

# GENE EXPRESSION ANALYSIS OF CONDITIONAL LETHALITY IN DROSOPHILA MELANOGASTER INBRED LINES

**STUDENTESSA**

Kristina Gagalova



**RELATORE**

Prof. Alejandro Hochkoeppler

**CORRELATORE**

Dott. Corneel Vermeulen



university of  
 groningen



LAUREA MAGISTRALE BIOTECNOLOGIE MOLECOLARI

22 Marzo 2013

# INTRODUZIONE



# LA DEPRESSIONE DA ININCROCIO

La depressione da incrocio è la riduzione della *fitness* dovuto all'incrocio tra individui consanguinei

L'incrocio è l'incrocio fra individui strettamente imparentati o consanguinei

Fenotipi degli individui *inbred* rispetto ad individui *outbred* sono:

- ✓ Ridotta fertilità
- ✓ Aumento della mortalità perinatale
- ✓ Velocità di crescita mediamente più lenta

Si misura tramite il

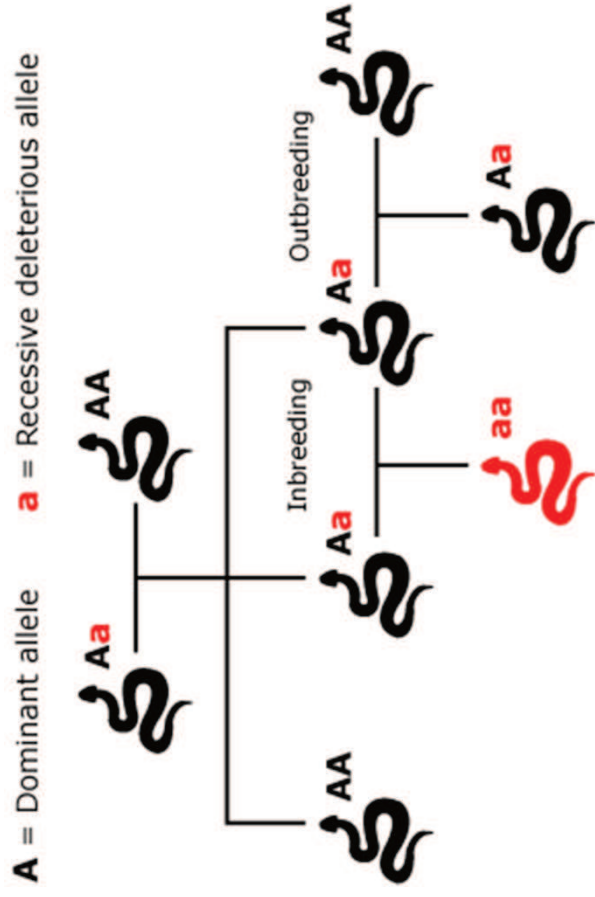
**coefficiente di incrocio  $F$**   
**( $0 < F < 1$ )**

che rappresenta la probabilità che un individuo omozigote abbia ricevuto entrambi gli alleli dallo stesso antenato

- Introduzione • Scopo del progetto • Materiali e metodi • Risultati • Discussione e conclusioni •

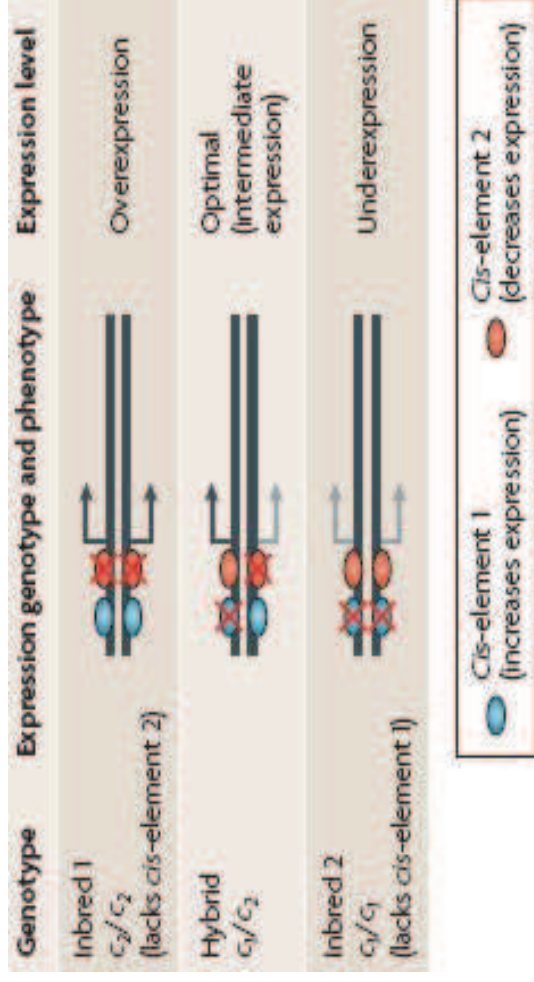
# MECCANISMI GENETICI DELETEREI NELLA DEPRESSIONE DA ININCROCIO

Poche generazioni di inincrocio aumentano le frequenze di individui omozigoti per tutti gli alleli



Aumento della probabilità di comparsa di alleli rari deleteri (se recessivi)

