

The Central Dogma of Molecular Biology

Lo sviluppo, come altri processi biologici, e' controllato a livello genetico.

Ma come si studia la funzione di un gene?

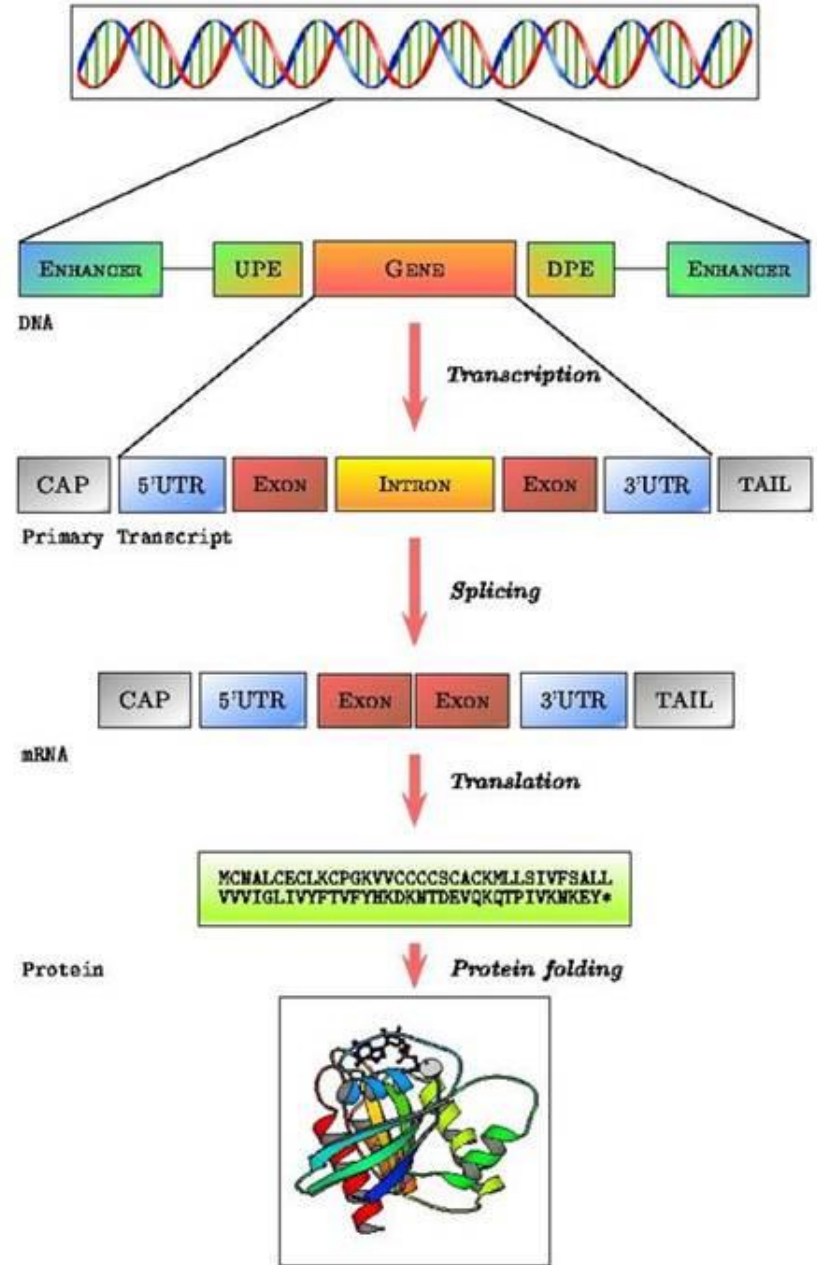
Bisogna:

Identificare i geni coinvolti nello sviluppo

Studiare la funzione mediante approcci di perdita o guadagno di funzione (Cosa succede se il gene viene inattivato o iperattivato?)

Studiare il modo in cui è regolata l'espressione durante lo sviluppo (quando e dove è espresso un gene nell'embrione?)

L'espressione genica è un processo complesso regolato a diversi livelli!



APPROCCI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLE FUNZIONI GENICHE

GENETICA CLASSICA

Identificazione di geni importanti per determinate funzioni in base al fenotipo prodotto dalla loro mutazione.

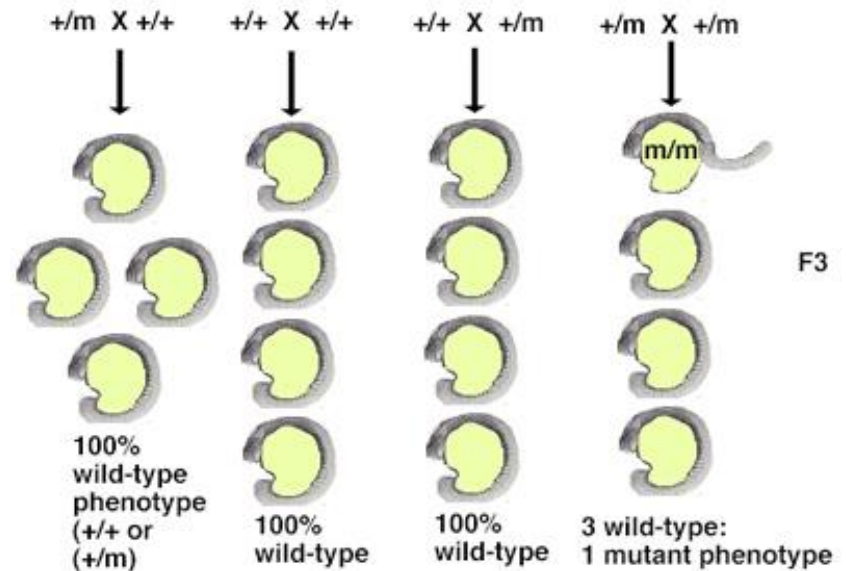
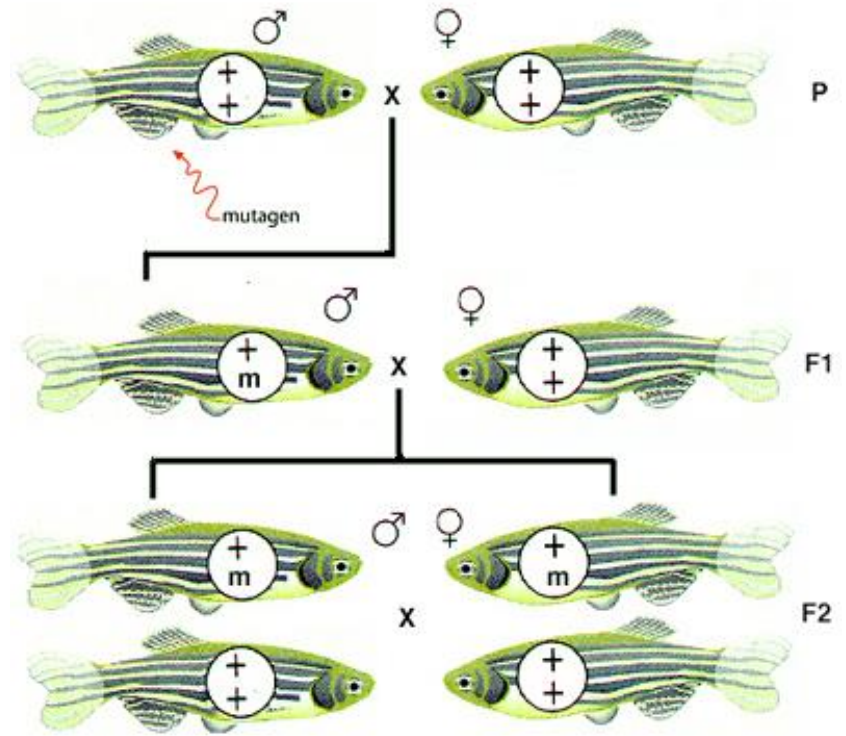
- 1) Isolamento di linee mutanti con fenotipi di interesse: mutazioni spontanee o mutagenesi casuale indotta su larga scala.
- 2) La posizione del gene mutante viene mappata sul genoma.
- 3) La regione genomica contenente la mutazione viene analizzata per identificare il gene mutante.

Invertebrati (C. elegans, Drosophila)

Vertebrati di piccole dimensioni (Zebrafish, Medaka)

Zebrafish Mutagenesis Strategy

ENU SCREENING IN ZEBRAFISH



APPROCCI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLE FUNZIONI GENICHE

GENETICA INVERSA (REVERSE GENETICS)

1) Identificazione di geni mediante tecniche di biologia molecolare (es. sequenziamento del genoma).

2) Tecniche di **perdita di funzione (loss of function)**

Il gene viene inattivato o geneticamente, mediante tecniche di modificazione genetica (knock-out), o funzionalmente, introducendo nell'embrione reagenti che interferiscono con la funzione del messaggero o della proteina.

3) Il fenotipo prodotto dall'inattivazione del gene viene studiato.

Knock-out genico: topo.

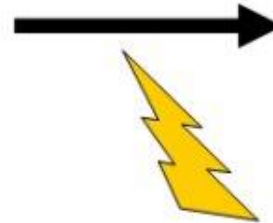
Inattivazione funzionale (es. mediante oligonucleotidi antisenso): embrioni di vertebrati facilmente manipolabili (pesci, anfibi, pollo).

