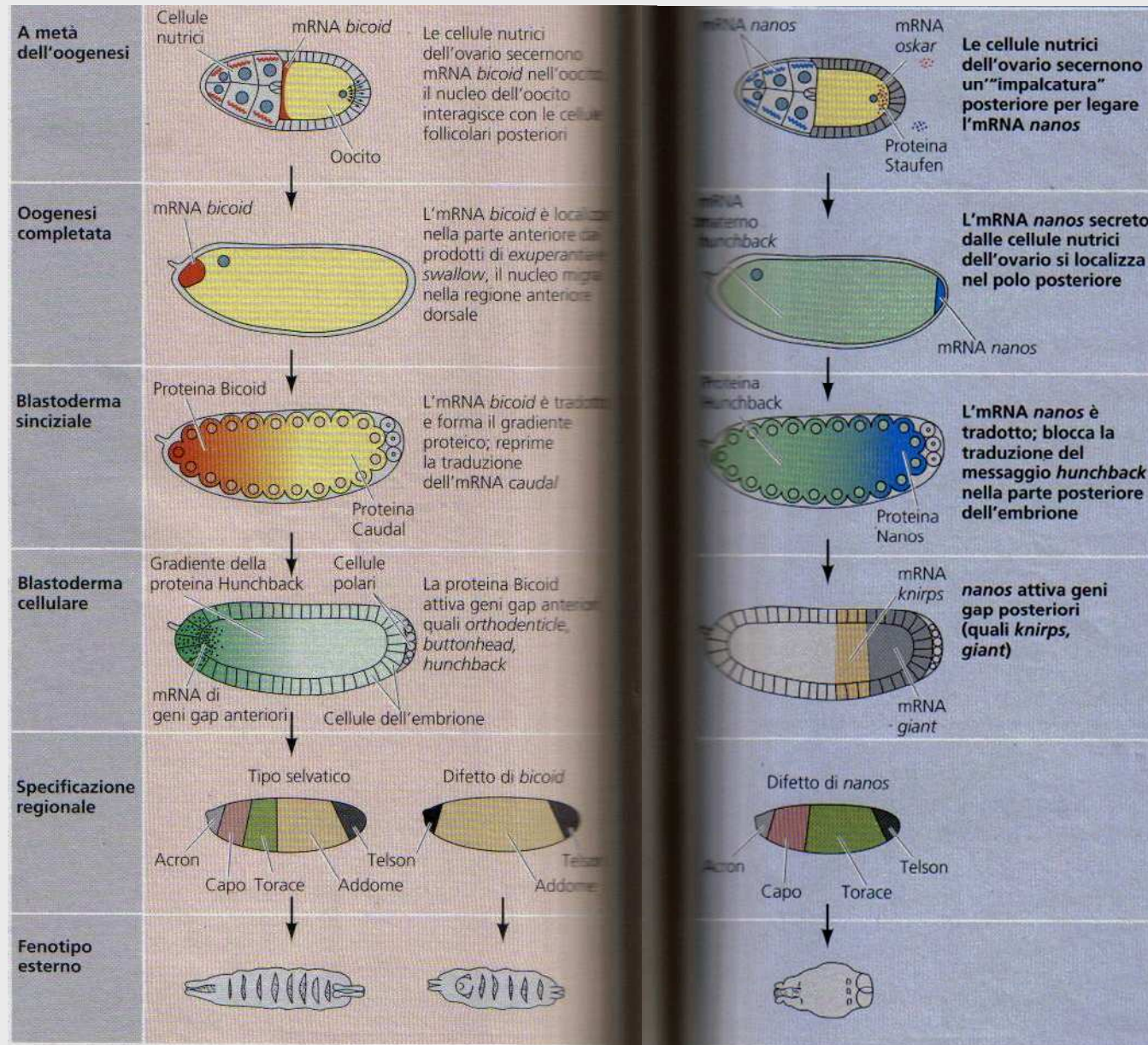


Asse ant-post

stadio

anteriore: bicoid

posteriore: nanos



Bicoid

- → hunchback
- --| caudal
- Coopera con hunchback per indurre espressione dei geni che operano successivamente per zone anteriori

Nanos

- → caudal
- --| hunchback
- induce espressione dei geni che operano successivamente per zone posteriori

Asse ant-post: estremità: torso

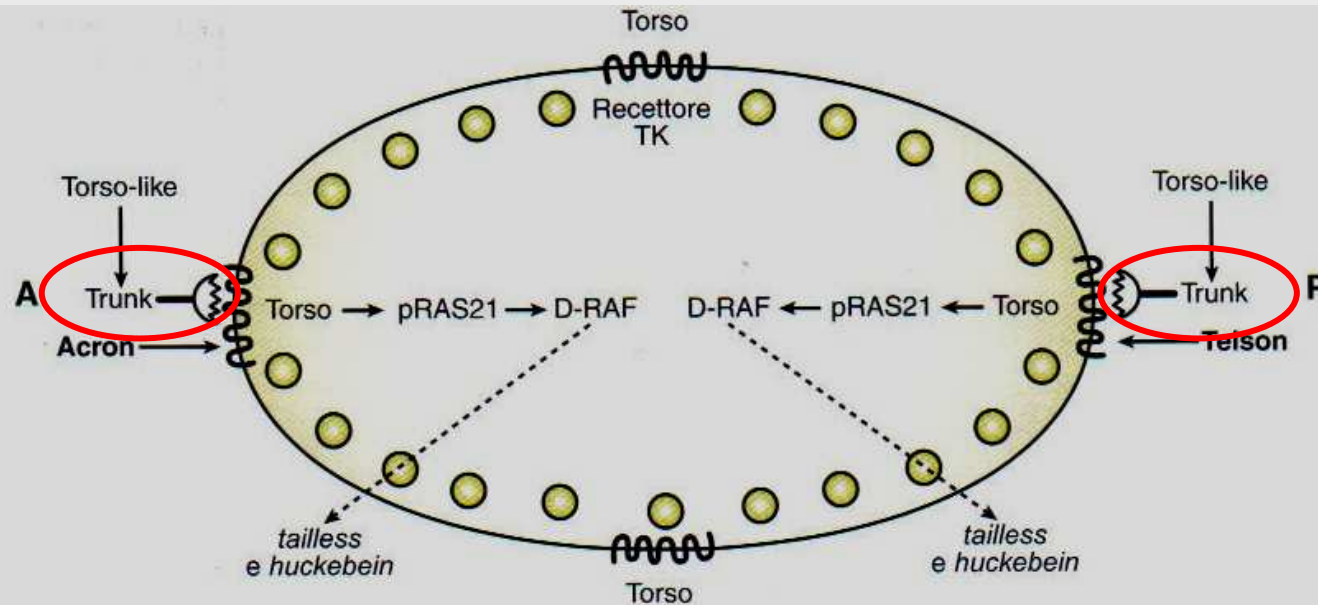
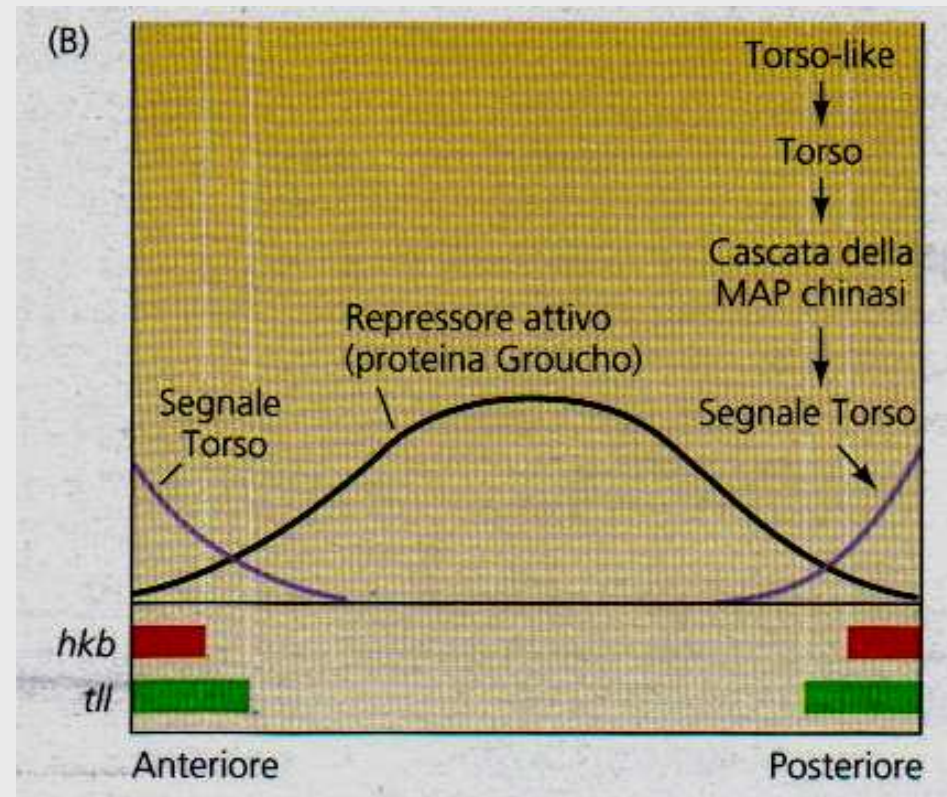
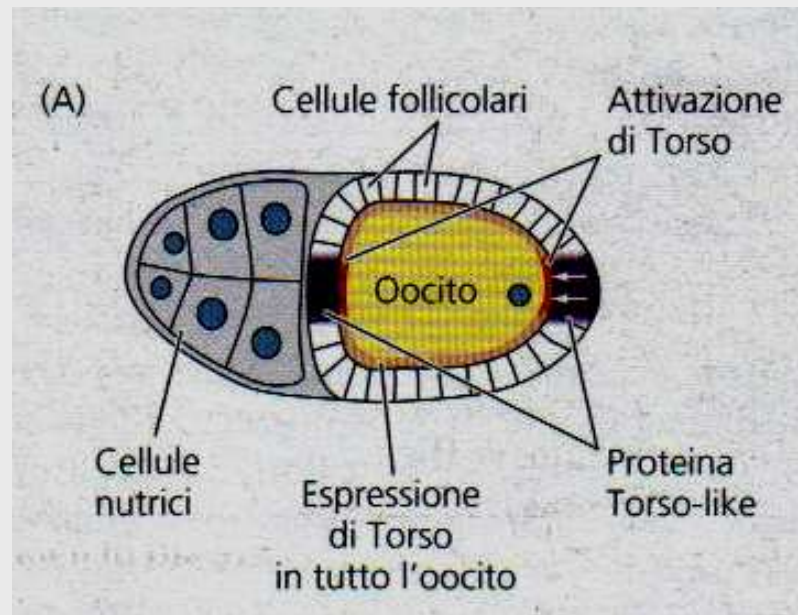


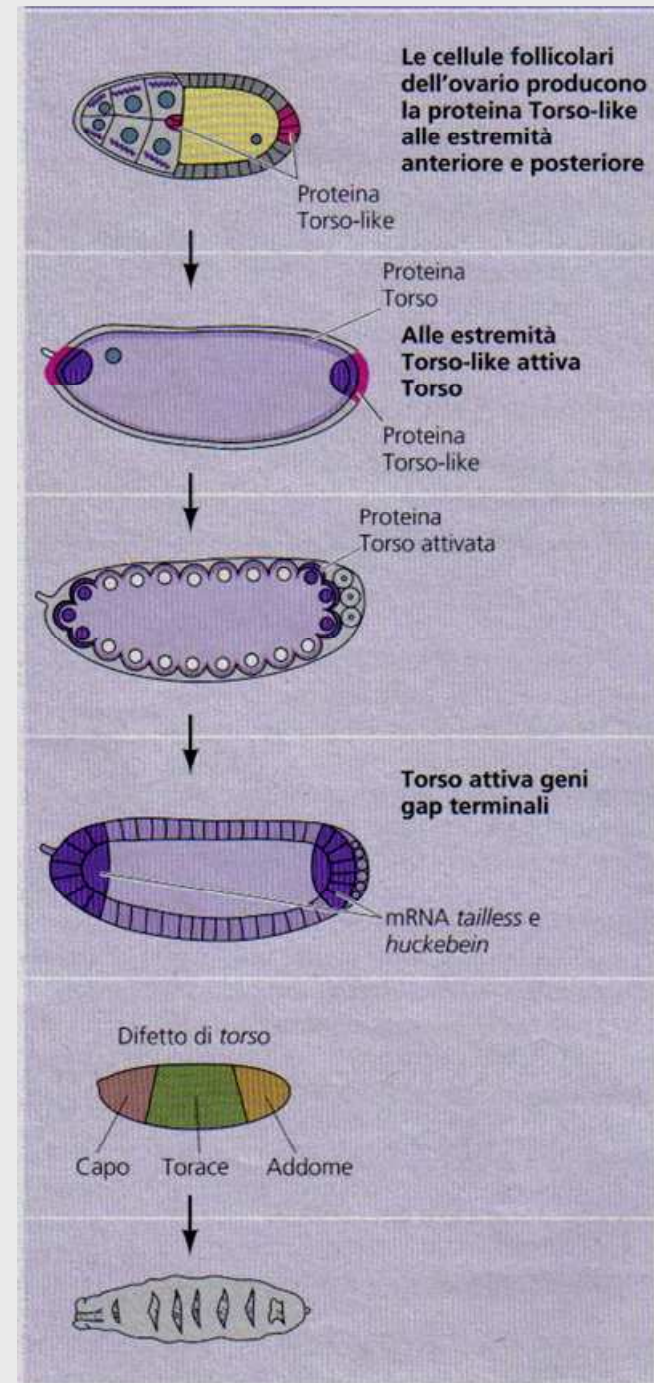
Figura 12

Schema che illustra le parti essenziali del meccanismo di formazione degli estremi acron e telson in *Drosophila*, attraverso l'attivazione selettiva ai due poli del recettore ubiquitario Torso, per un ligando (Trunk) presente solo ai due estremi. Da questa, attraverso l'attivazione di Ras e di Raf, si ha la trascrizione finale dei geni *tailless* e *huckebein*. I pallini gialli stanno ad indicare i nuclei del blastoderma sinciziale. A = Anteriore, P = Posteriore, TK = tirosina chinasi.

Cellule follicolari ant e post rilasciano Torso-like/Trunk



Fenotipo di torso



Compartimentalizzazione del corpo

Graduale nel tempo:

- Geni della polarità o degli assi corporei
ant-post e dorso-ventr
- Geni della segmentazione (secondo asse ant-post)
geni gap: 6
geni di coppia (pair-rule): 8
geni di polarità del segmento (segment polarity):
10
- Geni dell'identità del segmento corporeo
geni selettori omeotici

Geni della segmentazione (a effetto zigotico): si definisce sempre più nel piccolo

