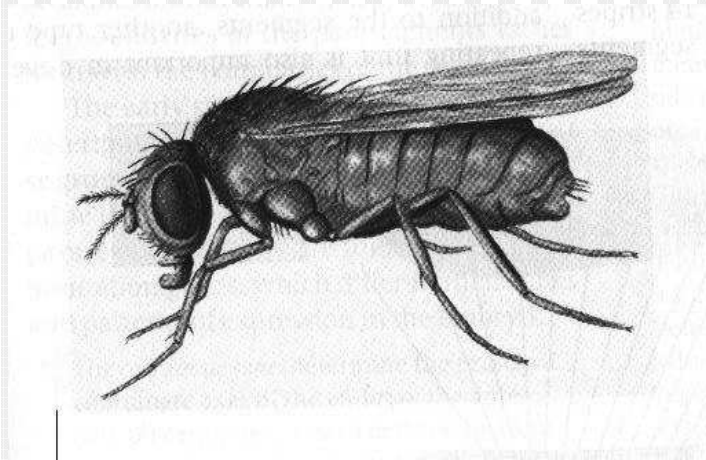


Drosophila melanogaster

Základní informace



Historie

- Morgan, Bridges, Sturtevant, Muller, Rubin, Spradling, Garcia-Bellido, Ashburner
- V současnosti pracuje na problematice 6 490 vědců

Výhody pro genetiku

- 4 páry chromozomů
- krátký generační cyklus a velké množství potomků
- existence polytenních chromozomů
- snadná laboratorní manipulace

Hlavní databázové adresy

- Fly Base - A Database of the *Drosophila* Genome
<http://flybase.bio.indiana.edu/>
- Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) <http://www.fruitfly.org/>
- European *Drosophila* Genome Project (EDGP) <http://edgp.ebi.ac.uk/>

Databázové informace

- Bibliografie, více než 156 tis. citací
- Popsáno více než 46 tis. alel, 14 tis. aberací, 9 tis. transkriptů
- Známo celkem 14 480 kmenů drozofil

Chromozomy u *Drosophila melanogaster*

- Chromozom X akrocentrický
- Chromozom Y asi 0,79 délky X
 - geny kódující organizátor jadérka (*bobbed* -
ňouma, netrefený)
 - geny působící při primární spermatogenezi
(*kl 1 - kl 5*)
- Chromozomy 2. a 3. metacentrické
- Chromozom 4. je velice malý

Genom *Drosophila melanogaster*

- Ramena 4 chromozomů dělena na 102 sektorů

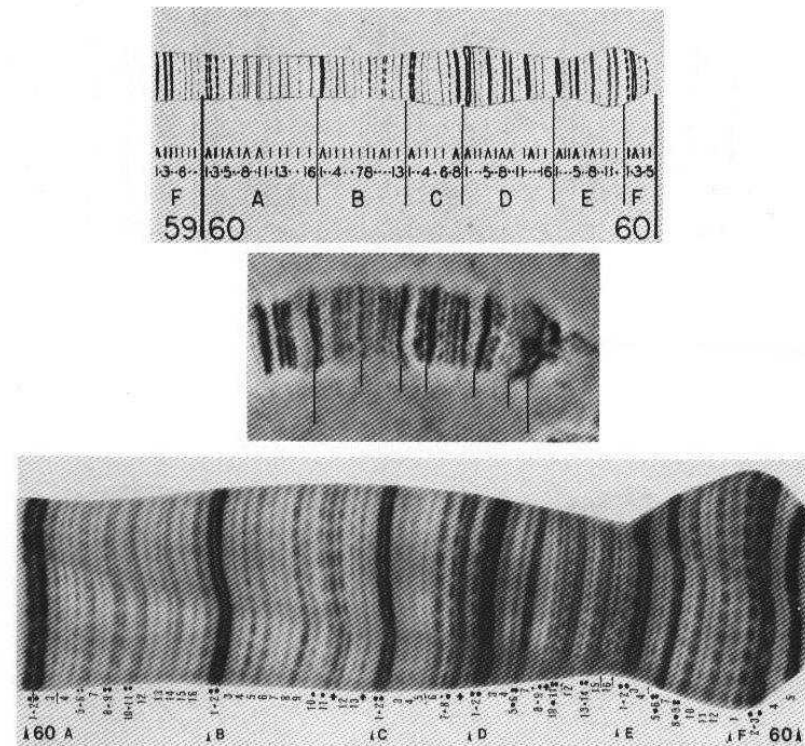
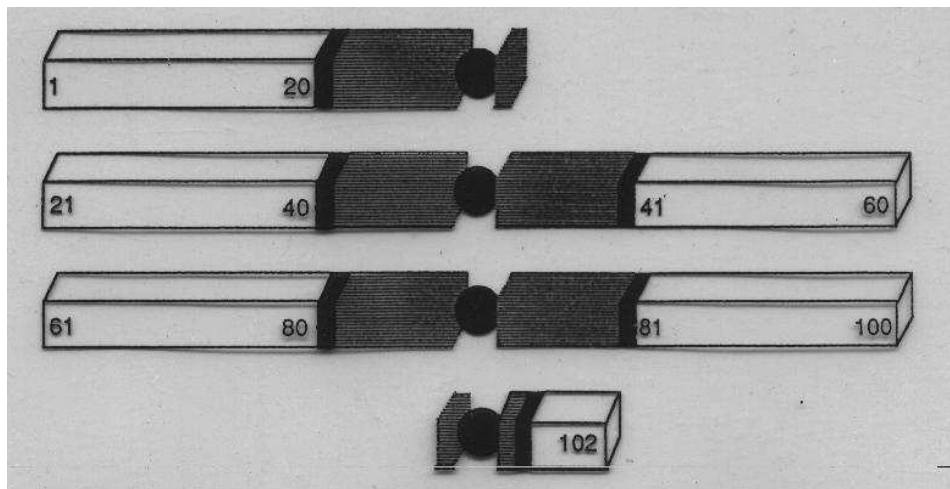


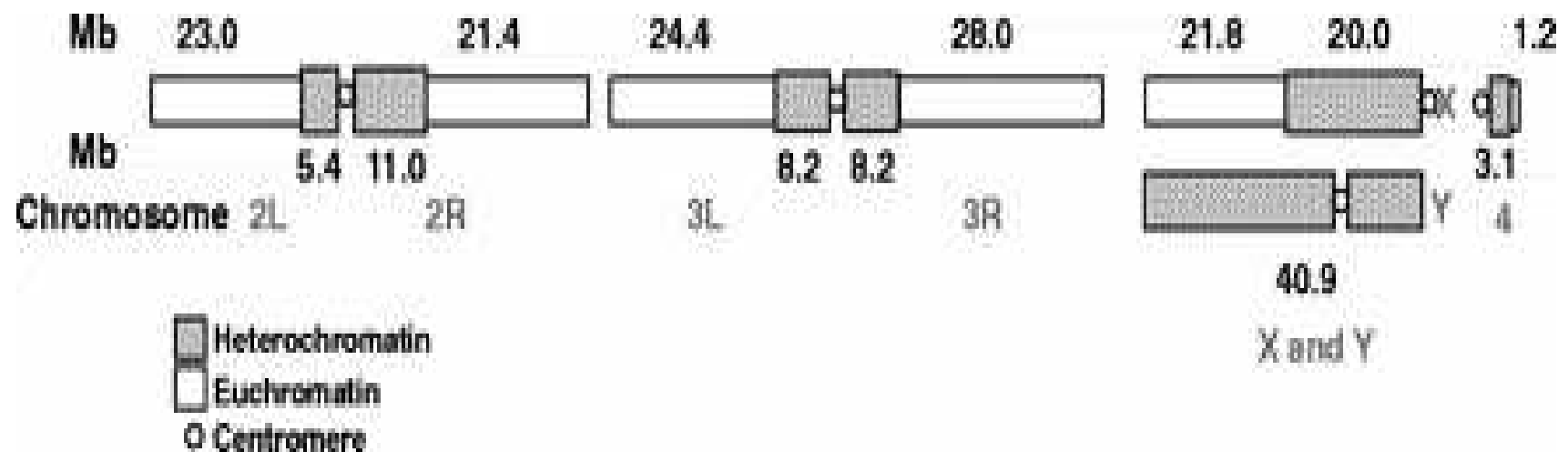
FIGURE 1 (continued)

