

Lezione 27 - 28

Martedì 27 Aprile 2010

corso integrato di Biologia Applicata BU
e Ingegneria Genetica BCM

Venerdì 21 Maggio ore 11:00 aula 18
la Professoressa Francesca Dalpero terrà la lezione
sul metodo 454 shot-gun sequencing

Topi transgenici per inserzione random nel genoma

Primi topi transgenici solo di espressione di marcatori, geni eterologhi, sovrannumerari,

- iniezione diretta del DNA nella blastocisti
- inserzione in una o più copie nel genoma ospite,
- inizialmente un marcatore carrier per il colore del mantello come controllo della ricombinazione ed espressione

Metodologia di base

- organismo transgenico

Come si ottiene: trasfezione batterica come modello

Trasfettare cellule eucariotiche animali e vegetali col DNA

Tecnica del DNA ricombinante per i vettori

Cellule vegetali hanno anche la parete di cellulosa: metodi di trasfezione più complessi

Cellule animali hanno solo la membrana meno resistente

Tecniche di trasfezione diverse e con efficienze diverse

Necessità della tecnica adeguata per veicolare il DNA

Organismi Transgenici

La selezione tramite incroci produce organismi “innaturali” ?
come gli organismi transgenici? Innaturale = manipolato ?

- la trasmissione orizzontale di informazione genetica per via naturale esiste: es MIRs (mamm. interspersed regions)
SINE (short interspersed nucl. Elements) Vipera-Bovini
- pericolo (soprattutto in agricoltura) per il passaggio di geni esogeni in altre specie che ne sono privi (batteri simbiotici).
- i geni che si usano possono creare rischio?
- uso del criterio di cautela

Le stesse preoccupazioni sono state poste quando iniziarono i clonaggi nei plasmidi e poi con vettori di espressione usando batteri e resistenze ad antibiotici.

Sono nati i laboratori a contenimento negativo da cui non possono uscire batteri ricombinanti.

Organismi trangenici II

Dopo i procarioti è stato possibile fare organismi transgenici con organismi eucariotici.

- fattore limitante la tecnica adatta.
- manipolazione del DNA è sempre la stessa,
- cambia la veicolazione e stabilità nei genomi.
- non ci sono plasmidi nelle cellule degli organismi complessi.

L'integrazione in un genoma può creare dei problemi sia al frammento da integrare sia al genoma ospite. C'è stata e c'è una notevole differenza tra i modi di produrre organismi transgenici vegetali o animali.

Per alcuni organismi vegetali si possono usare con facilità dei trasposoni che facilitano l'integrazione nel genoma.

Per integrarsi un costrutto deve comunque ricombinare. Finché non erano note molte sequenze la ricombinazione era esclusa anche perché è un evento raro ($\approx 10^{-6}$)

Organismi transgenici III

Organismi modello transgenici: Drosophila, Coenorabditis el. ed il Topo e tra i vegetali Arabidopsis e Nicotiana.

- sono stati usati organismi modello già usati in genetica con sufficienti informazioni.
- per gli organismi vegetali: come veicolare il DNA attraverso le protezioni esterne come la parete di cellulosa,
- sono stati usati virus o batteri trasformanti o micro sfere di metalli pesanti (oro) come proiettili adsorbiti col DNA.
- negli animali le cellule sono più facilmente penetrabili
- l'uso dei virus come veicolo è il metodo più efficiente, i virus devono essere non infettivi e non ricombinare per ridare origine al virus "wild type" infettivo.

Nel topo la tecnica iniziale è stata quella di utilizzare la blastocisti che era già utilizzata dai biologi dello sviluppo. Il primo successo è stato ottenuto generando un topo chimerico.

Topi chimerici e transgenici

- un organismo transgenico deve avere trasformate le cellule della linea germinale oppure il nucleo dello zigote. Nel topo in cui è problematico intervenire sugli uni e sull'altro è stato utilizzata la blastocisti su cui già veniva fatta sperimentazione. La topolina da accoppiare viene trattata con estrogeni per far avvenire l'ovulazione e per avere un buon numero di blastocisti.

