

Lezione 29 - 30

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

Organismi Transgenici

- Alterazione del genoma tramite tecniche di manipolazione del DNA
- Metodo diverso rispetto all'induzione di mutazioni
- Le mutazioni indotte avvengono in maniera random
- Prime prove di organismi transgenici :
inserzione di un elemento esogeno nel genoma
- Preparazione di costrutti adatti per essere attivi in
genomi di origine diversa,

Nei genomi eucariotici non esistono unità autonome autoreplicanti come i plasmidi nei batteri. Perché?

Meiosi e mitosi vogliono strutture cromosomiche con centromero

OGM e organismi transgenici

modi di dire e luoghi comuni

confusioni mediatiche

un OGM è anche un batterio che ha subito mutagenesi o in cui abbiamo inserito un plasmide o un vettore di espressione

adesso i giornali chiamano OGM gli organismi vegetali trasformati o “ricombinanti” per un gene esogeno

organismi transgenici e topi trnsg.

le tecniche per ottenere organismi transgenici variano molto da organismo ad organismo

metodologia:

- trasfezione del vettore

- transiente o per integrazione - ricombinazione

- uso di cellule staminali, zigoti, embrioni,

trapianti (drafts)

sono pseudo ricombinanti o pseudo transgenici

non c'è mescolamento di genomi

le piante si innestano comunemente

piante da frutto usano l'innesto da centinaia di anni o più

da quando è stato possibile usare il DNA e clonarlo è uscita la tecnica del DNA ricombinante

il salto dai batteri (metà anni '60) ai mammiferi (topo, anni '80) ha fatto un grande scalpore

esempio dei topi transgenici

non abbiamo tempo per poter vedere le differenti tecniche usate nei vari organismi eucariotici

negli organismi eucariotici non si possono usare plasmidi o regioni autonome di replicazione, solo cromosomi

si deve ottenere un evento di ricombinazione del vettore nel genoma e rendere l'integrazione del DNA eterologo stabile

il vettore deve essere veicolato nell'organismo (trasfezione)

il vettore si deve esprimere se vogliamo un fenotipo

il vettore deve entrare nella linea germinale per avere la linea transgenica: sarà monoclonale?

Topi transgenici per espressione e knock-out

Inserzione random

Ricombinaz. omologa (cellule ES)

Embrioni tetraploidi

Costrutti con BAC

Mutanti condizionali

Espressione inducibile

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

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' $\sim 1-2 \times 10^{-6}$

quando il knock out non dà il fenotipo

può dipendere da molti fattori:

- non c'è un effetto in eterozigosi
- oppure il knock out del gene è dominante letale
- il fenotipo non si manifesta in quello stadio o è difficile da determinare, potrebbe influenzare una funzione supplita da un'altra
- può essere utile provare ad ottenere l'omozigote

l'omozigote come va prodotto

in assenza di un fenotipo chiaro si può ricorrere al topo in omozigosi,

non si può sperare di avere un secondo evento ricombinativo identico,

si può solo accoppiare due transgenici della stessa linea transgenica ottenuta dalla / dallo stesso topo fondatore

gameti 50% con l'allele transgenico
gli omozigoti transgenici saranno il 25%

caso opposto: non si vede fenotipo perchè muoiono tutti i transgenici (cioè eterozigoti)

perchè muoiono: il knock out del gene è dominante letale,
c'è rimedio?

il DNA è sempre lo stesso per tutti

un sistema di ricombinazione preso dal batteriofago P1

creare un mutante condizionale

un mutante che è w.t. finché non si induce mutazione *in vivo*

la ricombinasi che induce una delezione sito specifica si attiva
nel momento voluto, evitando l'effetto letale della mutazione
nella fase dello sviluppo critica non permissiva

A cosa serve come si applica

Da un sistema procariotico ad uno eucariotico

Attuare o far avvenire la ricombinazione al momento voluto

Ricombinazione: applicazione più usata per fare delezioni

Si può anche fare inversione, integrazione o scambio

Il metodo deriva dal meccanismo di azione dell'enzima CRE (enzima che crea ricombinazione)

Come avviene la ricombinazione, è l'enzima che è specifico e che riconosce la sequenza lox su cui interviene

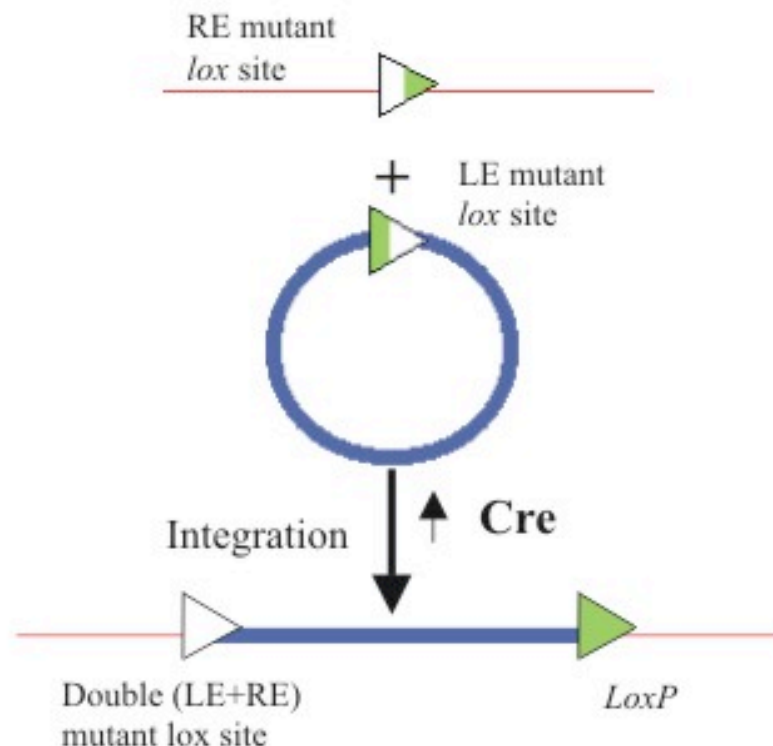
Ricombinazione tramite siti specifici Lox P

A. Sequences of LE and RE *lox* sites.

LE Mutant: TACCGTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT
RE Mutant: ATA ACTTCGTATA GCATACAT TATACGAA CGGTA