Genom *Drosophila melanogaster*

- Obsah DNA v diploidní buňce 0,35-0,36 pg
- 74% genomu tvoří nerepetitivní DNA
- 24% genomu tvoří repetitivní DNA
 - 12% vysoce repetitivní s nejčastějším motivem ATAAT, ATATAAT, AATAACATAG, AAGAG, AGAGAAGAAG
- 99% známých mutací leží v euchromatinových oblastech
- Charakteristická je nízká nebo žádná metylace cytosinu

Genom *Drosophila melanogaster*

- 69% euchromatin
- 31% heterochromatin



Genom *Drosophila melanogaster*

- Genom kompletně zmapováno
- Počet genů je 13 615
 - odhad z proužků na polytenních chromozomech byl asi 5 000, některé proužky obsahují více než jednu komplementační skupinu, až 15 000 genů
 - minimální počet genů mnohobuněčných organismů se odhadoval na 12-14 000 genů
- Velikost haploidního genomu je asi 180 Mb (124 Mb eu-, 56 Mb heterochromatin)

Science 2000, 287, 2185-95

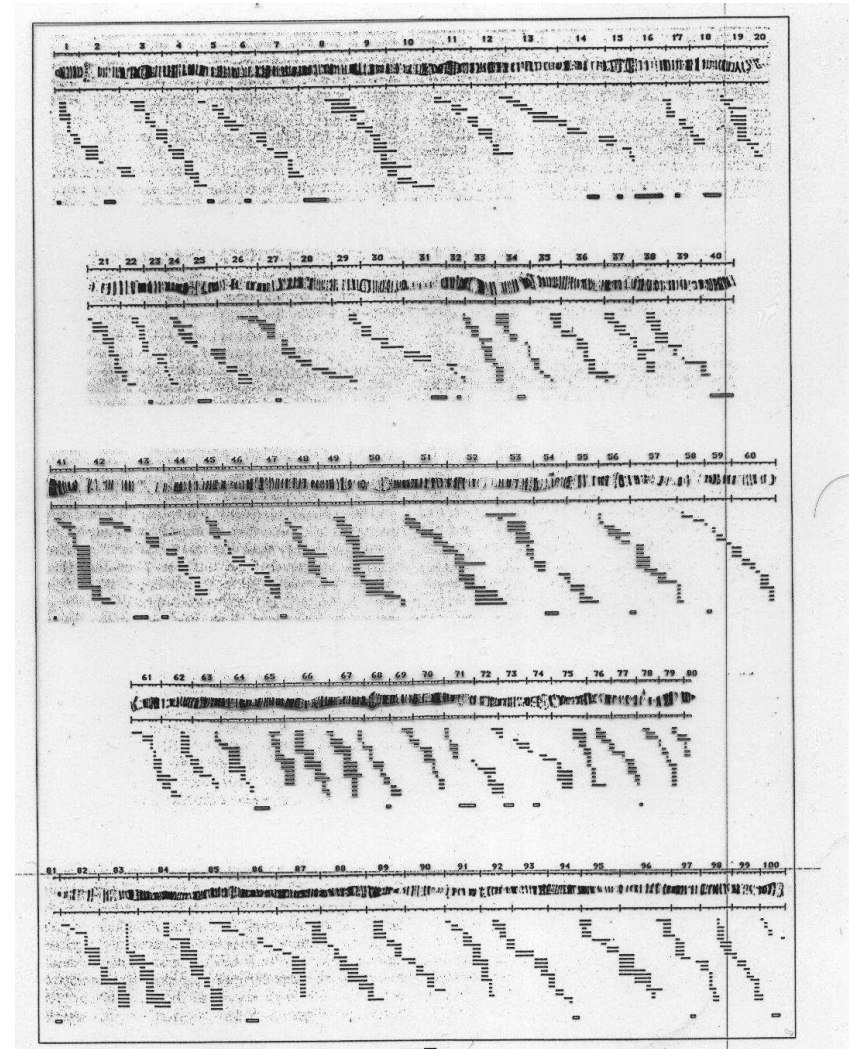
■ The genomic sequence of *D. melanogaster*

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC.

Celera Genomics, Rockville, USA

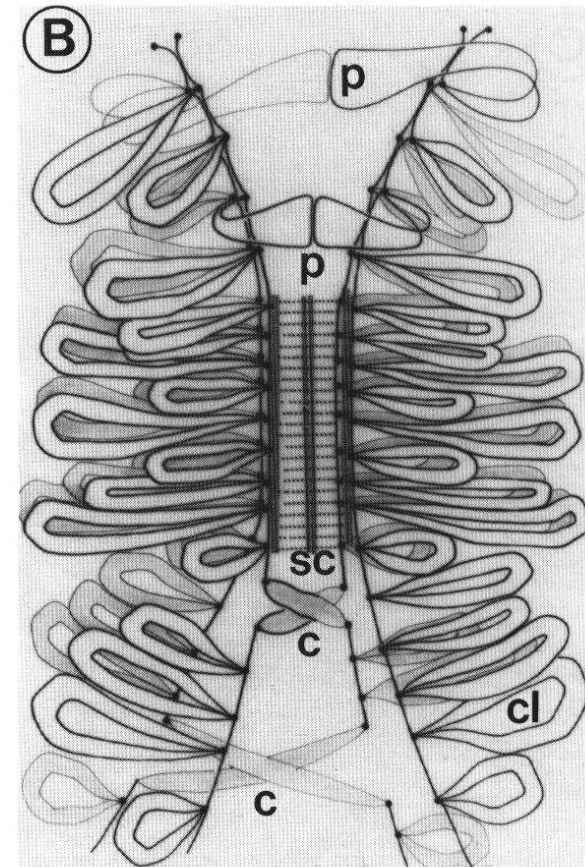
Postup mapování genomu

- 9216 kontigů,
naštěpení *Hinf*1
- 1085 YAC
- RT-PCR
- Polytenní
chromozomy
- Analýza informací
DNA

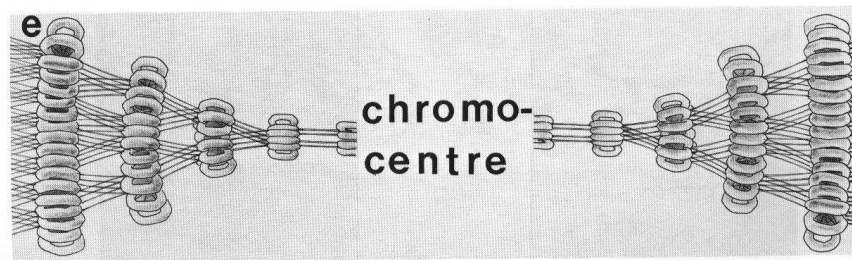


Známé genetické mechanismy

- Polytenní chromozomy
- Hybridní dysgeneze
- Kompenzace dávky genů
u samečků dochází ke dvojnásobné transkripci X chromozomu (dominantní gen *Sex-lethal*)
- U samečků nedochází k rekombinaci
- Variabilita genomu standardních linií kolísá mezi 0,002-0,018
dva náhodně vybrané chromozomy se liší v průměru ve 4 bp na 1 kb