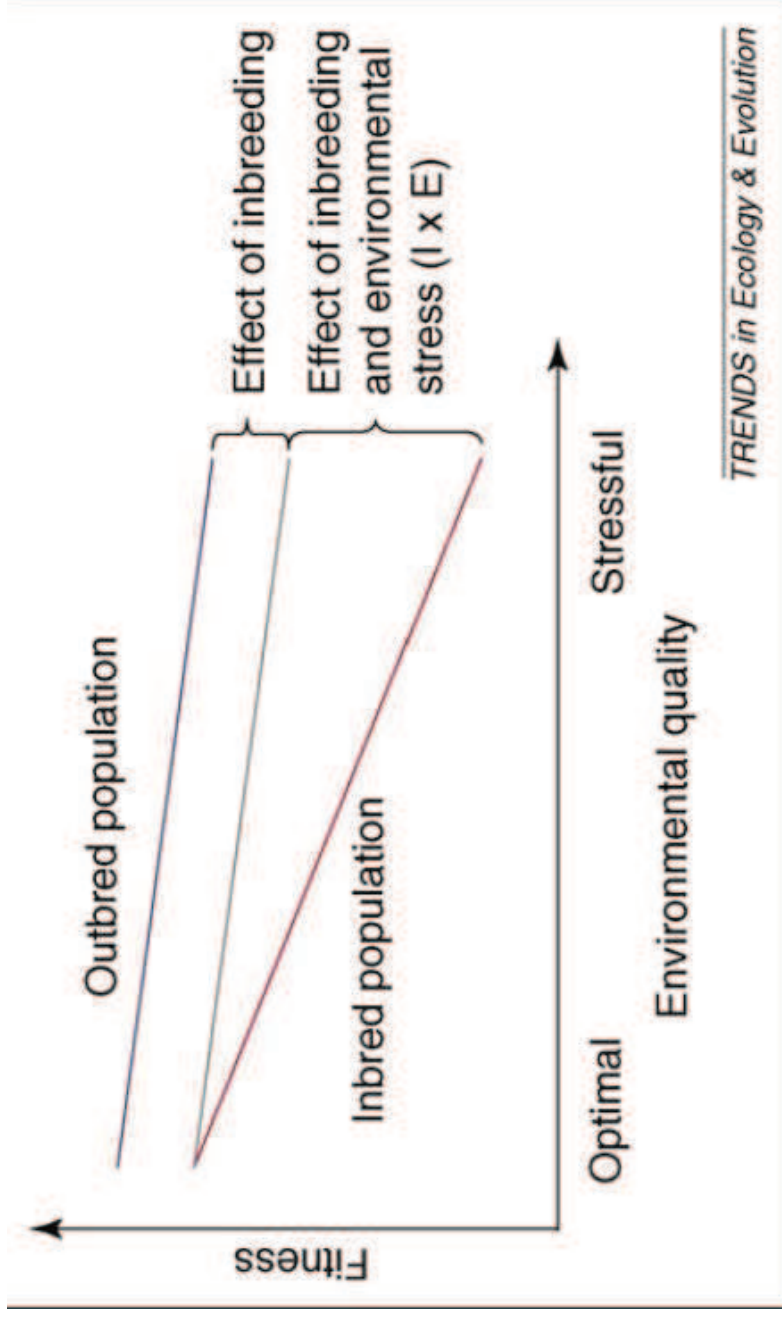
La riduzione di alleli vantaggiosi in eterozigosi



# POPOLAZIONI *INBRED* IN AMBIENTI DI STRESS

La depressione da inincrocio si manifesta con fenotipo più severo in condizioni ambientali di stress

Interazione  
sinergica  
tra  
inincrocio e  
condizioni  
ambientali



- Introduzione • Scopo del progetto • Materiali e metodi • Risultati • Discussione e conclusioni •

# LE LINEE DI DROSOPHILA MELANOGASTER



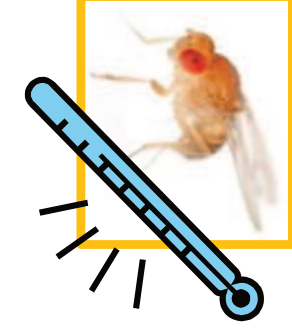
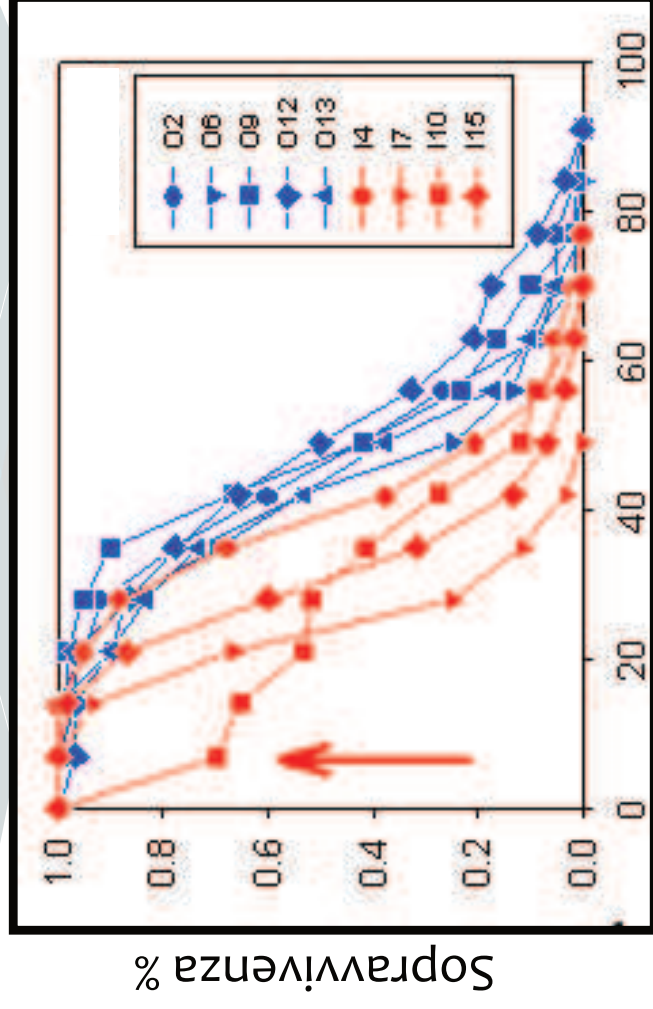
**G83 Linea Outbred**