Forward Genetics



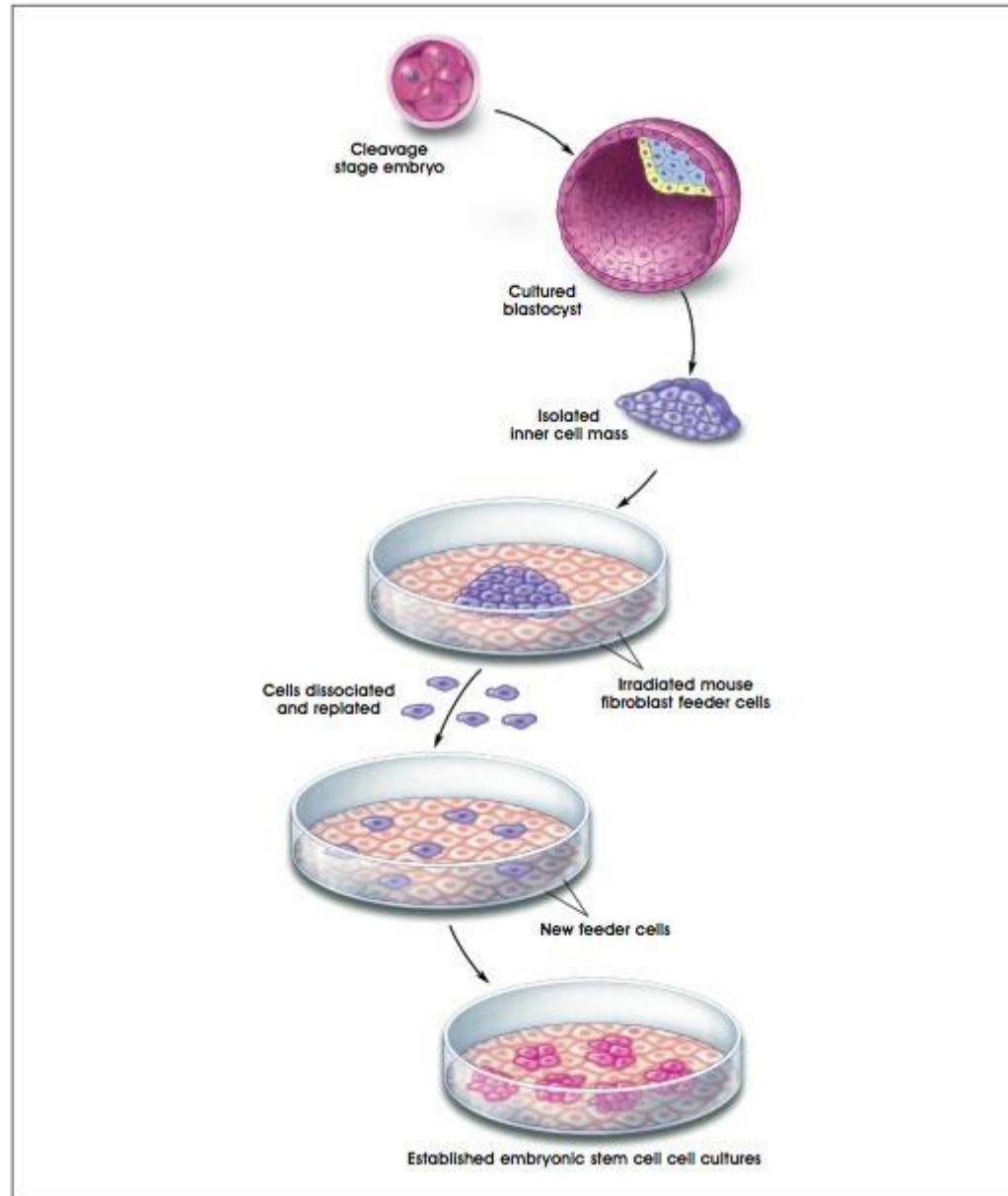
Reverse Genetics

```
ATGACTTCTGTCCGTGTTTCGATGCGGCC
GTGGCGGAGTTCGGTTCGTCTGGATCTG
CATCTACATCTGGATCTGCGTCCGGGTCT
ACTTCGGCAAGTGCTGTTGTGAGCAGTT
CGAGTGCGACTGTGAGCGGTGCTGGTAT
CGGGGCTGGTGTGTCGGTGAAGAGAAG
GAGAGCATTTCGTGAGCTCCGCCGTGG
GTACGACTGCTGACGAGGTGTTAGCATC
GAATGCTACTGCTATCGTGAGATCTTTAA
CCTTTGGGAACCTGTACGCTCAGTCTGC
GCATGACGTTTTCGAGTGGATCGTCASTG
GCTGTGTACGCGGUAG
```