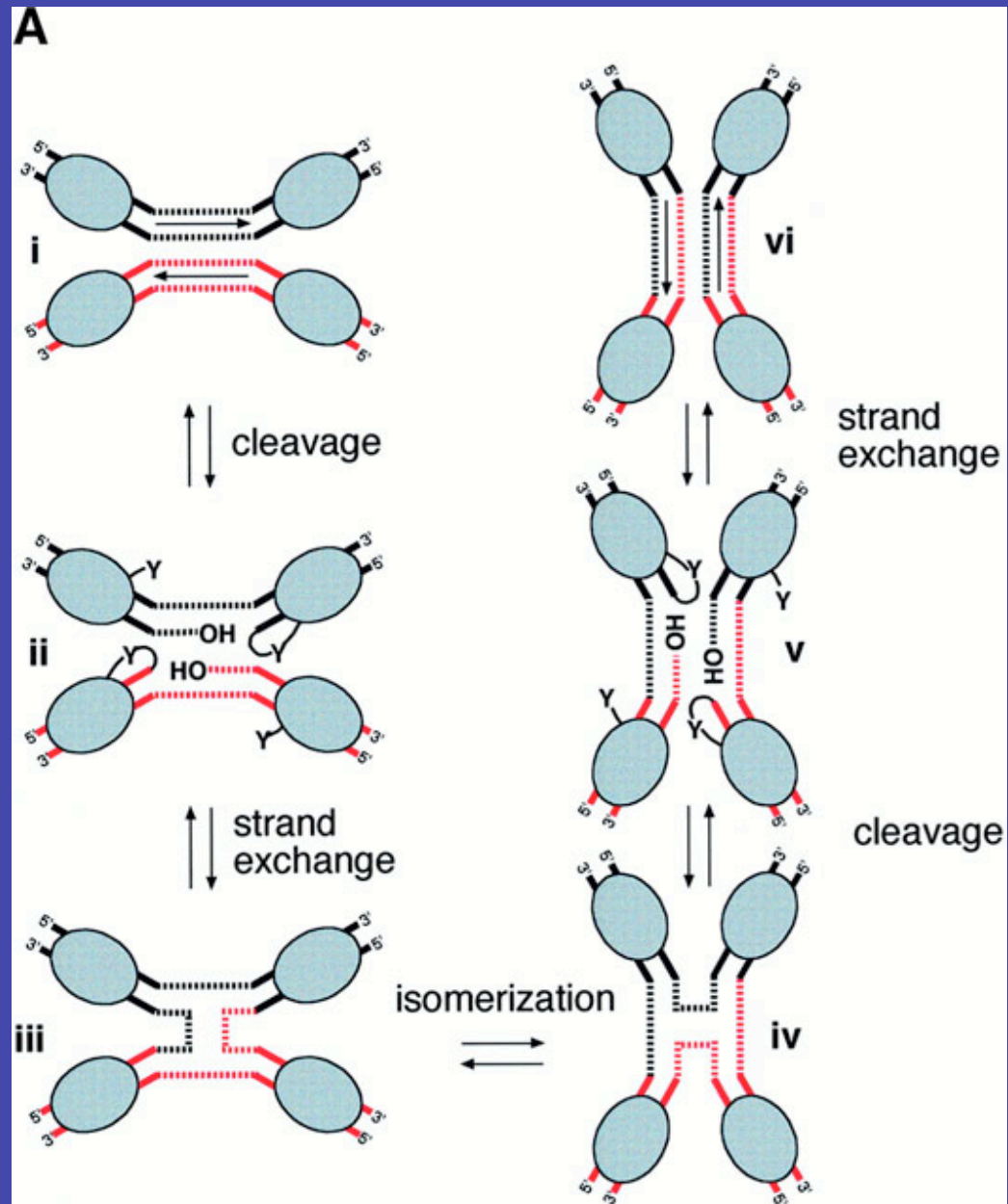
8 bp core

B. *De novo* Lox site generation in DNA recombination.



dimostra come funziona la ricombinazione tra due siti che dopo l'evento di ricombinazione ricostituiscono i due siti (in basso)

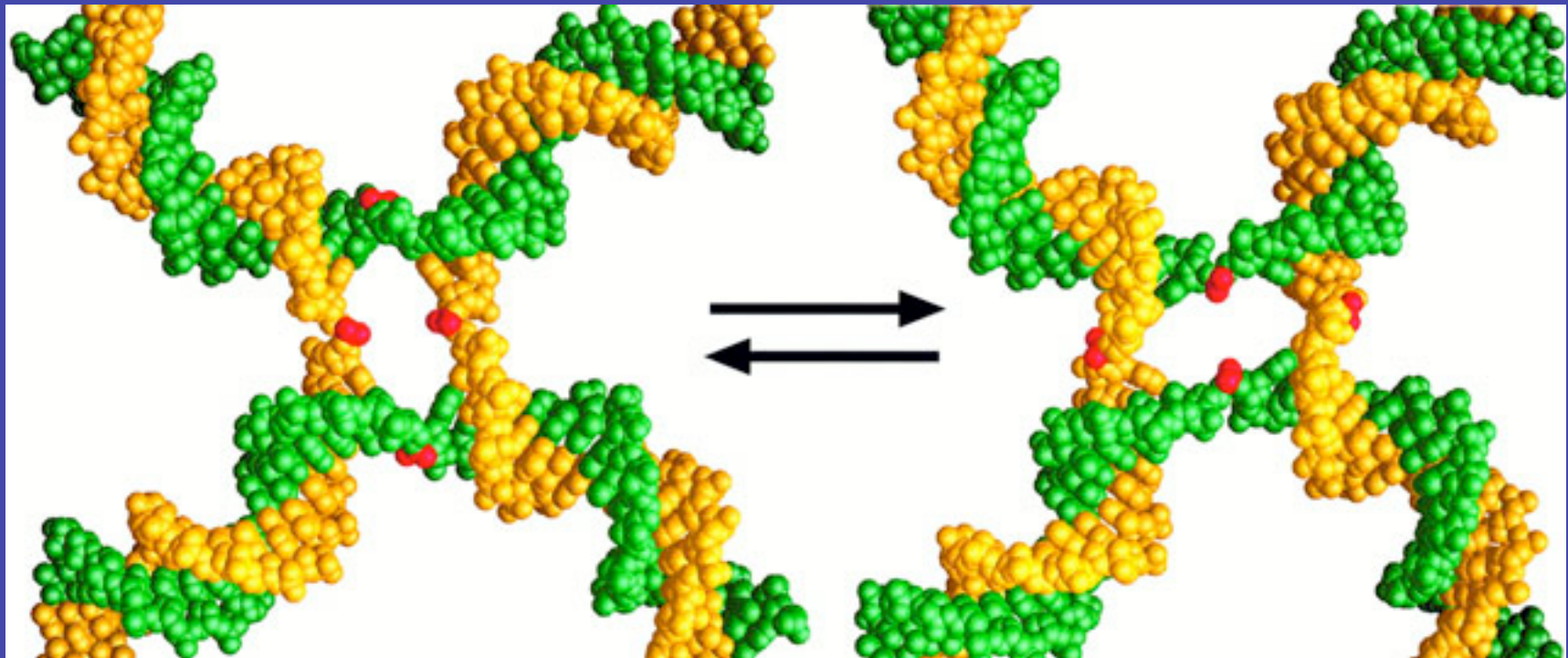
Cre-lox sito specifica



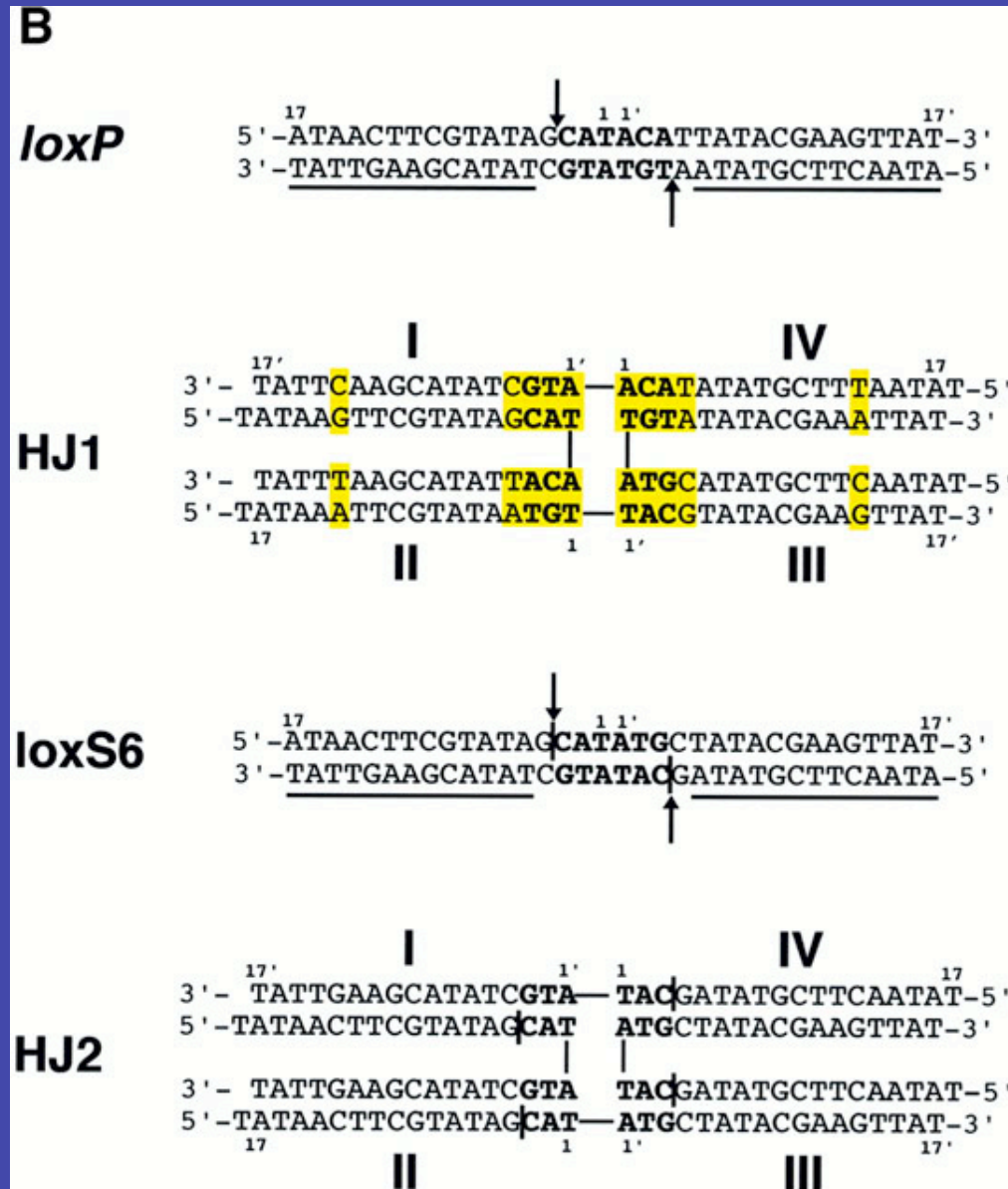
Modello di taglio e
giunzione dei due
filamenti di DNA di un
sito lox P