**IC13 Linea Inbred**

Coefficiente  
di incrocio  
95 %

Sopravvivenza di individui maschi adulti



**L110 Linea Inbred**

**Letale termosensibile**

Coefficiente di Incrocio

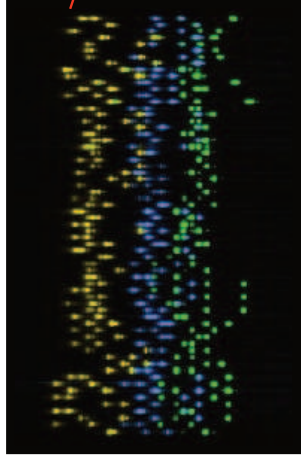


# STRATEGIE DI INDAGINE

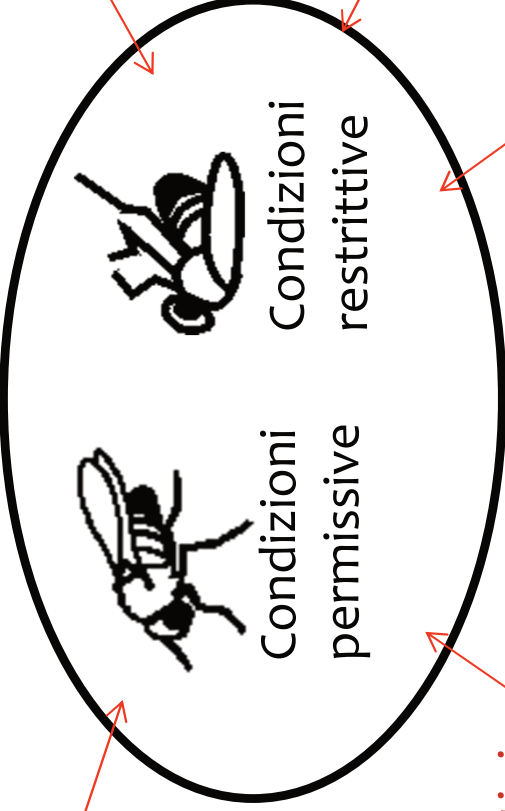
La depressione da incrocio è un fenotipo complesso ed ancora poco caratterizzato a livello molecolare e meccanicistico

E' tutt'ora in corso un'indagine che coinvolge la ricerca di geni candidati su diversi livelli molecolari

## Linea letale termosensibile

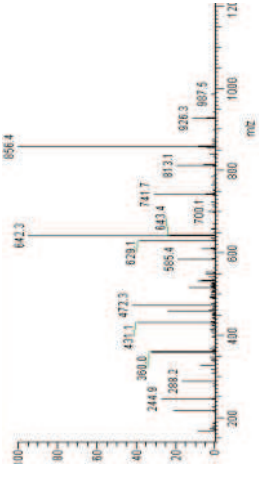
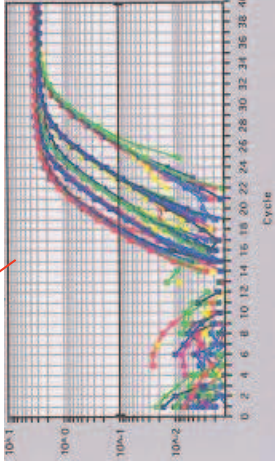
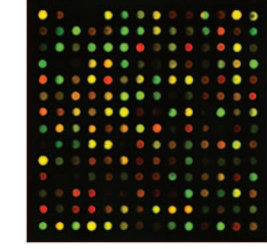
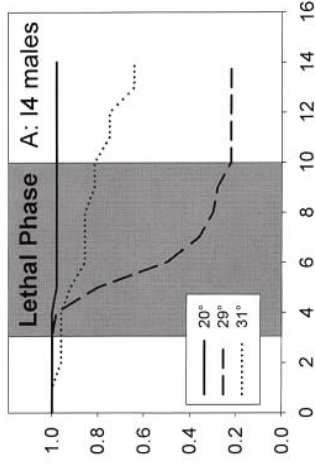


Mappaggio genetico



Sequenziamento genico

## Caratterizzazione fenotipica

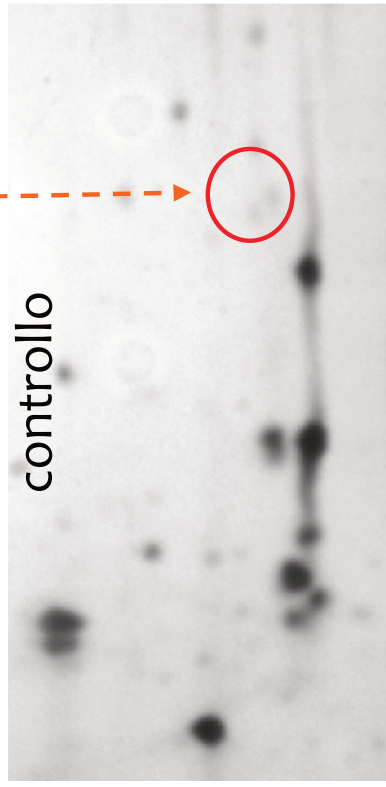
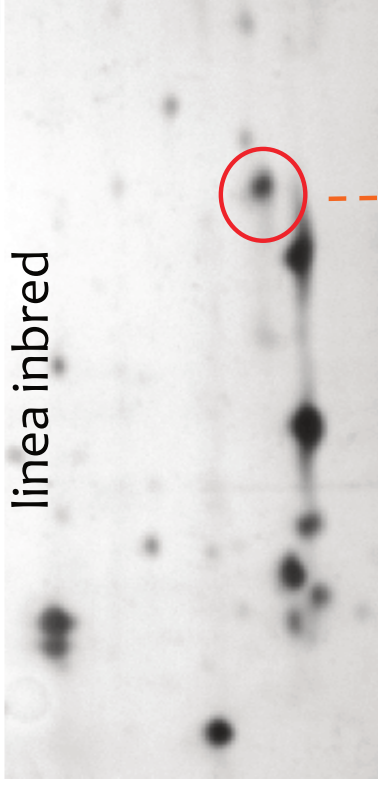


## Caratterizzazione proteomica

## Caratterizzazione dell'espressione genica

# CARATTERIZZAZIONE PROTEOMICA

## 2 DGE e SPETTROMETRIA DI MASSA



7 PROTEINE CON UN'ESPRESSIONE  
SINGOLARE NELLA LINEA INBRED  
LETALE

Confronto dell'espressione proteica tra le  
linee inbred di controllo e la linea letale  
inbred, 48h dopo breve trattamento  
termico