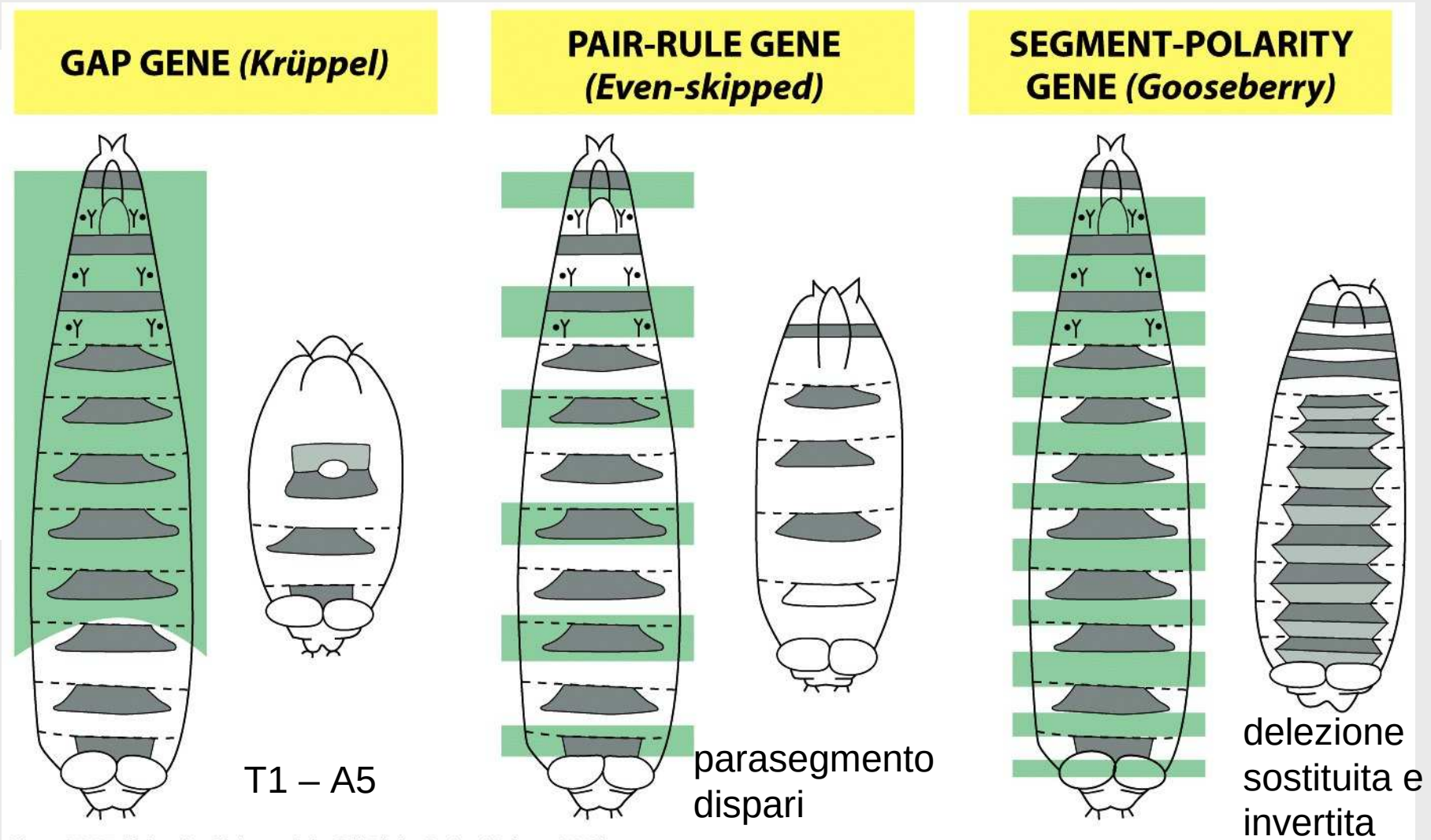
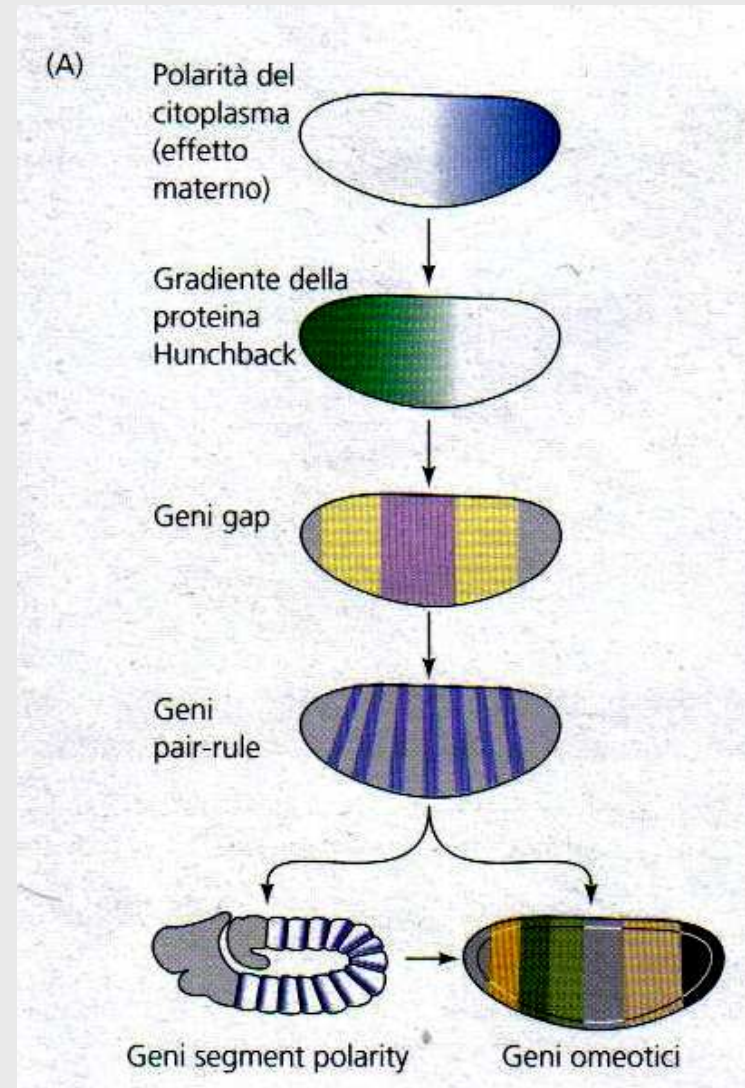


Figure 22-37 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Realizzazione del piano ant-post



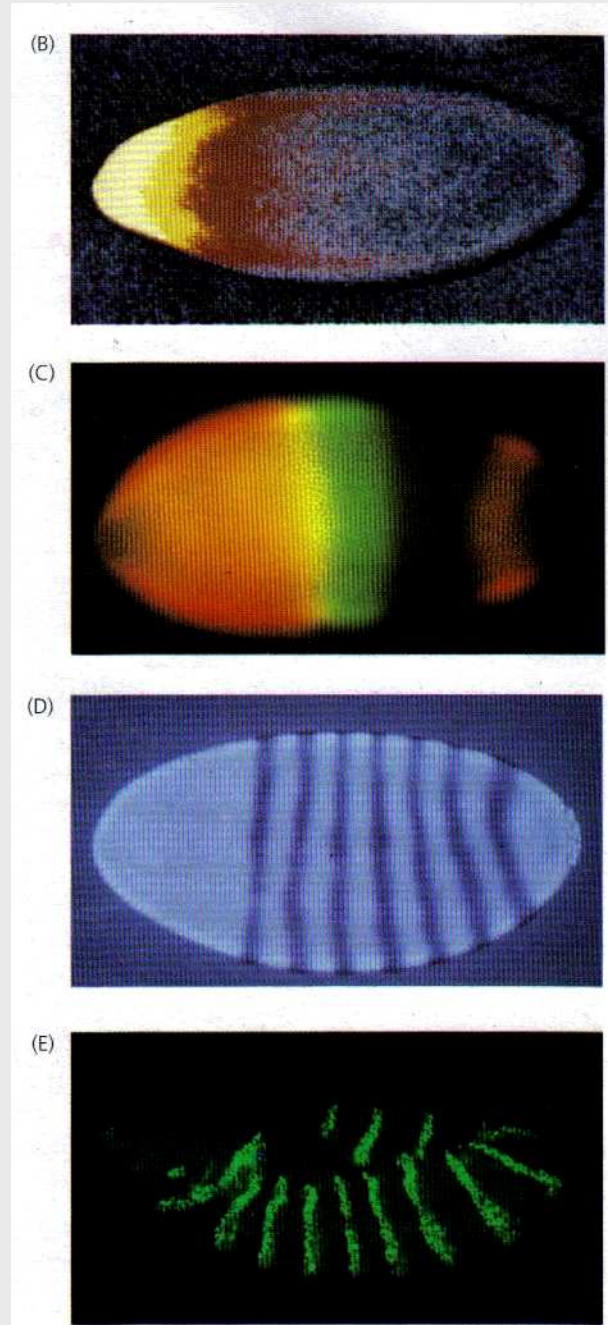
Realizzazione del piano ant-post

materno:
bicoid

gap:
hunchback/
Kruppel

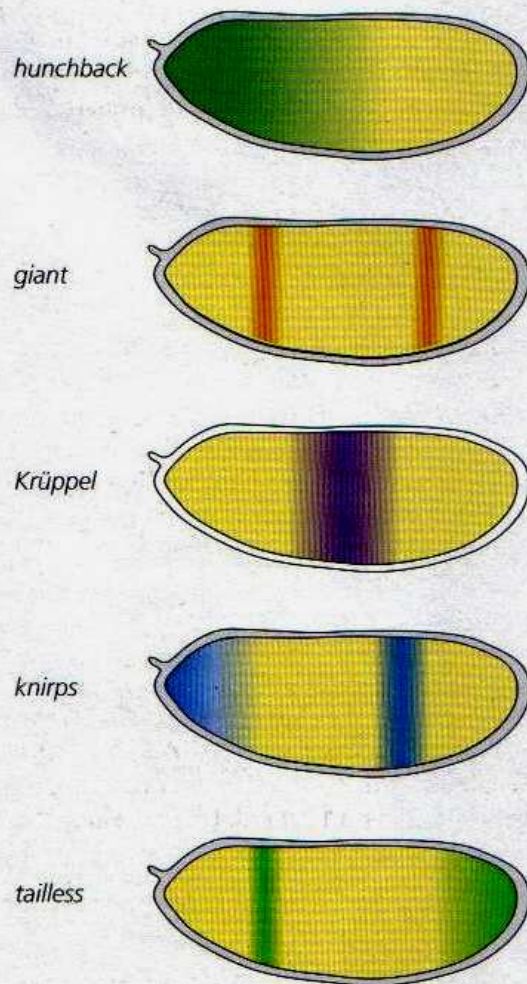
pair rule:
fushi tarazu

segment polarity:
engrailed



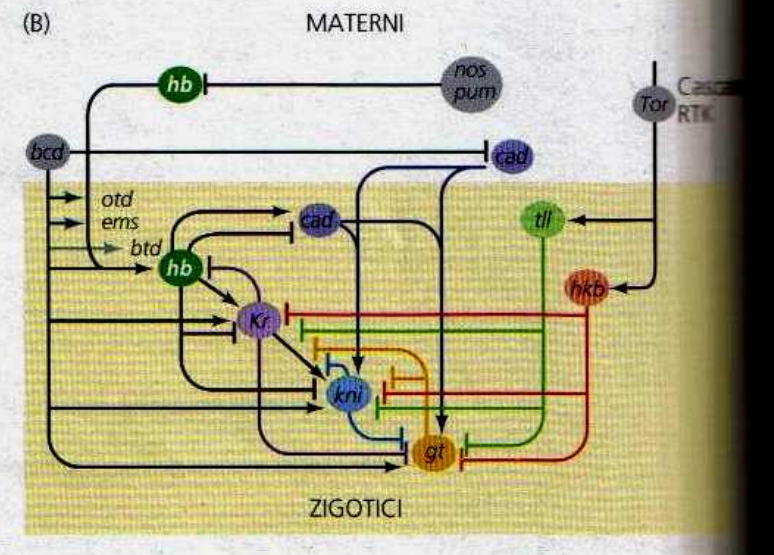
1. Geni-proteine gap

(A) Espressione dei geni gap



Anteriorizzanti:
hunchback, giant, kruppel

Posteriorizzanti:
caudal, Knirps, tail-less, giant



Geni gap

- Espressione dinamica
- Hunchback: gradiente
 - attivazione di giant e kruppel
 - | inibizione knirps
- Caudal → attivazione knirps
- Regolazione negativa da proteine vicine
 - delimitazioni spaziali sempre più precise

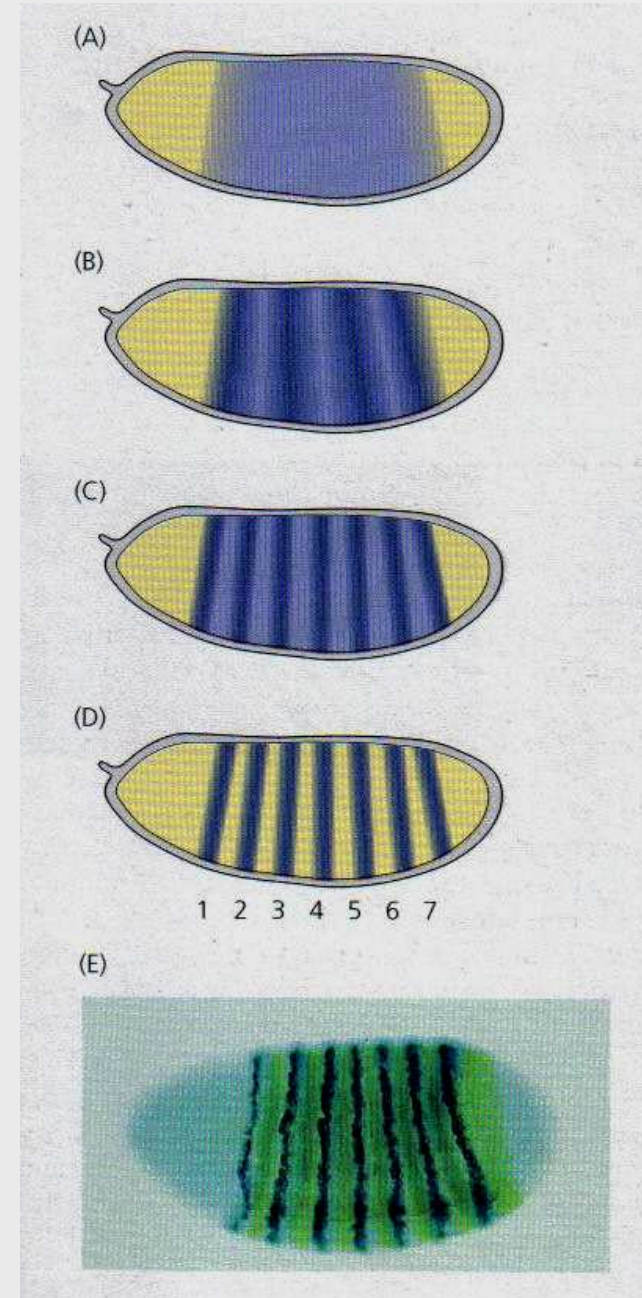
Geni attivati in successione

- Geni di origine materna (mRNA immagazzinati)
- Geni zigotici
- Geni per la segmentazione:
 - Gap
 - Pair rule
 - Segment polarity
- Geni per l'identità del segmento corporeo

2. Geni pair-rule

espressione di
Fushi tarazu
nel tempo:
ridefinizione
piano corporeo

Fushi tarazu
Even-skipped



La localizzazione dell'espressione della proteina *Eve* cambia a seconda del promotore del gene

Blu: transgene
Pr-Eve-LacZ
Arancione: normale

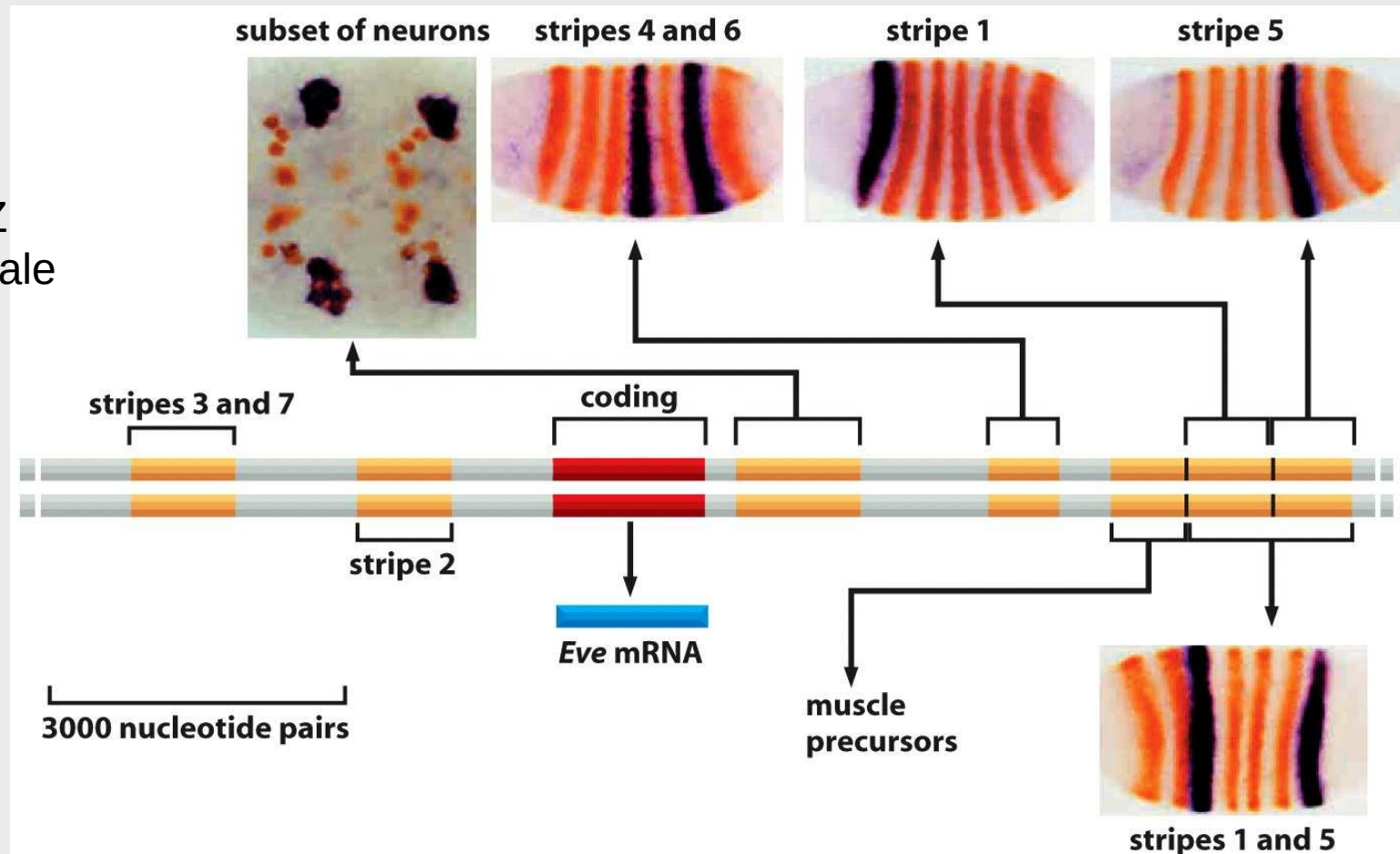
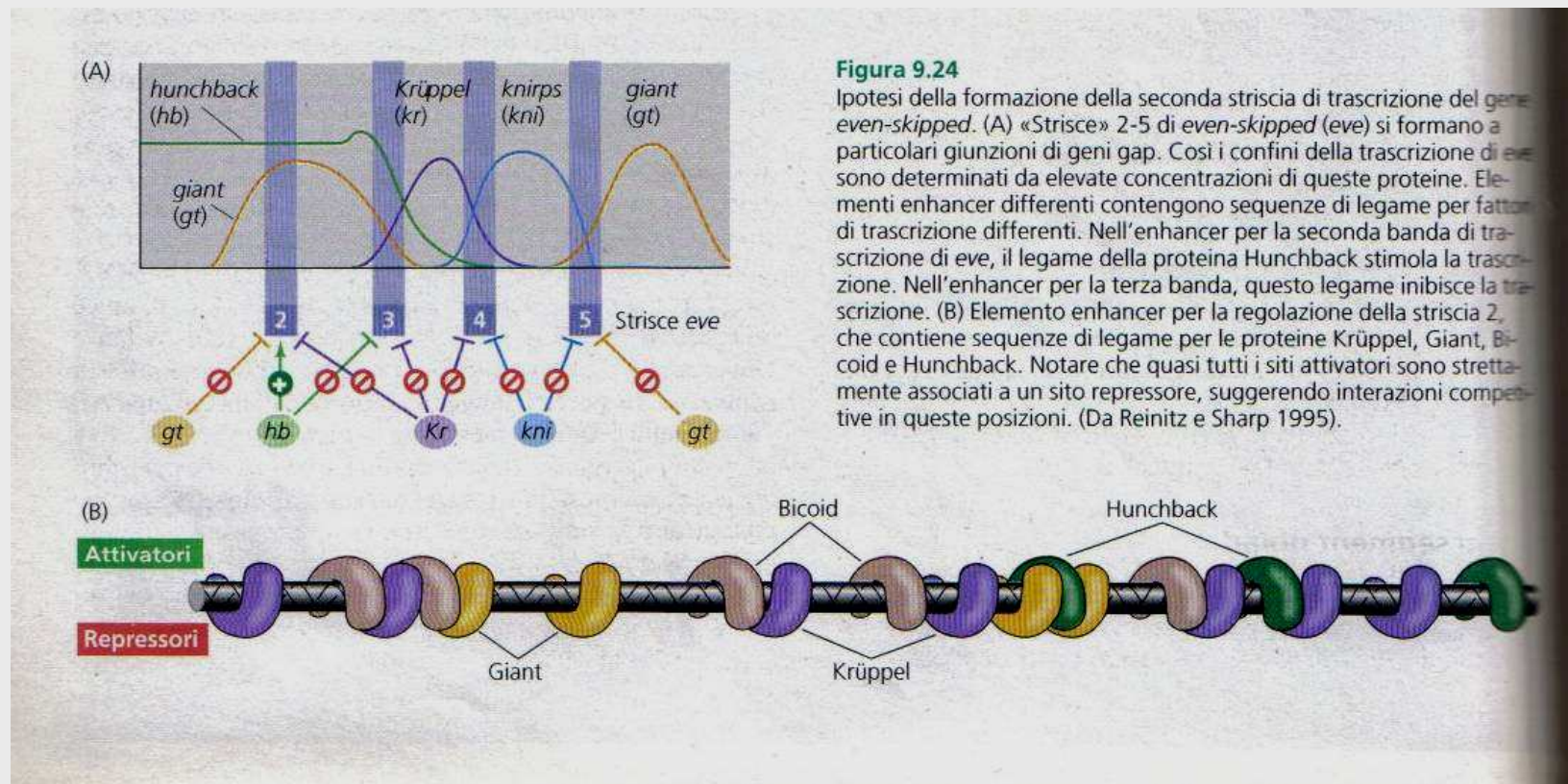