La blastocisti si riconosce più facilmente da uno zigote (annessi) e si riesce a trovare facilmente nell'utero di una topolina accoppiata poco prima. Dopo l'accoppiamento in poche ore si forma un tappo vaginale che è il segno dell'avvenuta fecondazione. I primi topi chimerici sono stati ottenuti iniettando direttamente il DNA nella blastocisti che lo riassorbe e con buona probabilità riesce a trasformare le cellule.

Dal chimerico al transgenico

Iniettando il DNA nella blastocisti qualche cellula potrà assorbire il DNA, ma non tutte e quindi si otterrà un topo chimerico in cui non tutti i tessuti hanno nel genoma il DNA iniettato (con un costrutto adatto per essere funzionale ed esprimersi, cioè un gene completo e più spesso artificiale, recante un promotore forte costitutivo come quello di un virus). Questo tipo di vettore se porta un gene per una resistenza ad un antibiotico non deve essere diffuso fuori dal laboratorio.

Tra i topi chimerici ci potrebbe essere quello che ha assorbito e ricombinato nella linea germinale e che può dare origine ad una linea transgenica. - un incrocio con un topo della linea isogenica per poter riconoscere eventualmente dal pelo se si è trasmesso il gene marcatore.

Quindi se si ottiene una F1 transgenica si reincrocerà sempre con topi isogenici a quelli utilizzati per fare il topo chimerico.

Si ottiene sempre un eterozigote! 1 allele resta wt!

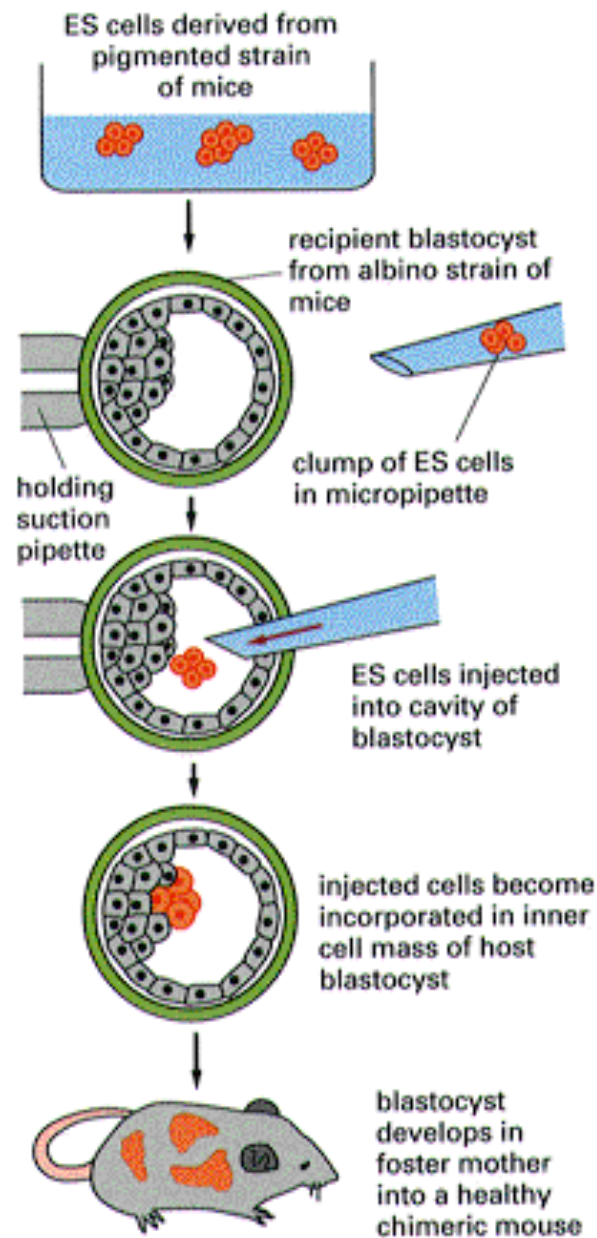
Controllo del topo transgenico

Come si può essere certi che il topo sia transgenico a parte il colore del pelo (non sempre si associa un marcatore per il colore del pelo) ? Si deve analizzare il DNA dell'animale, nel caso del topo si prende un frammento della coda che non provoca troppo trauma o danno fisico e se ne analizza il DNA tramite Southern blot o tramite PCR.

Per sapere dove si è integrato si deve clonare il frammento corrispondente a quello del Southern con PM alterato e sequenziarlo, - tramite PCR inversa cercare la sequenza dei frammenti limitrofi al costrutto integrato. - il gene che si esprime corrisponde ad un fenotipo atteso, oppure diverso dal wt.?