- CG18067
- B -Tubulina at 56D
- Enzima di conversione dell'angiotensina

## DOPO TRATTAMENTO

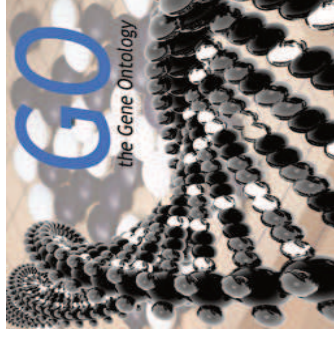
- Fosfogluconato mutasi
- Pro-phenol ossidasi A1
- CG11796
- Transaldolasi

DOPO TRATTAMENTO E A NATURALI  
CONDIZIONI DI CRESCITA



# CARATTERISTICHE DEI GENI CANDIDATI

Gene	Funzione	Processo biologico
CG18067	3'-5'-nucleotide ciclico fosfodiesterasi	Trasduzione di segnale
$\beta$ Tub56D ( $\beta$ Tubulina56D)	Componente strutturale del citoscheletro	Duplicazione del centrosoma movimento intracellulare mediato da microtubuli
CG11796	4-idrossifenil piruvato diossigenasi	Regolazione del flusso emolinfatico
Ance (Enzima di conversione dell'angiotensina)	Carbossipeptidasi attivazione di peptidi bioattivi	Contrazione della muscolatura liscia
PPOA1 (pro-fenolossidasi 1A)	Ossidoreduttasi	Immunità innata
Pgm (Fosfogluconato mutasi)	Metabolismo del glucosio Biosintesi di glicogeno Sintesi del trealosio	Metabolismo di zuccheri
Tal (Transaldolasi)	Via del pentosio fosfato, metabolismo di NADPH e del ribosio	<div> <p>Accumulo di energia e crioprotezione</p> </div>



# SCOPO DEL PROGETTO

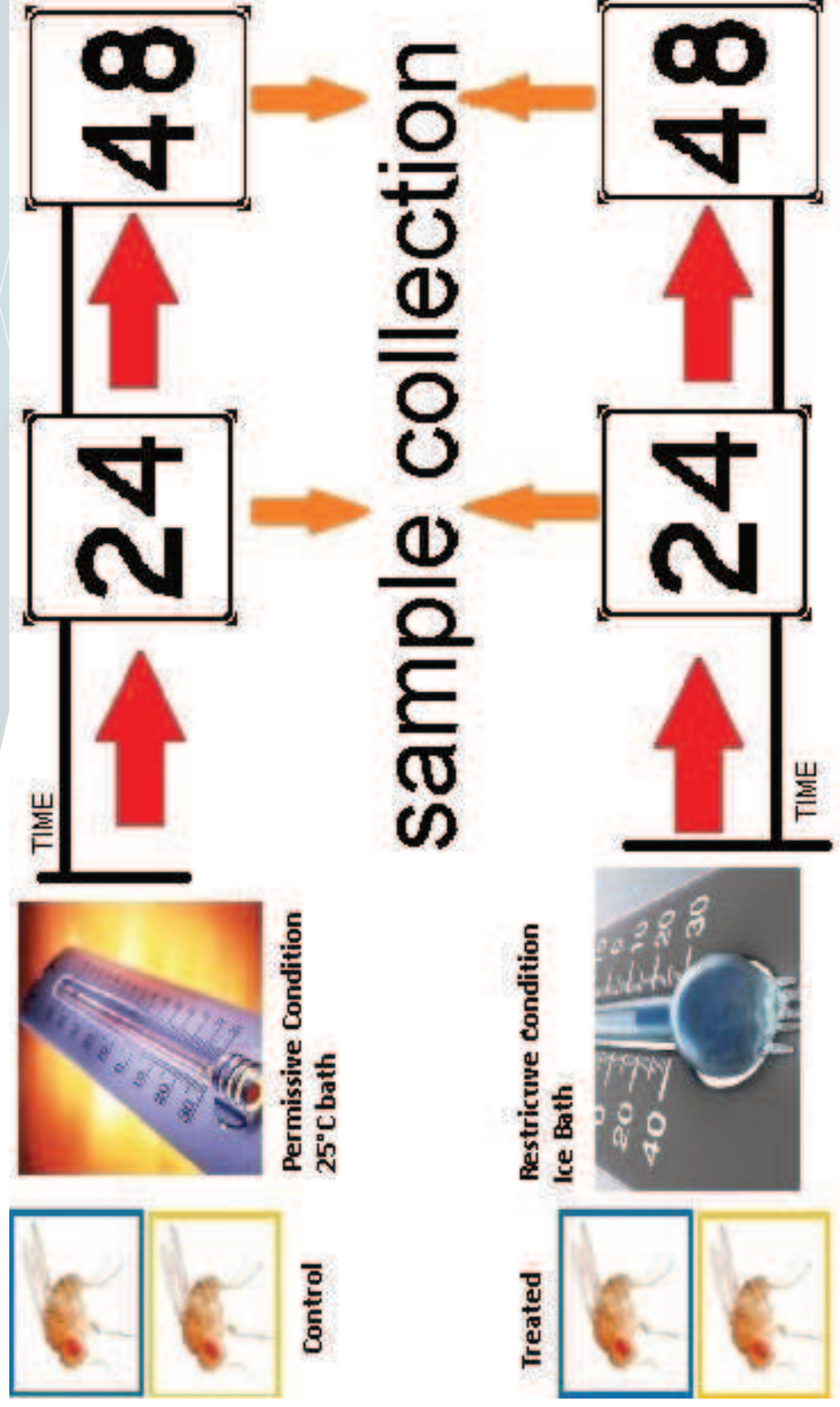
IN CHE MODO L'ESPRESSIONE GENICA  
RIFLETTE L'ESPRESSIONE DELLE 7  
PROTEINE IDENTIFICATE TRAMITE 2DGE?