Figure 22-39 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Regolazione combinatoriale dell'espressione del gene eve



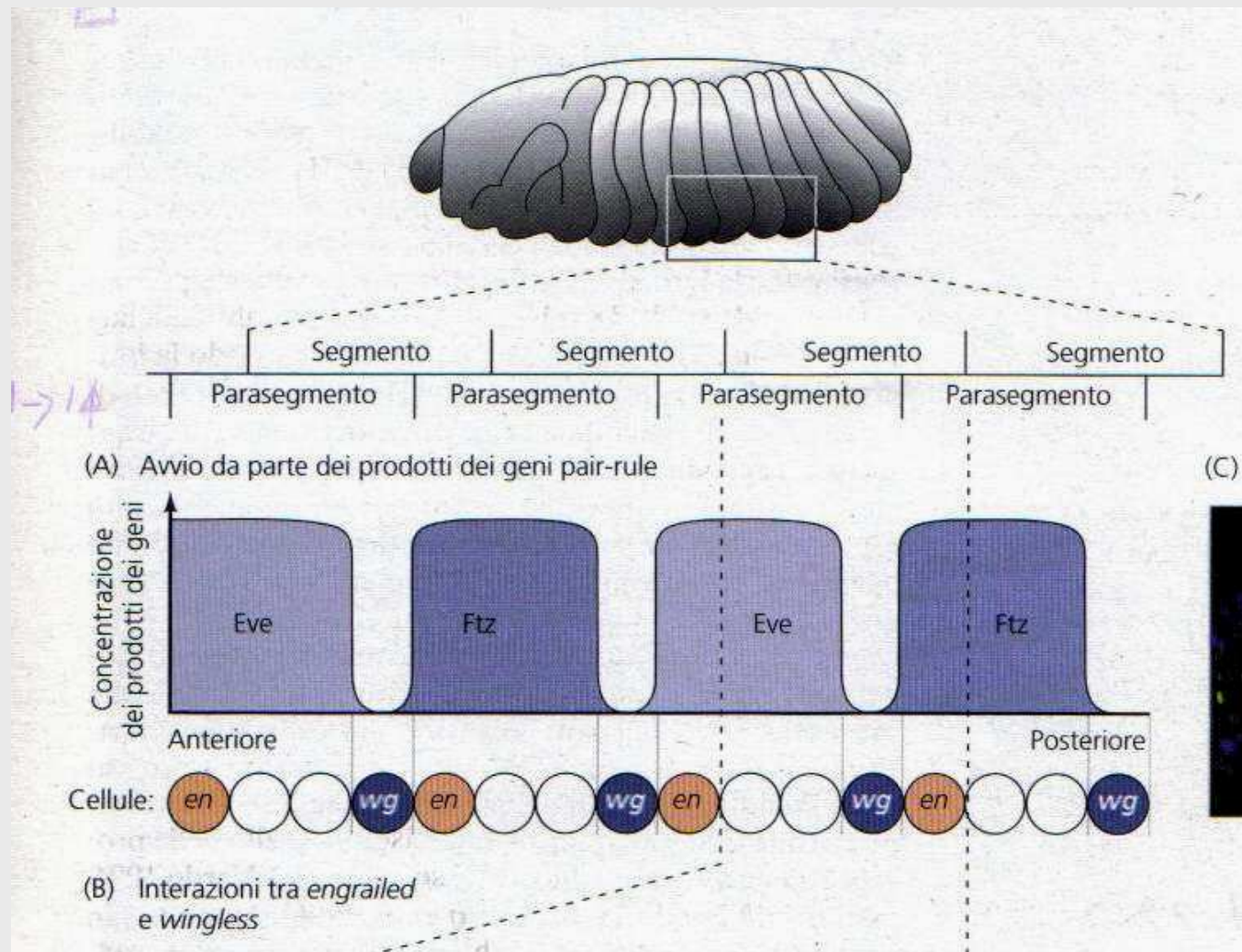
Geni attivati in successione

- Geni di origine materna (mRNA immagazzinati)
- Geni zigotici
- Geni per la segmentazione:
 - Gap
 - Pair rule
 - Segment polarity
- Geni per l'identità del segmento corporeo

3. Geni della polarità del segmento

- Loro induzione dipende da geni “pair-rule” e gap precedenti
- Interagiscono tra di loro (segnalazione cellula-cellula: vie di wg e hh che si autoregolano)
- Queste vie aiutano a rifinire l'espressione di altri geni di questa famiglia
- Alcuni espressi per poco; altri per sempre

Segment polarity: en- wg si
sovrappongono su eve e ftz



Eve o ftz

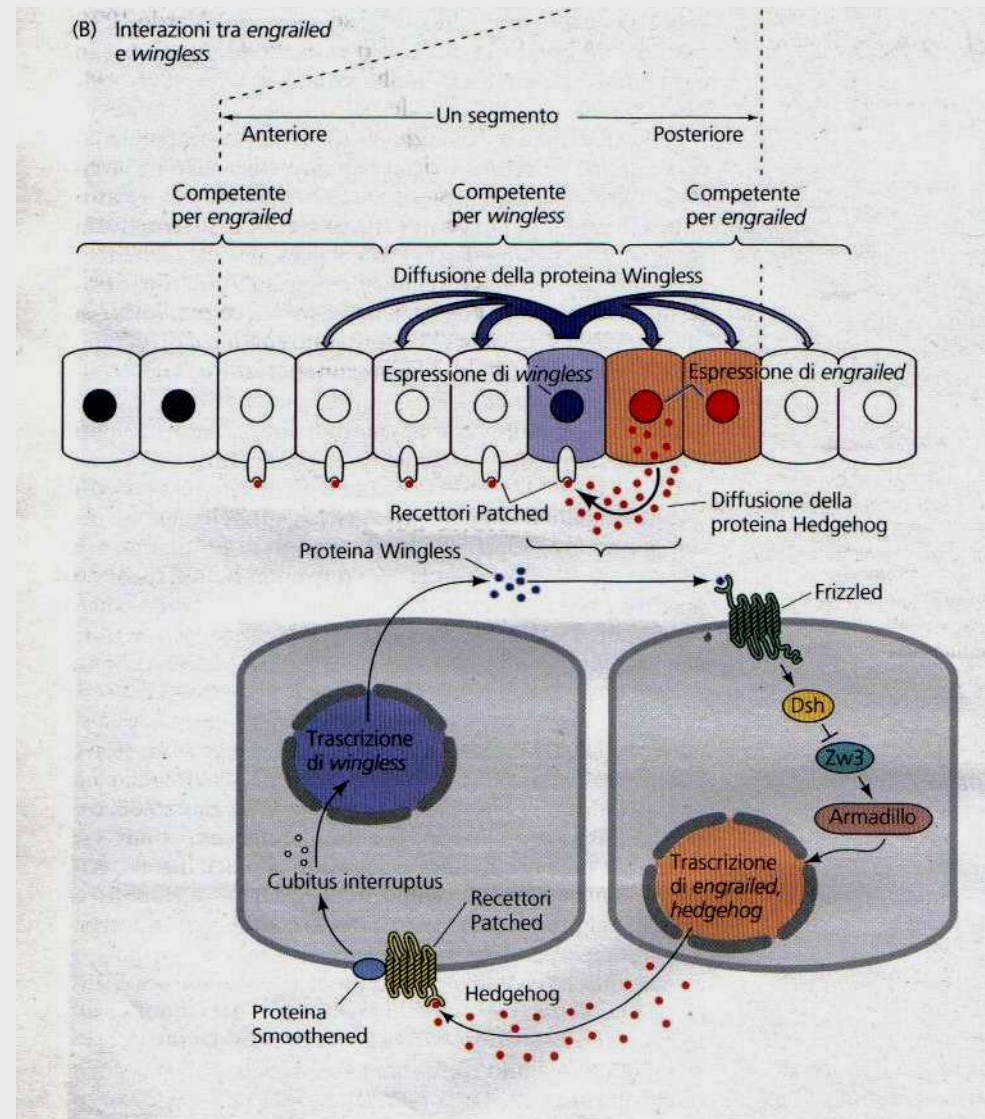
→ engrailed

→ hedgehog

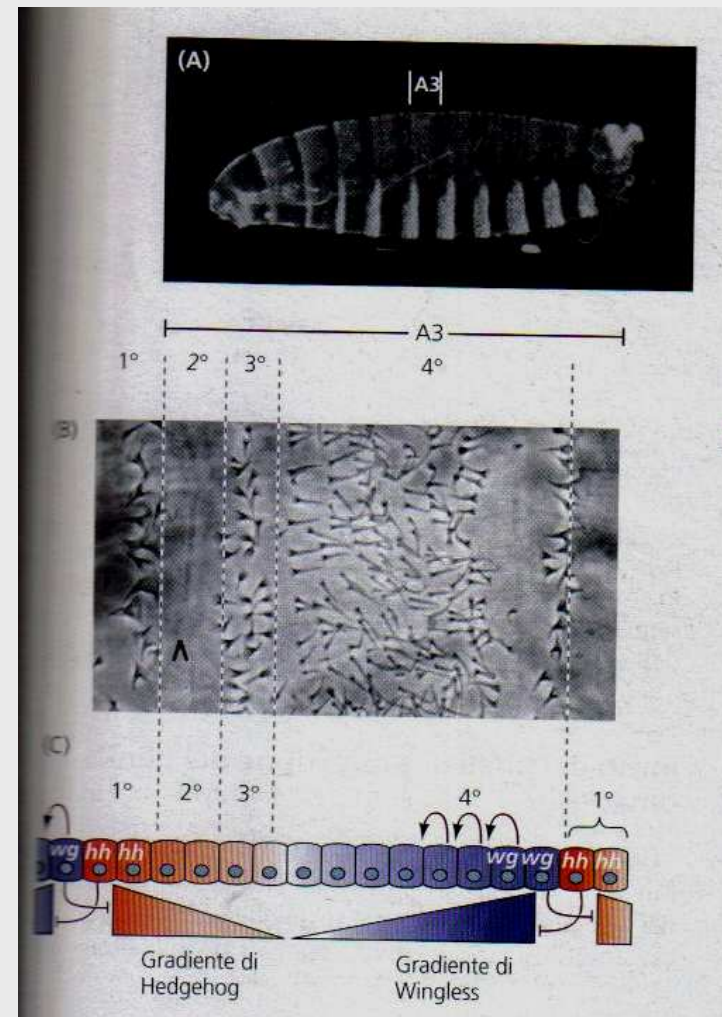
→ suo recettore su
cellula vicina

→ wg

circuito si
autosostiene e
si rafforza



Specificazione delle cellule in A3

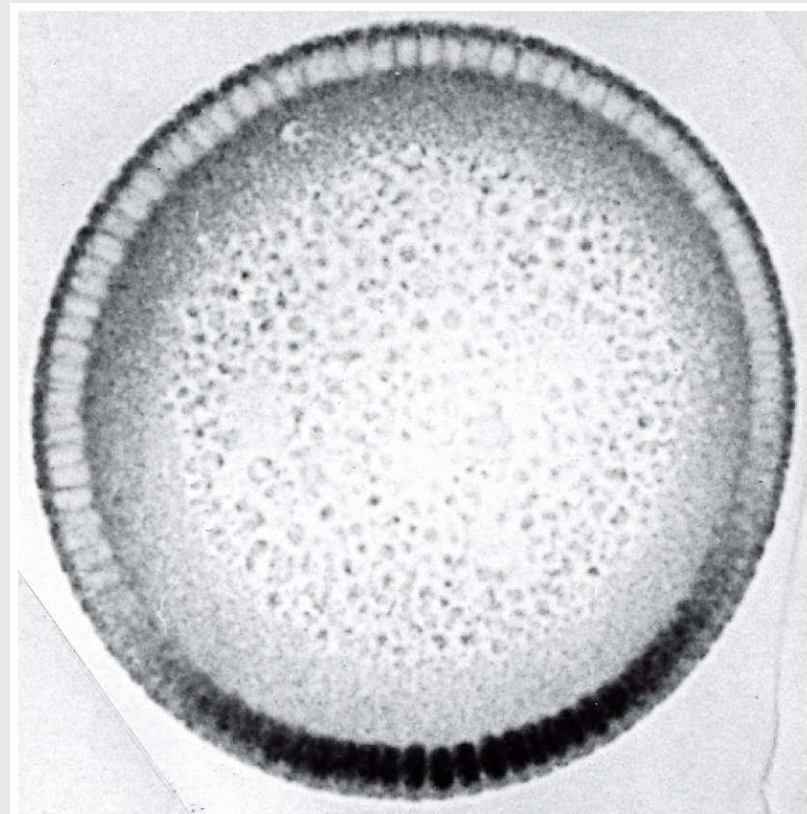


Moduli regolatori

- Costituiti da fattori transattivanti o inibitori in combinazioni diverse = **proteine regolatorie**
- Loro espressione è risultato dell'effetto delle proteine espresse prima
- Sistema altamente modulabile
- Rende possibile l'adattabilità indipendente di ogni parte della struttura corporea nell'evoluzione → minor rischio di danno

Asse dorso-ventr: Toll → Dorsal

- Dorsal
- nel citoplasma (dorsalmente)
- nei nuclei (ventralmente)