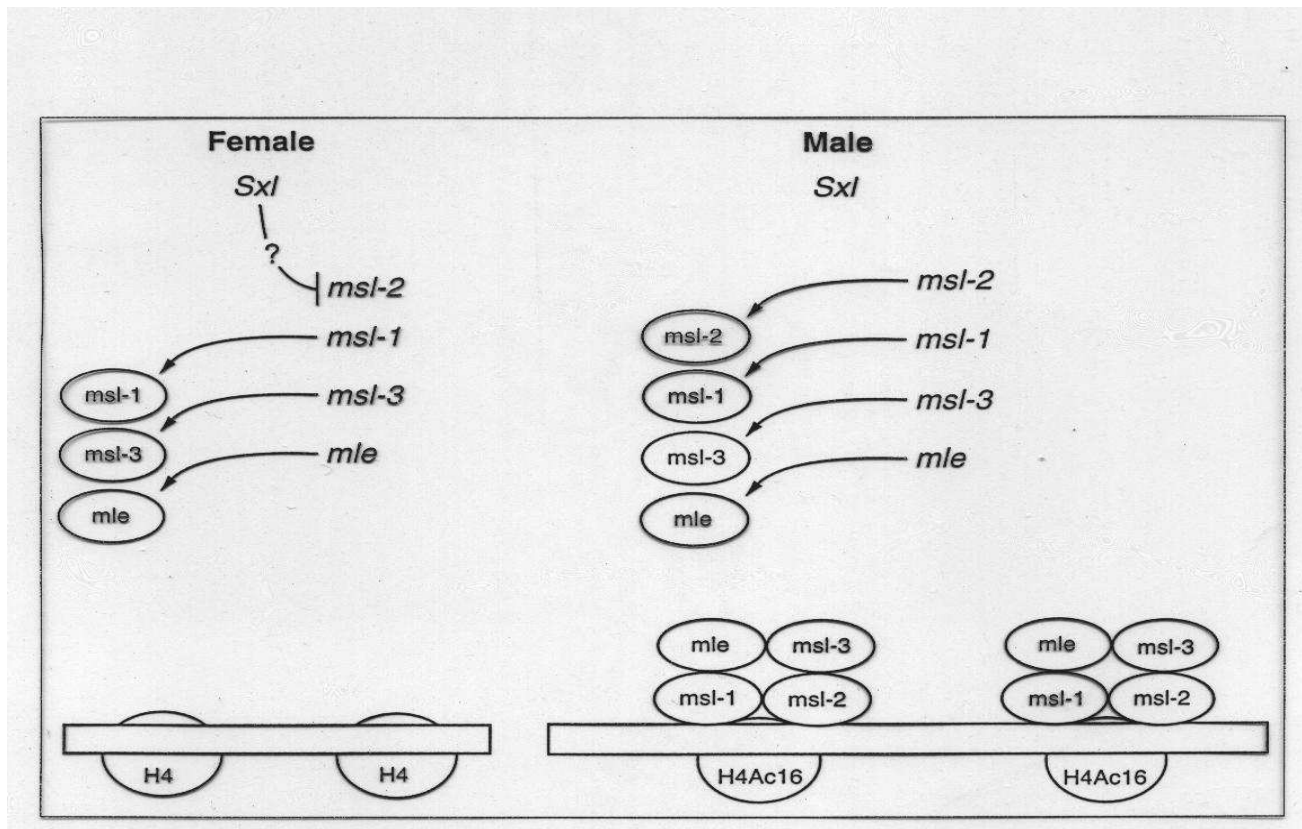
Polytenní chromozomy



- Vyskytují se ve slinných žlázách
- Obrovský potenciál pro mnohostranný genetický výzkum, jsou složeny z celkem 1024 paralelních vláken (polytenizují pouze euchromatinové oblasti)
- Obsahují celkem 5100 proužků po nabarvení
- Puffy jsou místa chromatinu spojená intenzivní transkripcí projevující se dekondenzací chromozomů

Známé genetické mechanismy

- Tvorba pohlaví
dominantní gen *Sex-lethal*



Transgenoze u drozofil

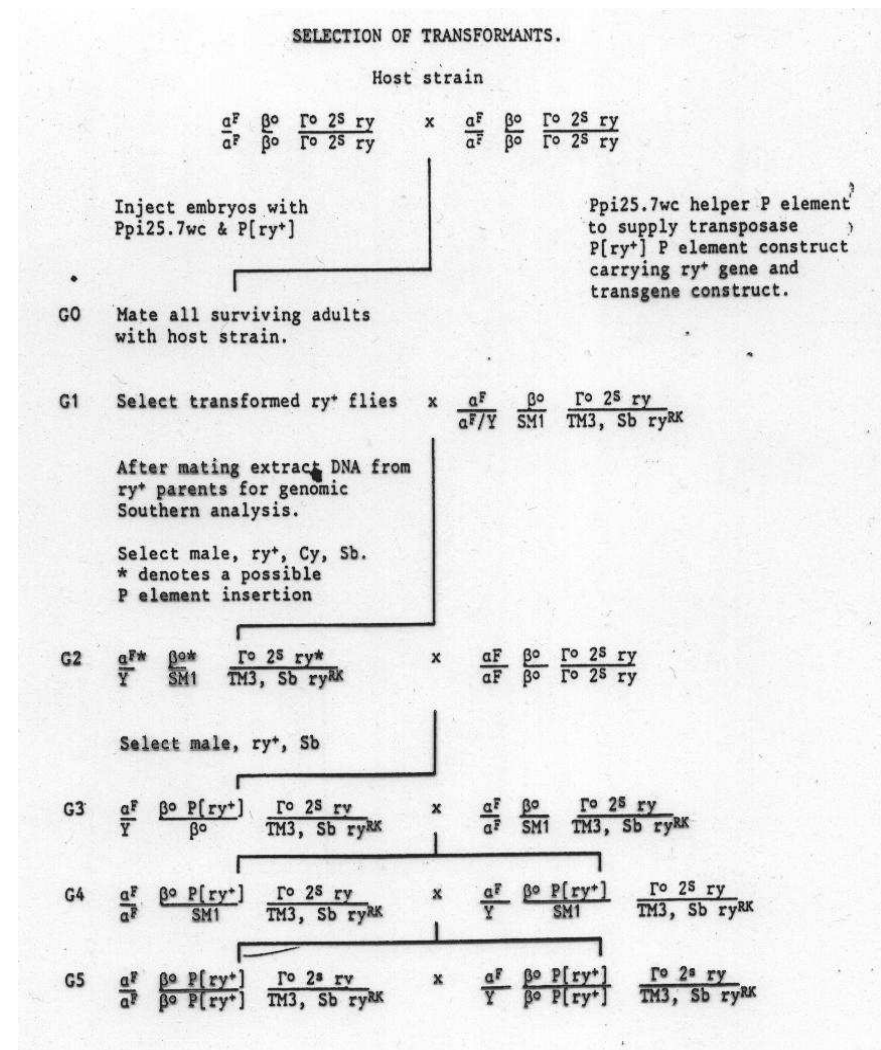
- Volba transgenu
- Volba promotoru
- Volba signálního genu
- Kolekce vajíček
- Jehly
- Mikroinjekce
- Selekcce transgenních organizmů

Promotory

- Spolehlivost exprese – vysoká hladina transkripce transgenu
- Exprese ve vhodném vývojovém stadiu
- Tkáň, ve které dochází k expresi
- Nejčastěji používané promotory
 - LSP – larvální sérové proteiny
 - HSP 70 – promotor heat shock proteinu 70

Signální geny

- Důkaz úspěšné transgenózy
 - Gen *rosy* – kóduje enzym xantin dehydrogenázu
 - Gen *white* – bílá barva očí



Kolekce vajíček

- Kladení 15-30 min
- Orientace vajíčka
 - Mikropyle – anterierní pól
 - Injekce do posterierního pólu
- Dechorionace (mechanická, chemická)
- Fixace vajíček na podklad
- Desikace (10 min při 18 °C)