Swapping model

Modello di scambio



Modello di ricombinazione



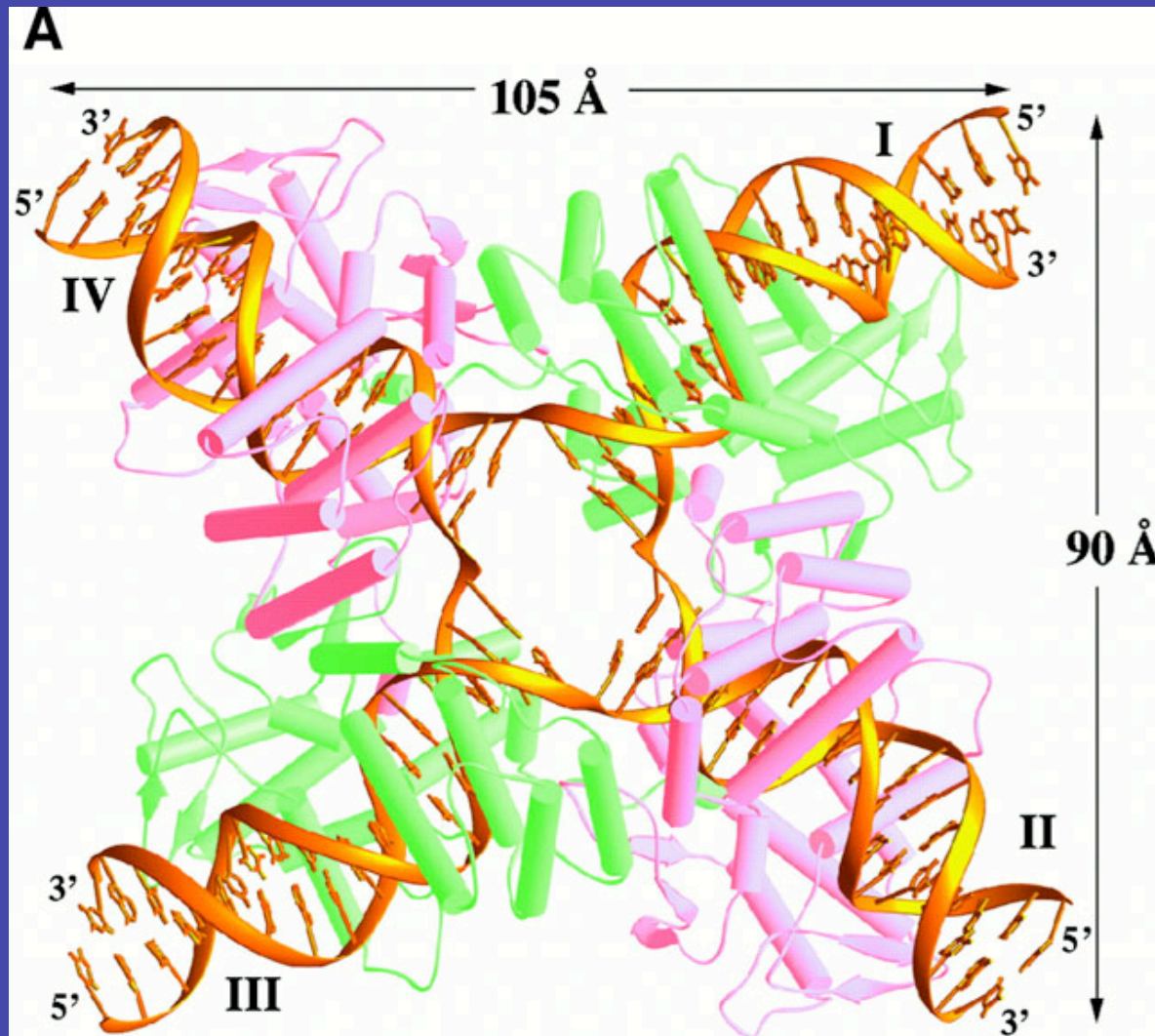
Intermedio cruciforme

isomerizzazione

intermedi

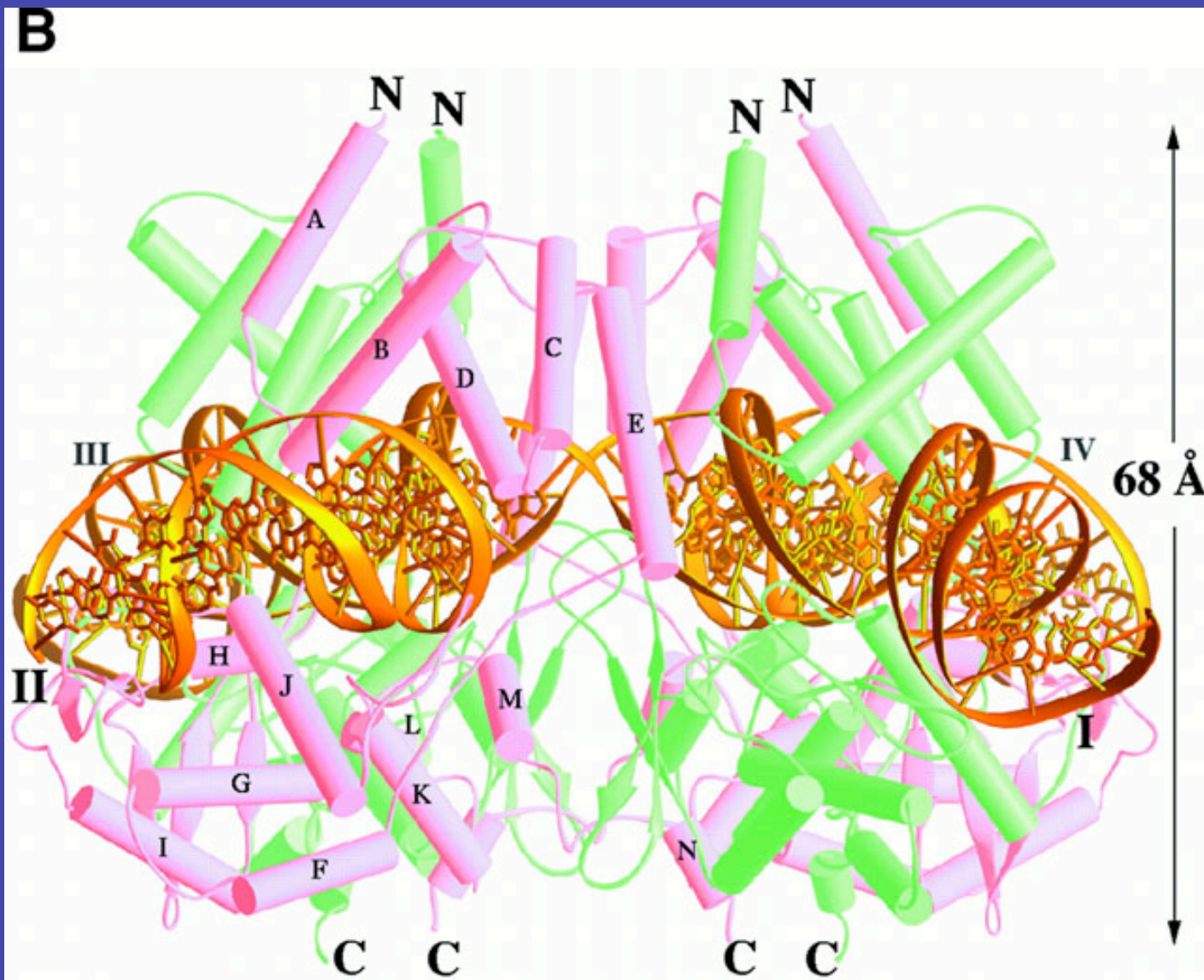
(A) Schematic drawing of the Cre—loxP site-specific recombination pathway, based on the strand-swapping model (Nunes-Düby et al., 1995) and on Cre—loxP structural models (Guo et al., 1997; this work). Conserved tyrosine residues from two of the four recombinases in a synaptic tetramer cleave the DNA backbones of the recombining segments to form transient 3'-phosphotyrosine linkages. The released 5'-hydroxyl ends of the cleaved DNA undergo intermolecular nucleophilic attack of the partner phosphotyrosine linkages to complete the exchange of one pair of strands and form a Holliday intermediate. A second round of cleavages and strand exchanges using the remaining two recombinase subunits and the complementary DNA strands gives recombinant products. (B) Sequences of loxP and loxS6 DNA duplexes used to design the HJs HJ1 and HJ2. HJ1 and HJ2 are shown in the same orientation as in Figure 3. For HJ1, the strand-bridging arms I and II contain the wild-type loxP sequence and the strand-bridging arms III and IV contain the loxP complementary sequence. Bases that are not related by twofold symmetry and prevent branch migration are highlighted in yellow. Vertical lines indicate missing phosphates in the DNA backbone. The 13 bp inverted repeat binding sites for Cre recombinase are underlined and the 6 bp crossover region between cleavage sites are in bold. For both the Cre—HJ1 and Cre—HJ2 complexes, an additional 5'-overhanging thymidine residue was found to facilitate crystallization.