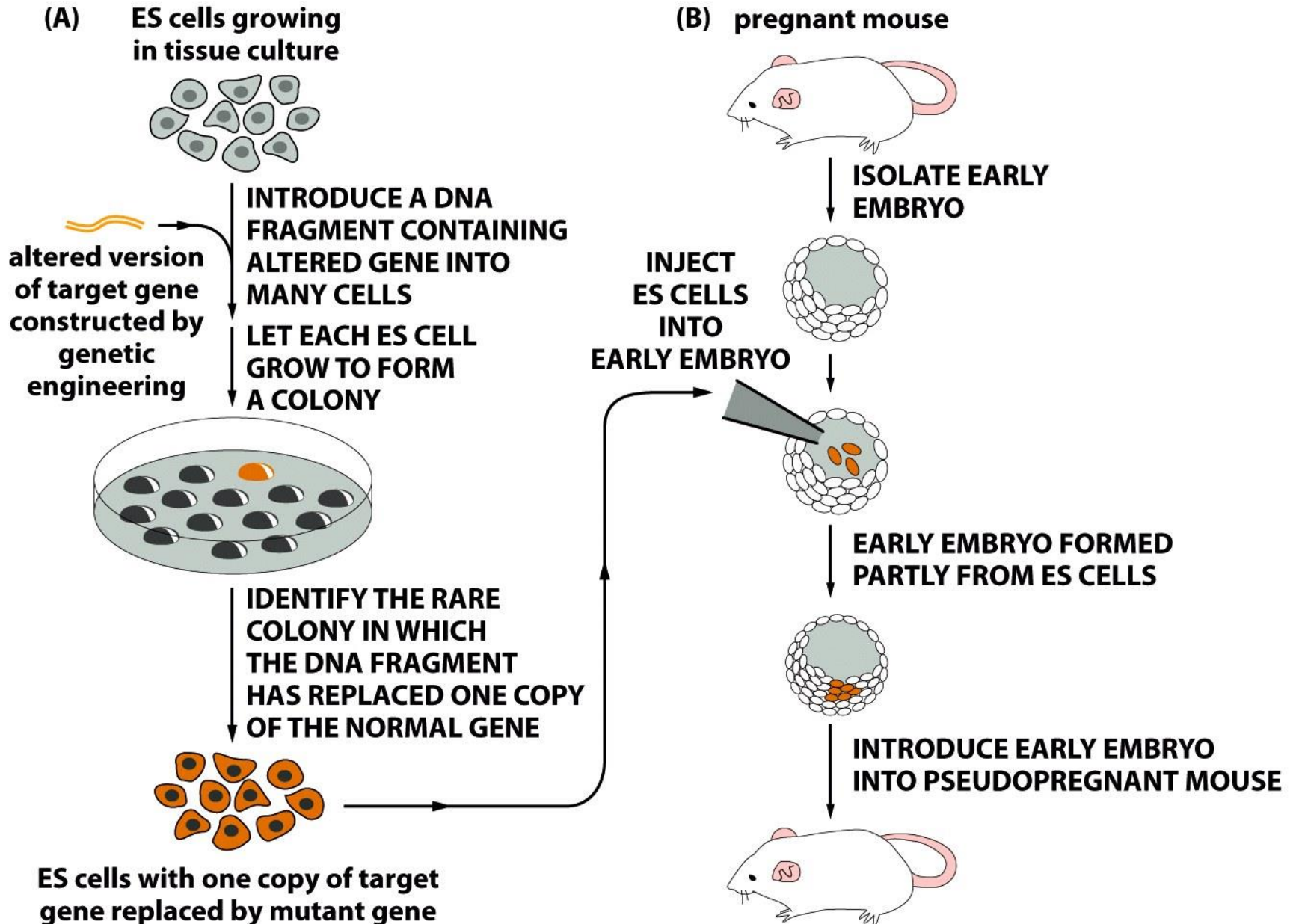


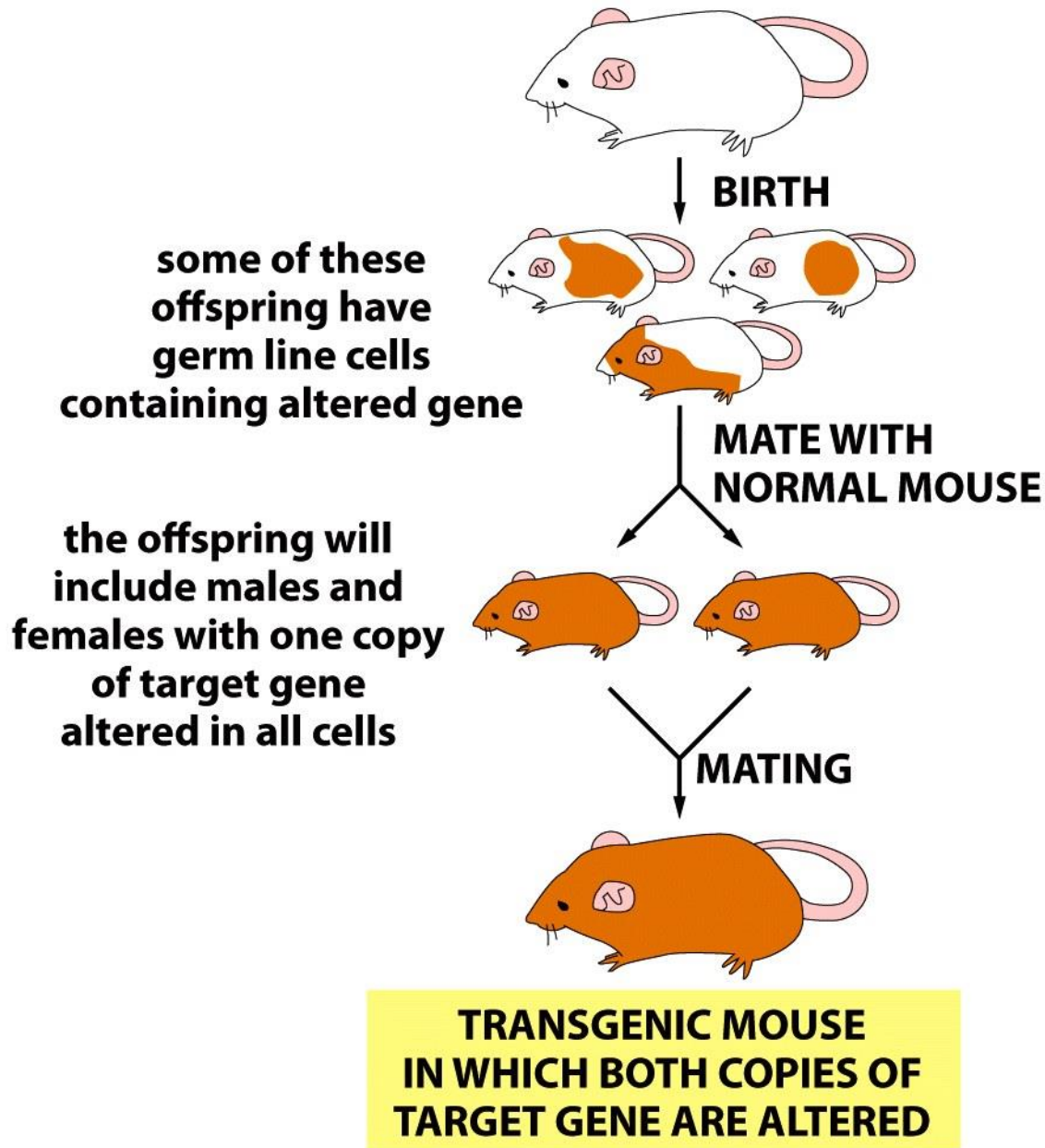
Mutagenesis

LA TECNICA DEL KNOCK-OUT GENICO FA USO DI CELLULE STAMINALI EMBRIONALI RICAVATE DA EMBRIONI ALLO STADIO DI BLASTOCISTI

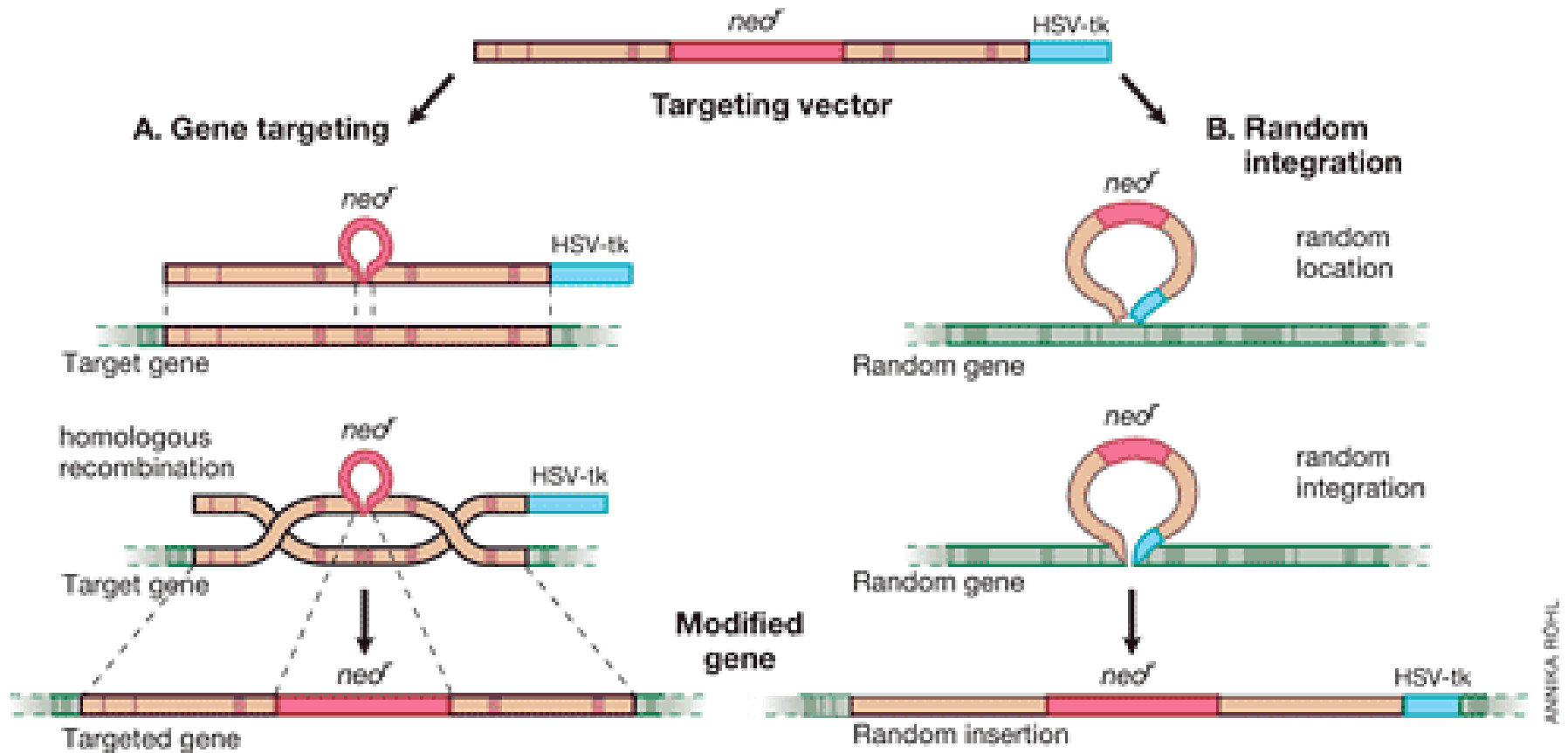


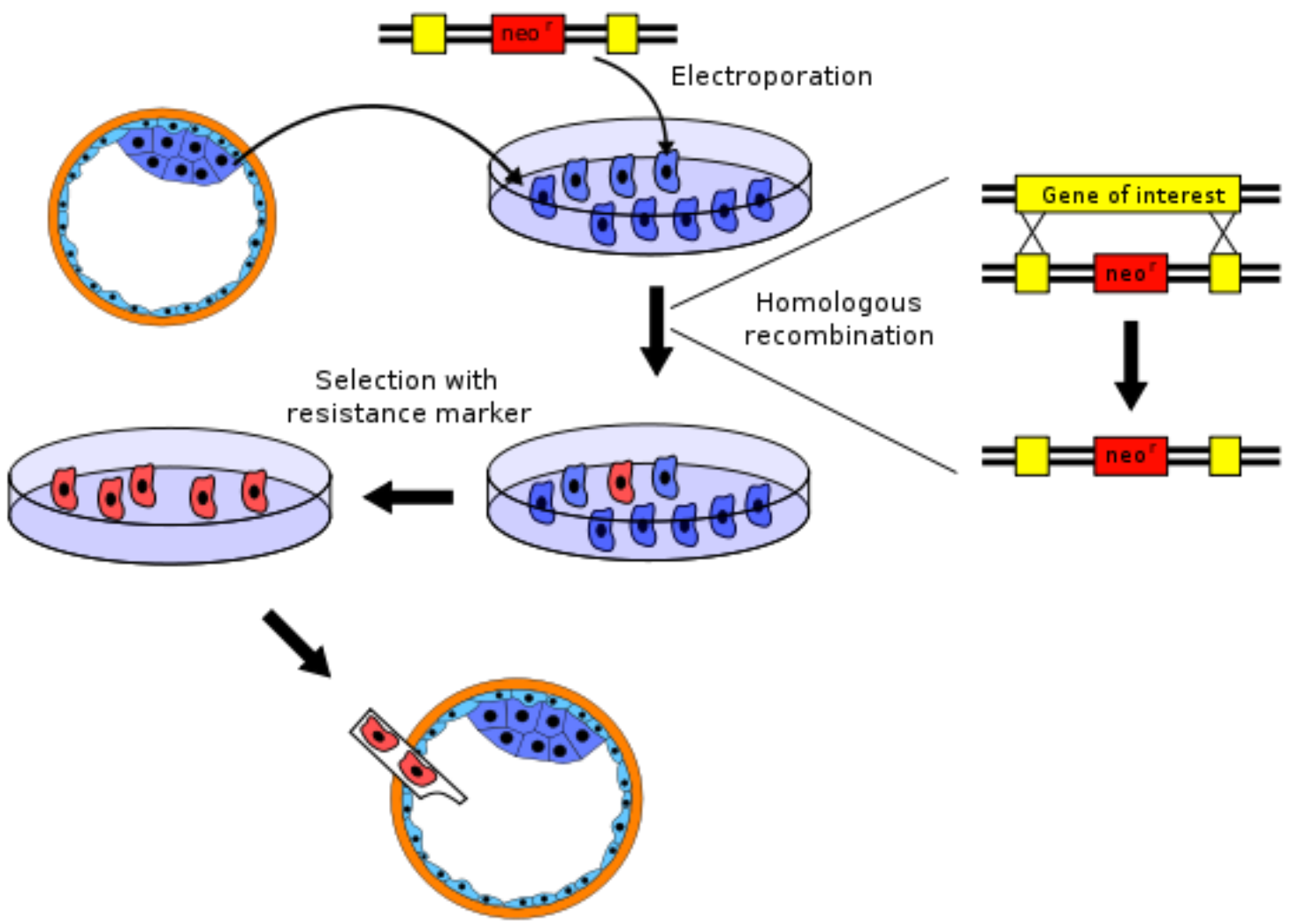
TECNICA DI KNOCK-OUT GENICO NEL TOPO

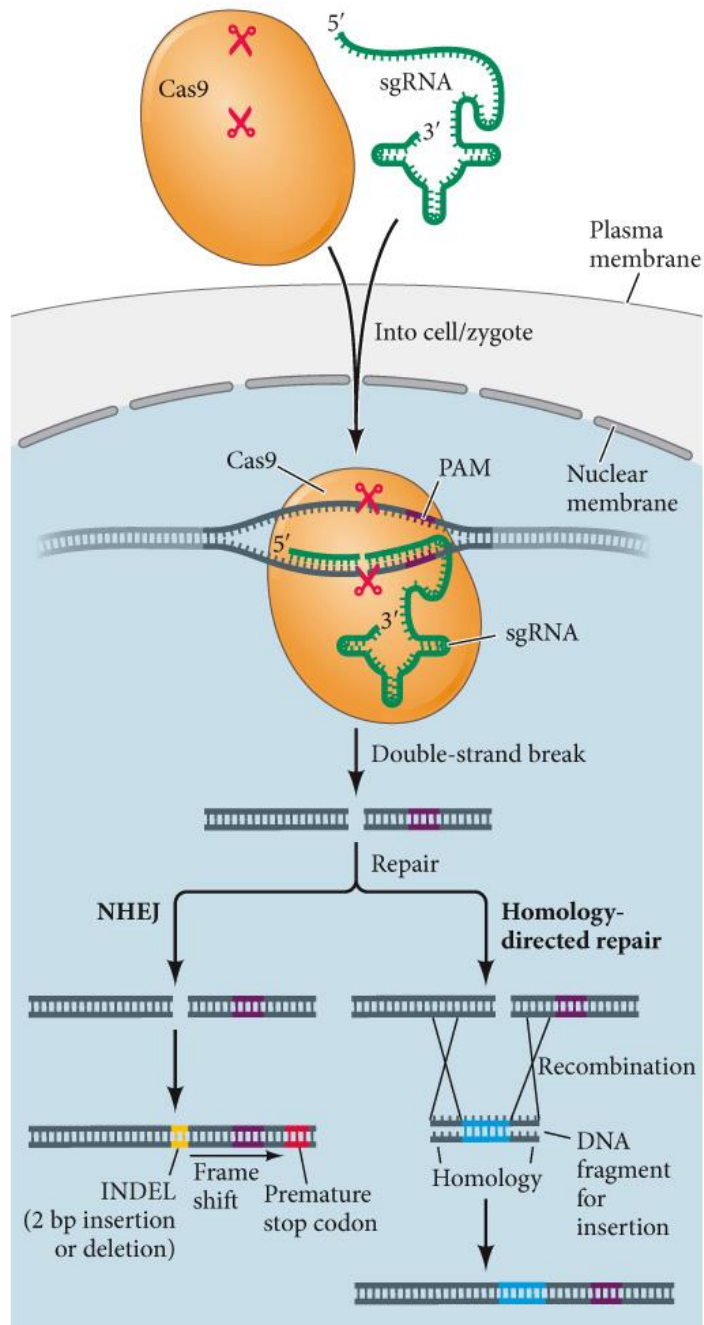