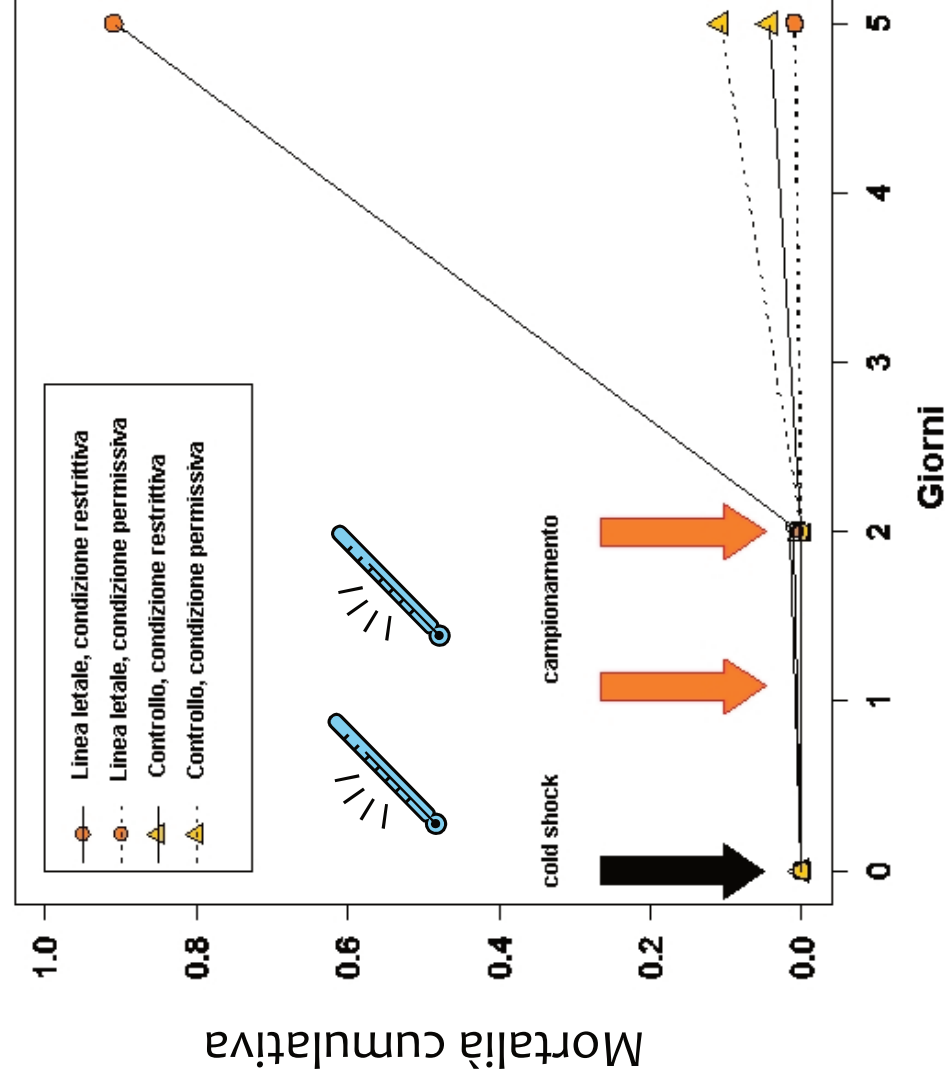
# MATERIALI E METODI



# DESIGN SPERIMENTALE



# DESIGN SPERIMENTALE



Stesso pattern di mortalità cumulativa osservata nella caratterizzazione proteica



- Introduzione • Scopo del progetto • Materiali e metodi • Risultati • Discussione e conclusioni •

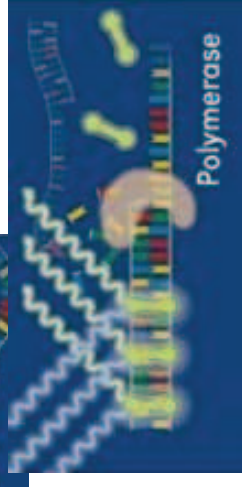
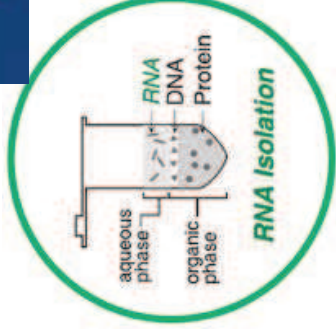
# METODI PER LA QUANTIFICAZIONE DI ESPRESSIONE GENICA

## 1) Tecniche di laboratorio

Estrazione di RNA

Conversione in cDNA

Quantificazione di espressione  
genica tramite SYBR Green - ROX  
RT-qPCR



## 2) Analisi dei dati e statistica



based on: Ruijter et al  
Nucleic Acids Research, 2009

dr. J.M. Ruijter  
Heart Failure Research Center  
Academic Medical Centre  
Amsterdam, the Netherlands

**LinReg:** calcolo del Threshold cycle (Ct) e dell'efficienza di  
reazione

I dati sono stati analizzati come NO (fluorescenza iniziale)  
e normalizzati con 5 geni di riferimento