Mikroinjekční jehly

■ Tloušťka jehly

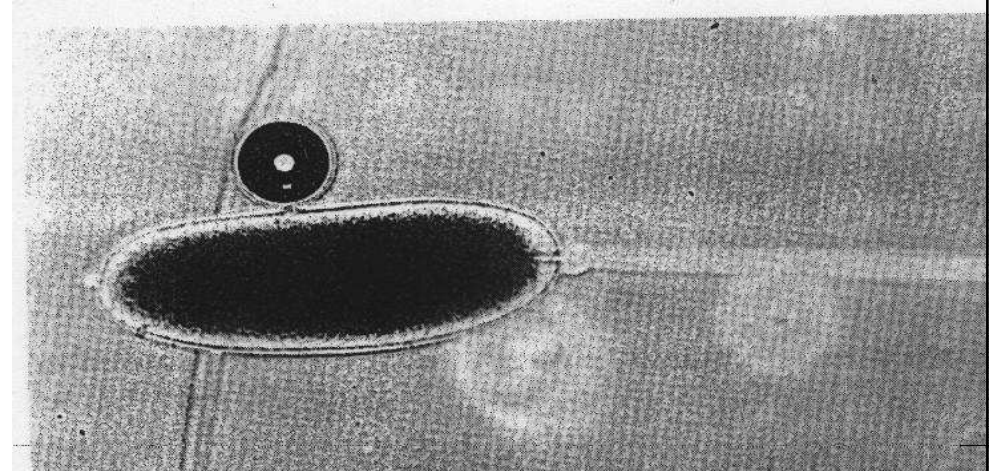
- Savci v jednotkách μm
- Zebra fish 5-10 μm
- Drosophila okolo 10 μm

■ Špice jehly

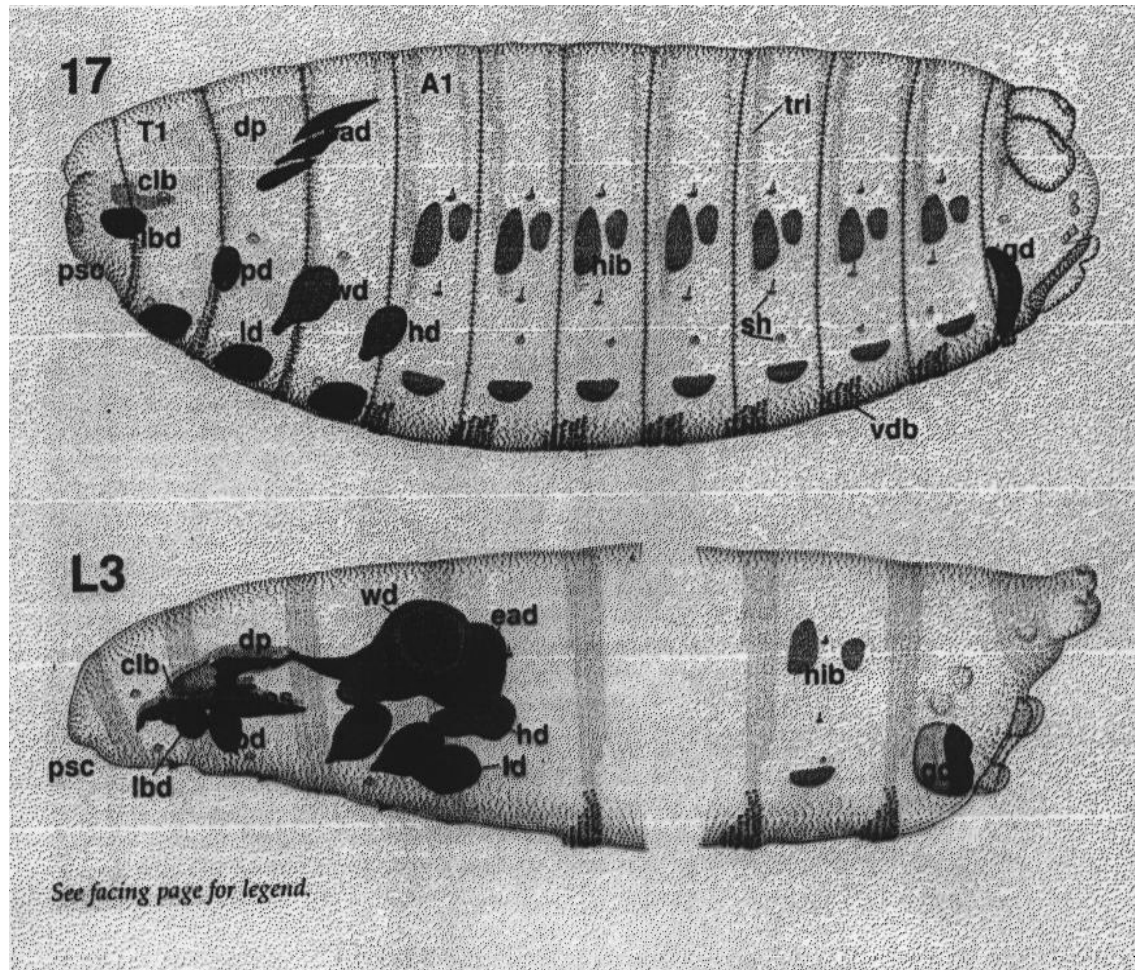
- Po zlomení (drozofila, ryby)
- Broušení (savci)

Mikroinjekce

- Prostředí
 - Olej (Voltalef oil)
 - Teplota
 - Čas (syncytium dělících se buněk)
- Množství
- Místo injekce



Mikroinjekce

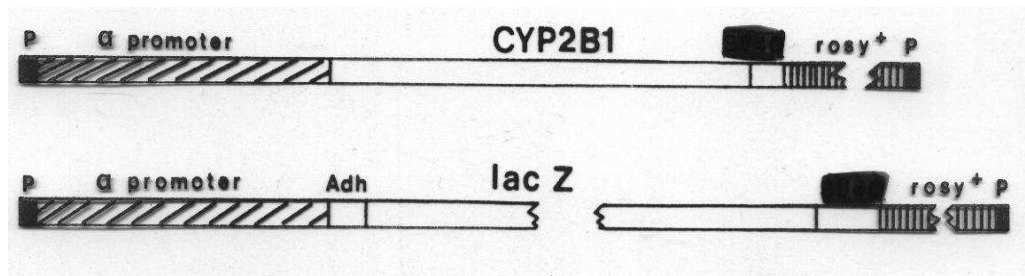


Volba transgenu

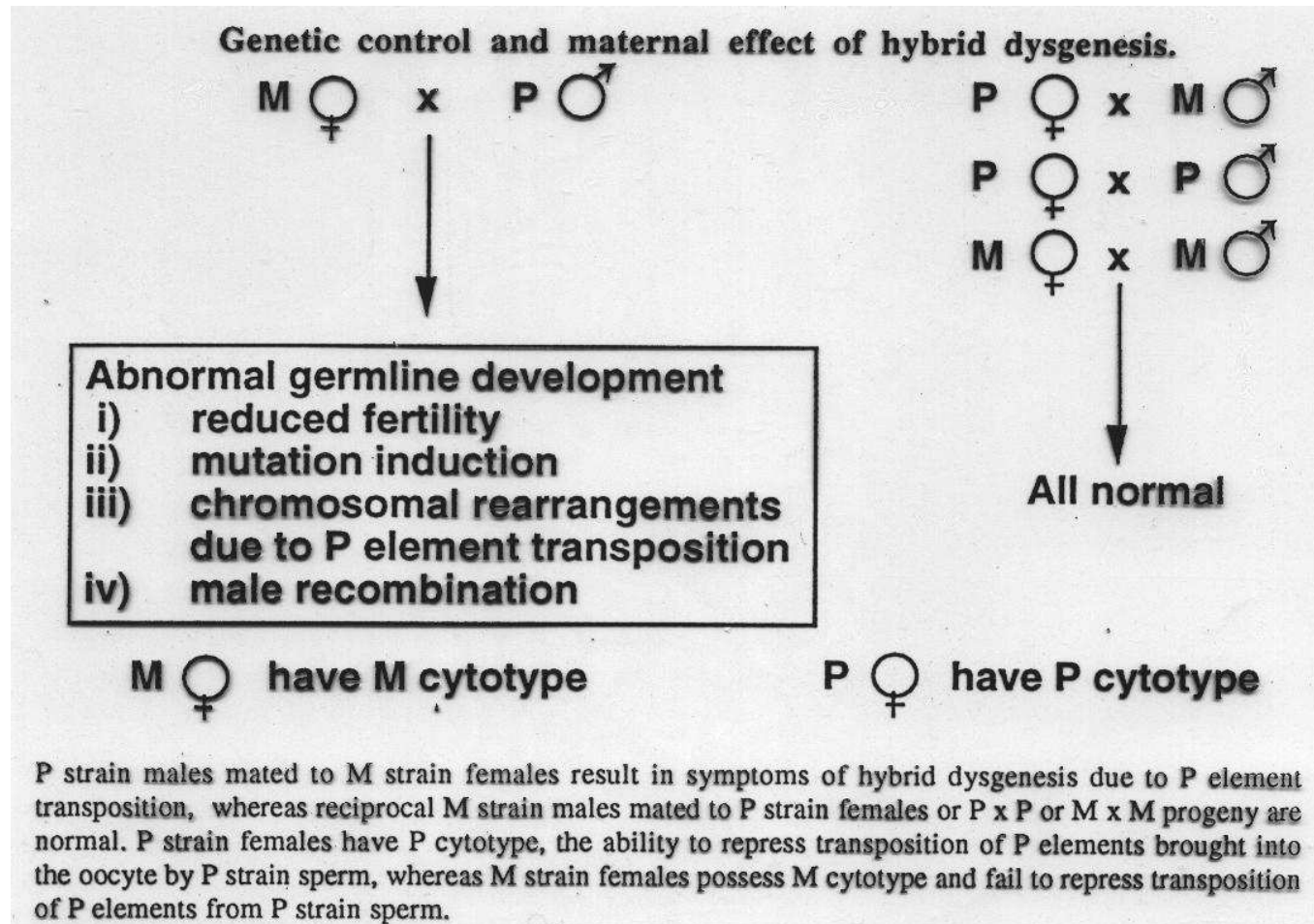
- Nutná znalost vlastních genů
- Modely funkce cizorodých genů
 - Lidské geny pro metabolizační enzymy
(*CYP1A1, 1A2, 2D6 ..*)
- Sledování promotorů
- Modely funkce prionů