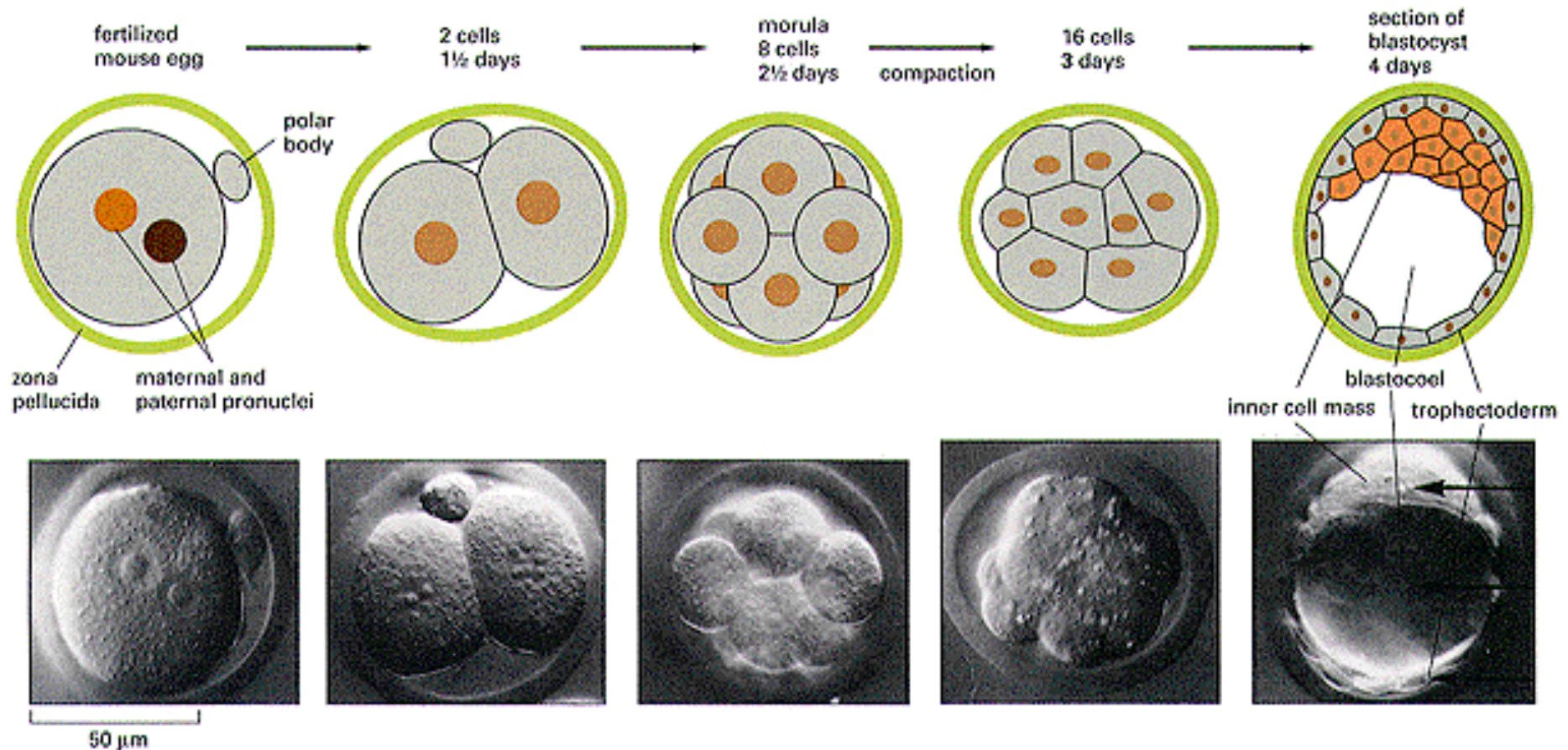
- Per sapere se si sono integrate più copie con il Southern si ha risoluzione migliore e cosa si vede? Per PCR inversa cosa si deve fare per vedere se c'è più di una copia ?

