

Attività formativa	GENETICA E GENOMICA FUNZIONALI				
Modulo didattico	MODULO 1: GENETICA FUNZIONALE				
CFU	5+1 (LABORATORIO)				
Ore	55				
tipo	Lezioni frontali e lezioni pratiche in laboratorio				
Obiettivo formativo	Al termine del corso, lo studente possiede conoscenze approfondite degli approcci sperimentali utilizzati nell'analisi genetica finalizzata alla dissezione funzionale di processi biologici complessi. In particolare, lo studente è in grado di: - analizzare e discutere con padronanza risultati sperimentali ottenuti mediante analisi della funzione genica in organismi modello; - proporre strategie di indagine su scala genomica finalizzate alla dissezione funzionale di processi biologici complessi utilizzando sistemi modello eucariotici; - eseguire esperimenti di marcatura molecolare di tessuti o organi oppure di analisi molecolare quantitativa (RNA o proteine) ai fini della comprensione della causa molecolare del fenotipo mutante.				
TEMATICA			LEZIONI		
Tema	Obiettivo	Ore		Argomenti	Durata (ore)
Introduzione	Lo studente conosce l'organizzazione dell'insegnamento, della verifica e degli argomenti da studiare. Lo studente conosce le principali tipologie di mutazioni e gli agenti chimico/fisici per indurle; conosce i principali metodi per identificare una nuova mutazione di interesse e per mappare e identificare il gene mutato	6	1	Introduzione all'analisi genetica funzionale. Confronto tra genetica diretta e genetica inversa. Introduzione all'utilizzo di sistemi modello in cui indurre mutazioni per comprendere la funzione dei geni e per ottenere informazioni sui meccanismi molecolari che sottendono a processi biologici complessi. Introduzione agli screen genetici su sistemi modello come strumento fondamentale per la dissezione funzionale di un processo biologico di interesse. Rassegna dei principali agenti mutageni: agenti fisici (radiazioni ionizzanti), agentichimici (etilnitrosurea, etilmetansulfonato, agenti intercalanti).	2
			2	Mutageni inserzionali (trasposoni, vettori retrovirali) con precisi riferimenti al tipo di lesioni provocate nel DNA e alle modalità di mappatura più comunemente utilizzate in funzione del tipo di lesione (mappatura per delezione, per ricombinazione mediante utilizzo di marcatori molecolari: microsatelliti, polimorfismi di restrizione, polimorfismi a singolo nucleotide, plasmid rescue e inverted PCR). Tipologie di alleli perdita e acquisizione di funzione e concetti di recessività e dominanza. Analisi genetiche per la determinazione del tipo di allele perdita di funzione (nullo: concetto di aploinsufficienza e aplosufficienza, ipomorfo). Analisi genetiche per la determinazione del tipo di allele acquisizione di funzione (iperomorfo, antimorfo o dominante negativo, neomorfo). Linee isogeniche e isocromosomiche. Marcatori cromosomici con fenotipo visibile.	2
			3	Introduzione al funzionamento e all'utilizzo dei cromosomi bilanciatori. Serie alleliche, allelia multipla, test di complementazione. Concetto di mutagenesi saturante. Introduzione agli screen genetici secondari (screen per mutazioni in secondo sito). Significato degli screen per geni modificatori (soppressori e intensificatori); applicazione per lo studio di malattie umane. Screen per letali sintetici. Mappatura di nuove mutazioni mediante delezioni sovrapposte. Mappatura di nuove mutazioni mediante ricombinazione di marcatori molecolari (microsatelliti, RFLP e SNPS: utilizzo delle sonde ASO).	2
Modelli genetici di interesse biotecnologico: <i>Caenorhabditis elegans</i>	Lo studente conosce i principali metodi e tecniche per indagare la funzione genica utilizzando <i>Caenorhabditis elegans</i>	8	4	Introduzione a <i>Caenorhabditis elegans</i> . Ciclo vitale, cenni alle prime tappe dello sviluppo embrionale, numero fisso di cellule componenti l'organismo, costanza dei lineages cellulari, cenni di anatomia e descrizione delle caratteristiche che ne rendono possibile l'utilizzo come sistema modello. Screens semplici in F3 per la ricerca di fenotipi visibili recessivi. Principali classi di geni trovati: geni unc (uncoordinated), let (lethality), egl (egg laying defective), mel (maternal effect-lethal), ced (cell death), lin (lineage defective), dpy (dumpy).	2
			5	Approcci per completare la dissezione genetica funzionale di un processo biologico e per l'identificazione di un pathway genetico: Screens secondari per l'identificazione di altre mutazioni	2

				confenotipo simile. Screen per modificatori -Screen per modificatori di fenotipi multivulva e vulvaless perla dissezione del pathway dipendente da EGF receptor. Dissezione del pathway di determinazione del sesso e del meccanismo che regola la compensazione del dosaggio genico sesso-dipendente.	