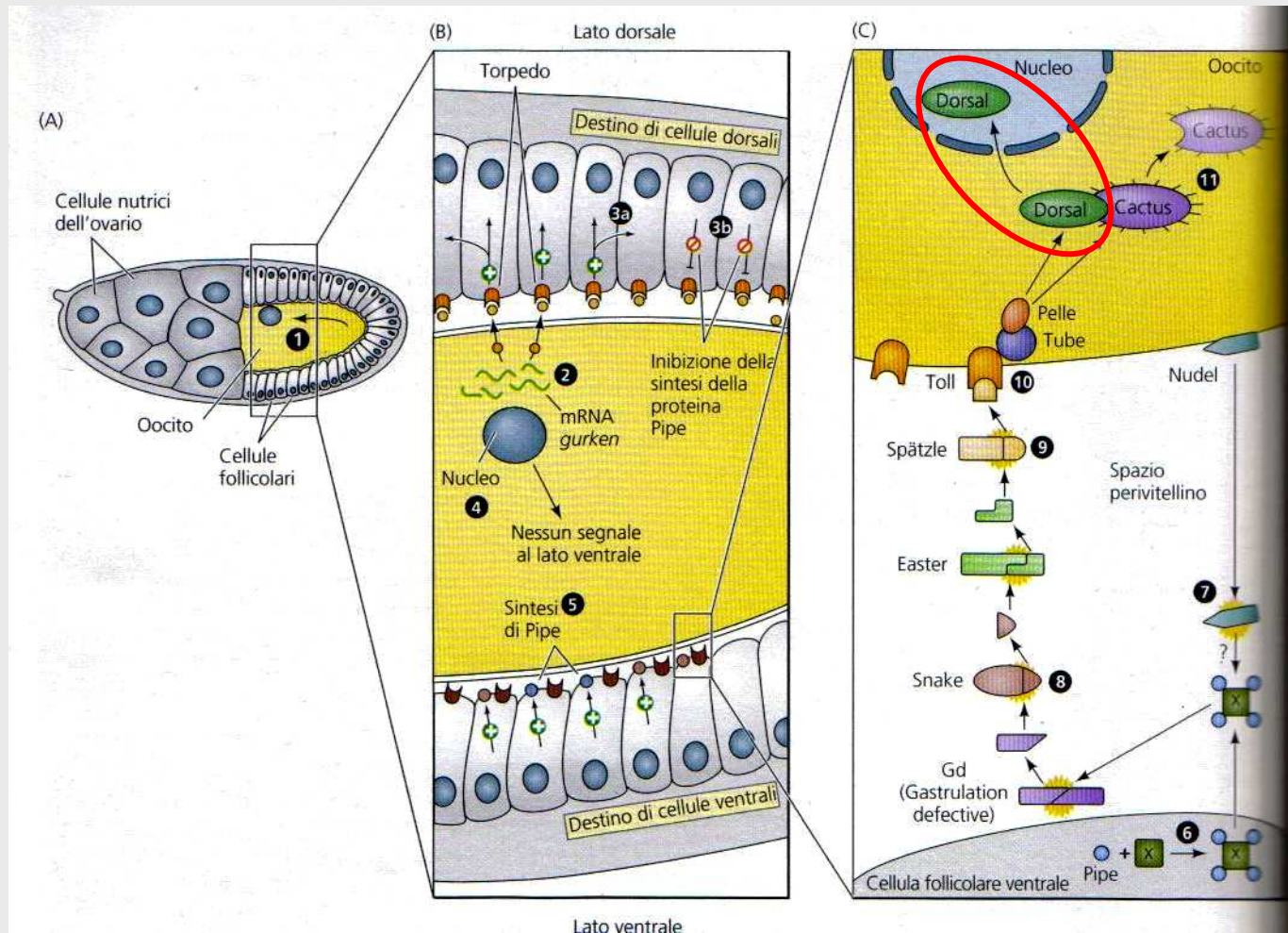


100 μm

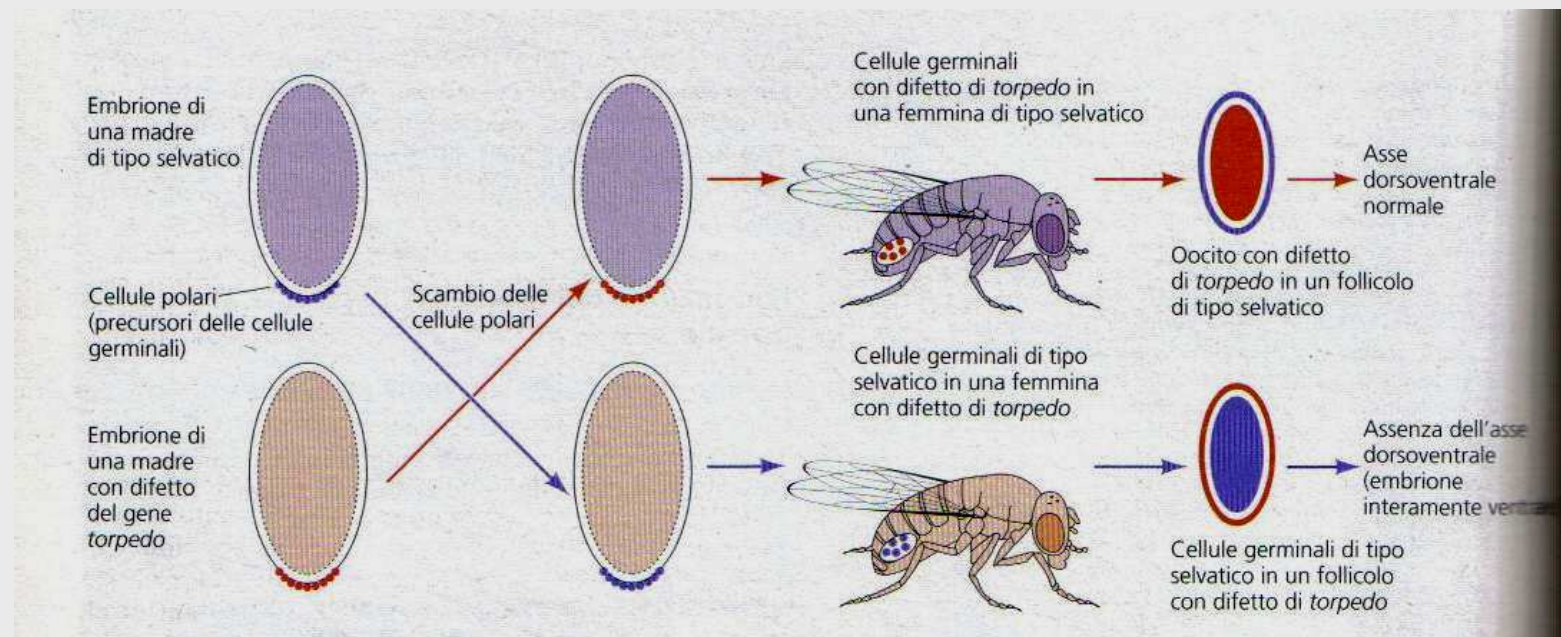
Figure 22-33 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Gurken – Pipe – proteasi a cascata – attivazione di recettore Torpedo – P*

→ **Dorsal va in nucleo** (cellule ventrali)



Torpedo deve essere espresso su cellule follicolari



Gradiente di Dorsal accende trascrizione di geni diversi

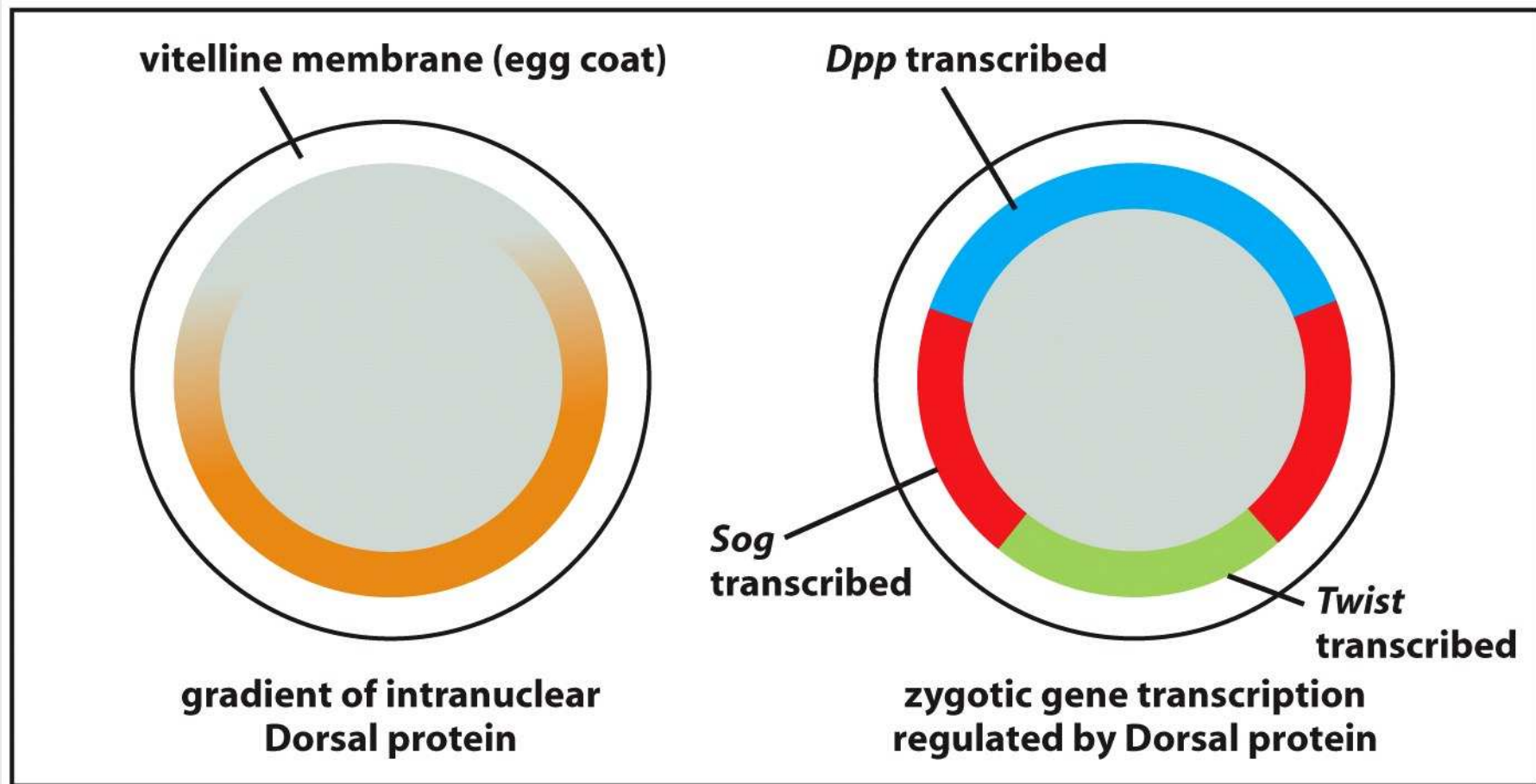


Figure 22-34a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Dpp e Sog controllano asse dorso-ventr

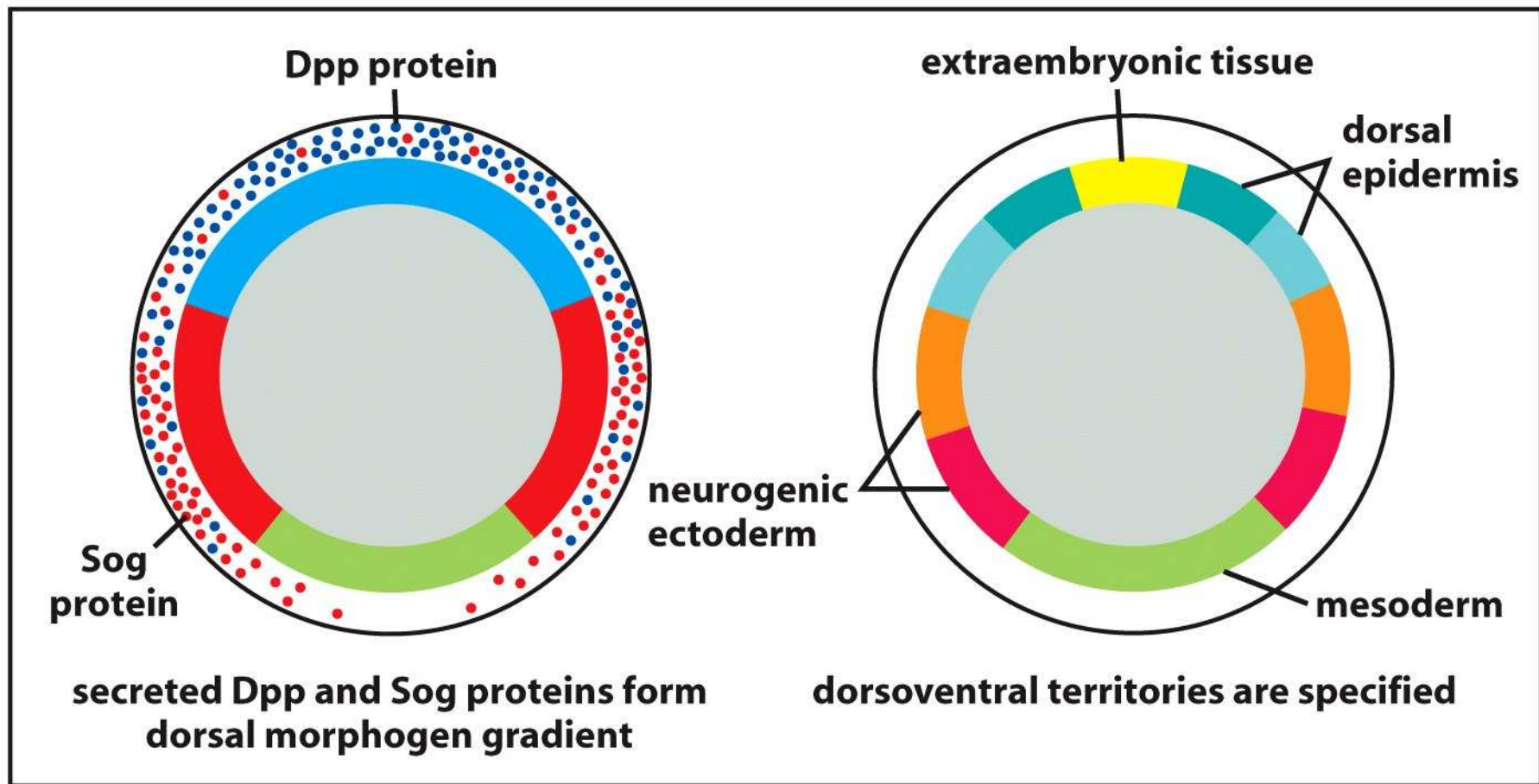
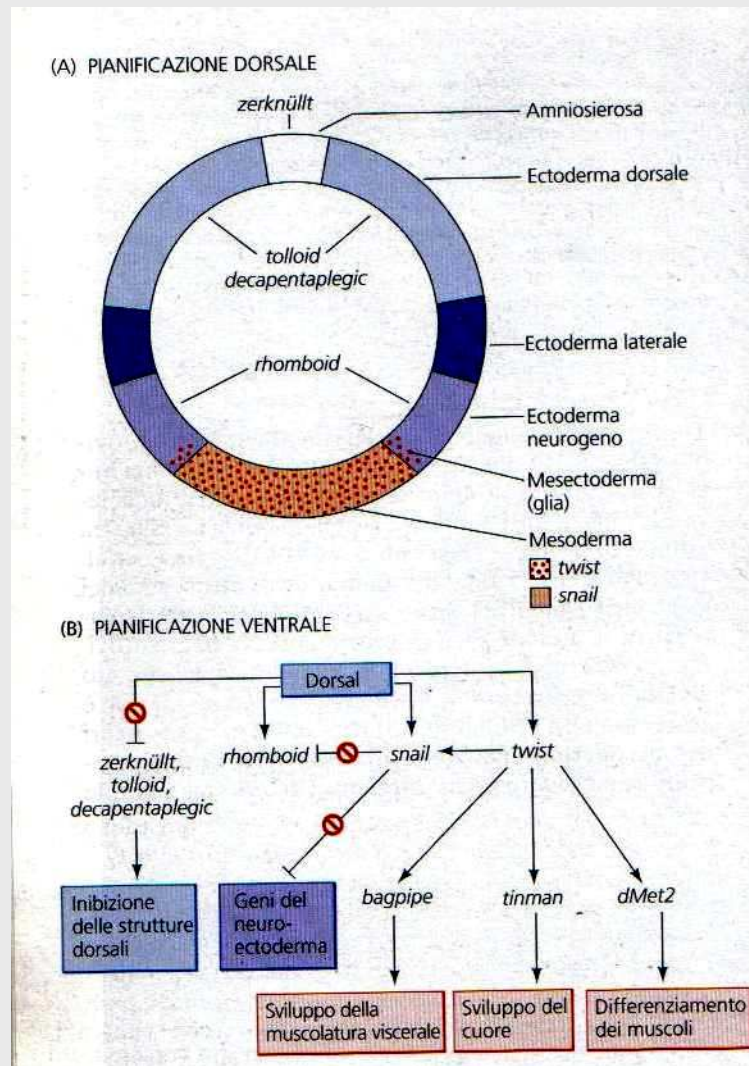


Figure 22-34b Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Mappa prospettica

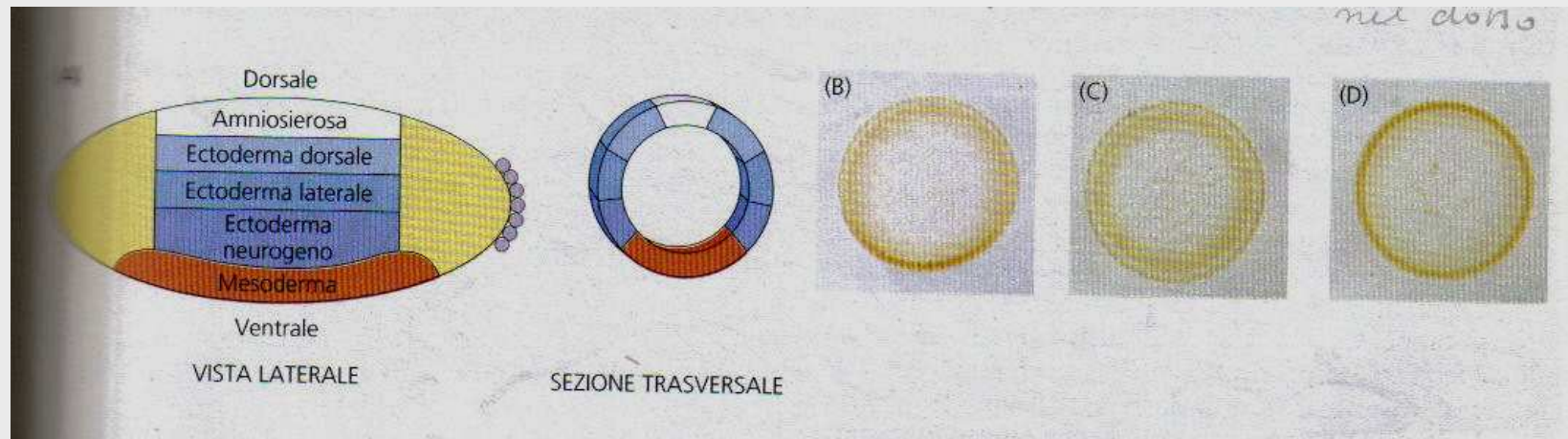


Cellule Twist+ → mesoderma
con meccanismo della gastrulazione



Figure 22-35 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Asse dorso-ventrale: Dorsal