IL KNOCK-OUT GENICO NEL TOPO PUO' ESSERE EFFETTUATO ATTRAVERSO IL PROCESSO DELLA RICOMBINAZIONE OMOLOGA







Modificazione del genoma mediante la tecnica CRISPR/Cas9

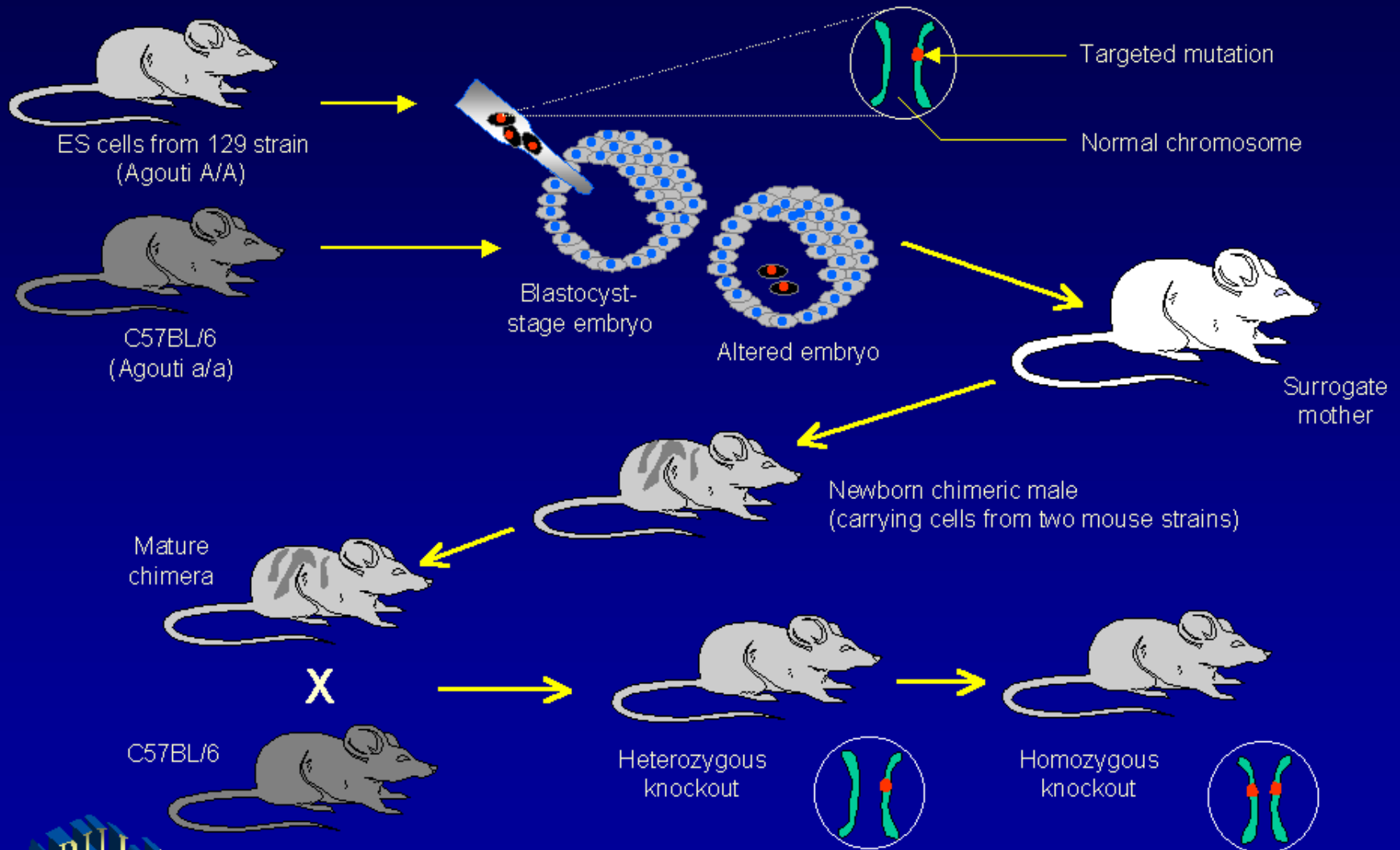
CRISPR

clustered interspaced short palindromic repeats

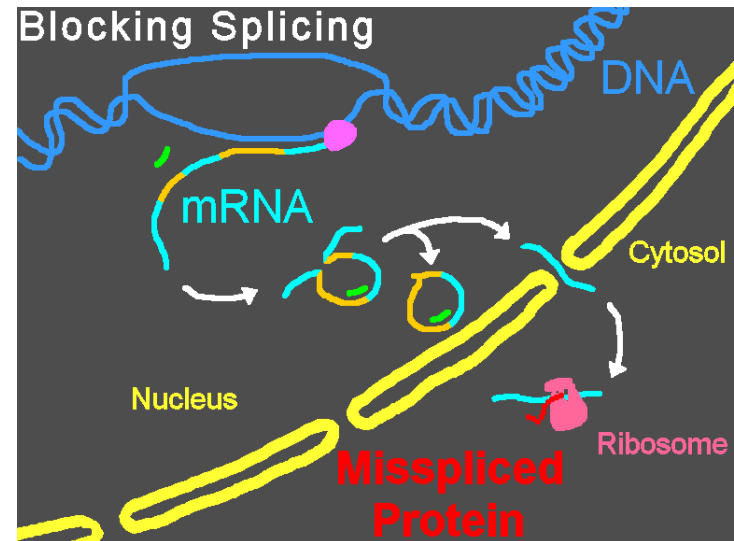
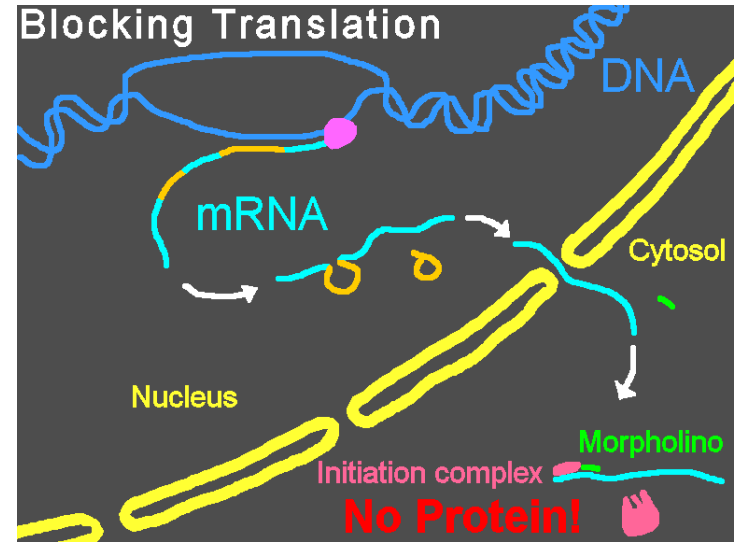
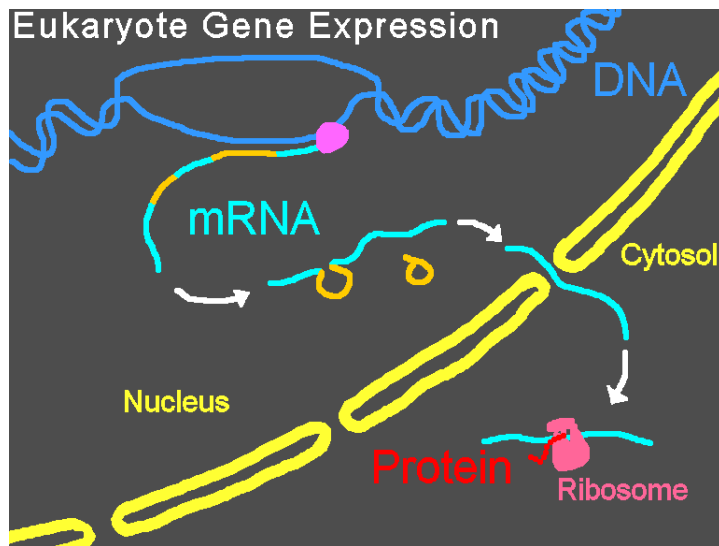
Cas9

