

	eliminazione di metaboliti. Meccanismi di produzione di radicali liberi dell'ossigeno. Stress ossidativo e danni molecolari indotti da agenti chimici e fisici presenti nell'ambiente. Meccanismi cellulari di protezione da stress ossidativo: ruolo degli enzimi catalasi, superossido dismutasi, glutatione perossidasi e reduttasi. Gli agenti antiossidanti naturali e sintetici. Effetti di agenti chimici e fisici ambientali sui meccanismi di proliferazione e di morte cellulare. Proliferazione cellulare: fattori di crescita e regolazione di agenti mitogeni. Apoptosi, necrosi, aneokis, autofagia e perossifagia. Agenti cancerogeni: esempi di meccanismo d'azione, fonti e accumulo a livello ambientale.	
Testi consigliati	"Mutagenesi ambientale" - Migliore L. - Ed. Zanichelli, 2004. "Biotecnologia molecolare" - B.R. Glick & J. Pasternak - Ed. Zanichelli Articoli scientifici. Appunti delle lezioni.	
Propedeuticità	Obbligatorie: nessuna	Consigliate: nessuna
Metodi di valutazione	Prova scritta NO	Colloquio orale SI
Collocazione	Anno di Corso: I	Semestre: II

SSD BIO/11	BIOTECNOLOGIE AMBIENTALI (c.i.)			
Docente	<u>Prof. Guglielmina Chimienti</u> Telefono: 080/5443312 e-mail: g.chimienti@biologia.uniba.it Orario di ricevimento: concordato via e-mail Presso: Dip.to Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica			
Attività	Lezioni frontali	Esercitazioni	Laboratorio	Totale
Crediti	3,5		1,5	5
Ore attività	28		18	46
Ore studio individuale	59,5		19,5	79
Pre-requisiti	Conoscenze di Biologia molecolare con metodologie biomolecolari e tecnologia del DNA ricombinante, acquisite durante la laurea triennale.			
Obiettivi di Base	Studio dei meccanismi molecolari in grado di indurre variazioni del genoma			
Obiettivi Formativi Disciplinari	Analisi delle interazioni tra fattori ambientali e genotipo.			
Obiettivi Professionalizzanti	Conoscenza di tecnologie molecolari per analisi di popolazioni e valutazione della biodiversità, anche grazie ai laboratori previsti			
Contenuto	<p>1) Le mutazioni. Spontanee e indotte da mutageni. Effetti fenotipici delle mutazioni negli organismi pluricellulari. Mutazioni nelle linee somatiche e germinali. Perdita di funzione e acquisizione di funzione. Effetti fenotipici delle mutazioni nei microrganismi. Tasso di mutazione. Mutazioni geniche: missenso, non senso, silenti e neutre, inserzioni e delezioni, espansioni o riduzioni di sequenze ripetute. Cause endogene di mutazioni: tautomerizzazione, idrolisi, deaminazione, metaboliti endogeni mutageni.</p> <p>Mutazioni cromosomiche: numeriche e strutturali. Rotture cromosomiche e cromatidiche. Agenti clastogeni ad effetto immediato o ritardato. Errori nella ricombinazione.</p> <p>Metodiche per la caratterizzazione di mutazioni geniche.</p> <p>a) metodi per determinare la presenza/assenza di una mutazione: analisi SSCP, dell'eteroduplex, DGGE, TGGE, Protein truncation test (PTT).</p> <p>b) metodi per identificare una specifica variazione già nota: analisi RFLP. Sonde oligonucleotidiche allele-specifiche. Analisi di fenotipi mutatori.</p> <p>c) metodiche "ad alta resa": Macro-array e micro-array. Array di EST. Analisi comparative di trascrittomi. Screening differenziale di library di cDNA. Produzione di library di cDNA in vettori di tipi I. Ibridazione sottrattiva. Analisi delle differenze</p>			

di rappresentatività. Metodiche per la caratterizzazione di mutazioni cromosomiche: ibridazione Southern, PFGE, FISH.