Mappa predittiva sviluppo corporeo

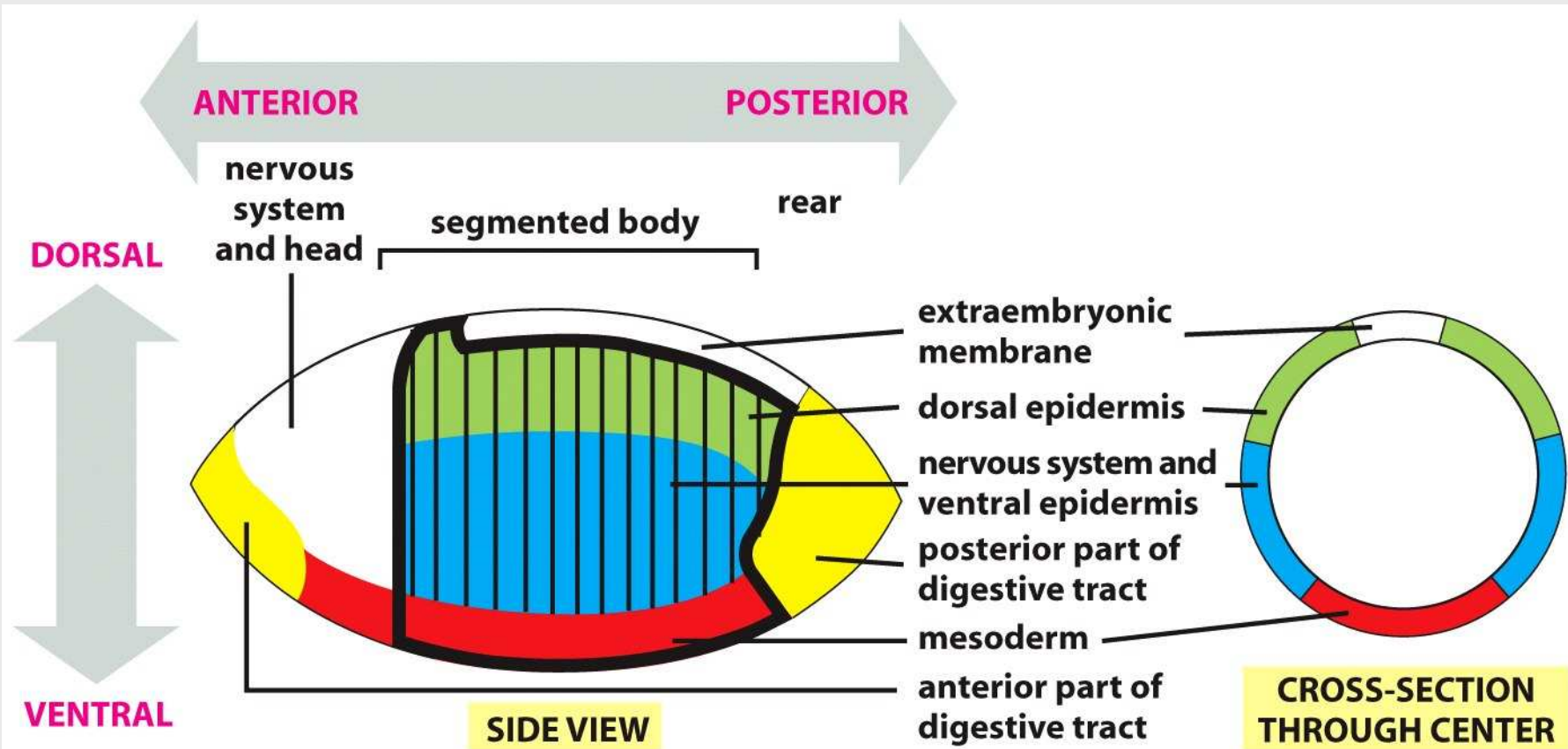
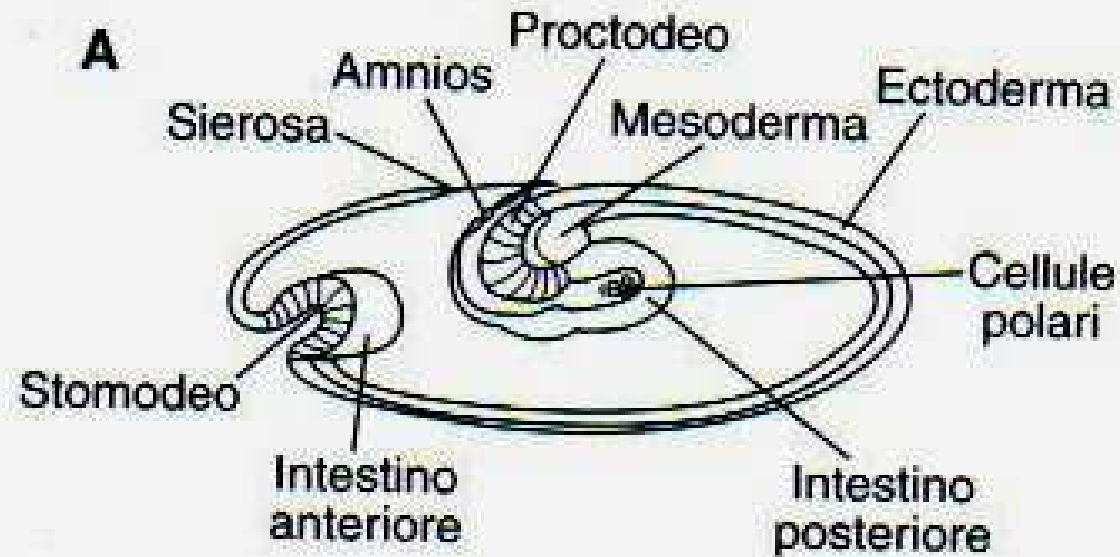


Figure 22-29 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Gastrulazione: invaginazione di strato cellulare da periferia a interno

Invaginazione dell'intestino



Inversione asse dorso-ventrale

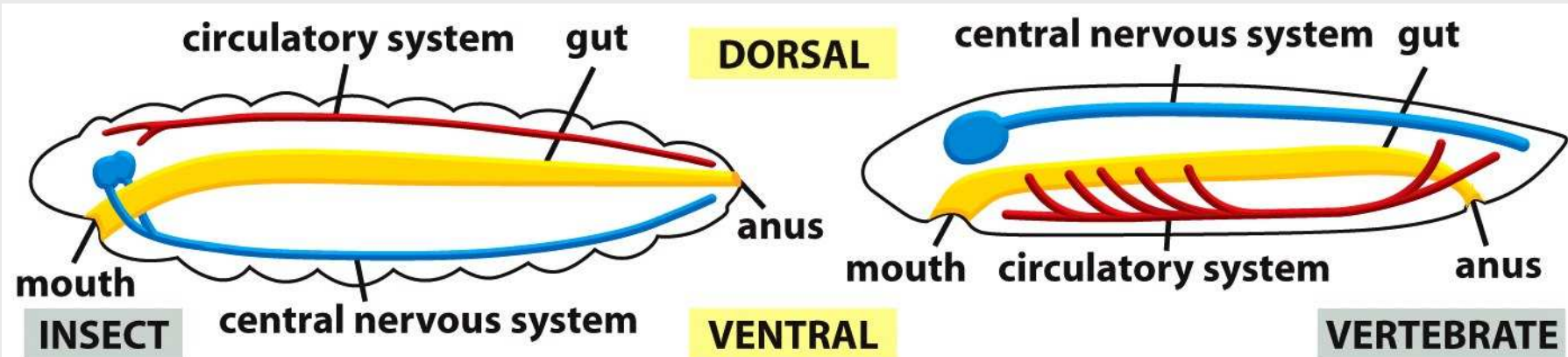


Figure 22-36 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Morfogeni/molecole segnale

SIGNALING PATHWAY	LIGAND FAMILY	RECEPTOR FAMILY	EXTRACELLULAR INHI
Receptor tyrosine kinase (RTK)	EGF FGF (Branchless) Ephrins	EGF receptors FGF receptors (Breathless) Eph receptors	Argos
TGF β superfamily	TGF β BMP (Dpp) Nodal	TGF β receptors BMP receptors	chordin (Sog), noggin
Wnt	Wnt (Wingless)	Frizzled	Dickkopf, Cerberus
Hedgehog	Hedgehog	Patched, Smoothened	
Notch	Delta	Notch	Fringe

Omologhi in specie diverse mantengono
funzioni simili (asse dorso-ventr)

Agiscono al contrario: animale si è capovolto

Geni selettori omeotici

Identità al segmento

Mutante omeotico antennapedia



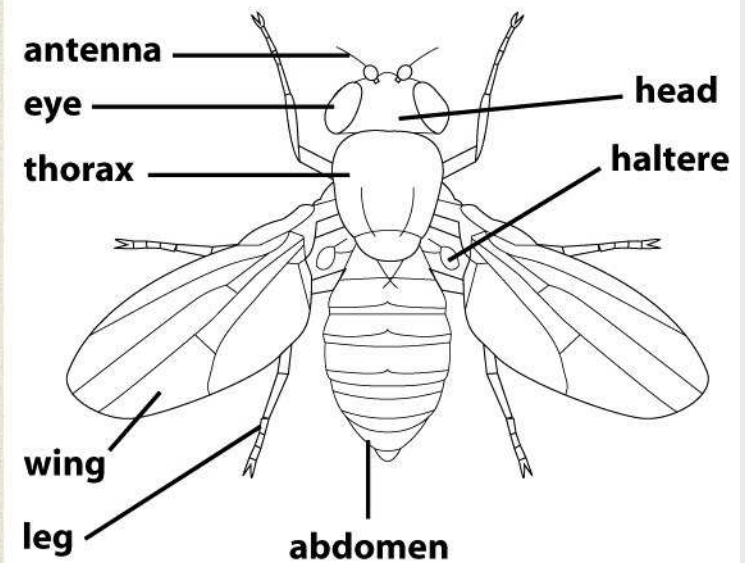
Figure 22-42 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Drosophila (fenotipo selvatico)



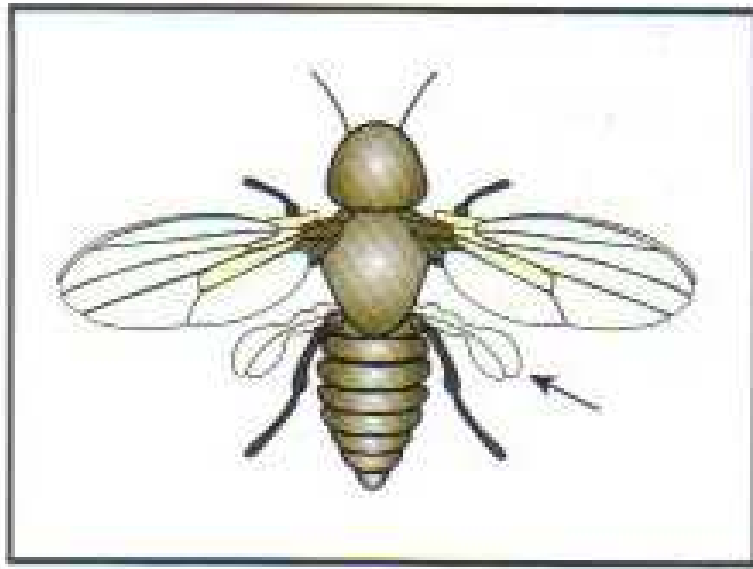
(A)

Figure 22-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

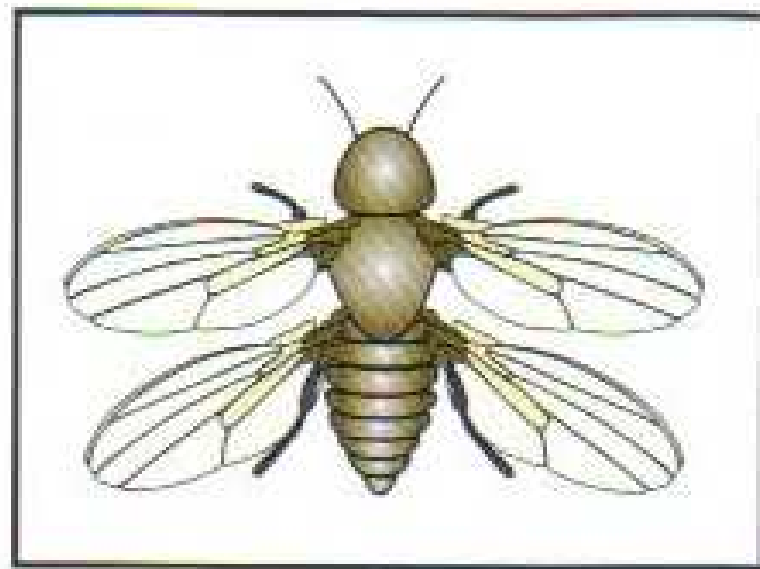


(B)

Mutante omeotico ubithorax



A



B

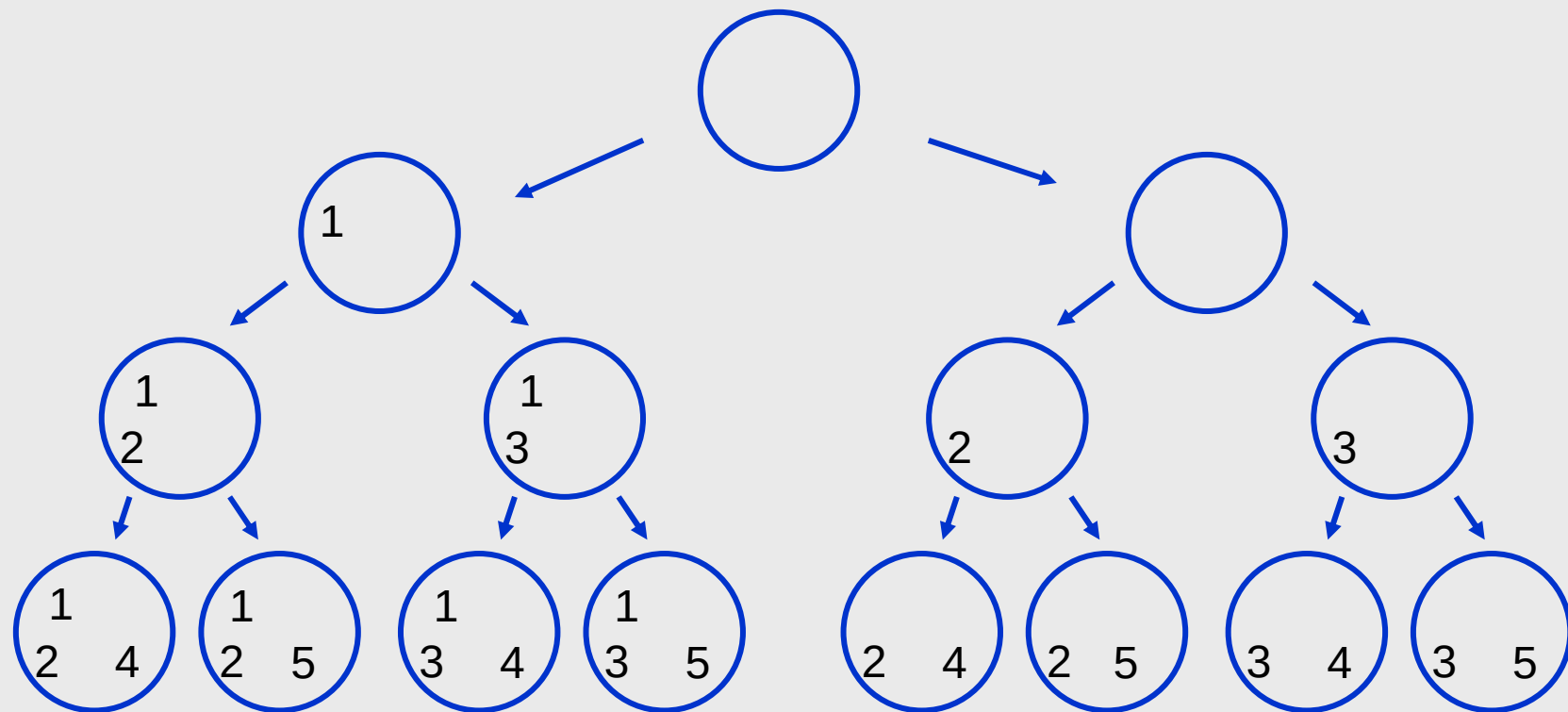
- Ripetizione modulare dei segmenti
- Ma differenze tra loro
- Quale è il meccanismo di questo?
- Come è modificato nelle mutazioni?
- → geni omeotici