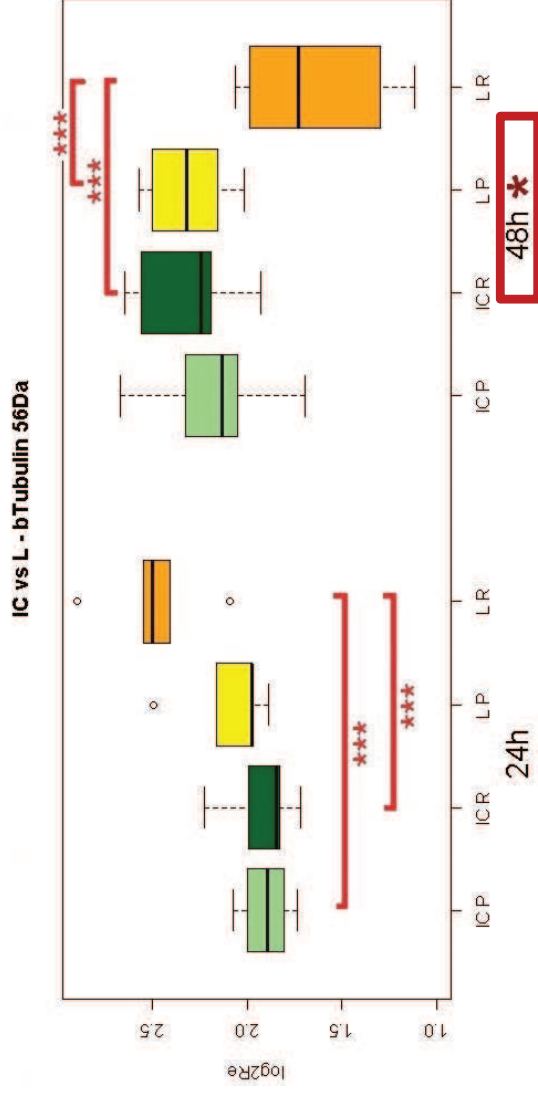


**R statistical software:** One Way ANOVA, Two Way ANOVA

# RISULTATI



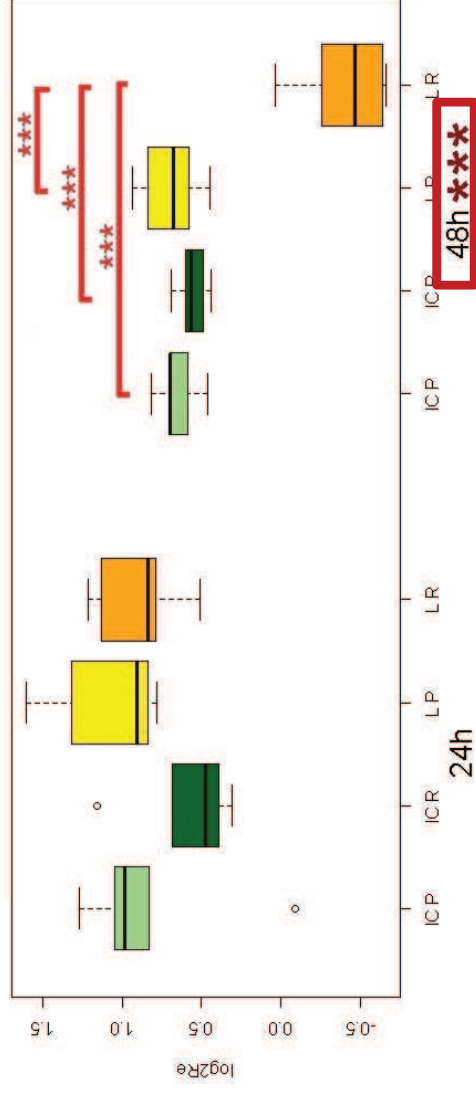
# ESPRESSIONE GENICA



B-Tubulina 56 Da, 48 ore  
dopo trattamento termico

Fold Change LR/LP: - 1.6

IC vs L - Phosphogluconate mutase

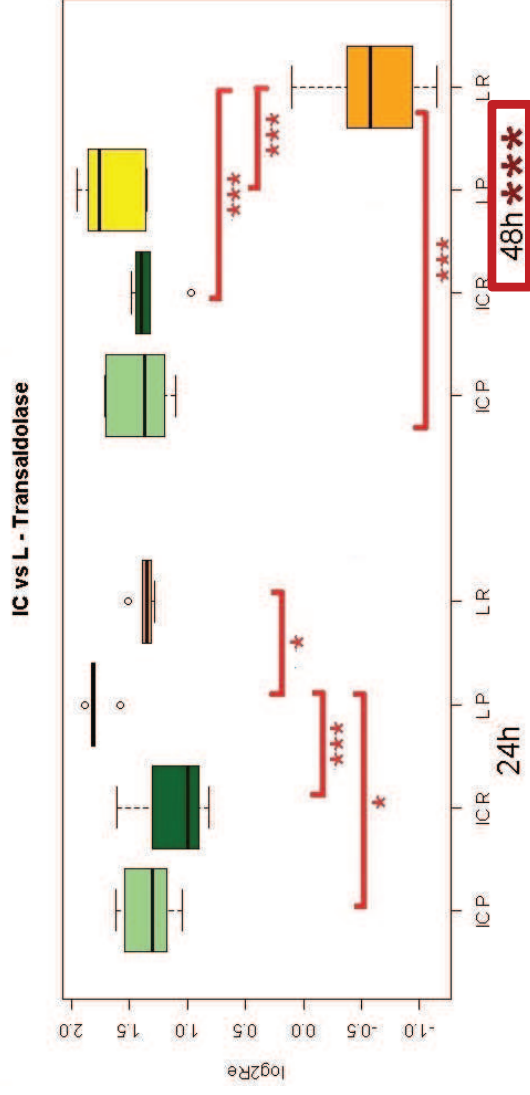


Fosfogluconato mutasi, 48 ore  
dopo trattamento termico

Fold Change LR/LP: - 2.1

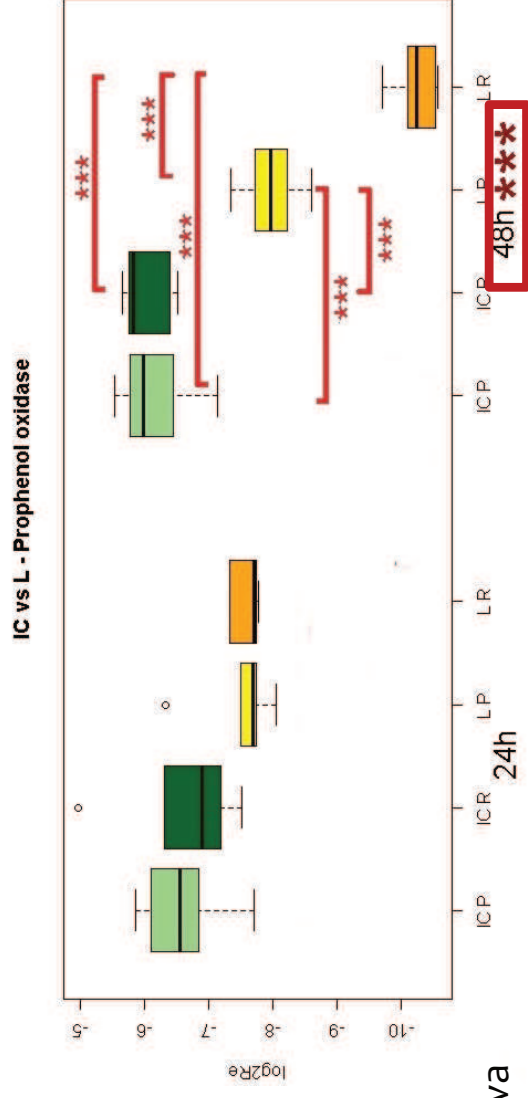
IC- linea inbred di controllo, L- linea inbred letale  
P – condizione permissiva, R- condizione restrittiva

\*  $0.05 < P < 0.01$  \*\*\*  $0.01 > P$