CRISPR associated enzyme 9

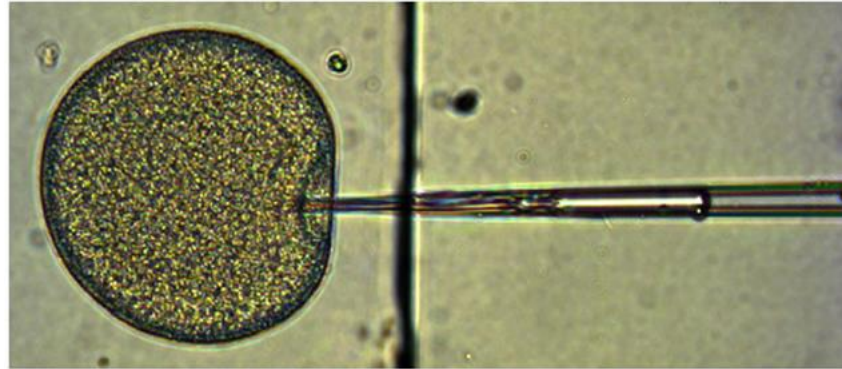
TARGETED GENE REPLACEMENT IN MICE



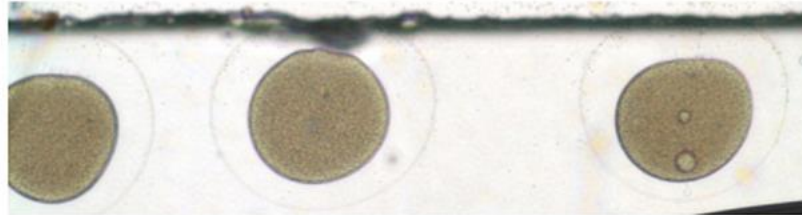
INATTIVAZIONE FUNZIONALE DI GENI MEDIANTE OLIGONUCLEOTIDI ANTISENNO “MORPHOLINO”



MICROINIEZIONI IN EMBRIONI DI RICCIO DI MARE



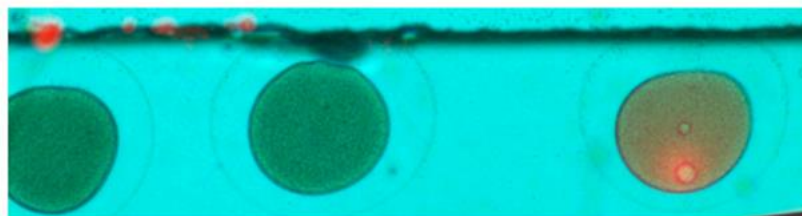
A



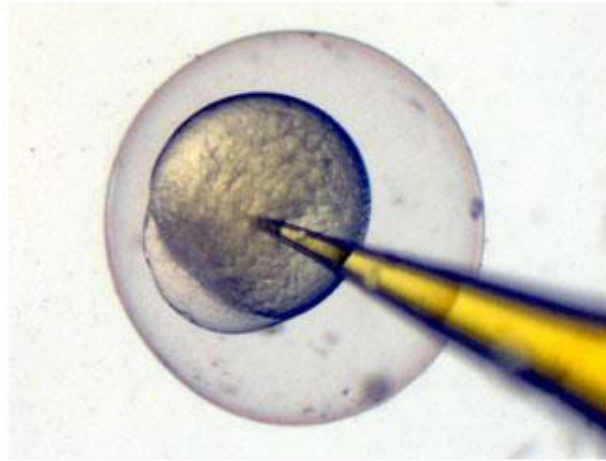
B



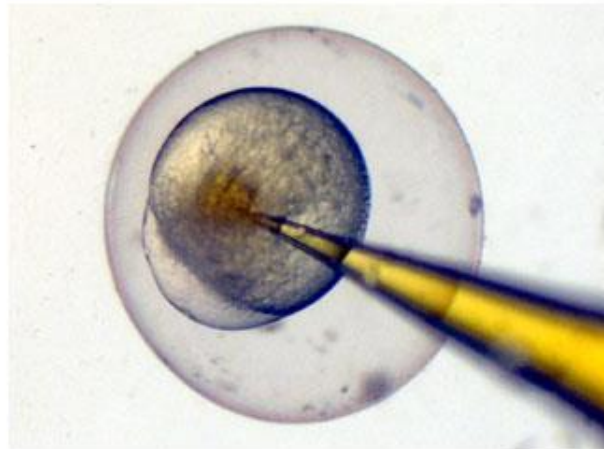
C



Zebrafish Embryo Injections

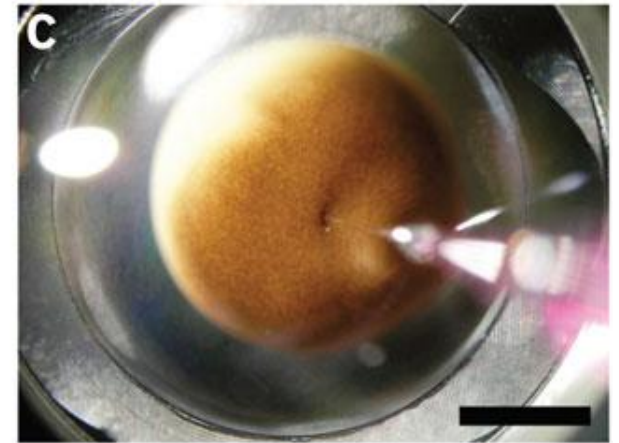
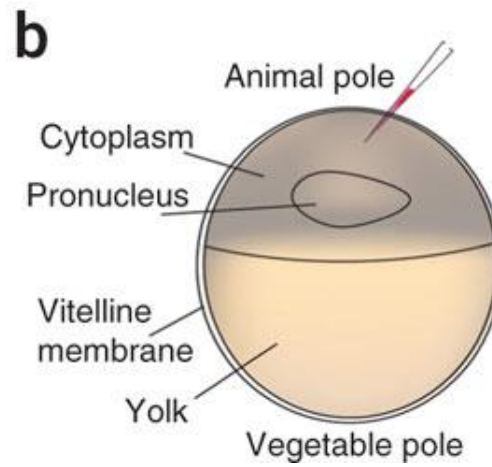
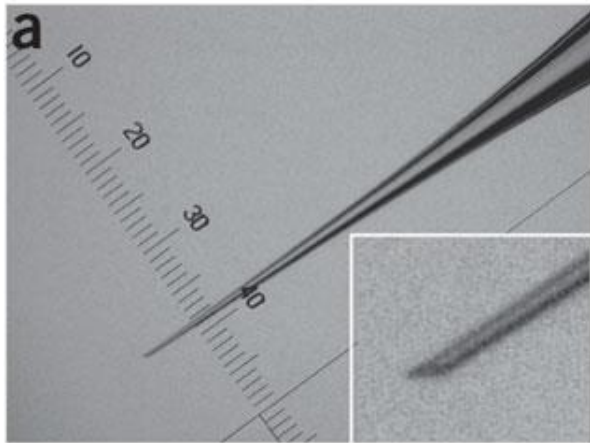


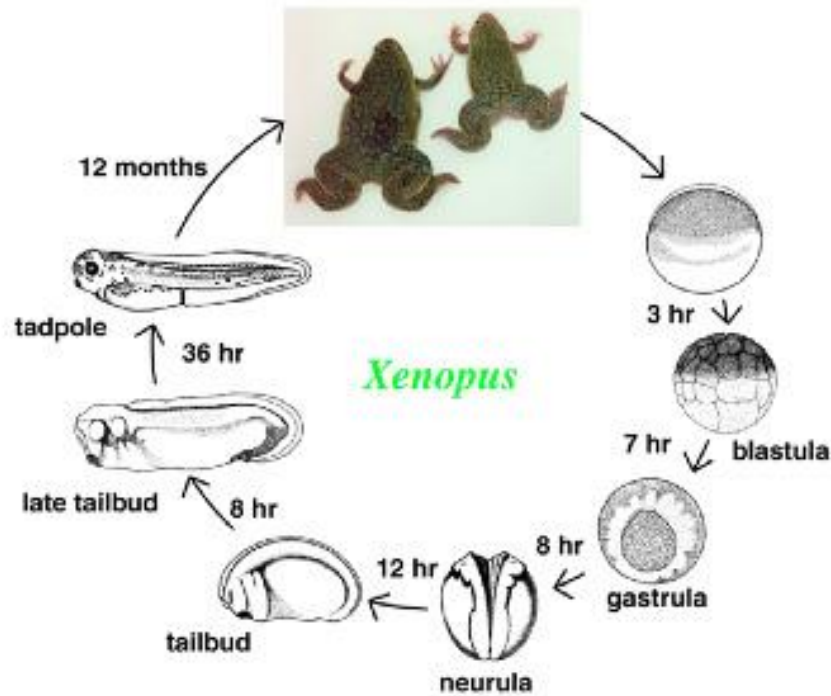
First the glass needle penetrates the chorion into yolk mass



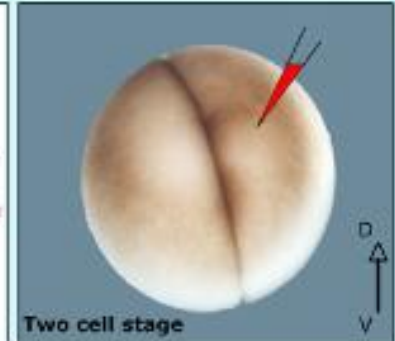
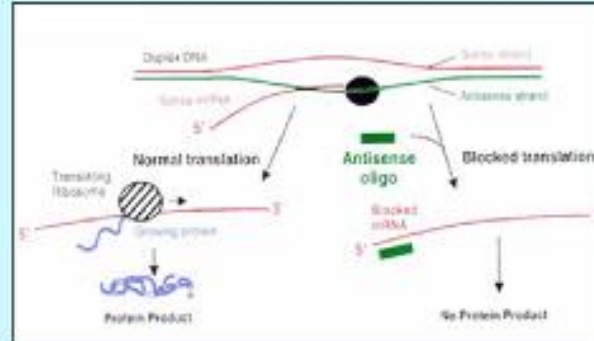
Next, 2.3 nl of caged fluoresce dextran is injected into yolk

MICROINIEZIONI IN EMBRIONI DI XENOPUS





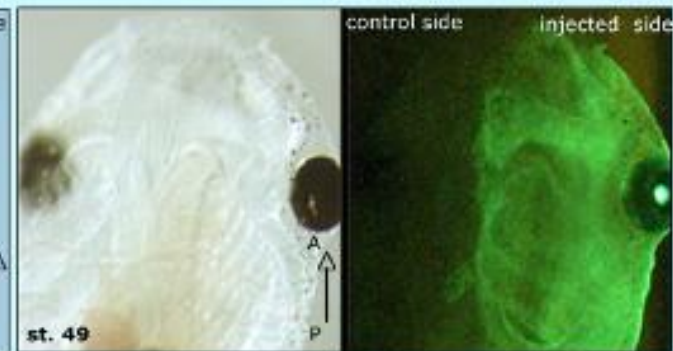
Gene Loss of Function strategy: Antisense Morpholino oligos microinjection