Compartimentalizzazione del corpo

Graduale nel tempo:

- Geni della polarità o degli assi corporei
ant-post e dorso-ventr
- Geni della segmentazione (secondo asse ant-post)
geni gap
geni di coppia (pair-rule)
geni di polarità del segmento (segment polarity)
- Geni dell'identità del segmento corporeo
geni omeotici

Schema del modello combinatoriale desunto da studio delle mutazioni omeotiche



(Antenna)

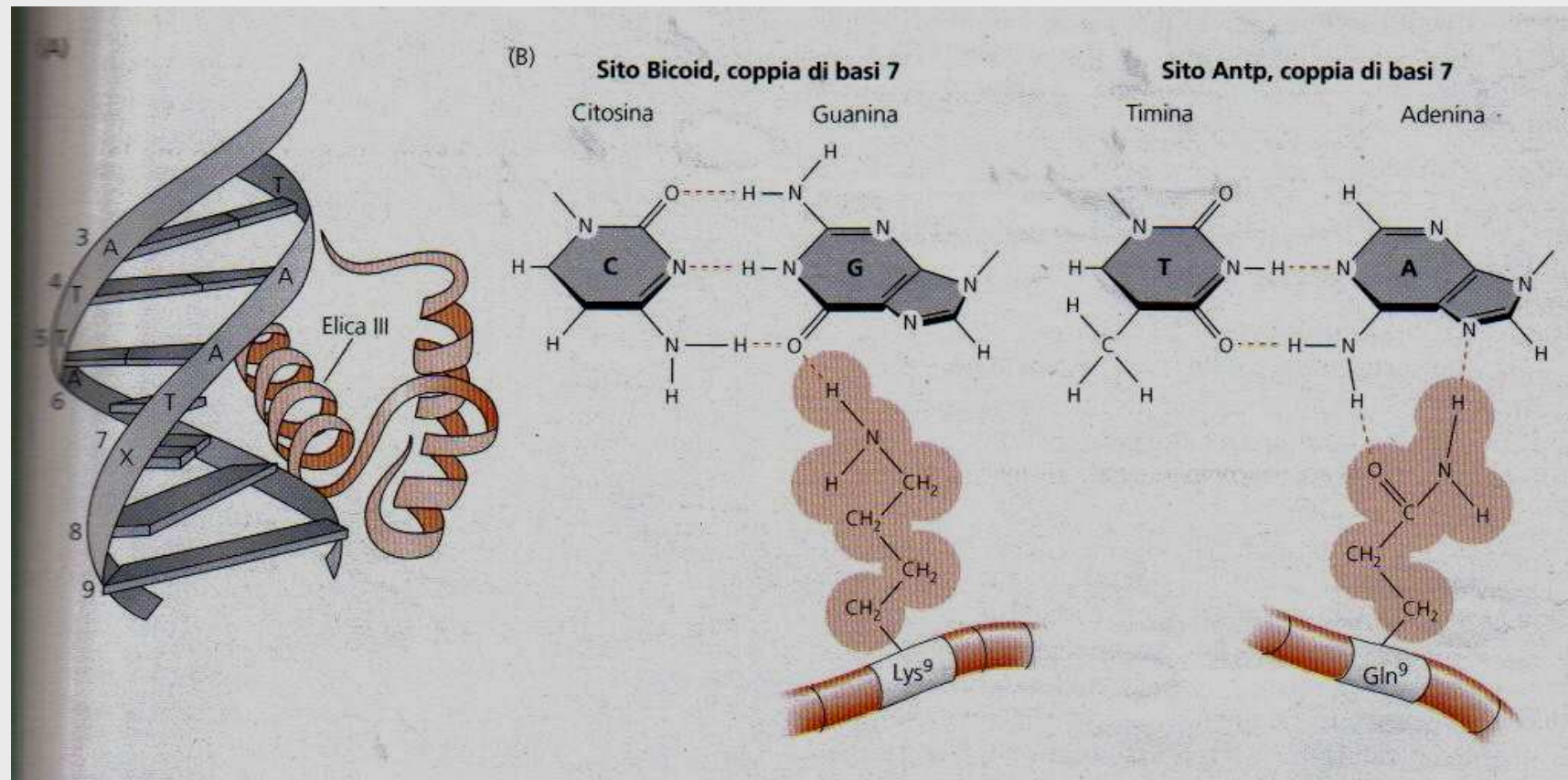
(Piede)

Il gene per l'antenna è mutante e non funzionante → l'appendice diventa piede

Gene omeotico

- Contiene una “homeobox”, che codifica per l’omeodominio (60 aminoacidi basici, sequenza che si lega a DNA)
- Fattore transattivante, che agisce sulle sequenze regolatorie di più geni, attivando un programma di sviluppo complesso
- È quello che si chiama “**master gene**”

Homeodominio: elica-giro-elica (per solco DNA e per legame specifico)



I due clusters di geni omeotici della *Drosophila* (cromosoma 3)

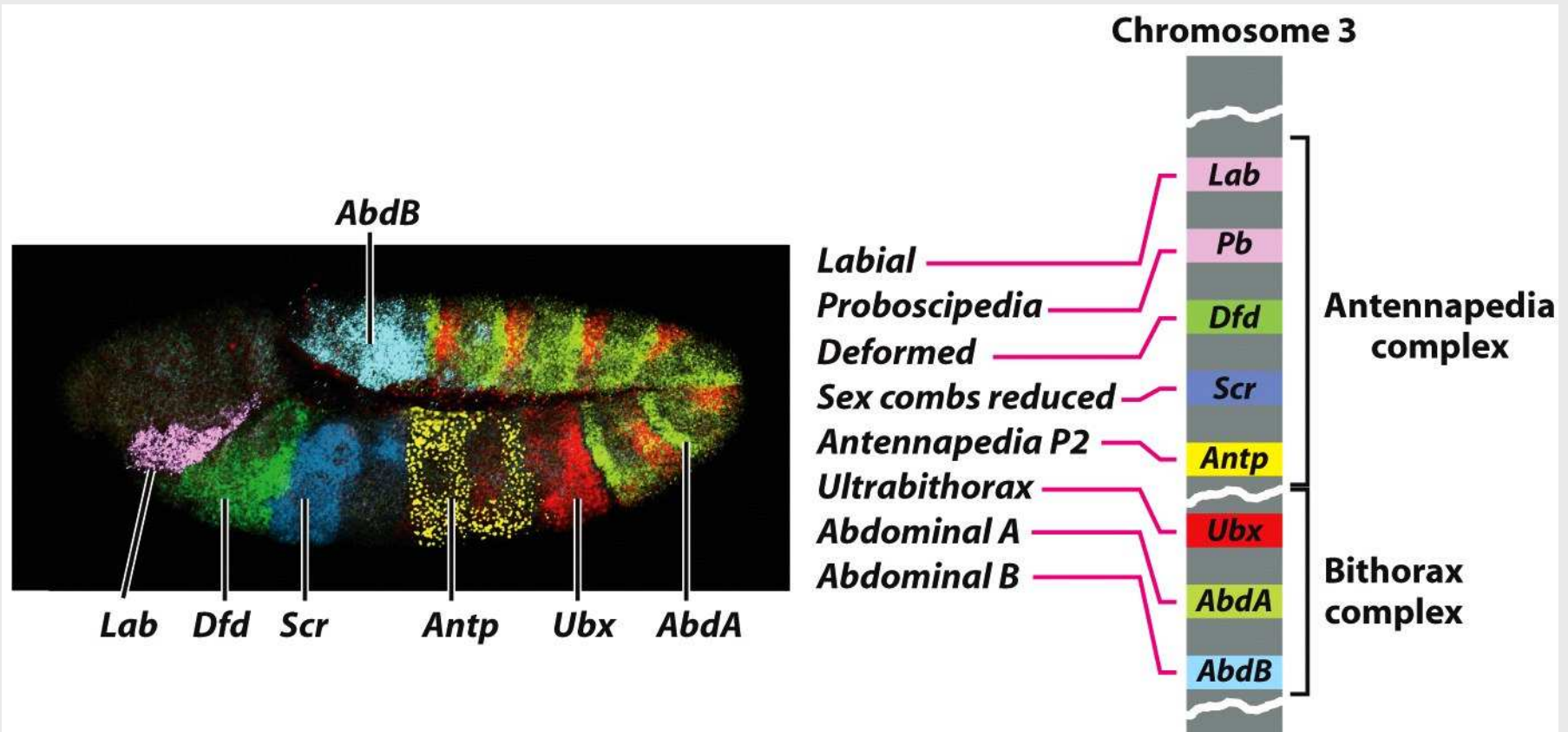


Figure 22-44 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Mutante Bithorax

- Tutti i parasegmenti posteriori fino a P5 hanno l'aspetto di P5
- I geni posteriori dominano su quelli anteriori, riducendone l'effetto.

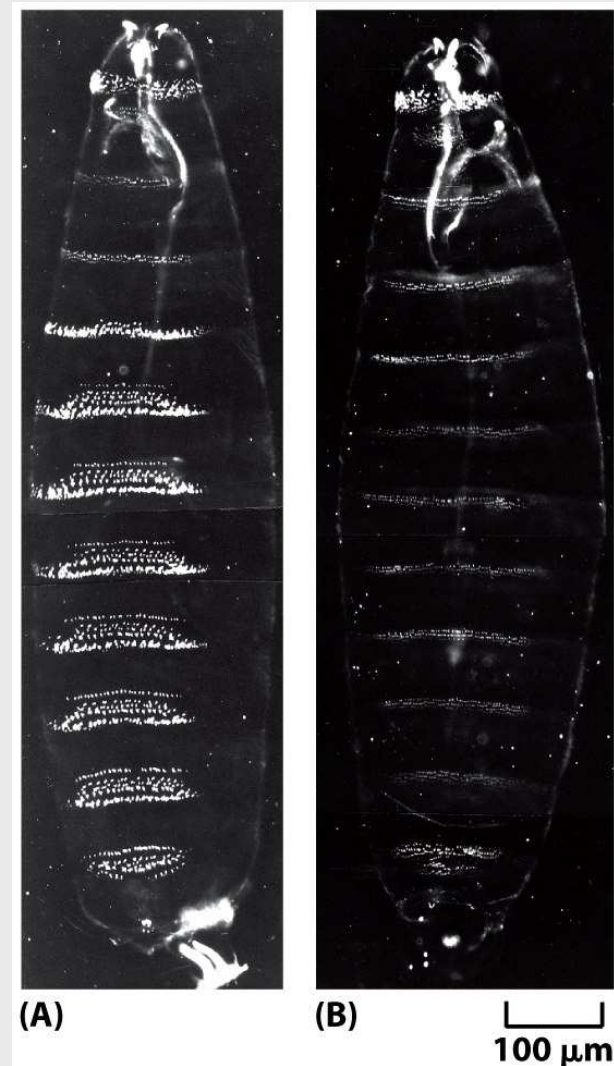
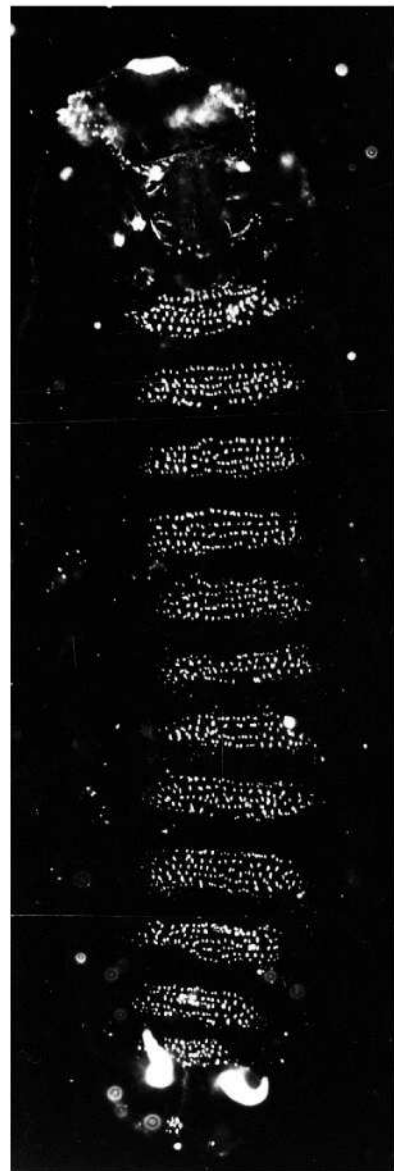
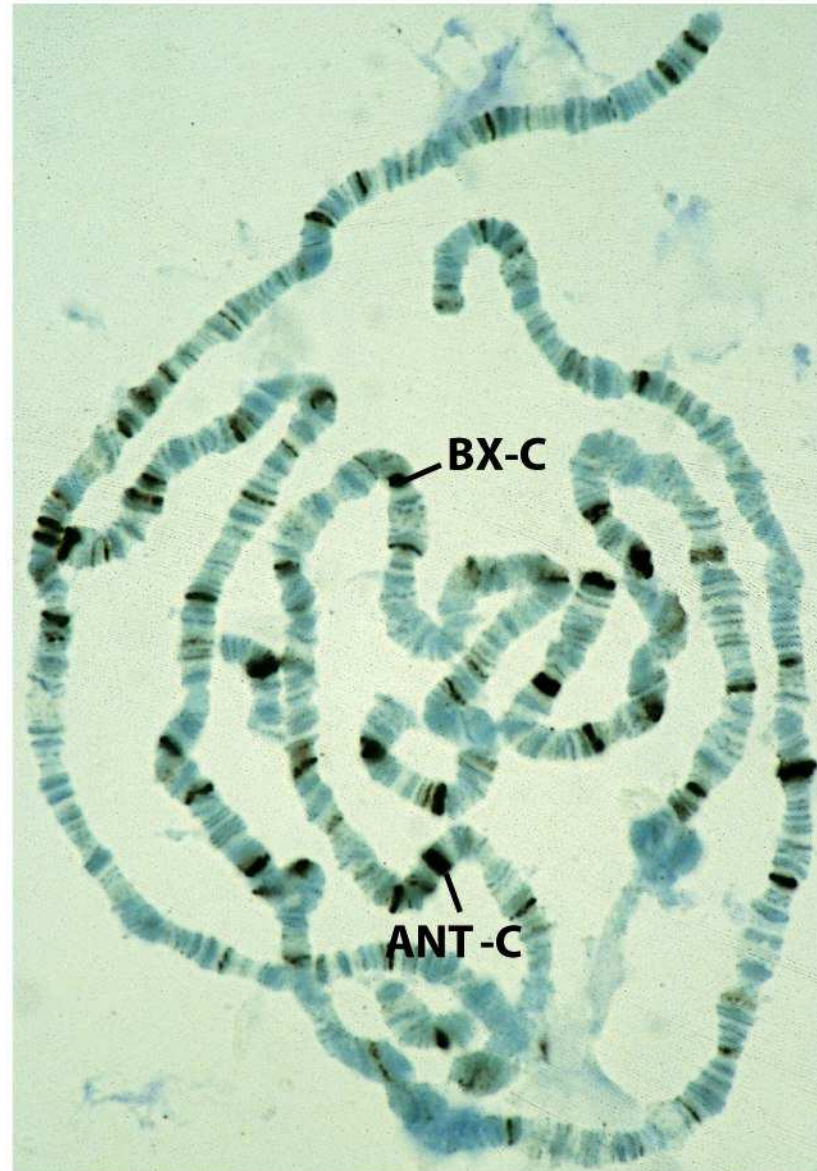


Figure 22-43 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)



(A)

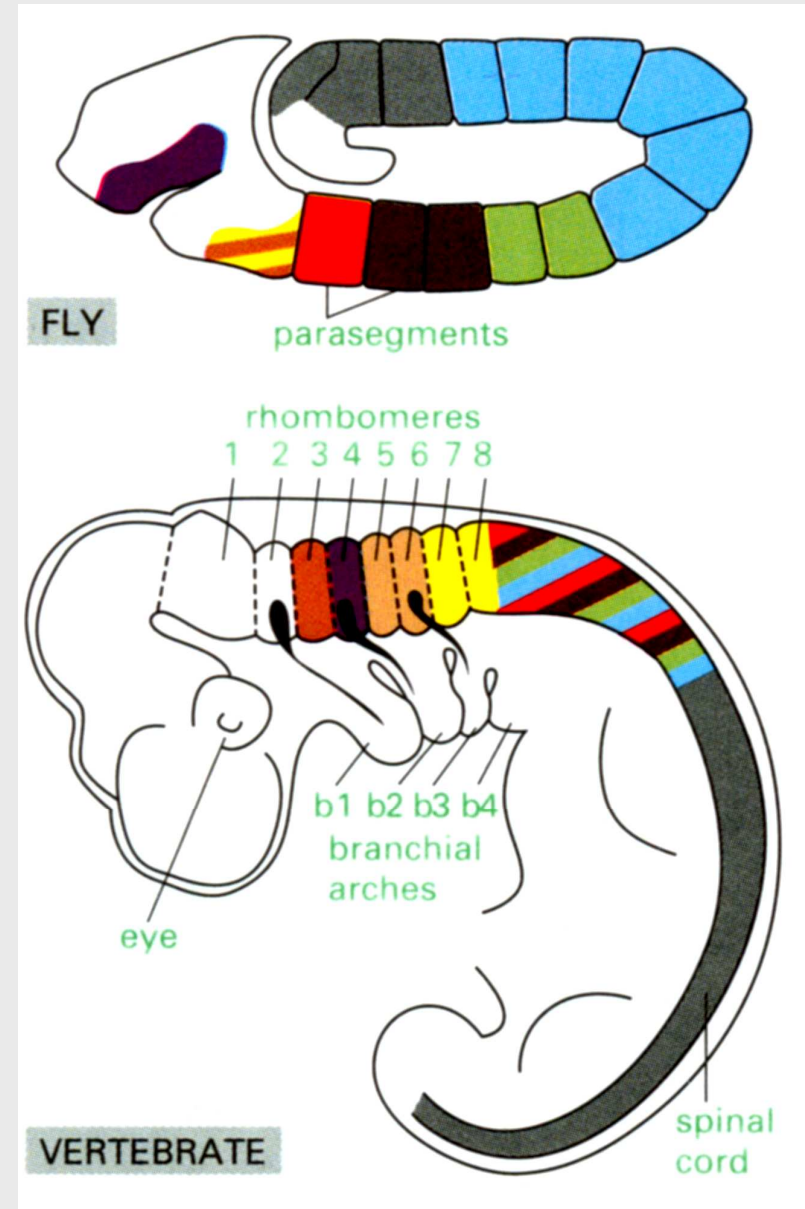
100 μm



(B)