Transaldolasi, 48 ore dopo  
trattamento termico

Fold Change LR/LP: - 4.6

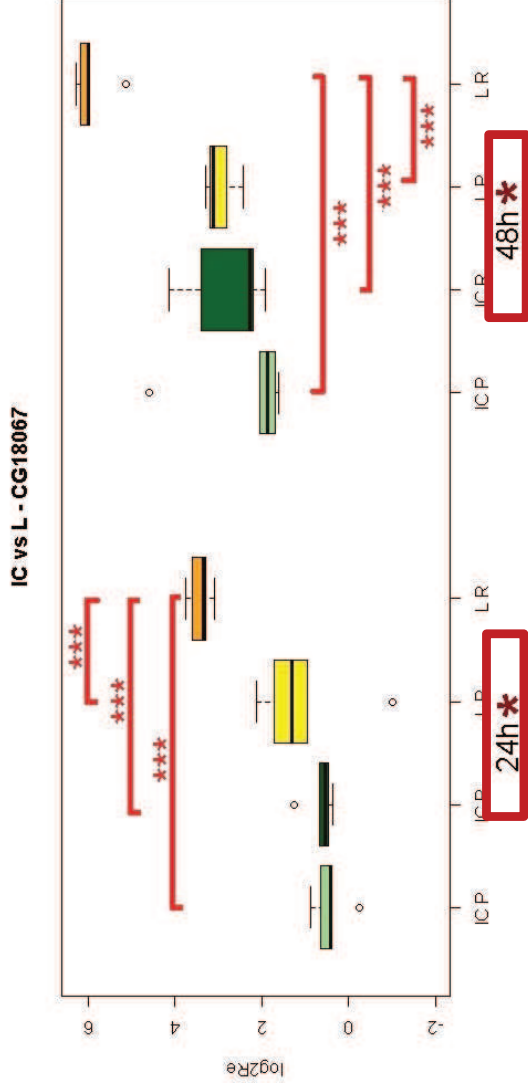


Profenol ossidasi A1, 48 ore  
dopo trattamento termico

Fold Change LR/LP: - 5

IC- linea inbred di controllo, L- linea inbred letale  
P – condizione permissiva, R- condizione restrittiva

\*  $0.05 < P < 0.01$  \*\*\*  $0.01 > P$



CG18067, 24 e 48 ore dopo  
trattamento termico

Fold Change LR/LPa 24 ore: 4.3

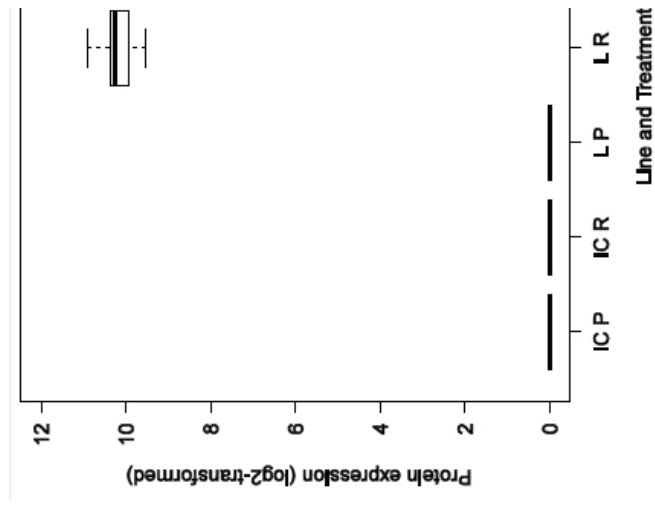
Fold Change LR/LP a 48 ore: 7.7

CG18067 ha un maggiore  
espressione sia genica che  
proteica nella linea letale  
inbred, esclusivamente  
dopo trattamento termico