			6	Approcci per realizzare screen su grandi numeri: vantaggi e scopo degli screen su grandi numeri. Screen con selezione: utilizzo di inibitori dell'acetilcolinesterasi per dissezione della funzionalità sinaptica. Isolamento di alleli rari per acquisizione di funzione di RAS. Isolamento di mutazioni soppressori allele specifiche per l'identificazione di proteine che interagiscano fisicamente. Screen su larga scala per studi struttura-funzione (Screens basati su analisi a livello cellulare con ausilio di microscopia(primai identificazione digeni coinvolti nel meccanismo di apoptosi). Cenni allo sviluppo di cromosomi bilanciatori. Screens per l'identificazione di mutazioni letali zigotiche e ad effetto materno utilizzando background geentici egg laying defective per effettuare più efficacemente e più brevemente la selezione degli individui mutanti utili.	2
			7	Screen in background genetico sensibile: screen per non complementazione non-allelica (screen per la ricerca di funzioni geniche che compngano complessi proteici implicati nella funzionalità sinaptica). Screen per letalità sintetica (screen per l'identificazione dei geni target del fattore di regolazione dellosplicing Mec8). Strategie più comunemente usate per la mappatura di mutazioni puntiformi in C. elegans (mappatura per ricombinazione di marcatori molecolari in background genetico ibrido).	2
Modelli genetici di interesse biotecnologico: <i>Drosophila melanogaster</i>	Lo studente conosce i principali metodi e tecniche per indagare la funzione genica utilizzando <i>Drosophila melanogaster (moscerino)</i> .	10	8	Introduzione a <i>Drosophila melanogaster</i> . Ciclo vitale e principali caratteristiche che rendono <i>Drosophila melanogaster</i> un ottimo sistema modello. Cromosomi politenici e sistema di ben sviluppati cromosomi bilanciatori per tutti i principali autosomi e per i cromosomi sessuali. Creazione e mantenimento di linee isocromosomiche bilanciate e a letali bilanciati.	2
			9	Sistemi più usati di mutagenesi chimica e di mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni. Schemi di incrocio per la realizzazione di mutagenesi inserzionale mediata da trasposoni della famiglia P. Metodi di mappatura e clonaggio delle sequenze genomiche fiancheggianti l'inserzione di interesse (plasmid rescue, inverted PCR). Schemi di incrocio per l'isolamento di revertenti da mutazioni indotte da trasposoni P(escisione precisa) e per l'identificazione di mutazioni da escisione imprecisa di un trasposone P inserito in un gene di interesse.	2
			10	Primo screen saturante su scala genomica per l'isolamento di mutazioni letali in geni coinvolti nello sviluppo embrionale di un organismo multicellulare; screen di mutazioni letali recessive sui principali autosomi e sul cromosoma sessuale X. Screens di Heidelberg e principali classi di letali zigotici morfogenetici isolati. Aspetti positivi e limiti dello screen di Heidelberg. Screen per geni essenziali ad effetto materno.	2
			11	Approcci per la ricerca di geni interattori funzionali di un gene di interesse. Screen per modificatori (soppressori ed intensificatori). Screen per soppressori dominanti del recettore Tyrkinasi Sevenless. Vantaggi degli screens per modificatori dominanti (tempi brevi, grandi numeri, scala genomica, identificazione di funzioni postembrionali anche di geni essenziali mediante l'identificazione di fenotipi dominanti vitali. Caratterizzazione del pathway di Ras/MAPKinasi. Tecniche e approcci per lo studio di geni essenziali richiesti in più momenti dello sviluppo. Screen clonali basati sul meccanismo della ricombinazione somatica. Evidenziatura di cloni somatici mediante marcatori genetici a fenotipo visibile a livello di singole cellule. Sistema di	2

				ricombinazione somatica indotta mediante il sistema di ricombinazione sito-specifica FLP-FRT mutuato dal lievito <i>Saccaromyces cerevisiae</i> . Screen clonali per l'identificazione di geni che controllano proliferazione e crescita cellulare. Isolamento di oncogeni e geni soppressore di tumore.	