Testi di riferimento: Mutagenesi ambientale. Migliore (Ed. Zanichelli). Cap. 1 e 2. Dai geni ai genomi. Dale, von Schantz (Ed. Zanichelli). Cap.14

2) Effetti epigenetici degli inquinanti ambientali. Meccanismi epigenetici: metilazione del DNA, modificazioni degli istoni, microRNA. Effetti sull'espressione genica. MiRNA e shRNA. Effetti dei metalli pesanti. Metodiche per l'analisi dello stato di metilazione del DNA:

a) analisi con isoschizomeri. Methylation specific- multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA).

b) metodiche basate sul trattamento del DNA con bisolfito di sodio. Analisi COBRA, PCR metilazione-specifica. Metodiche "ad alta resa". Real time PCR. Methylight.

Testo di riferimento: Allison. Fondamenti di Biologia Molecolare. (Ed. Zanichelli). Cap. 12

3) Metabolismo degli xenobiotici. Bioaccumulo e biotrasformazione. I mutageni chimici. Mutageni diretti: analoghi delle basi, agenti che reagiscono col DNA, alchilanti, intercalanti. Mutageni indiretti: ossidativi, antimetaboliti, mutageni mitocondriali. Promutageni. Bioattivazione. Ammine aromatiche, idrocarburi policiclici aromatici, aflatossine e nitrosammine. Enzimi del metabolismo degli xenobiotici. Monossigenasi citocromo P450 dipendenti (CYP). Regolazione trascrizionale dei geni CYP: recettore degli xenobiotici e l'esempio della diossina. Fattori che influenzano il metabolismo degli xenobiotici. Farmacogenomica e ecogenetica.

Testo di riferimento: Mutagenesi ambientale. Cap. 4 e 5.

Ricerca di contaminanti chimici mediante SPME-GC/MS (solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry).

4) Il monitoraggio biologico. Biomarcatori di esposizione o dose interna, di effetto biologico o di suscettibilità. Metodi per la valutazione della genotossicità di sostanze esogene. Test di genotossicità con i batteri: Test di Ames. Determinazione degli addotti al DNA e alle proteine. Test di mutagenesi con le cellule animali. Colture cellulari: colture primarie, linee stabilizzate e trasformate. Test HPRT; TK. Metodi per l'analisi delle rotture del DNA: metodi diretti (eluizione alcalina e Comet test); metodi indiretti (UDS).

Testo di riferimento: Mutagenesi ambientale. Cap. 9, 10, 15.

Elementi di epidemiologia. Epidemiologia descrittiva: mortalità e morbilità.

Epidemiologia analitica. Studi retrospettivi e prospettici. Definizione di errore.

Analisi multivariata. Risk ratio, Odds ratio e rischio attribuibile. Modelli di interazione tra genotipo e ambiente.

5) Biorisanamento: la degradazione microbica degli xenobiotici. Manipolazioni geniche di microrganismi. Trasferimento di plasmidi. Trasferimento di geni.

Testo di riferimento: Biotecnologia molecolare. Glick, Pasternak (Ed. Zanichelli) Cap. 13.

6) Applicazioni biotecnologiche del DNA ricombinante: produzione di proteine eterologhe in cellule procariotiche. Vettori di espressione, promotori, proteine di fusione, purificazione delle proteine ricombinanti. Mutagenesi in vitro, casuale e sito specifica. Clonaggio in cellule di mammiferi. Metodi per il trasferimento di geni. Trasfezione transiente. Vettori episomali: TOPO vector. Geni reporter. GFP. Trasfezione stabile. Vettori retro virali. Terapia genica. Produzione di topi transgenici. Gene pharming. Linker based sperm-mediated gene transfer. Gene targeting.

	<p>Testi di riferimento: Dai geni ai genomi. Dale, von Schantz (Ed. Zanichelli). Cap.11 e 15. Fondamenti di biologia molecolare. Allison (Ed. Zanichelli). Cap. 9 e 15. 7) Analisi genomiche: piattaforme di sequenziamento di nuova generazione Metagenomica. Progetto DNA barcode Biologia molecolare. Amaldi, Benedetti, Pesole, Plevani (Ed. Casa Editrice Ambrosiana). Cap. 21 Dai geni ai genomi. Cap.12 Appunti delle lezioni</p>	
Testi consigliati	<p>Biologia molecolare. Amaldi, Benedetti, Pesole, Plevani (Ed. Casa Editrice Ambrosiana). Cap. 21 Dai geni ai genomi. Cap.12 Appunti delle lezioni</p>	
Propedeuticità	Obbligatorie: nessuna	Consigliate: nessuna
Metodi di valutazione	Prova scritta NO	Colloquio orale SI
Collocazione	Anno di Corso: I	Semestre: II