LacZ mRNA



GFP mRNA



BRIGHTFIELD

DARKFIELD

APPROCCI MOLECOLARI ALLO STUDIO DELLO SVILUPPO

TECNICHE DI GUADAGNO DI FUNZIONE (GAIN OF FUNCTION)

Sovraespressione (Overexpression)

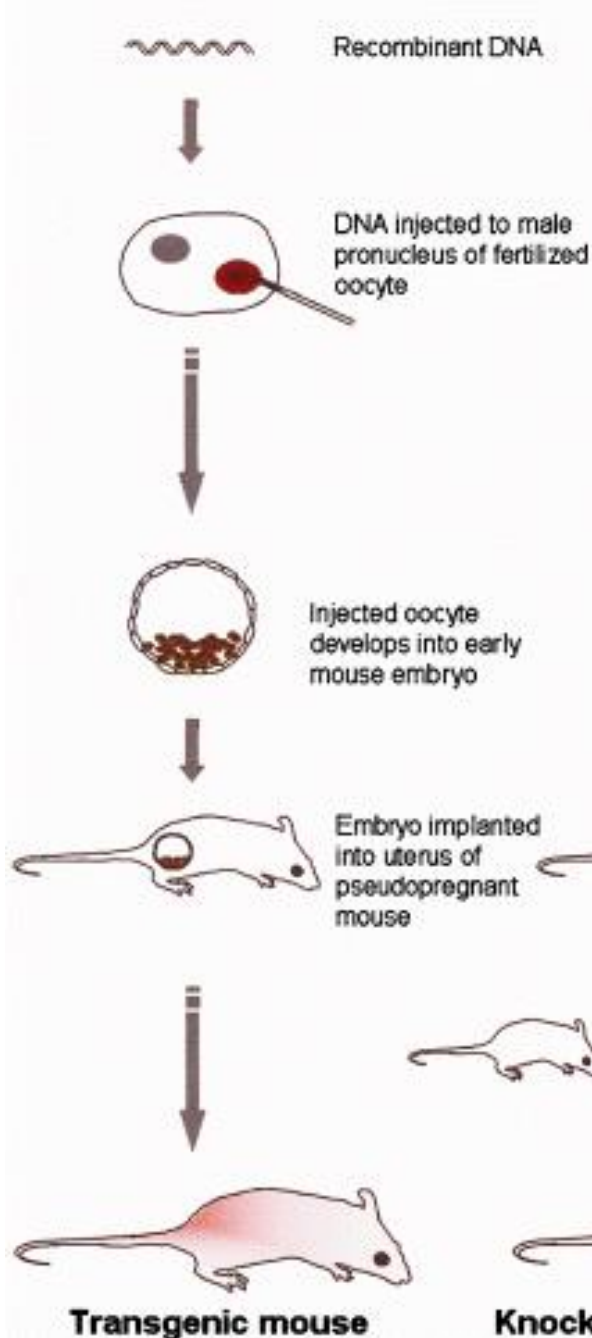
Espressione di un gene a livelli piu' alti del normale

Espressione ectopica (Misexpression)

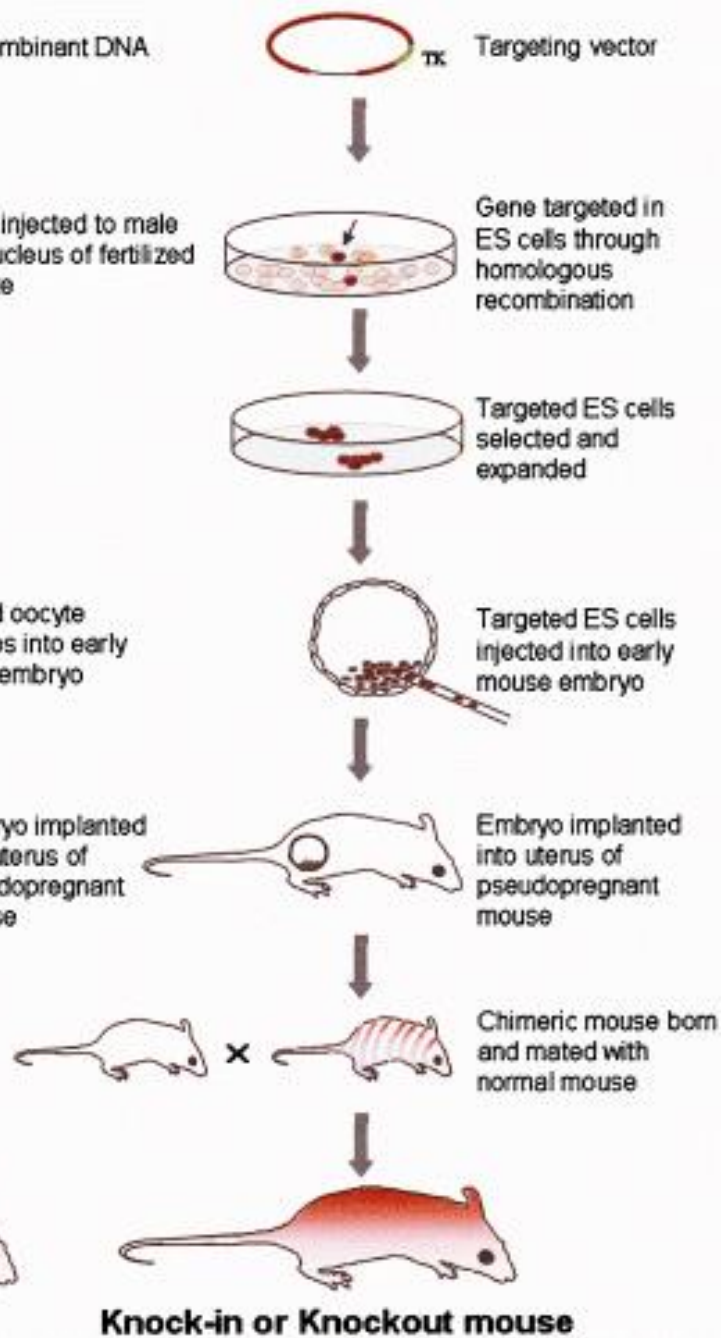
Espressione di un gene al di fuori del suo normale dominio di attivita'

- 1) In transiente: introduzione nell'embrione di RNA messaggero codificante per la proteina di interesse.
- 2) Stabilmente: creazione di organismi transgenici mediante integrazione nel genoma di copie extra del gene espresse ectopicamente o sovraespresse.

A Transgenic



B Knock-in or Knockout



APPROCCI MOLECOLARI ALLO STUDIO DELLO SVILUPPO

VISUALIZZAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DURANTE LO SVILUPPO

Ibridazione in situ

Visualizzazione della localizzazione del mRNA del gene di interesse mediante ibridazione con RNA antisenso marcato o radioattivamente o con un gruppo chimico riconosciuto da un anticorpo specifico coniugato ad un'attività enzimatica.

Immunocitochimica

Visualizzazione della localizzazione della proteina del gene di interesse mediante legame a un anticorpo specifico.

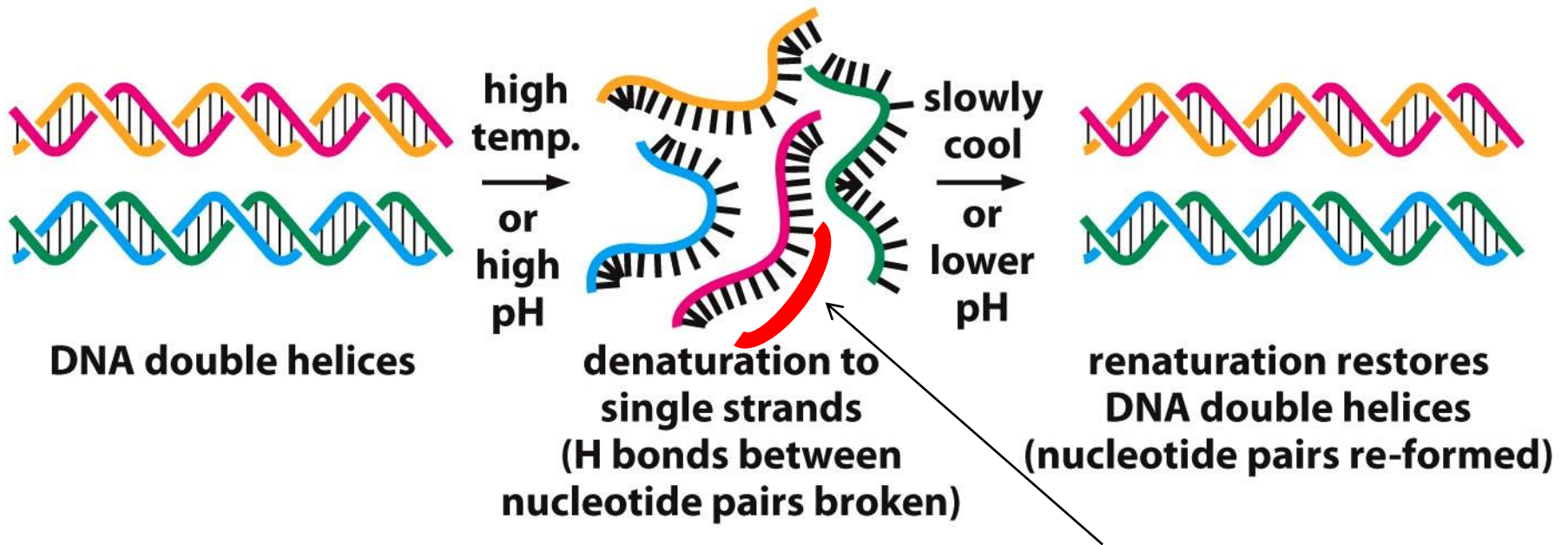
Transgenesi

Creazione di embrioni transgenici in cui l'espressione di un gene reporter (Green Fluorescent Protein, beta galattosidasi, etc) e' regolata dalle regioni regolatorie del gene di interesse.