Modello cre-lox

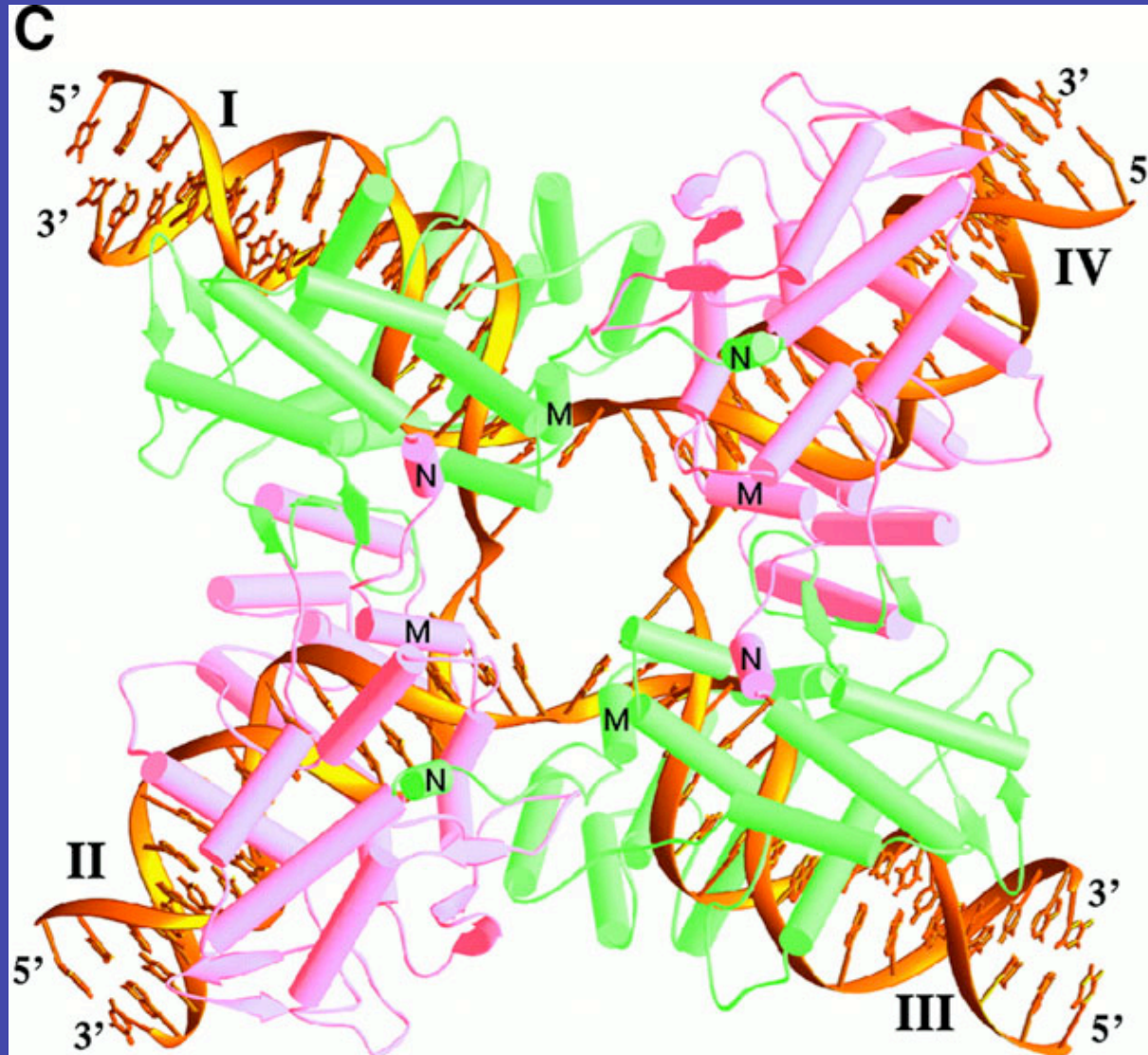


Struttura cruciforme
di Holliday

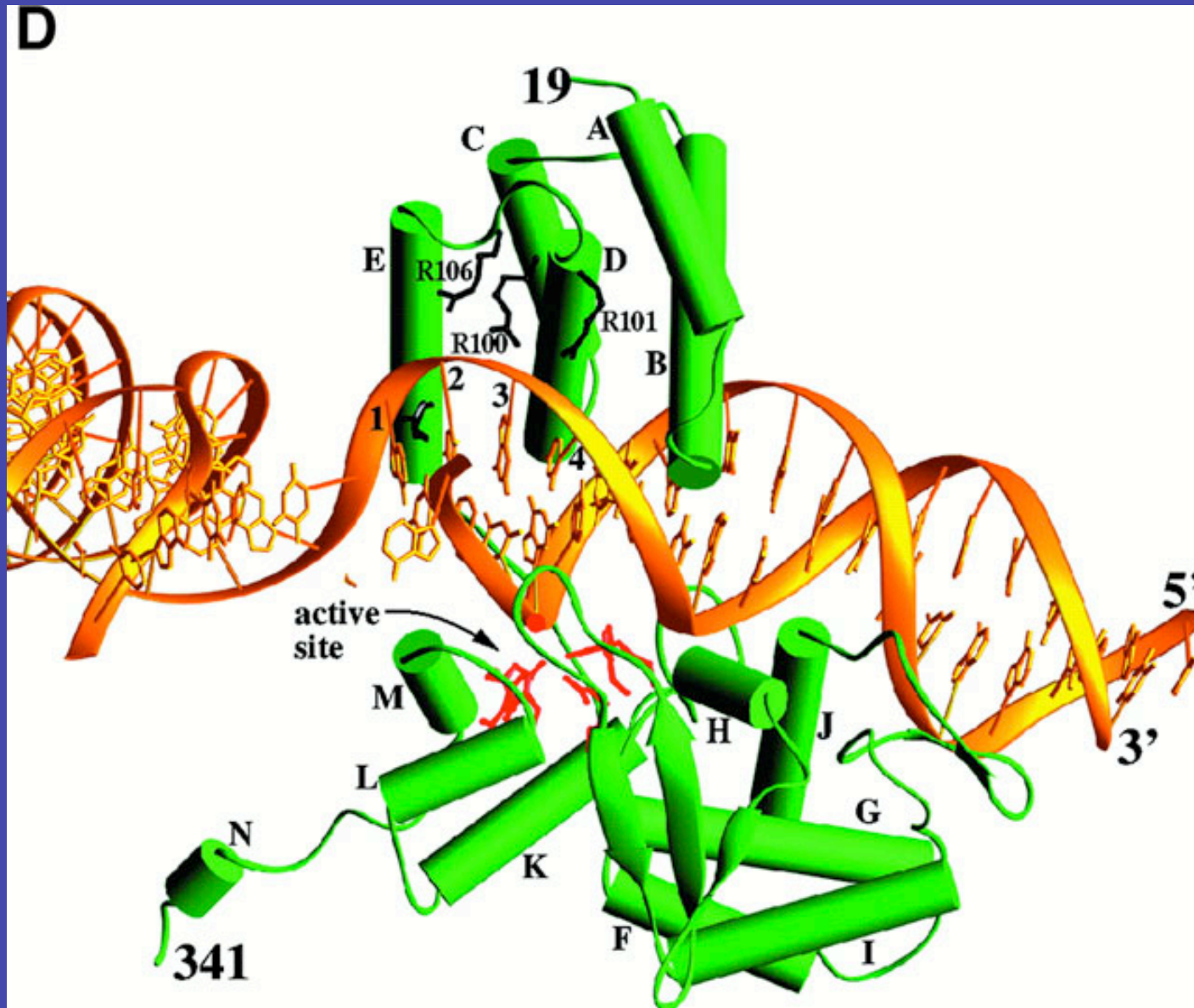
ricombinase



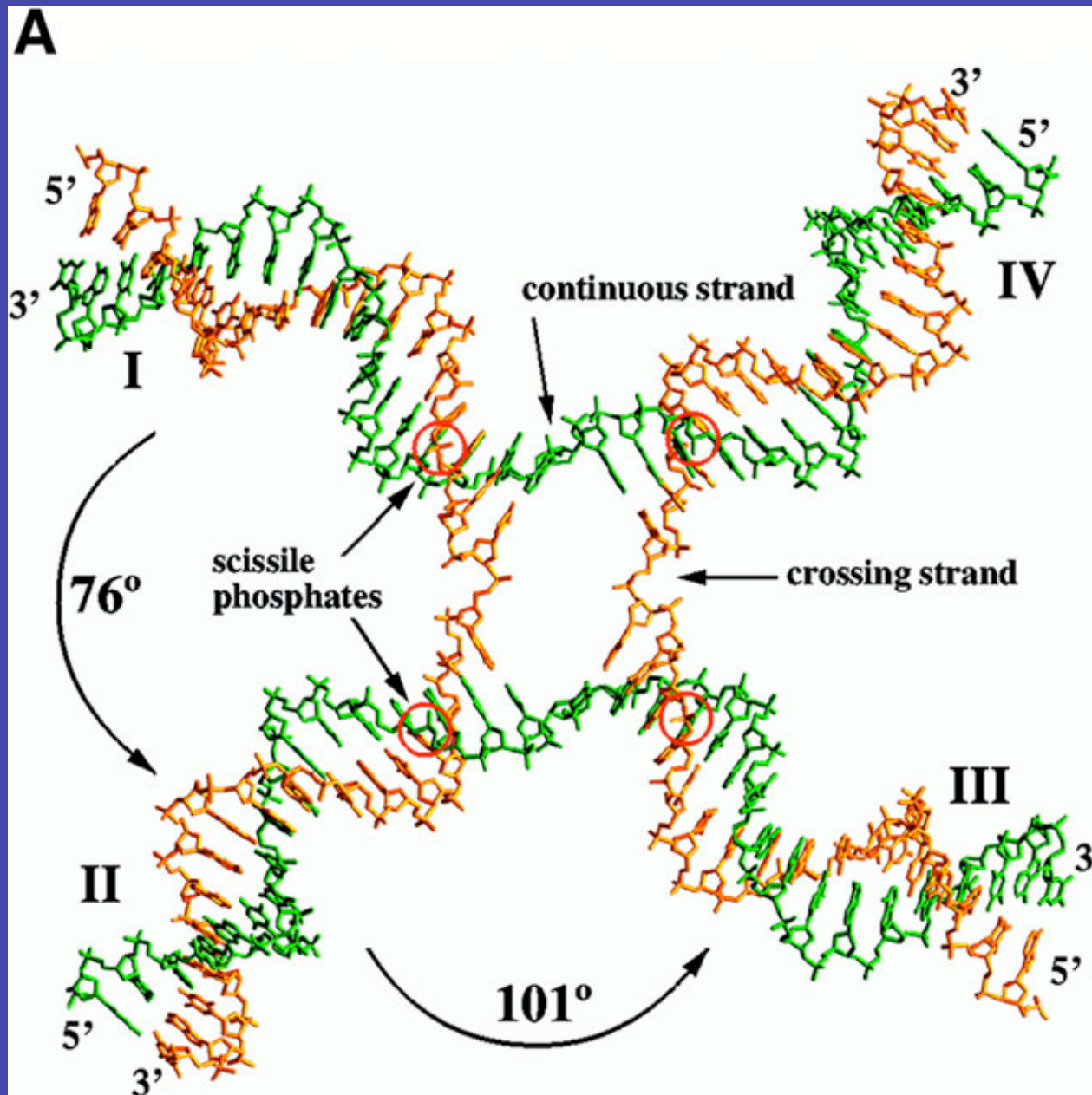
Attività Cre



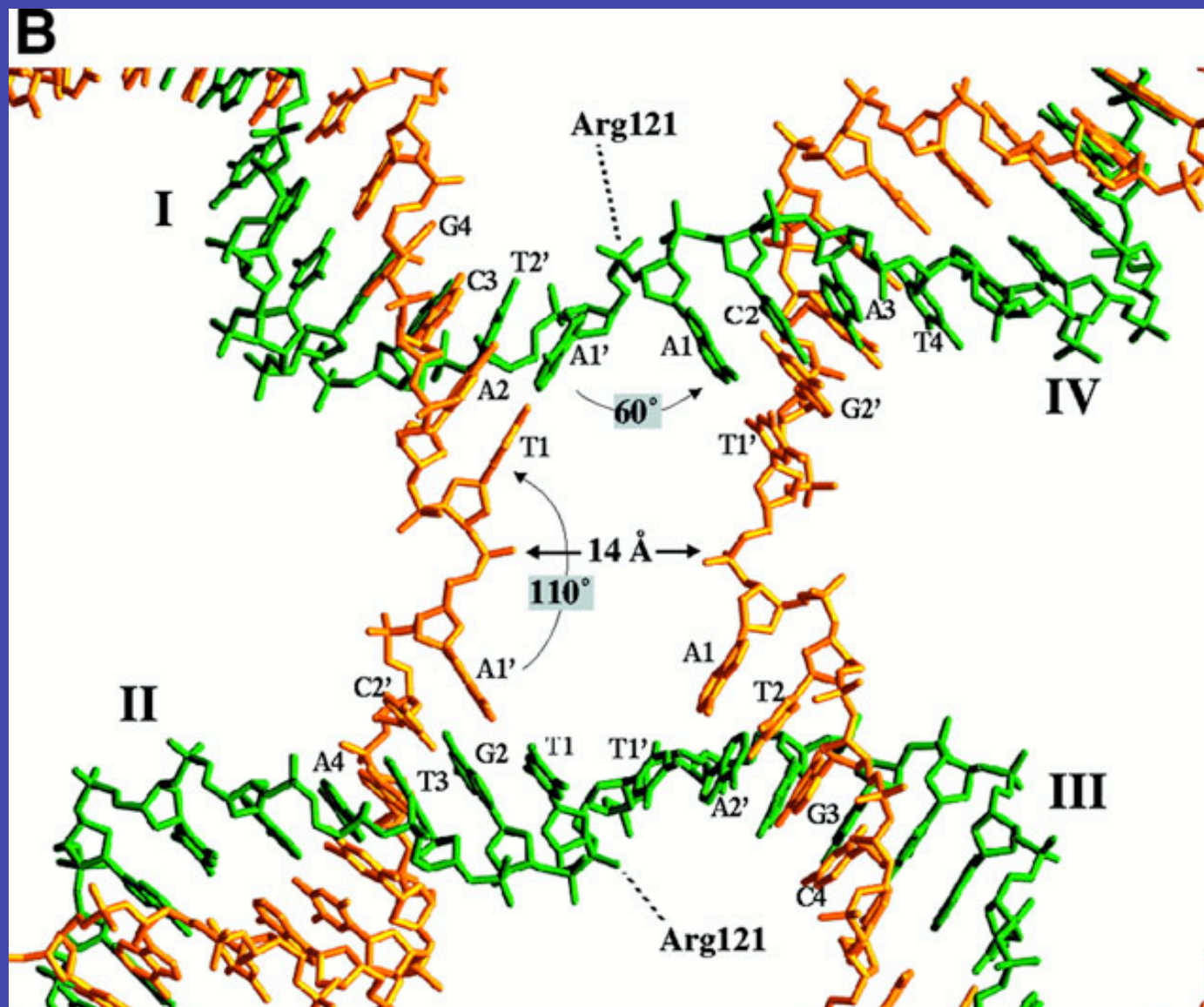
Lox taglio e riunione



Modello cruciforme

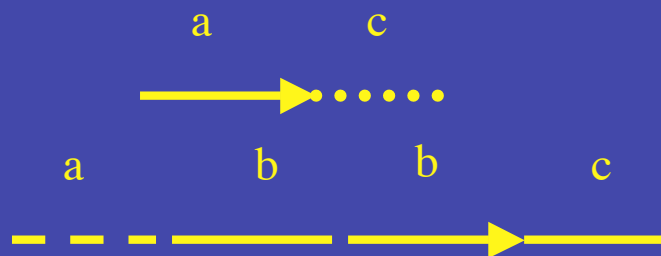
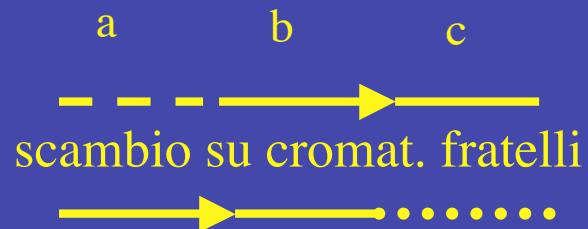