Figure 22-45 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Corrispondenza
tra le regioni del
corpo di insetto e
vertebrato
definite
dall'espressione di
geni Hox



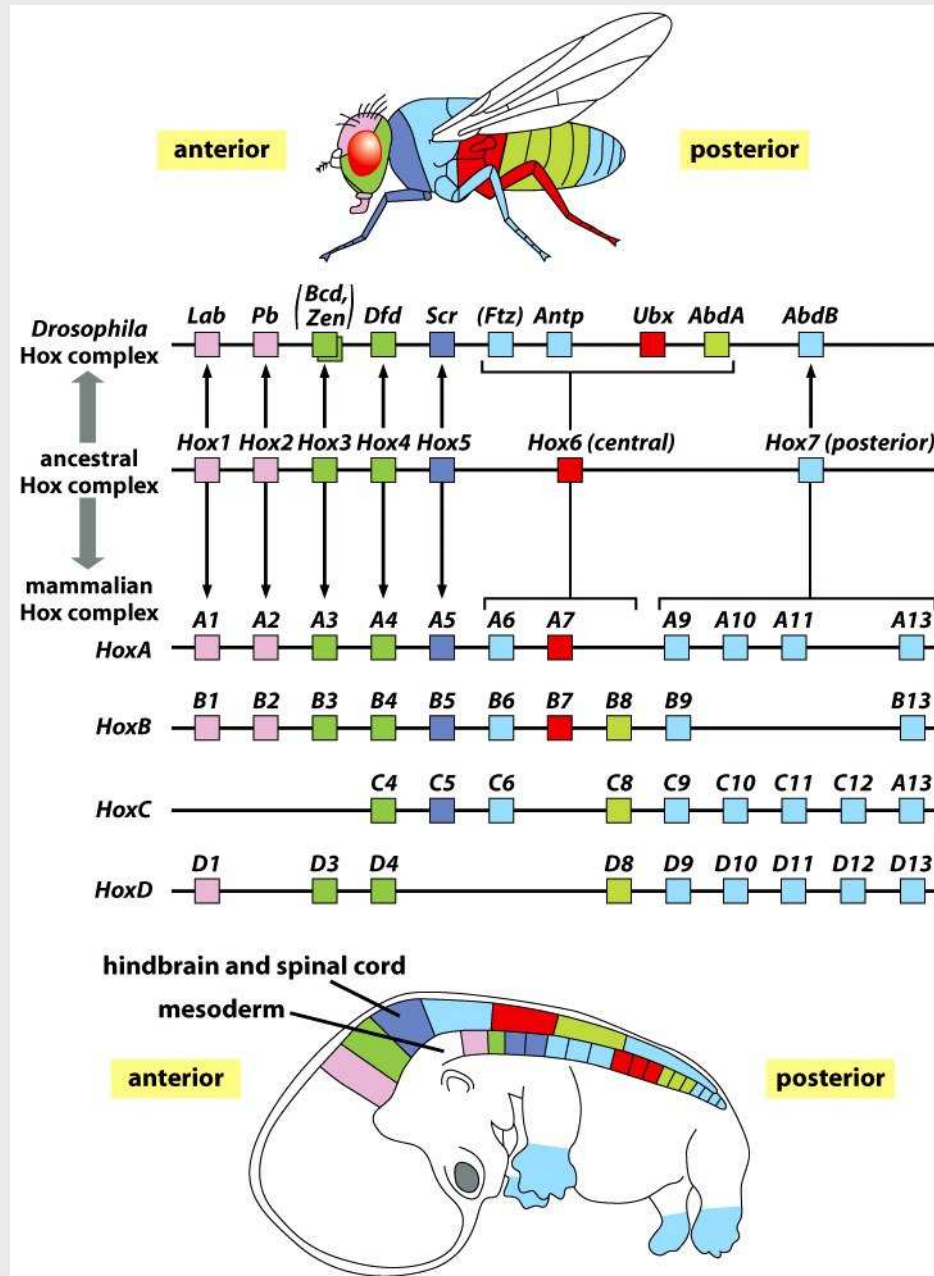


Figure 22-46 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Geni omeotici

- Il più spettacolare esempio del mantenimento nell'evoluzione del meccanismo/macchinario di controllo dello sviluppo
- Il modello corporeo si determina con lo stesso meccanismo per tutti gli organismi.
(andando dal più semplice al più complesso, aumentano solo la complessità e il numero dei geni coinvolti)

Geni omeotici

- Specificano l'organizzazione corporea
- Raggruppati in “clusters”
(1 in Drosophila, 4 in vertebrati)
- Colinearità gene-posizione di espressione
- Fattori di trascrizione (homeobox)
- Sono geni regolatori (“master genes”) che agiscono su più geni esecutori
- Specificano strutture simili, ma diverse nelle diverse specie (unghia/penna; dente/becco)

Geni omeotici

- Sono universali e interscambiabili tra le diverse specie

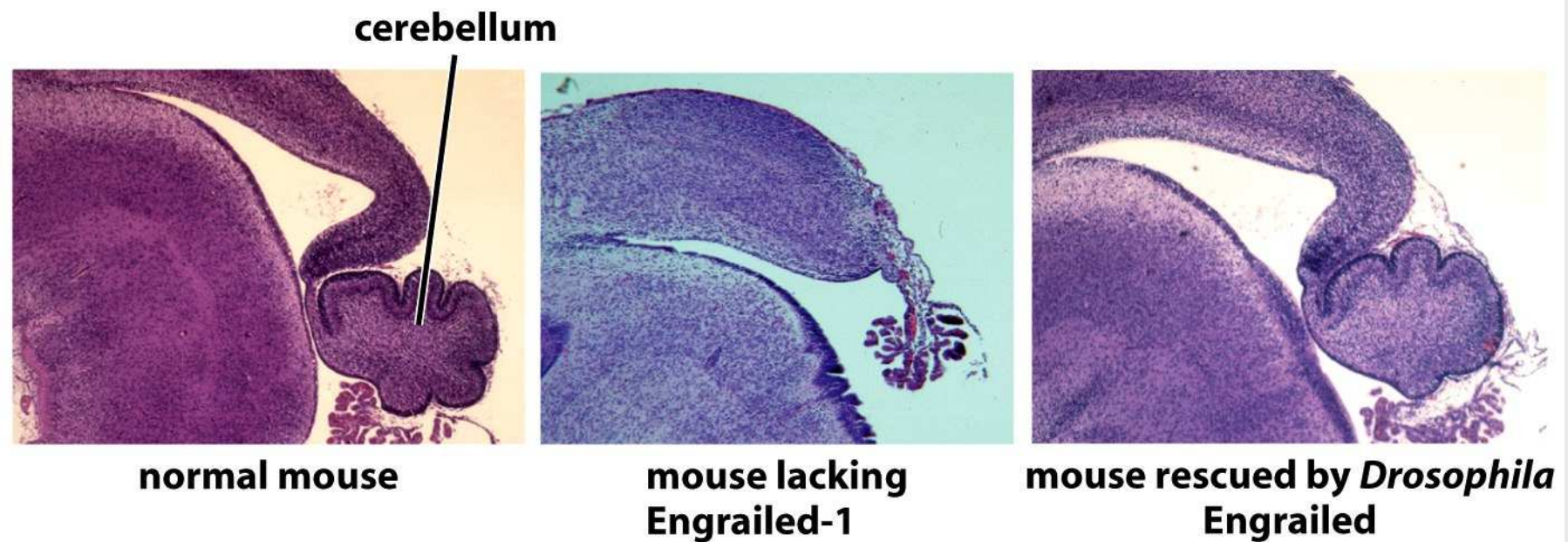


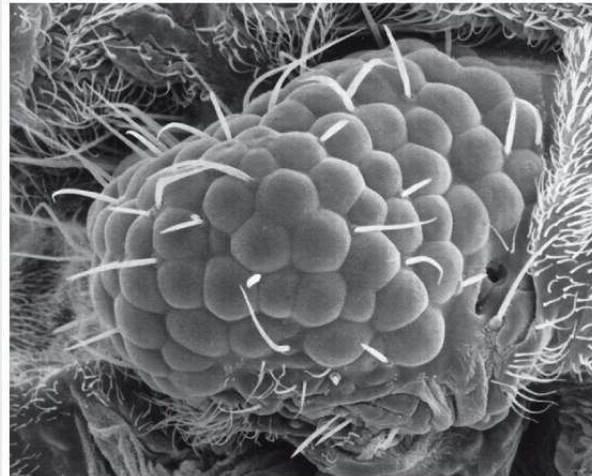
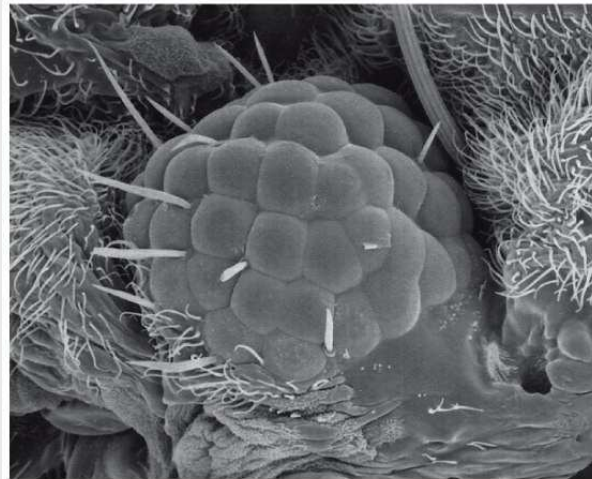
Figure 22-2a Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Universalità dei geni omeotici

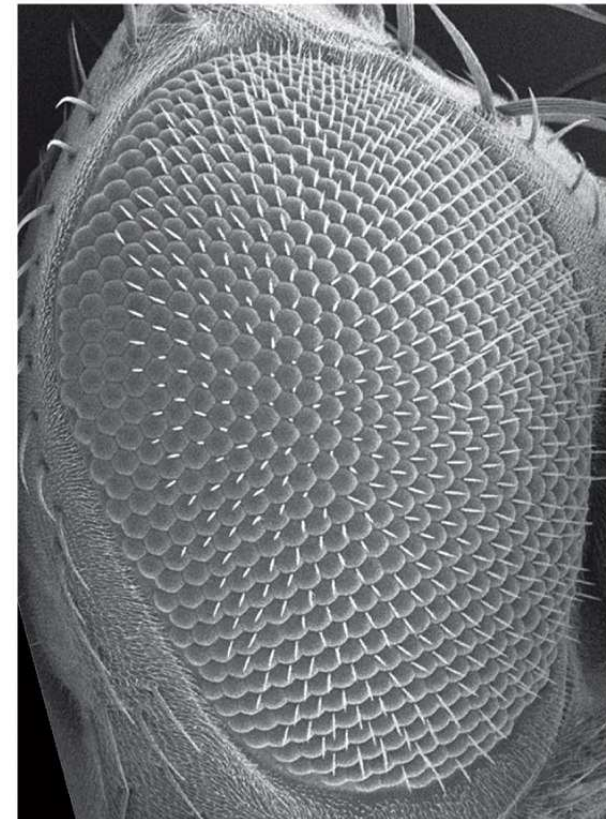
Struttura oculare
ectopica indotta
su zampa di mosca

per espressione di
Eyeless (Drosophila)