Knock-in (topo)

Inserimento di un gene reporter all'interno di uno dei due alleli del gene di interesse.

L'IBRIDAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI AVVIENE SOLO FRA MOLECOLE CON SEQUENZE COMPLEMENTARI



SONDA: molecola di DNA marcata (es. ^{32}P) complementare a un DNA di interesse

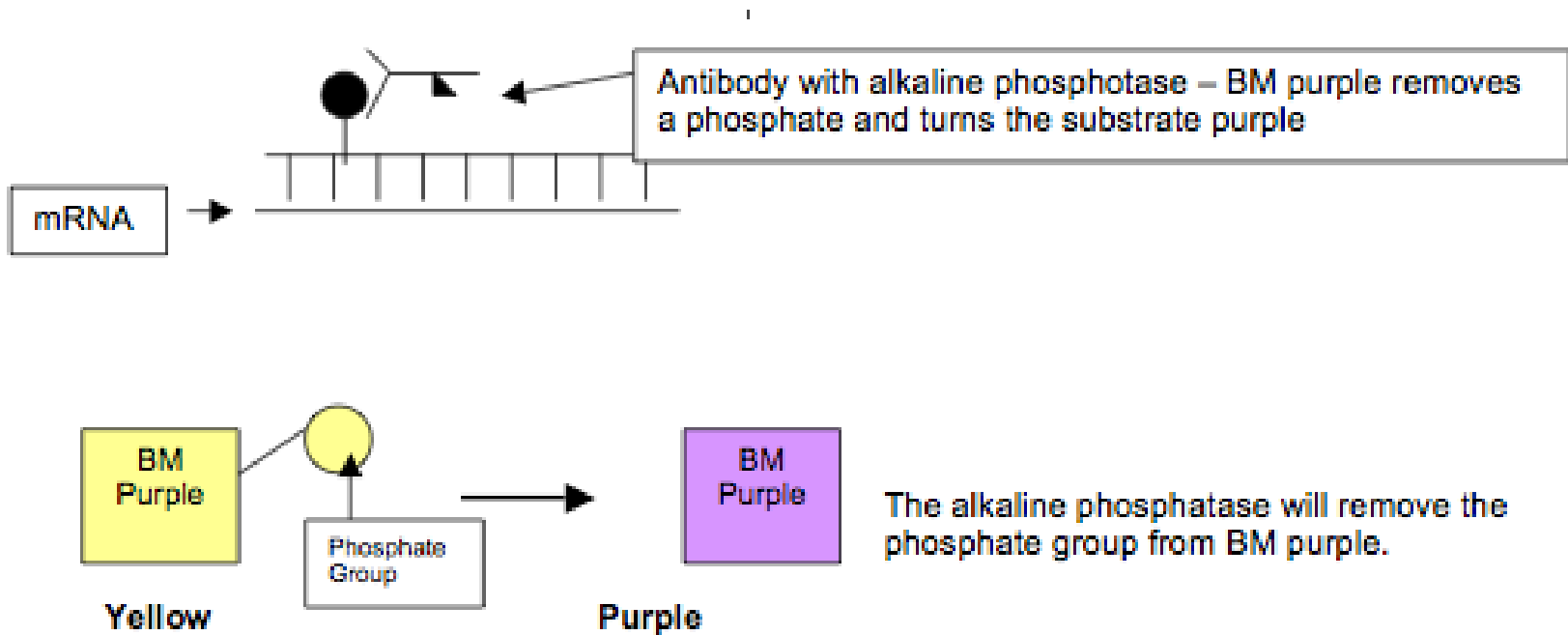
L'aggiunta di una sonda marcata durante l'ibridazione permette di individuare il DNA di interesse

DIVERSE TECNICHE DI IBRIDAZIONE IN SITU

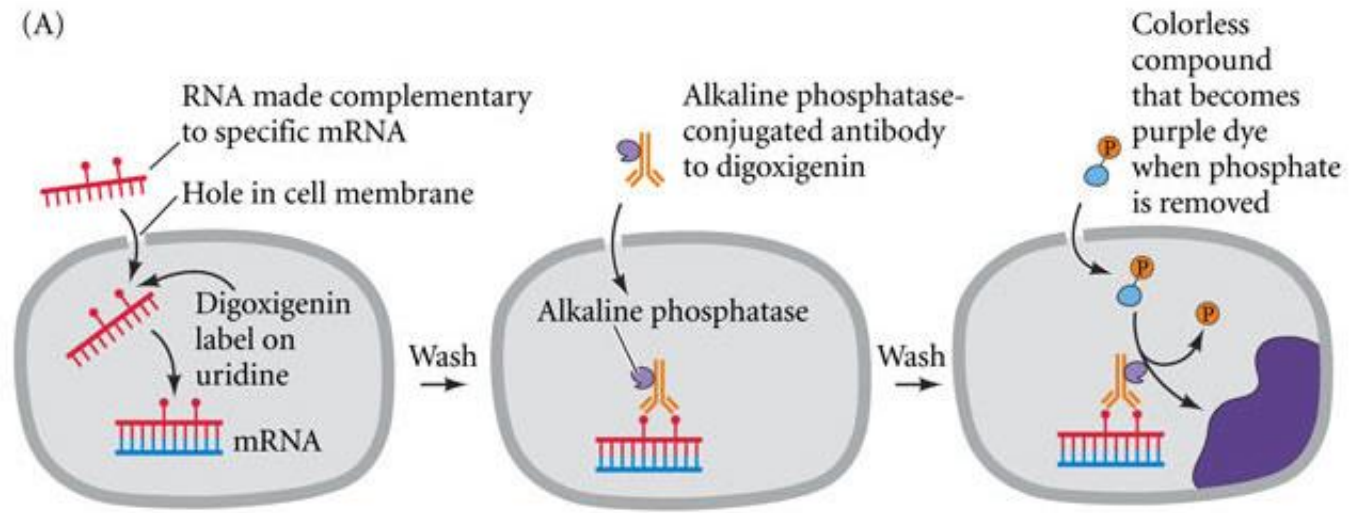
- 1) Whole mount**
- 2) Su sezioni**
- 3) Su cellule**

- 1) Rivelazione mediante reazione cromogenica**
- 2) Rivelazione mediante segnale radioattivo**
- 3) Rivelazione mediante fluorescenza**

IBRIDAZIONE IN SITU CROMOGENICA: RIVELAZIONE

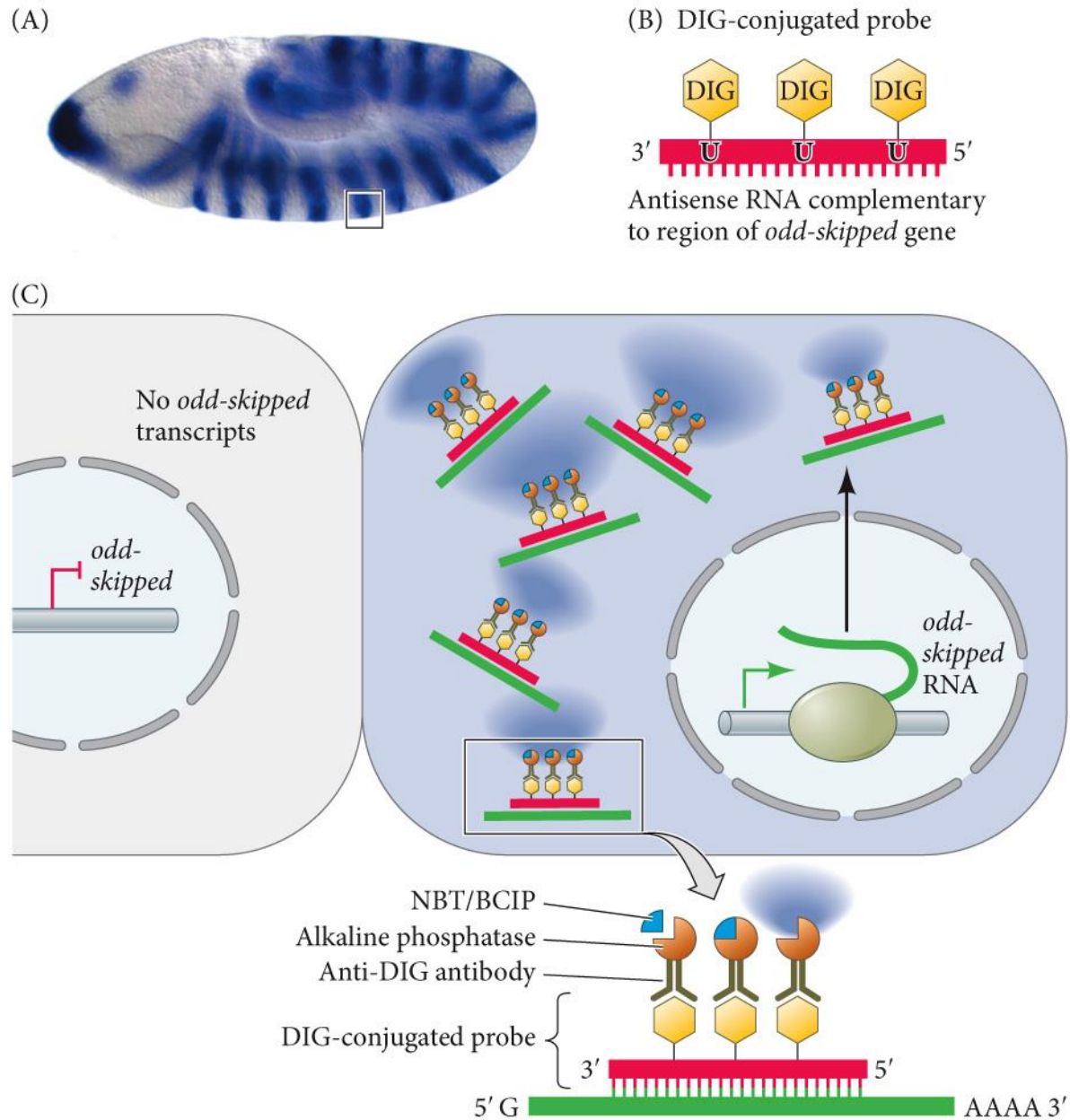


(A)