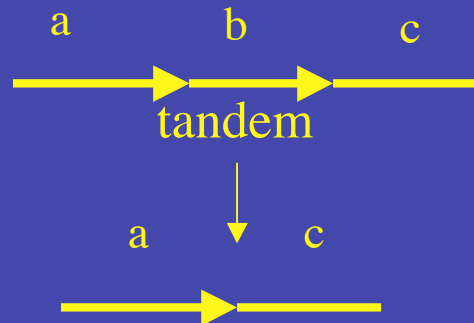


Modello interazione CRE



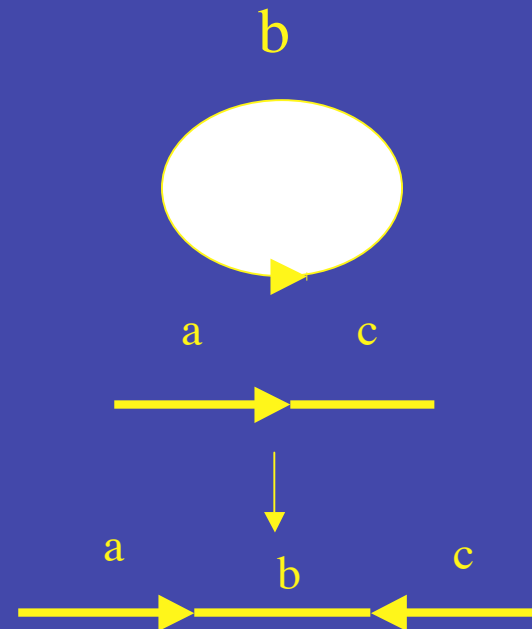
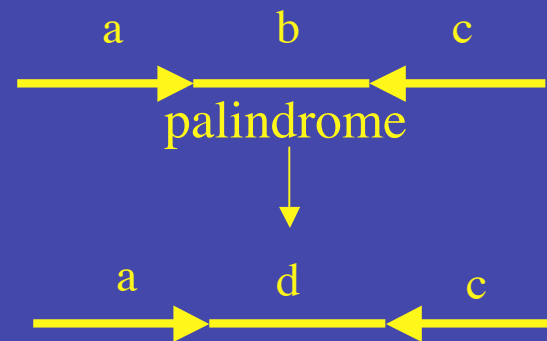
Ricombinazione tramite Cre Lox

intramolecular deletion



intramolecular deletion / duplication

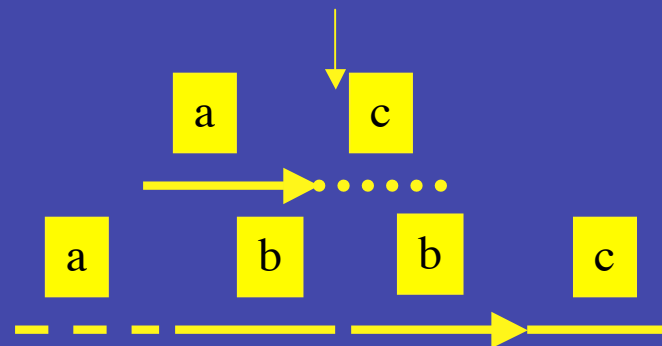
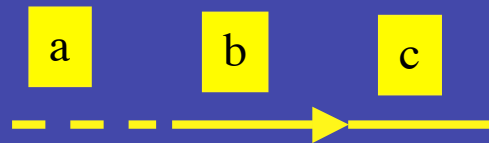