Hybridní dysgeneze

- Křížení samečků P kmene (nesoucí P-elementy) se samicemi M kmene
 - Výskyt mutací, rekombinací a chromozomových přestřev
- P-elementy
 - Autonomní 2,9kb, kódují transponázu, deletované koncové 31pb repetice, neschopný začlenění
 - Defektní, deletovány určité oblasti čtecího rámce kódujícího transponázu, koncové repetice má úplné, nese transgen, je mobilizován transponázou autonomního elementu



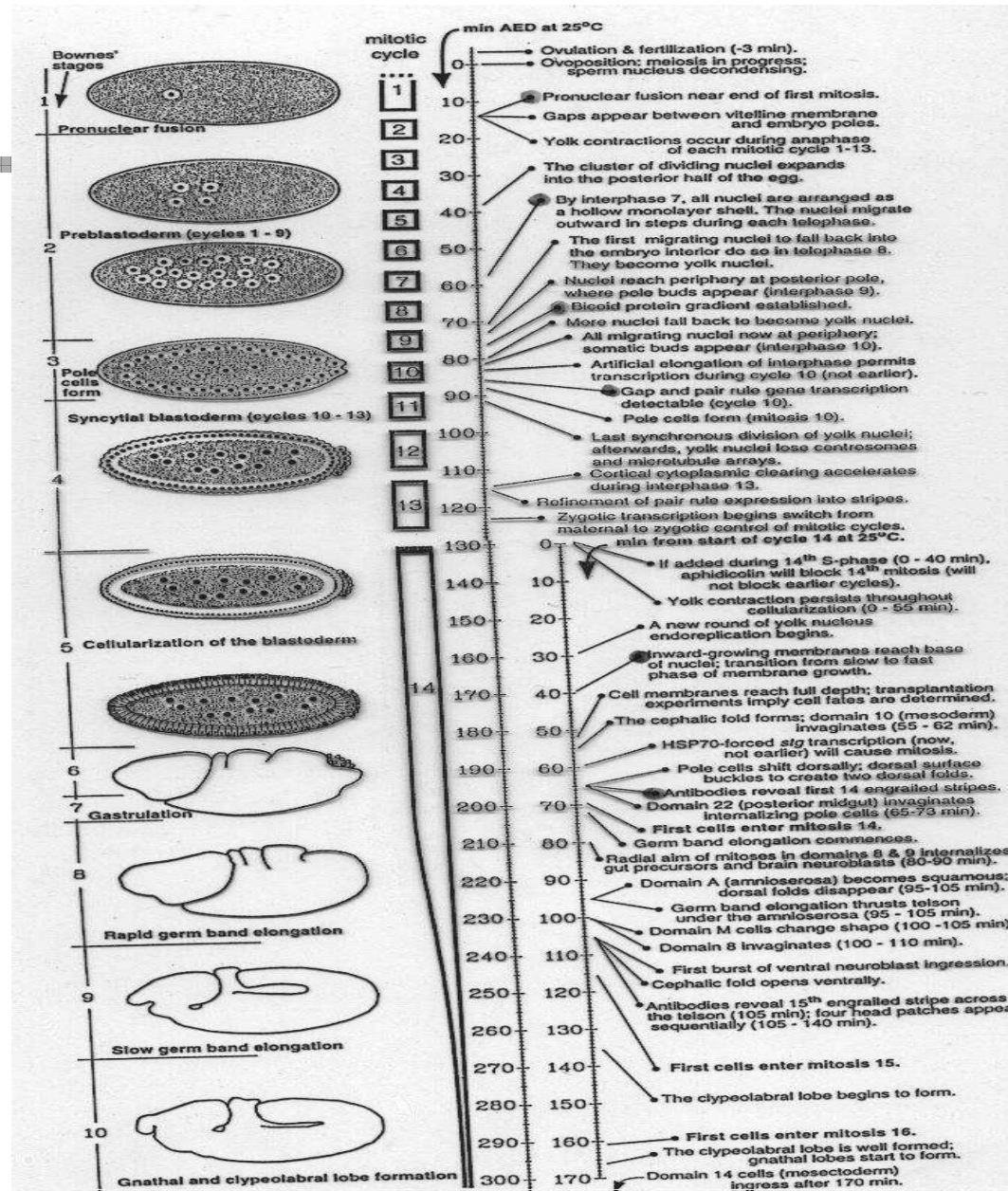
Hybridní dysgeneze



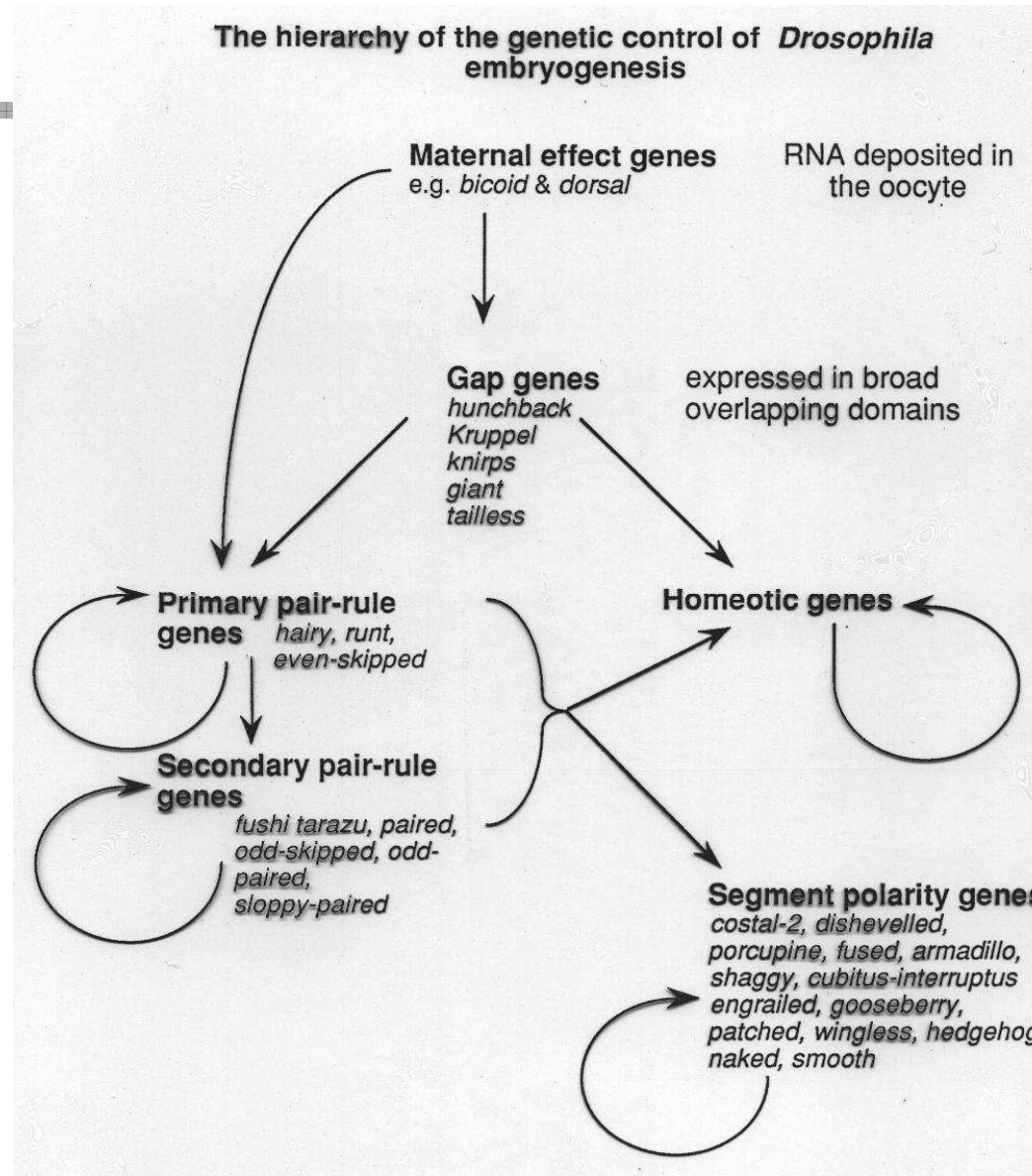
Embryogeneze

- 1.-13. cyklus 2 hodiny, bez celularizace
 - Syncitiální typ embrya
- 14. cyklus tvorba buněčných stěn
 - Lokalizace
 - Specializace
- Spuštění genů formujících anterior-posteriorní osu
 - 25 segmentačních genů (Gap, Pair-rules, Segment polarity)
 - 7 homeotických genů (Antennapedia a Bithorax komplex)
 - Primární transkript *Antp* genu 103 kb – 90 min syntéza

Embryogeneze



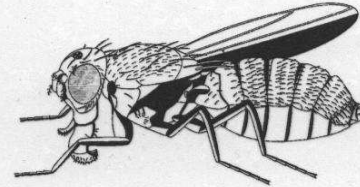
Embryogeneze



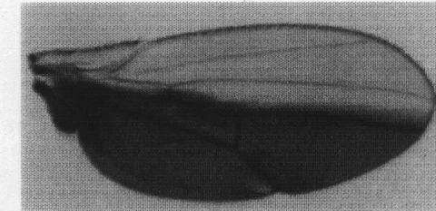
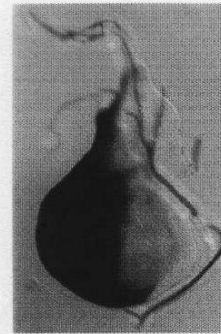
Embryogeneze

- Expresse *engrailed-lacZ*

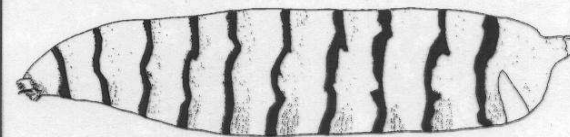