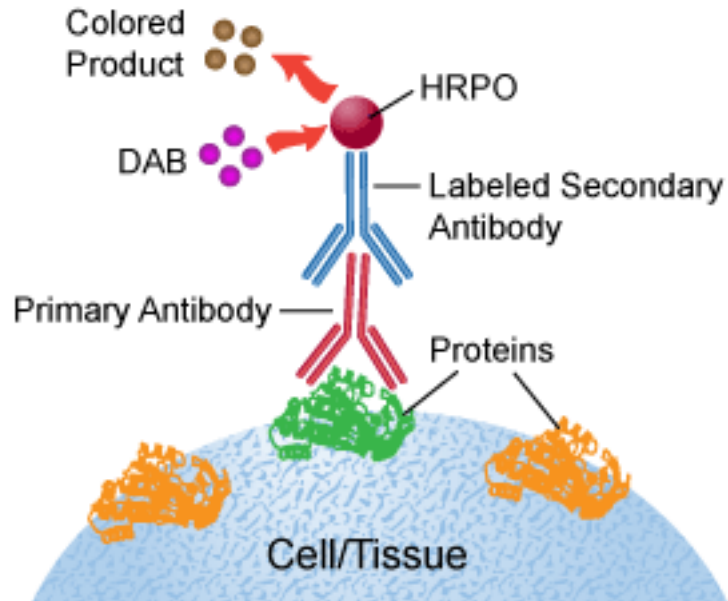
(B)





TECNICHE DI IMMUNOCITOCHIMICA

Indirect Immunohistochemistry



Immunofluorescence

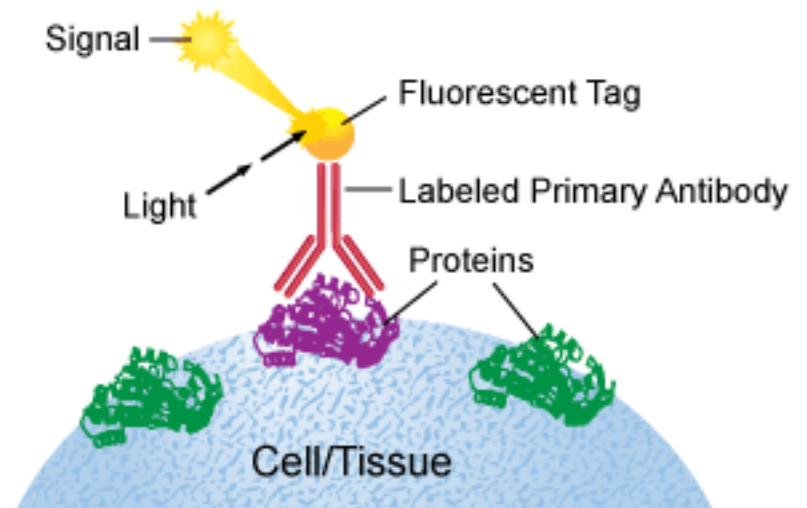
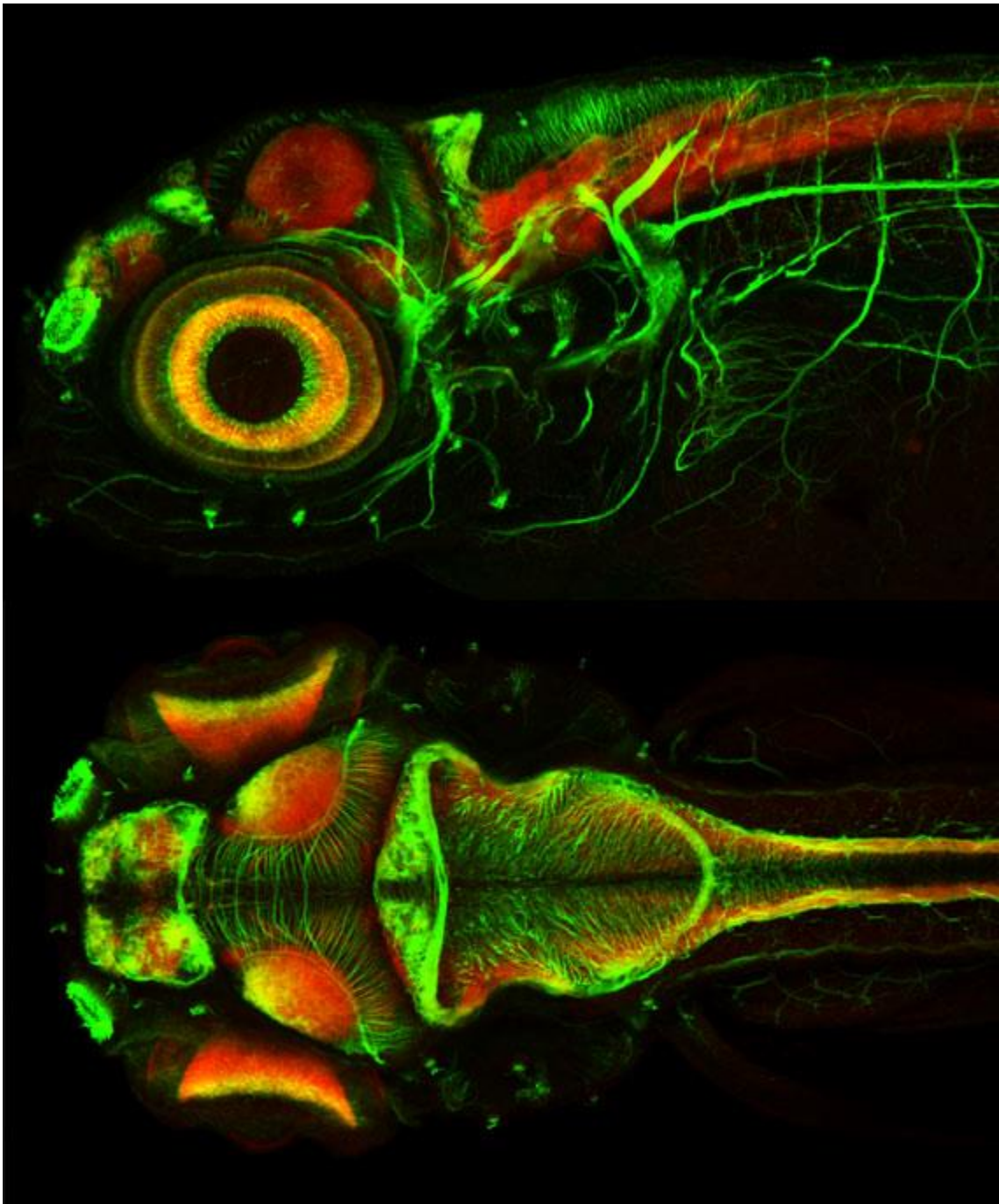
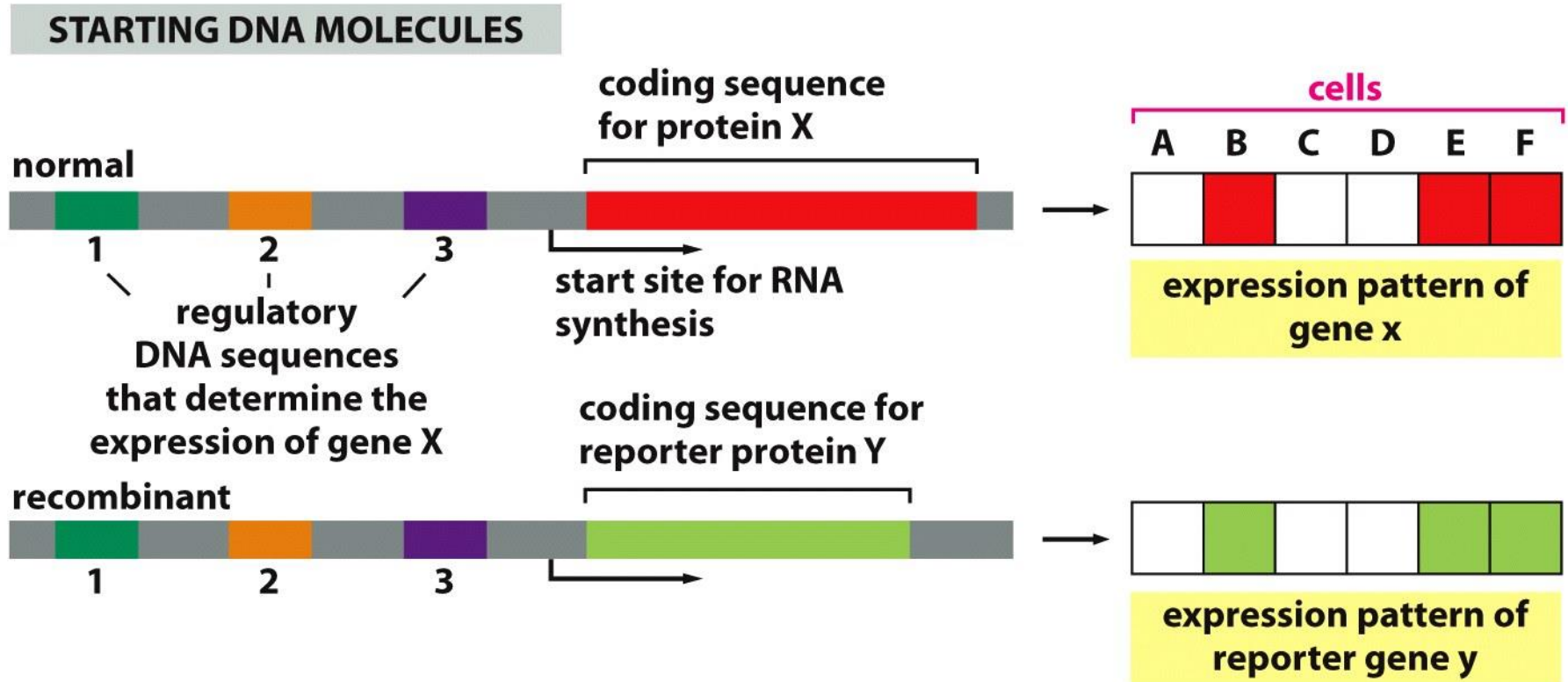


Diagram 1: Illustration of Indirect Immunohistochemistry and Immunofluorescence methods.



L'ESPRESSIONE DI GENI REPORTER PUO' ESSERE UTILIZZATA PER STUDIARE LA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA



Making Transgenic Zebrafish