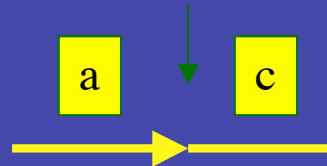
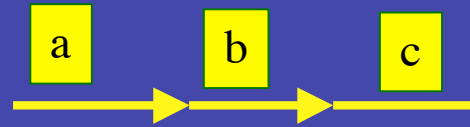
inversion



integration

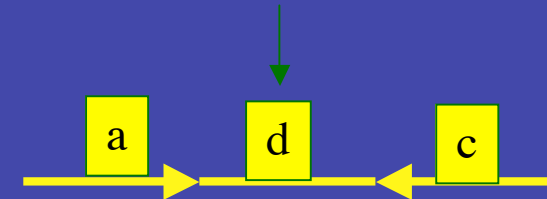
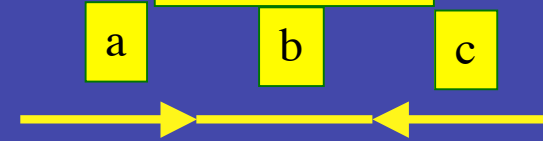
Come
funziona
Cre-Lox

intramolecular deletion



intramolecular deletion / duplication

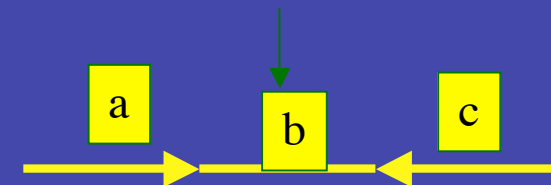
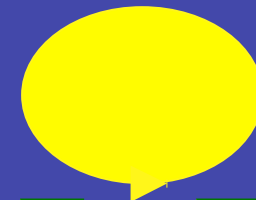
inversion