Expression of *engrailed-lacZ* transgene inserted at the *engrailed* locus



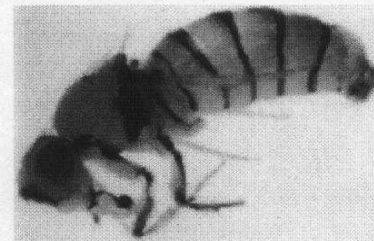
Engrailed protein and β -galactosidase are expressed in the posterior compartment of each body segment



X-gal staining for β -galactosidase showing expression in the posterior compartment of the wing imaginal disk and in the adult wing



X-gal staining for β -galactosidase showing expression in the epidermis of the third instar larva carrying *ryxho25 en-lacZ* transgene



X-gal staining for β -galactosidase showing expression in the posterior compartment of each of the adult body segments

Taken from Hama et al., (1990) *Genes Dev.* 4: 1079-1093. Region specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila engrailed* promoter.

Praktické aplikace

- Využití v testech genotoxicity

Genotoxicity testing using the Szabad SMART test in *Drosophila*

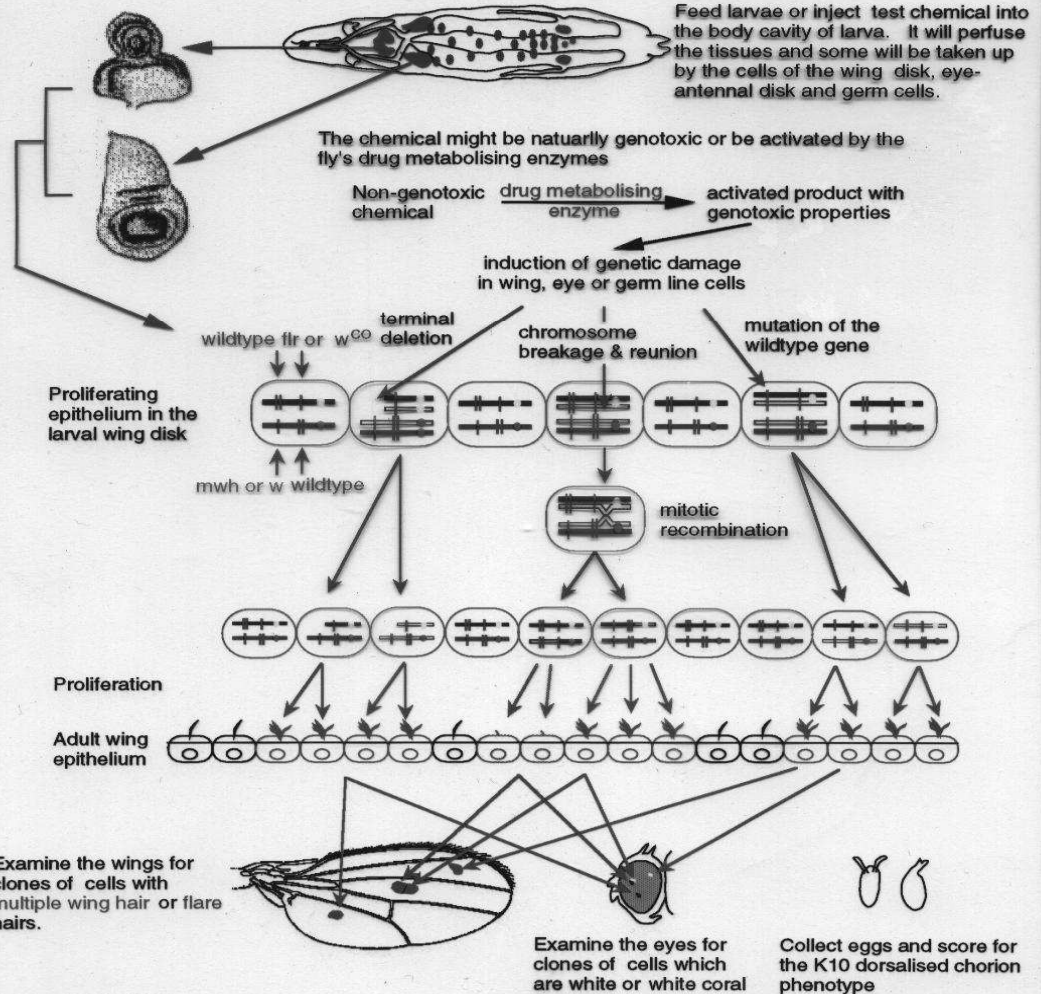
mwh = multiple wing hair, a recessive mutation which causes extra hairs on the wing blade.



fir = flare, a recessive mutation which causes abnormal hairs on the wing blade.