o di *Pax6*,
suo omologo in seppia



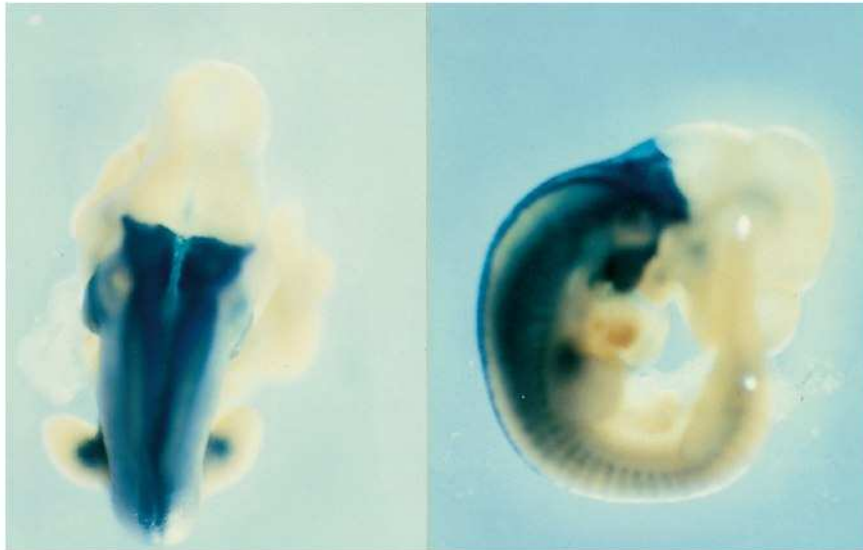
50 μ m



Occhio di Drosophila

Espressione di geni HoxB nell'embrione di topo

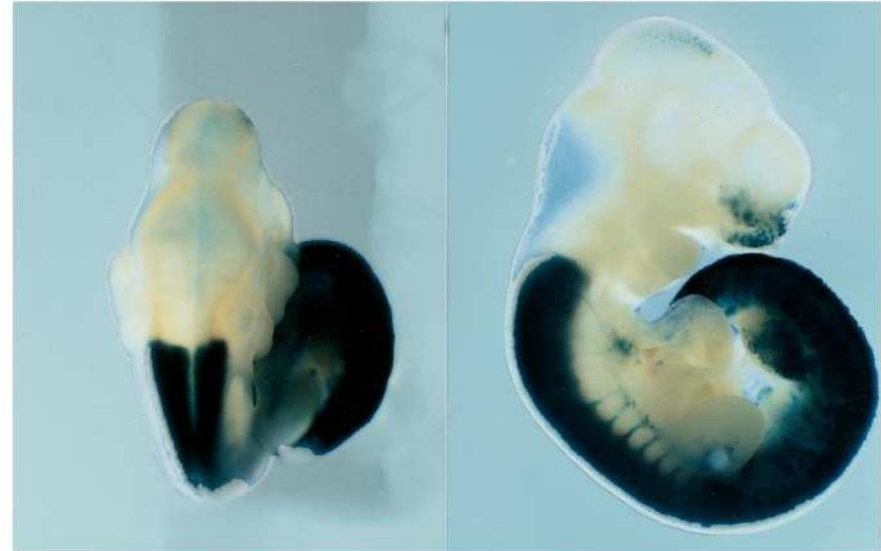
HoxB2



dorsal view

side view

HoxB4



dorsal view

side view

Figure 22-47 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

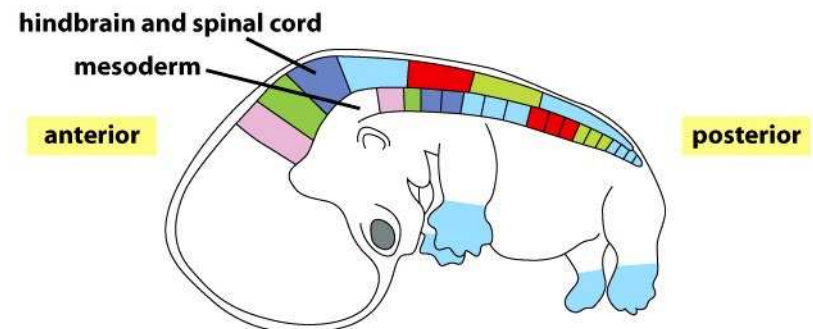
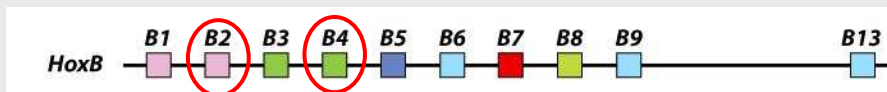
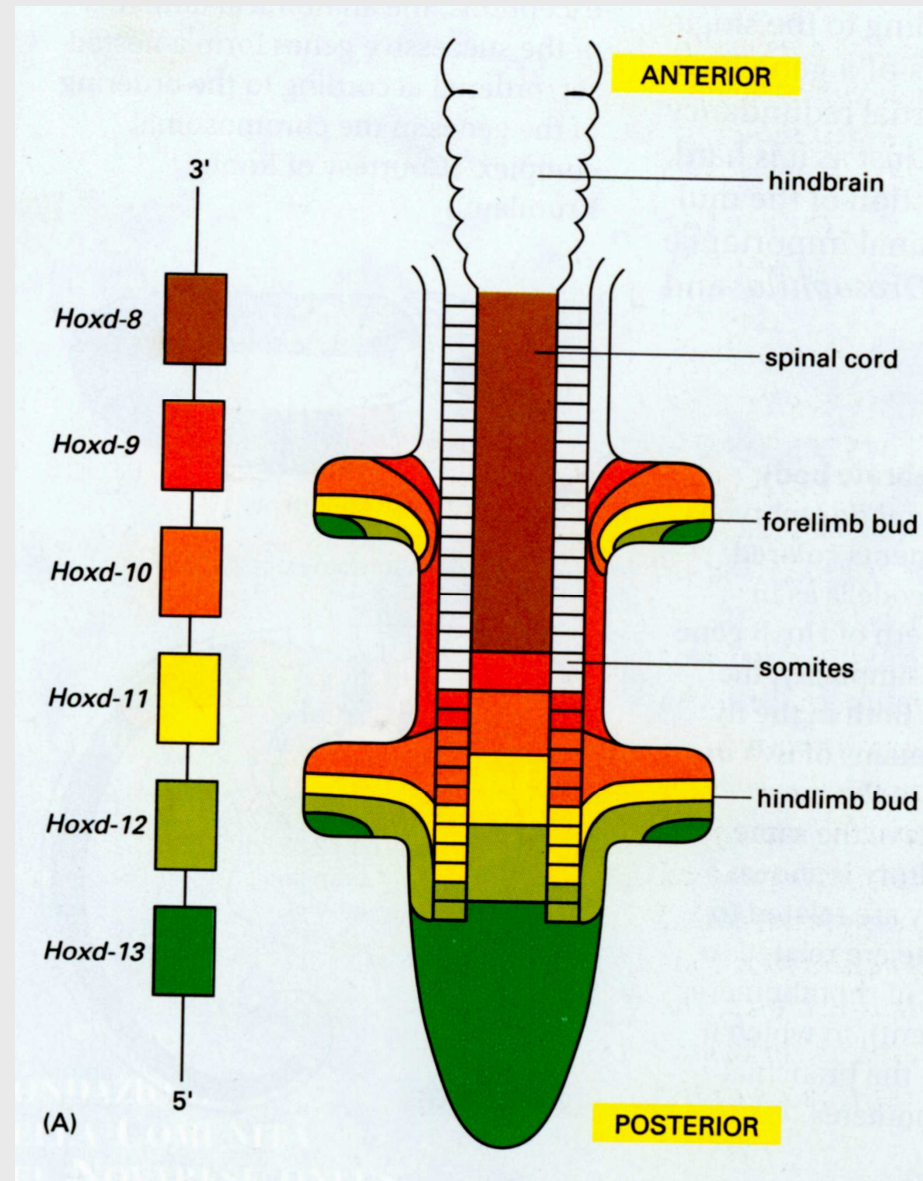
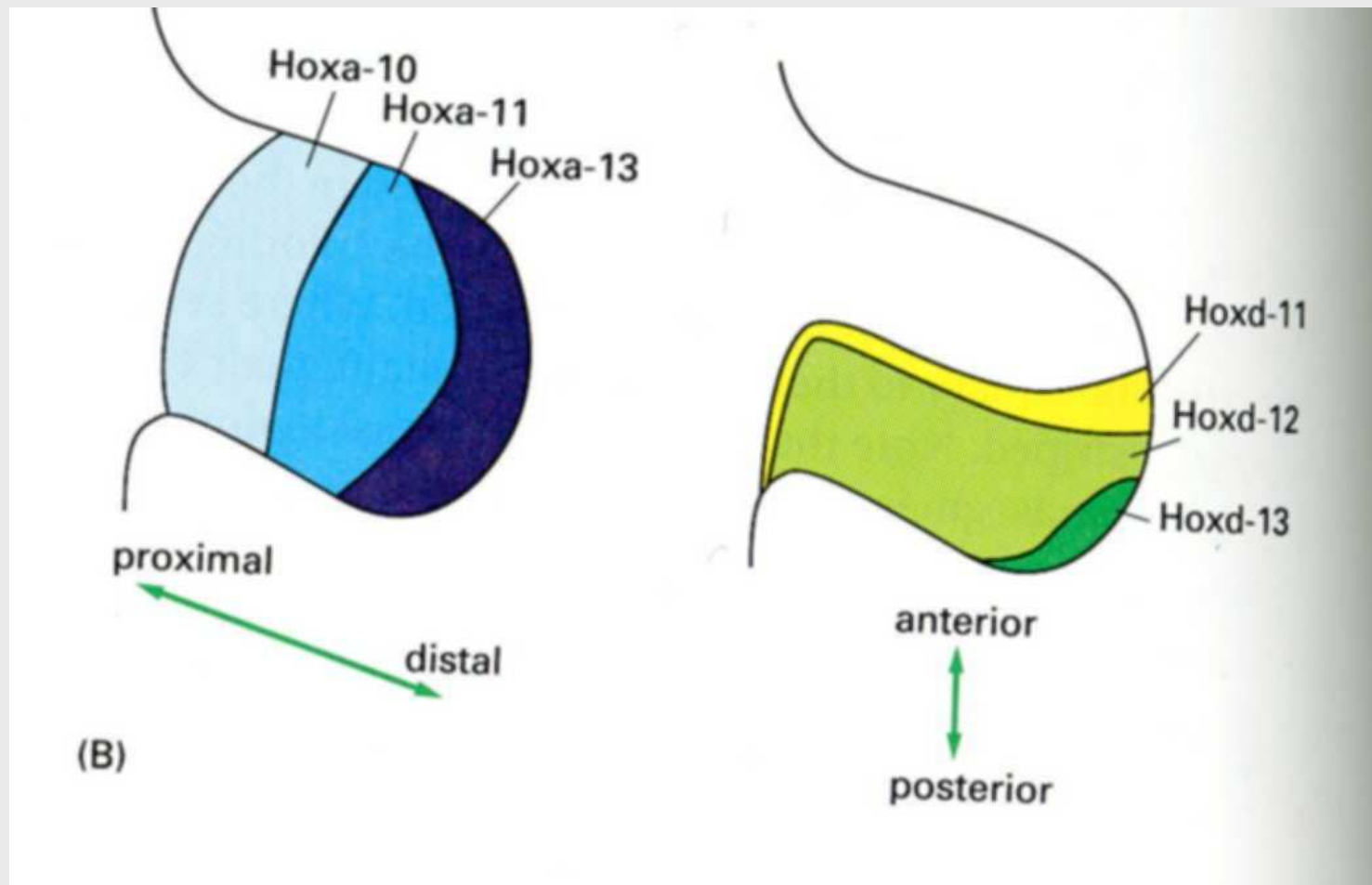


Figure 22-46 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

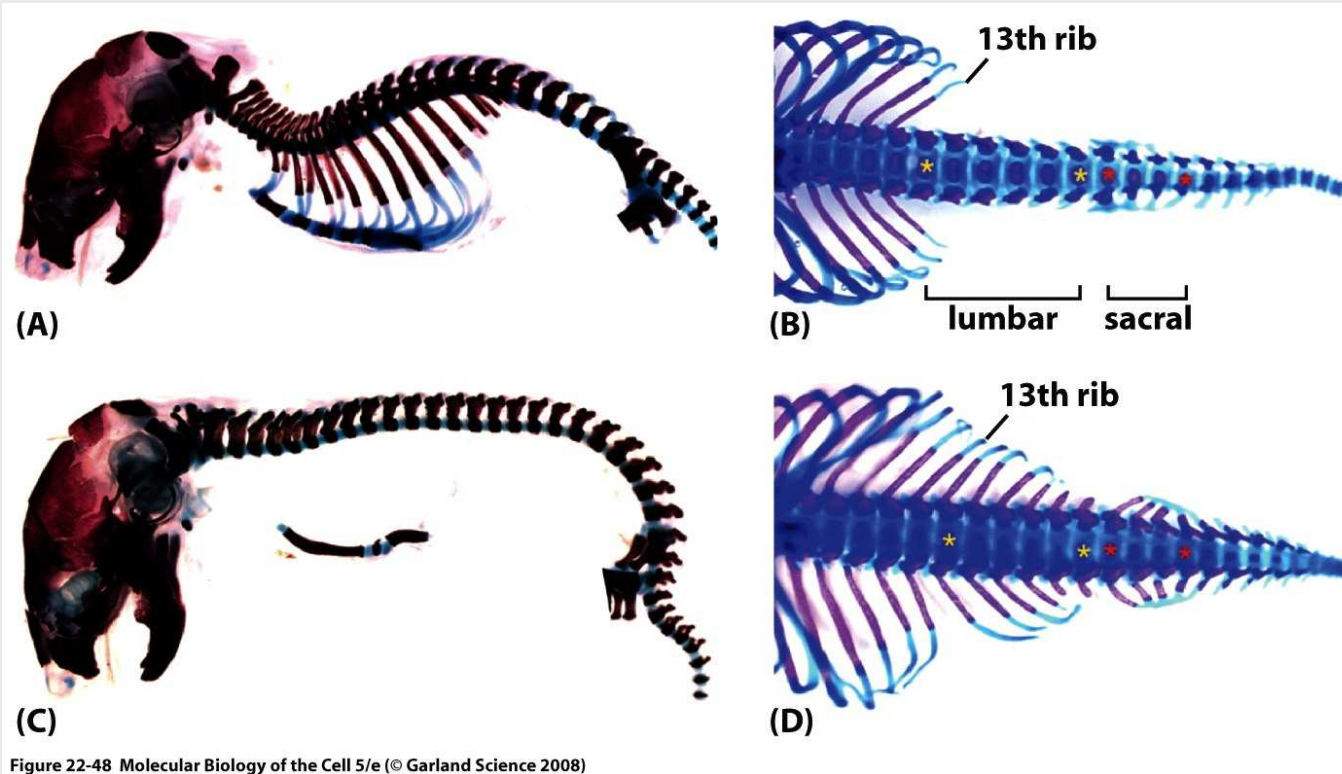
Profilo di
espressione
dei geni Hox
nell'abbozzo
dell'arto
(mammifero)
(topo: asse ant-post)



Espressione di geni Hox nell'arto (uccello: assi prox-dist e ant-post)



Geni Hox controllano schema ant-post nel topo



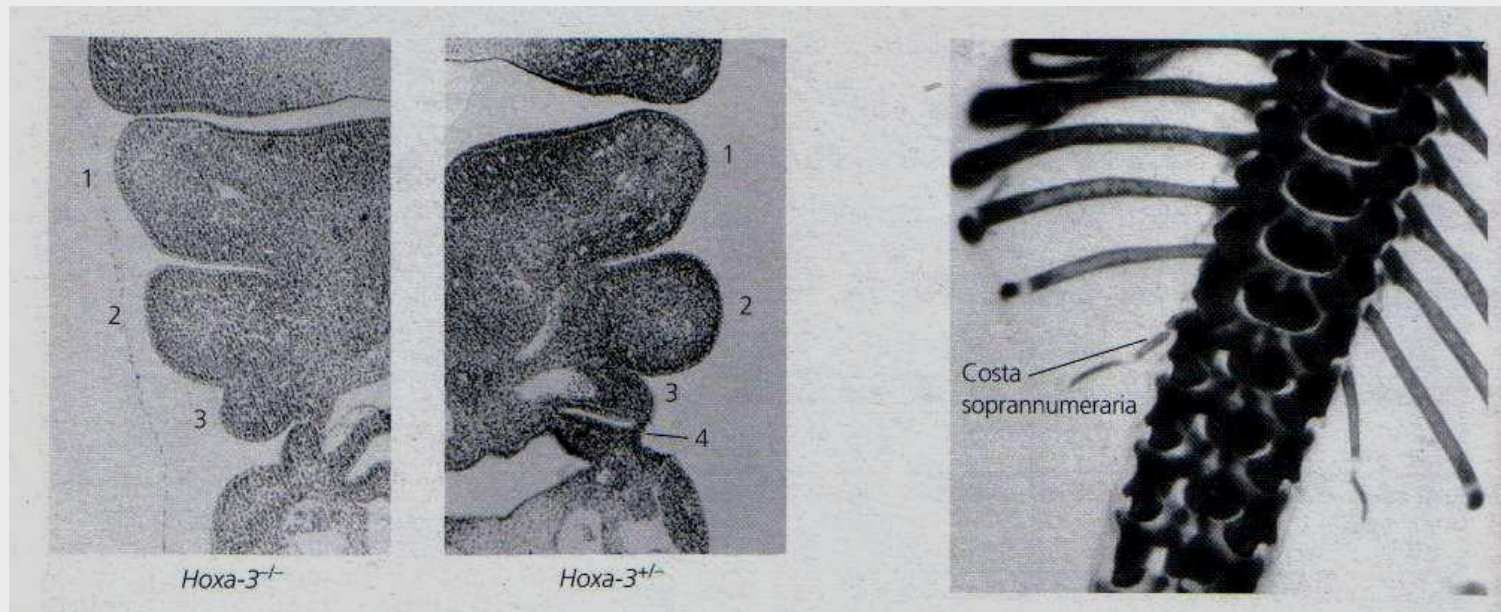
Espressione
ectopica
di *HoxA10*
e suoi
paraloghi

KO
di *HoxA10*
e suoi
paraloghi

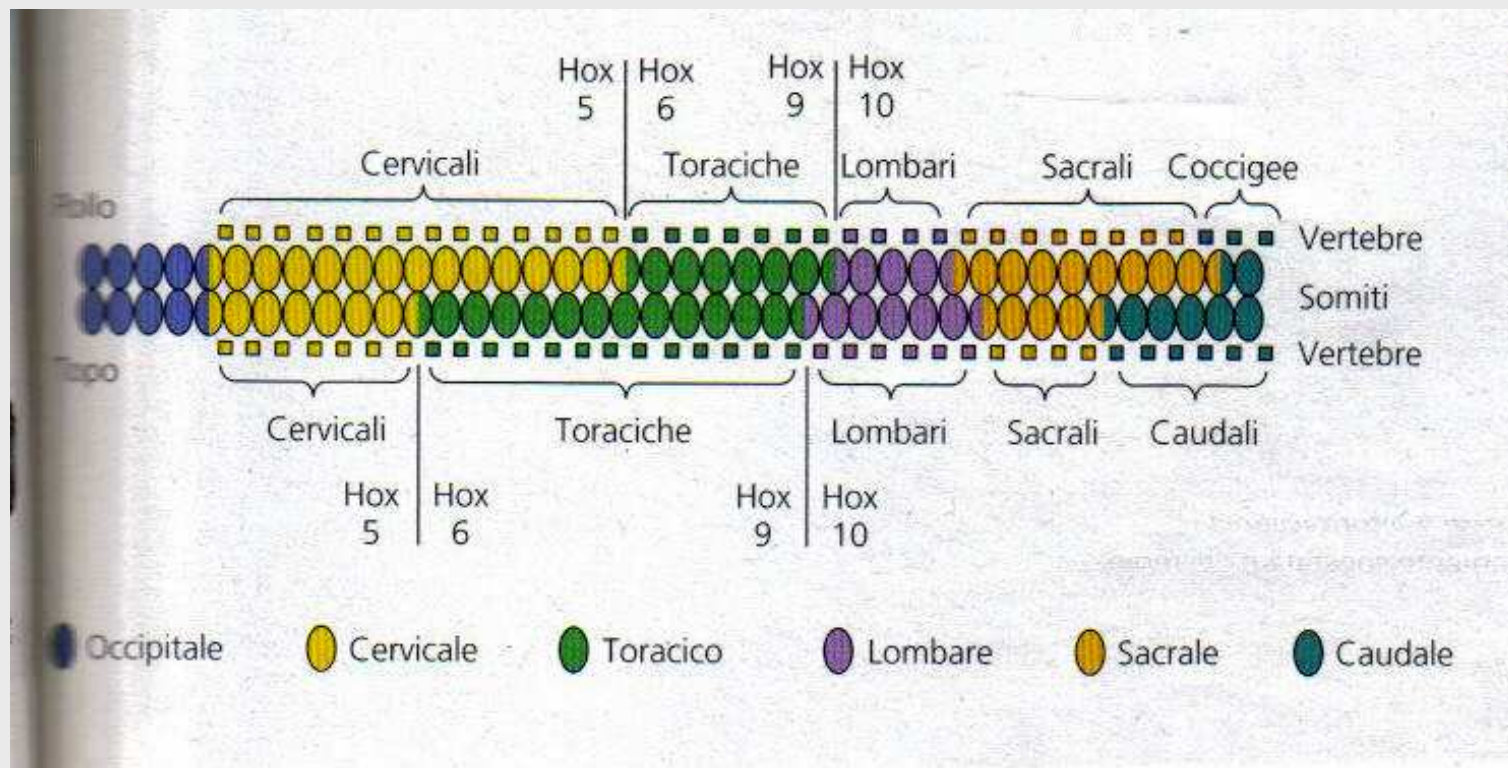
Fenotipo lombare
→ posteriorizzazione

Fenotipo toracico
→ anteriorizzazione

Difetti di Hox in mammiferi



Geni omeotici e colonna vertebrale



- Geni omeotici danno indicazioni per identità del segmento
- Variazioni su tema generale
- Semplificazione massima del sistema (→ efficienza)
- Le appendici vengono costruite in maniera modulare e consistono di sottostrutture