Lox site



b



integration

Mutanti condizionali

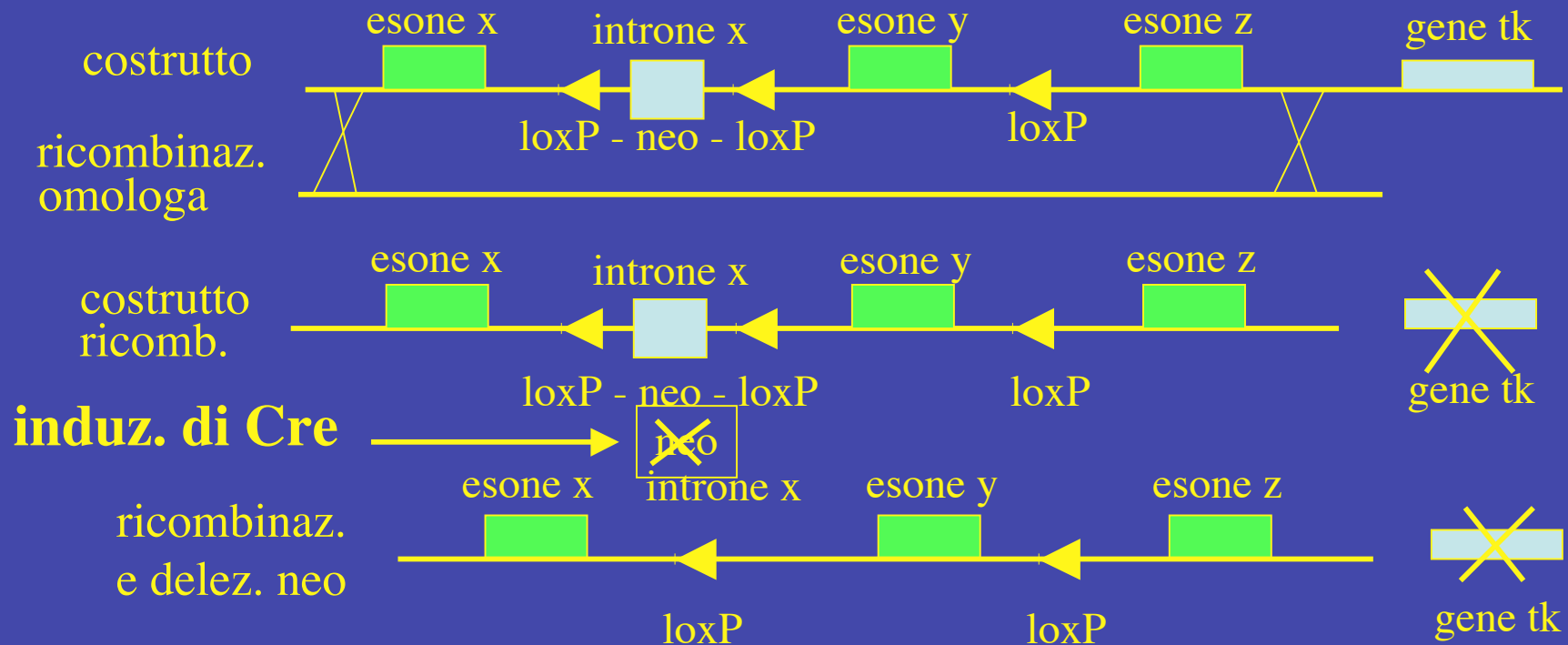
Il sistema cre-lox

Sfruttando il sistema di ricombinazione del fago P1 con i siti Lox e la ricombinasi Cre, si possono ottenere dei mutanti che perdono la regione voluta solo attivando la ricombinasi Cre. Si devono costruire dei vettori con siti Lox (di solito in due introni diversi) all'esterno del gene da eliminare, oppure della regione da eliminare. Si chiamano floxed gli esoni o le regioni da excidere.

Si rende attivo per interference un vettore con tandem che diventa plindrome per inversione Cre-Lox.

Con questa strategia si possono ottenere cellule o topi transgenici per geni che sono letali in fasi diverse e soprattutto con l'espressione della ricombinasi Cre tessuto specifica, si può far avvenire il knock-out del gene solo in particolari tessuti dove si esprime o dove si induce Cre.

Il costrutto per il gene floxed



Il gene per la timidino kinasi del virus Herpes simplex rende le cellule sensibili al Ganciclovir

Nel caso di ricombinazione non omologa il gene tk non verrebbe eliminato e le cellule potranno essere eliminate con la selezione dell'antibiotico

Dopo l'eliminazione della resistenza alla neomicina per l'induzione del gene Cre le cellule ES mutanti sono pronte per essere iniettate nelle blasocisti (si possono usare cellule con doppia resistenza)

Topi transgenici mutanti condizionali

Il limite principale dei topi transgenici knock-out per un gene e' la possibile mortalita' degli omozigoti durante lo sviluppo.

- una soluzione per questo problema potrebbe essere l'induzione della mutazione tempo e tessuto specifica
- e' stato applicato il sistema di ricombinazione fagica (fago P1) Cre-Lox utilizzato anche in biologia cellulare perche' inducibile
- Cre e' la ricombinasi (causa ricombinazione) e LoxP (locus di crossover in P1), serve per mantenere una sola copia del genoma, evita i multimeri
- i siti Lox sono costituiti da palindromo di 13 bp ed una regione centrale di 8bp
- la ricombinasi fa avvenire lo scambio di filamento tra due strutture Lox allineate originando delezione se sono in tandem, inversione se sono in palindromo, duplicazione se sono su cromatidi fratelli e integrazione se c'e' un elemento in un plasmide ed un altro nella sequenza dove si integra (vedi fig. 1)

Applicazioni del metodo Cre-Lox

- Questa tecnologia e' applicata alle cellule staminali di topo ES.
 - L'inserzione dei siti LoxP si deve far avvenire tramite gene-targeting con un costrutto specifico (i costrutti con i geni con le regioni fiancheggianti che contengono siti LoxP si chiamano "floxed")
 - quando si esprime il gene Cre avviene la ricombinazione e se si esprime solo in un tessuto la mutazione diventa tessuto specifica e si puo' seguire il destino delle cellule che lo vanno a formare, per esempio nelle cellule pancreatiche quelle che formeranno le cell. α e β
 - l'espressione del gene Cre non sempre e' omogenea nel tessuto e la ricombinazione avviene a mosaico non nel 100% delle cellule
 - come controllo si usano due geni reporter, per cui se si ha ricombinazione il primo fiancheggiato da due siti Lox (lacZ) si inattiva e si attiva il secondo gene reporter (di solito la GFP o la fosfatasi alcalina)
- L'introduzione delle cassette per la resistenza ed i siti LoxP si fa avvenire per ricombinazione omologa

Condizioni di funzionamento

Il gene per la ricombinasi Cre deve essere indotto e deve esprimersi al momento giusto e nel posto giusto

Ci sono linee di topi transgenici che esprimono Cre nelle cellule epatiche, oppure nel sistema nervoso centrale SNC o altri sistemi

Sono state fatte proteine di fusione con il dominio mutato di legame al ligando (ligand binding domain LBD) dell'ormone degli estrogeni, in modo che la ricombinasi sia confinata nel citoplasma finché non viene somministrato l'ormone sintetico che riconosce il recettore e fa traslocare la proteina di fusione con la ricombinasi nel nucleo dove induce la delezione del frammento incluso tra i due siti LoxP (vedi esempio della figura precedente)

Geni pleiotropici

- Definire una funzione di un gene membro di una famiglia puo' essere ancora piu' complicato quando la famiglia e' coinvolta in un sistema pleiotropico di un pathway di segnali come i recettori per l'acido retinoico o FGF.
- Altri effetti confondenti il knock-out di un gene possono essere il rischio di danno sulla fertilita' e disordini sistemici.

In tutti questi casi sara' problematico determinare la funzione di un gene in una frazione di cellule ad un certo momento della vita del topo.

- inoltre nel caso di modelli animali di patologie umane con mutazioni somatiche come il cancro
- Quindi la necessita' di avere un metodo con l'inattivazione condizionale di un gene e' molto forte

Sono state sviluppate strategie per avere gene-targeting

CRE-LOX ed RNA interference condizionale

Metodi per interferire con l'espressione di un gene: “stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells” P.N.A.S. vol.99 n.3 pp 1443-8 P.J.Paddison et al.

- mutagenesi, mutazioni termo sensibili(condizionali), soppressori
- knock out per ricombinazione
- anticorpi contro la proteina (prodotti da un vettore)
- RNA antisenso trascritto da un vettore
- oligo antisenso

Questi metodi hanno il difetto di non essere sempre applicabili ai sistemi eucarioti; in certi casi non sono regolabili. L'RNA antisenso per funzionare deve essere aggiunto in dosi massicce, oppure deve essere trascritto dentro la cellula, ma il funzionamento della interferenza e' legata al sistema Dicer, cioe' ad un pathway enzimatico che riduce l'RNA specifico del messaggero in frammenti.