Schema in cui si mostra l'iniezione con cellule, col DNA è uguale

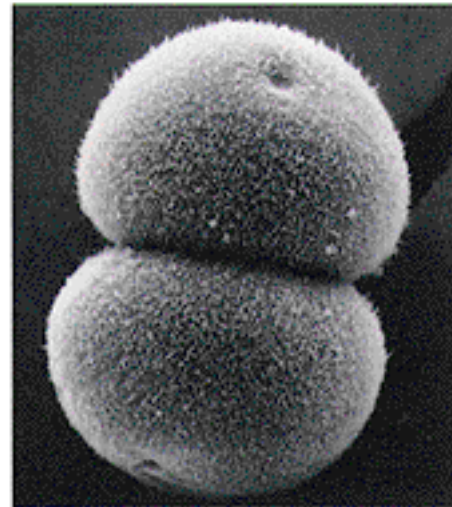


Iniezione con ES
cells o DNA

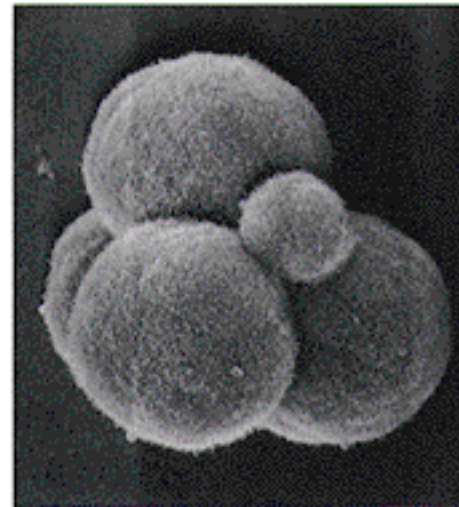
Come si forma la blastocisti



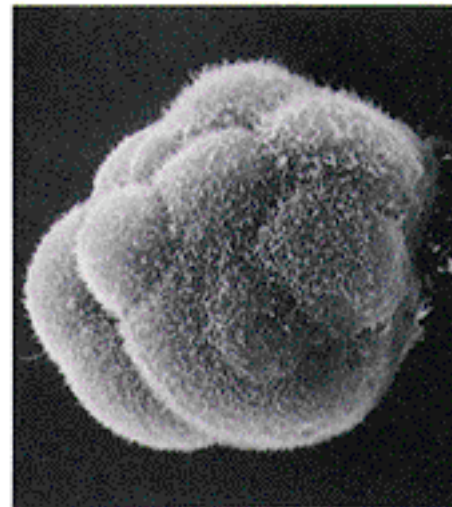
Stadi diversi di maturazione dalla morula



(A)



(B)



(C)



(D)

10 μm

From The Art of MBOC³ © 1995 Garland Publishing, Inc.

alla blastocisti

Ricombinazione omologa e cellule ES

Topi transgenici con iniezione diretta del DNA nella blastocisti possono avere il gene esogeno in un punto qualunque del genoma e non sempre si potrà esprimere come vorremmo, dipende dal sito in cui si inserisce. Potrebbe essere un sito silente oppure che provoca danno ad una funzione del topo, per cui non è vitale. Soprattutto si riesce solo a fare esprimere un gene e non si può interferire con una funzione genetica endogena del topo, caso mai si interferisce col metabolismo. Capecchi ed alcuni altri sono riusciti a coltivare cellule ES embrionali staminali di topo e a trasformarle per cui si poteva ottenere un topo chimerico con efficienza iniettando le cellule già con il DNA integrato, sapendo anche dove è integrato. La cosa più eclatante è stata la possibilità di ottenere cellule ES trasformate con DNA ricombinato in un sito specifico per ricombinazione omologa. Prime prove con gene HPGRT

Vettore per Ricombinazione omologa

I primi esperimenti di ricombinazione omologa furono fatti da Capecchi con il gene per la resistenza HGPRT ipoxantina-guanina fosforibosil Transferasi.

Il problema e' di selezionare le cellule con un fenotipo, ma sono pochi i geni con un fenotipo selettivo, in tale assenza si utilizza la res. per un antibiotico.

Il costrutto per far avvenire la ricombinazione omologa deve avere una regione omologa a quella con cui vogliamo ottenere la ricombinazione:



Di solito si utilizza un costrutto che abbia due regioni di omologia (spalle) rispetto alla regione che si vuole inserire.

La frequenza e' stata studiata ed e' $\sim 1-2 \times 10^{-6}$