IC- linea inbred di controllo, L- linea inbred letale

P – condizione permissiva, R- condizione restrittiva

\*  $0.05 < P < 0.01$  \*\*\*  $0.01 > P$



2DGE: 48 ore dopo trattamento termico



# DISCUSSIONE CONCLUSIONI

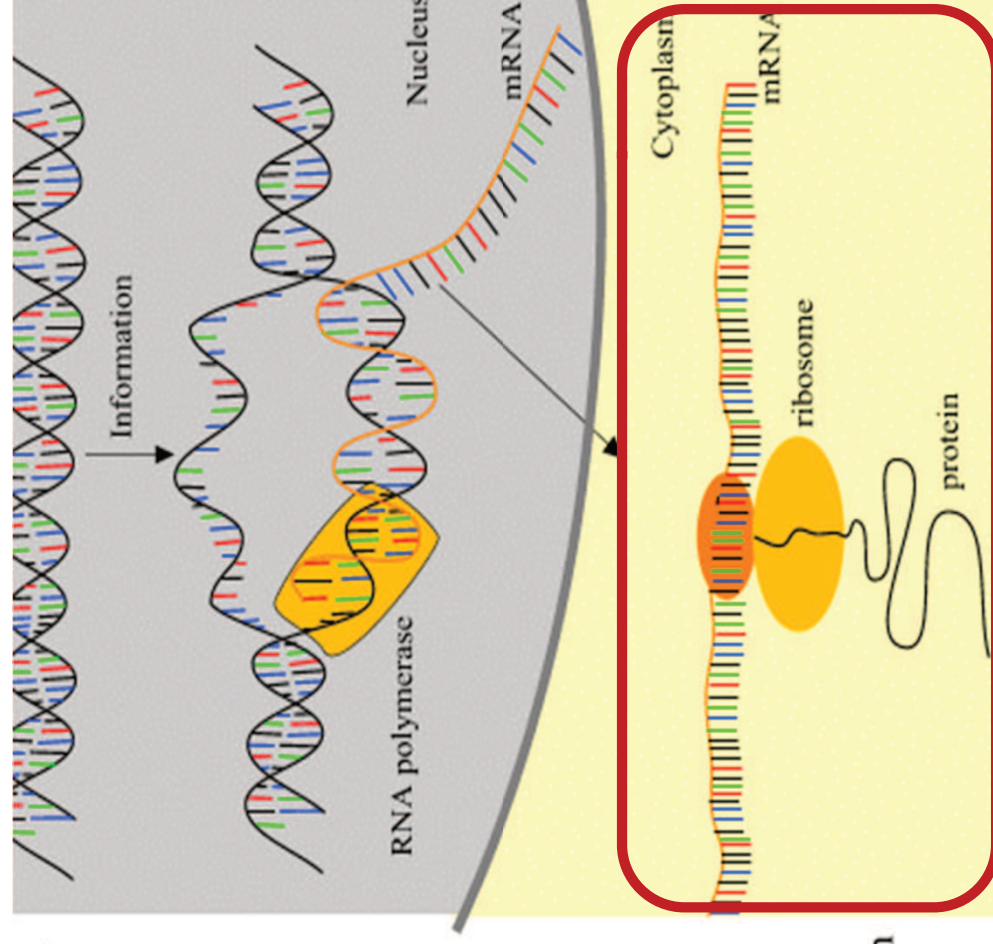


# ESPRESSIONE GENICA E PROTEICA

DNA

RNA

Protein



**Transcription**  
RNA synthesis

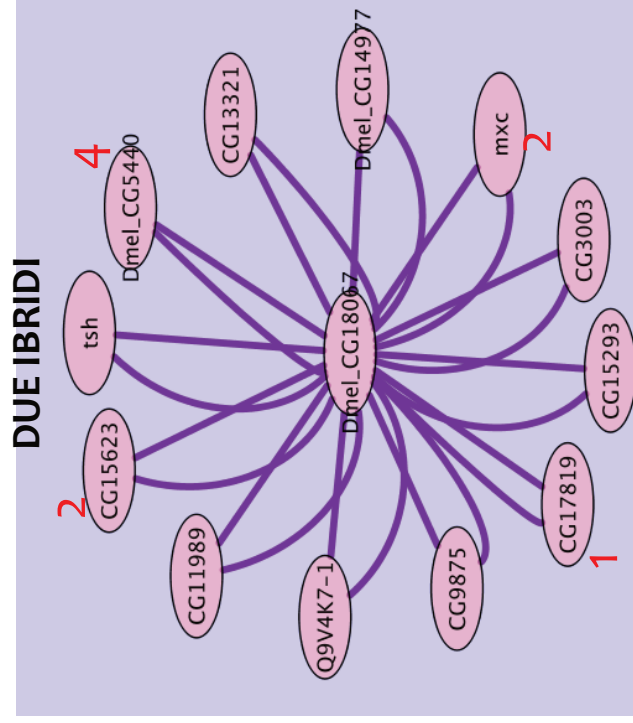
**Translation**  
Protein synthesis

La maggiore  
espressione proteica è  
regolata a livello  
post- trascrizionale e  
post-traduzionale

# CG18067: INTERESSANTE GENE CANDIDATO NELLA DEPRESSIONE DA ININCROCIO

La proteina è ancora scarsamente annotata: la sua  
esistenza è solamente predetta in base all'ORF

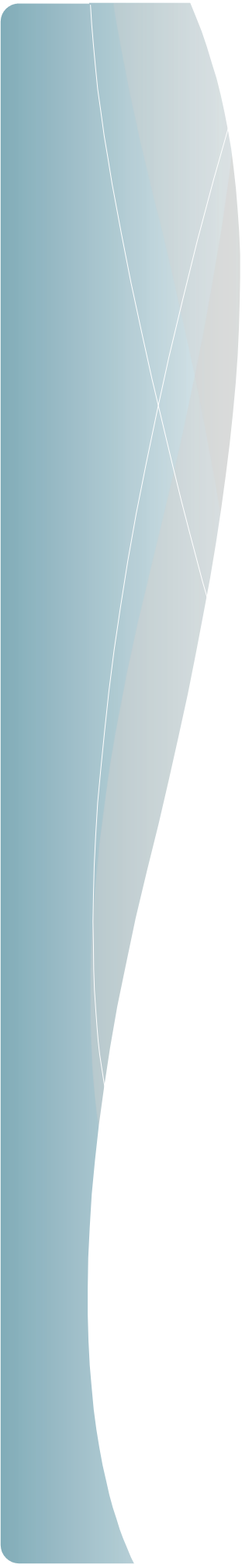
## INTERAZIONI PROTEINA-PROTEINA IDENTIFICATE TRAMITE MODELLO A



- 1) Trasduzione di segnale
- 2) Fattori stimolanti la proliferazione degli emociti e proteine leganti il gruppo eme
- 3) Risposta immunitaria
- 4) Attivazione dell'ubiquitina

• Introduzione • Scopo del progetto • Materiali e metodi • Risultati • Discussione e conclusioni •

# FUTURE STRATEGIE D'INDAGINE







**DOMANDE?**