E' stato fatto un esperimento sfruttando il metodo CRE Lox per produrre un RNA a doppio filamento per bloccare l'enzima Dicer stesso

Soppressione stabile dell'espressione genica tramite *RNA interference* in cellule di mammifero

Sistema cellulare di difesa antivirale

dsRNA esogeno (~ 500 bp)

dimerizzazione

PKR
(kinasi)

fosforilazione

EIF2 α

Blocco non specifico della traduzione

attiva

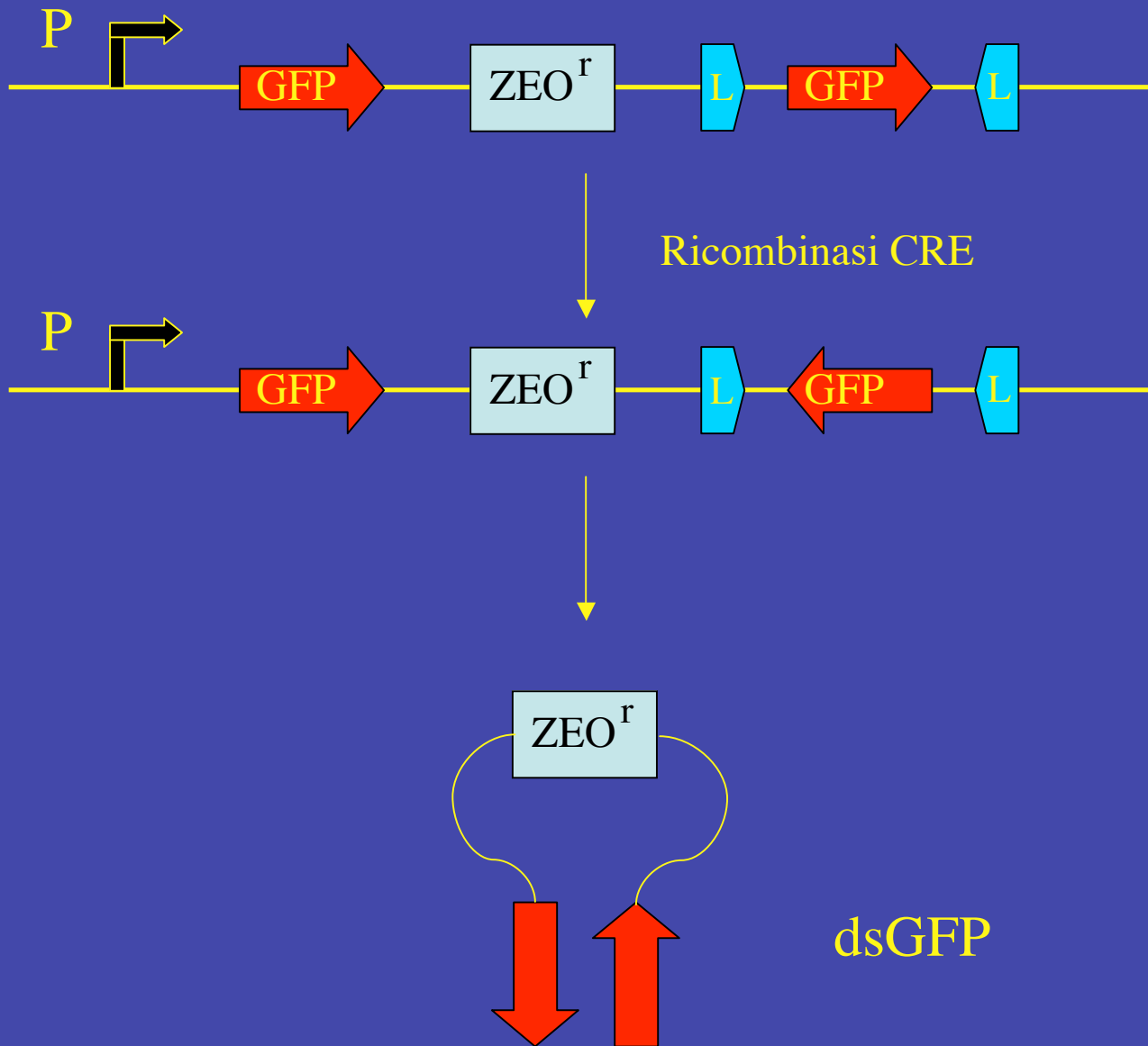
2'-5' oligadenilato polimerasi

Cofattore per la ribonucleasi non - specifica (Rnasi L)

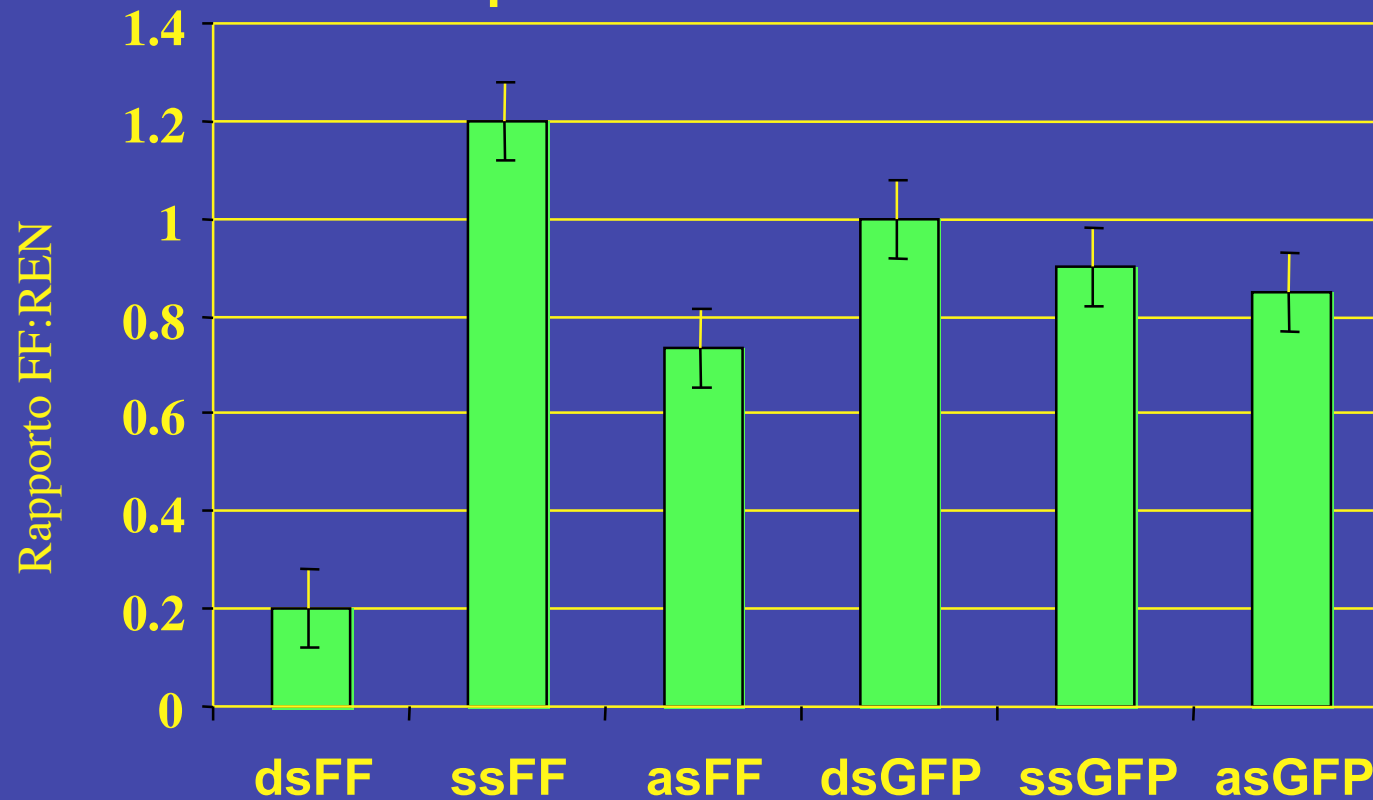
pcDNA3



Modello per interferenze con Cre-Lox



Espressione di CRE



Riduzione di 10 volte dell'espressione di FF in cellule trasfettate con i due plasmidi FF/REN

FF = firefly luciferase
REN = renilla luciferase

ds = double strand
ss = single strand
as = antisense