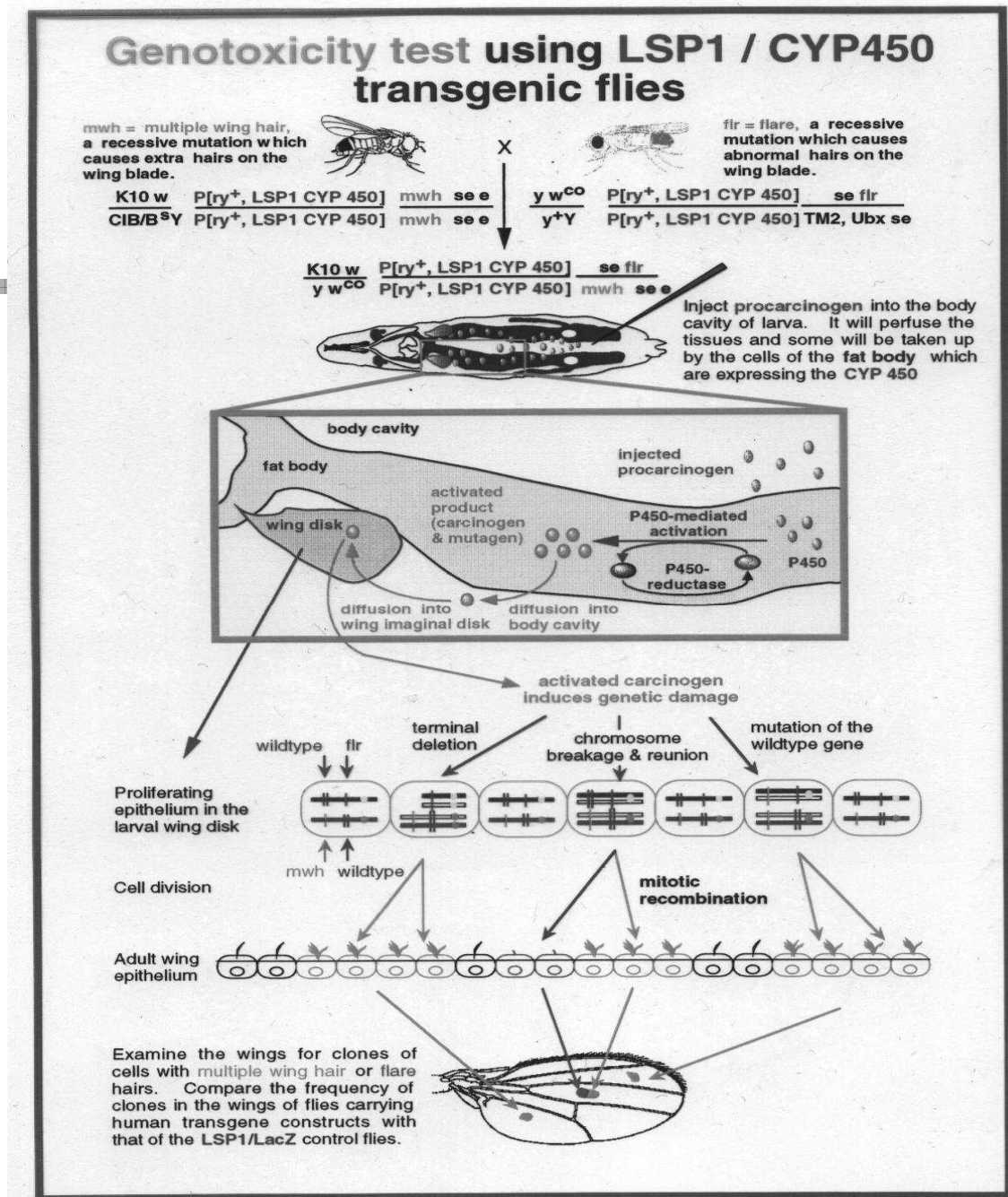
$\frac{fs(1)K10w}{B^s Y} \times \frac{mwh\ se\ e}{mwh\ se\ e}$
 \times
 $\frac{y\ w^{CO}}{y\ w^{CO}} \times \frac{se\ fir}{TM2, Ubx\ se}$

$\frac{y\ w^{CO}}{B^s Y} \times \frac{mwh\ se\ e}{TM2, Ubx\ se}$
 \times
 $\frac{fs(1)K10w}{y\ w^{CO}} \times \frac{se\ fir}{mwh\ se\ e}$