			12	Sistema EGUF (eyeless-Gal4-UAS-Flp) per ottenere individui adulti con occhi interamente formati da cloni somatici omozigoti per mutazioni di interesse, finalizzati al miglioramento degli screen clonali in F1 nell'adulto. Screen clonale pinhead/bighead per l'identificazione in individui adulti di mutazioni che alterano proliferazione e crescita cellulare. Tecniche di mappatura per ricombinazione di mutazioni non-inserzionali, mediante marcatori genetici a fenotipo visibile o mediante marcatori molecolari.	2
Modelli genetici di interesse biotecnologico: <i>Danio rerio</i>	Lo studente conosce i principali metodi e tecniche per indagare la funzione genica utilizzando <i>Danio rerio</i> (<i>zebrafish</i>)		13	Introduzione a <i>Danio rerio</i> (<i>zebrafish</i>). Ciclo vitale e caratteristiche generali che lo rendono un buon sistema vertebrato per lo studio dello sviluppo di organi interni e per la realizzazione di processi biologici non visibili dall'esterno. Primo screen su scala genomica in F3(Tubinga/Boston): isolamento di mutazioni che alterano lo sviluppo conferendo un fenotipo visibile (geni coinvolti in cardiogenesi, ematopoiesi e sviluppo e fisiologia del sistema circolatorio).	2
			14	Screen aploidi in F2: isolamento di mutazioni che alterano processi dello sviluppo precoce usando come marcatore di selezione il pattern di espressione di geni richiesti nel processo in esame (mutazioni che alterano il patterning del sistema nervoso centrale). Tecniche per la realizzazione di screen diploidi in individui ginogenici; identificazione di mutazioni in geni ad effetto materno che controllano le prime fasi della segmentazione embrionale. Mutagenesi inserzionale in <i>zebrafish</i> . Induzione di inserzione di vettori retrovirali: tecniche per massimizzare l'isolamento di eventi inserzionali differenti e per l'identificazione della singola inserzione che cosegrega con un fenotipo di interesse in individui recanti multiple inserzioni. Identificazione di geni coinvolti nello sviluppo e fisiologia del fegato.	2
			15	Ottimizzazione di un sistema di mutagenesi inserzionale mediata da un trasposone ingegnerizzato e basato sull'approccio del gene trapping (vettore Tol2). Tecniche di clonaggio delle sequenze 5' del trascritto intrappolato per retrotrascrizione e 5'RACE in animali recanti inserzioni di Tol2 che conferiscono fenotipi di interesse. Mappatura di mutazioni puntiformi per ricombinazione di marcatori molecolari. Tecnica del TILLING (Targeting Induced local Lesion in the Genome) per l'identificazione di lesioni in un gene a sequenza nota.	2
Modelli genetici di interesse biotecnologico: <i>Mus musculus</i>	Lo studente conosce i principali metodi e tecniche per indagare la funzione genica utilizzando <i>Mus musculus</i> (<i>topo</i>)	8	16	Introduzione a <i>Mus musculus</i> . Ciclo vitale e caratteristiche che lo rendono un buon sistema modello mammifero (alta omologia con genoma umano e sintonia con cromosomi umani). Considerazioni da effettuare in fase di progettazione di uno screen su scala genomica. Screen regione specifico: screen per non-complementazione allelica (test locus specifico per la messa a punto della tecnica di mutagenesi chimica) e per non-complementazione non-allelica; strategie per l'identificazione di fenotipi visibili vitali e fertili e di fenotipi letali o sterili. Mutagenesi per l'isolamento di mutlipli alleli del geneshort-ears (BMP5): un caso si studio struttura-funzione nel topo.	2
			17	Screen regione specifica mediante delezioni. Cenni di ingegneria cromosomica per l'induzione e selezione di delezioni o inversioni che coinvolgano regioni cromosomiche di interesse, mediante il sistema di ricombinazione sito-specifica Cre-LoxP. Schemi di incrocio per screens che utilizzino delezioni o inversioni indotte: utilizzo di marcatori per il riconoscimento univoco del genotipo della progenie mediante l'utilizzo di marcatori visibili nell'adulto.	2

				Screen per l'isolamento di mutazioni sul cromosoma 11 sintenico col cromosoma 17 umano. Tecniche e schemi di incrocio per la realizzazione di screen convenzionali su scala genomica. Screen per l'isolamento di mutazioni in geni che controllano lo sviluppo dell'encefalo.	
			18	Screen per l'isolamento di geni modificatori ad effetto dominante. Screen per l'identificazione di soppressori di un fenotipo trombocitopenico dovuto a mutazioni nel gene Mpl codificante per il recettore della trombopoietina. Identificazione di c-Myb come interattore funzionale di Mpl.	2
			19	Mappatura di nuove mutazioni per ricombinazione di marcatori molecolari (tecnica del backcross e dell'intercross) e identificazione del gene mutato mediante l'approccio del gene candidato.	2
Introduzione all'esperienza di laboratorio pratico	Lo studente conosce il background scientifico relativo all'esperimento che verrà replicato durante il laboratorio pratico.	2	20	Introduzione scientifica e tecnico-pratica all'esperimento che verrà realizzato in laboratorio mediante lettura degli articoli originali.	2
Laboratorio pratico	Lo studente conosce la procedura di raccolta di embrioni di Drosophila melanogaster, fissazione degli embrioni e allestimento di una quadrupla marcatura contemporanea in immunofluorescenza e viene introdotto all'utilizzo di un microscopio ad epifluorescenza convenzionale per l'analisi del risultato dell'esperimento.	15	21	Prima giornata laboratorio Pratico. Raccolta e fissazione di embrioni di drosophila melanogaster. Preparazione per la realizzazione del protocollo di marcatura per immunofluorescenza.	8
			22	Seconda giornata laboratorio pratico. Conclusione della procedura di marcatura per immunofluorescenza. Montaggio dei preparati su vetrino. Suddivisione in gruppi per: 1) osservazione dei preparati al microscopio epifluorescente, 2) acquisizione digitale di immagini, 3) discussione dei risultati ottenuti.	7