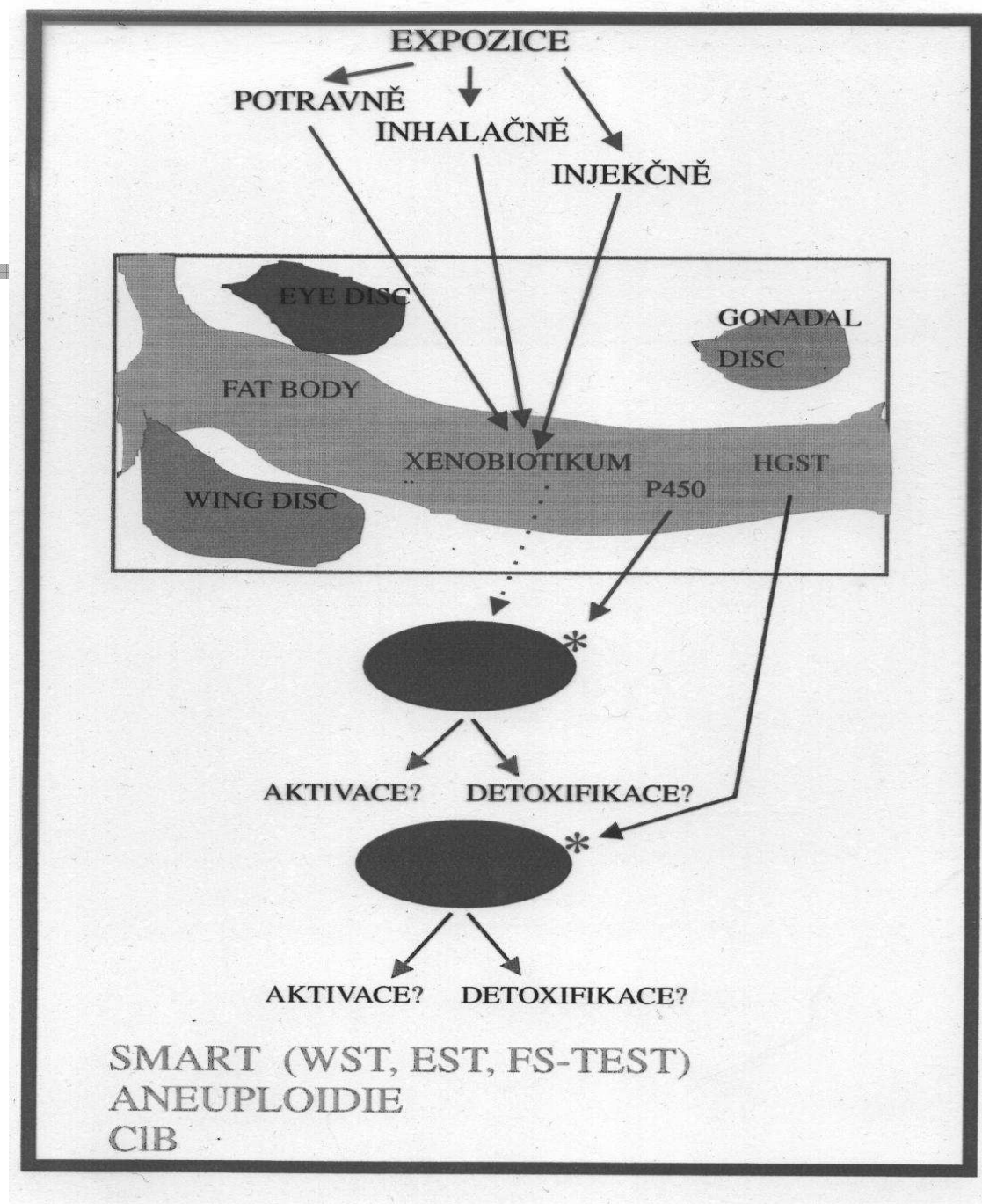
Praktické aplikace

- Využití v testech genotoxicity



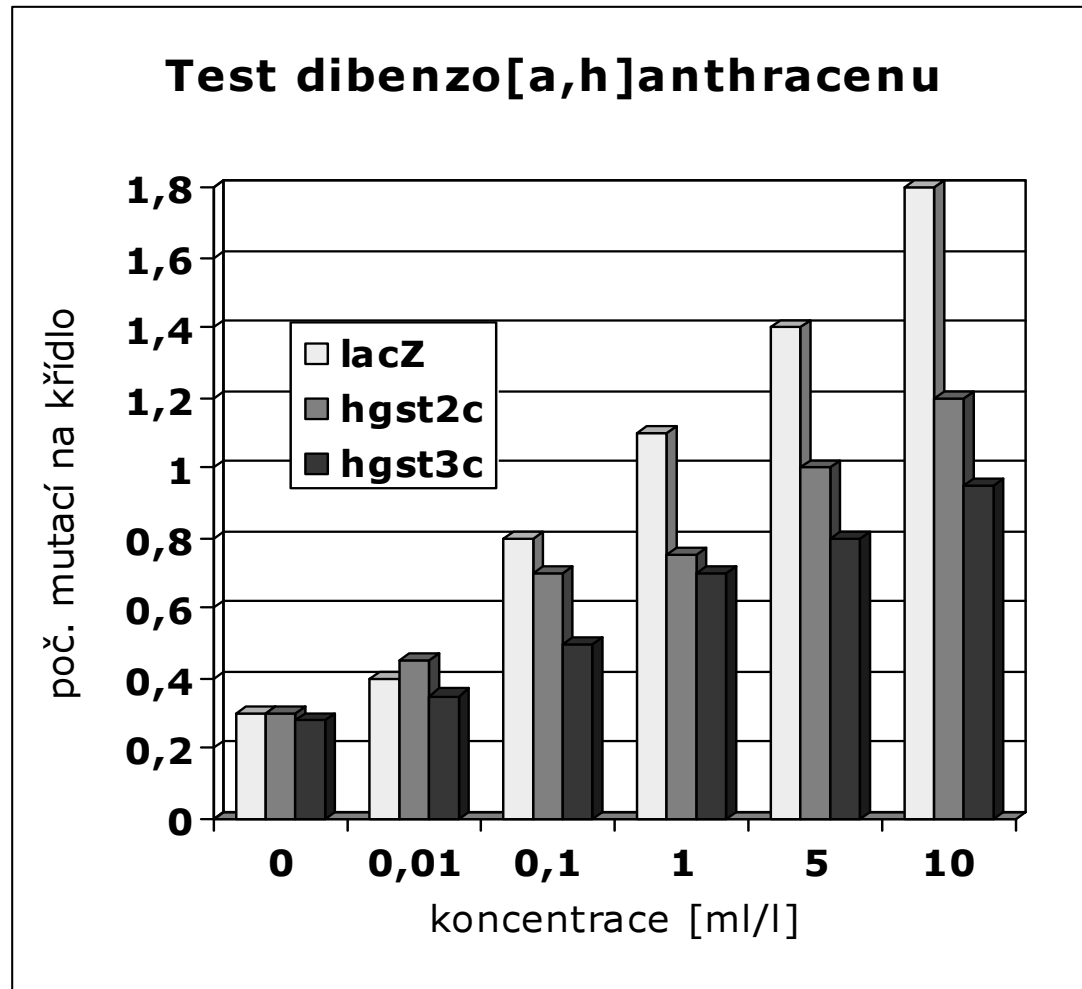
Praktické aplikace

- Využití v testech genotoxicity



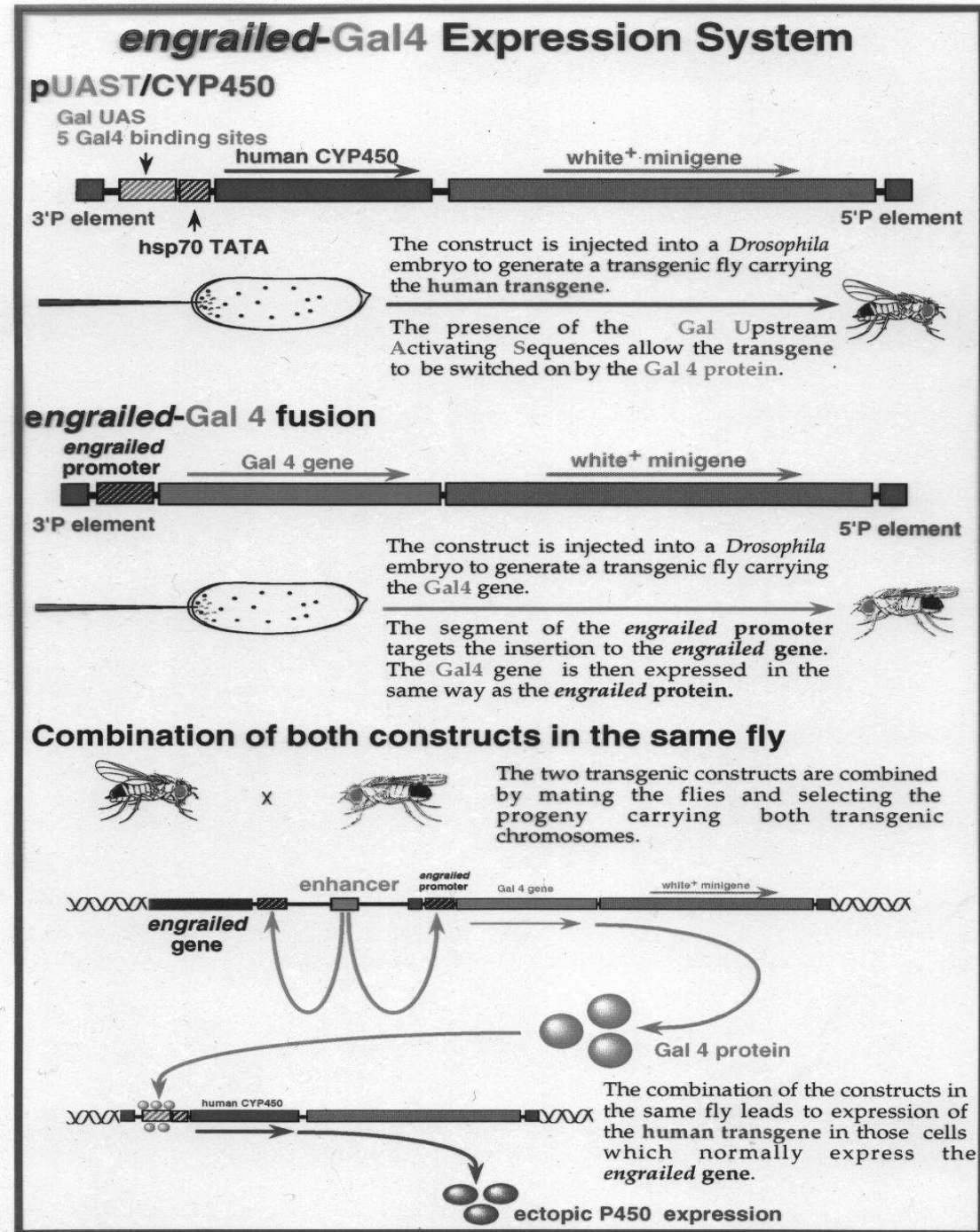
Praktické aplikace

- Využití v testech genotoxicity



Praktické aplikace

- Využití genu *engrailed* v testech genotoxicity



Praktické aplikace

- Využití genu *engrailed* v testech genotoxicity

