

Lezione 31 - 32

Martedì 4 Maggio 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

ricombinazione omologa

solo tramite le cellule staminali è possibile avere ricombinanti sito specifico a causa della frequenza di ricombinazione 10^{-6}

con una trasformazione di 5×10^7 cellule si ottengono abbastanza cellule trasformate resistenti alla neomicina

- per diluizione (< 1 cellula per pozzetto) si ottengono i cloni resistenti (isogenici)
- le cellule staminali embrionali avranno un genoma diverso per poter riconoscere i topi chimerici
- quale sarà il genoma di quelli transgenici ?

genoma dei topi transgenici

genoma di topi trnsg. con iniezione diretta del DNA (vettore) nella blastocisti (a quale genoma appartiene ?)

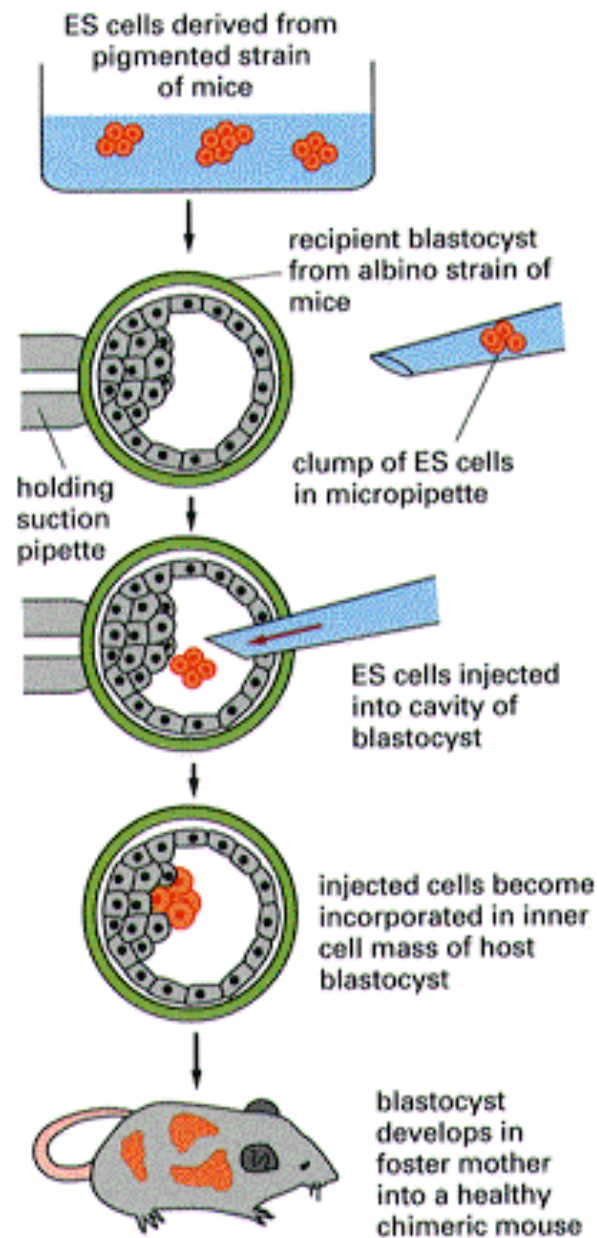
genoma di topi trnsg. ottenuti con iniezione di cellule staminali embrionali ricombinanti (ricomb. omologa) nella blastocisti (a quale genoma appartiene ?)

saranno in eterozigosi o in omozigosi ?

quale è la freq di ricombinaz. omologa ?

e ancora: con iniezione diretta del vettore per ricombinare nelle cellule della blastocisti due volte nello stesso sito quali probabilità ci sono ?

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

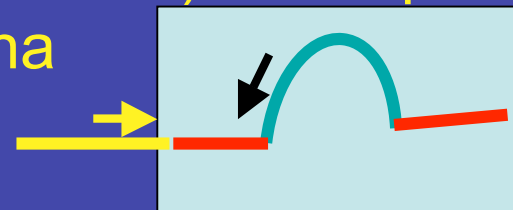


Iniezione con ES
cells o DNA

Controlli per l'integrazione di vettori con ricombinazione omologa

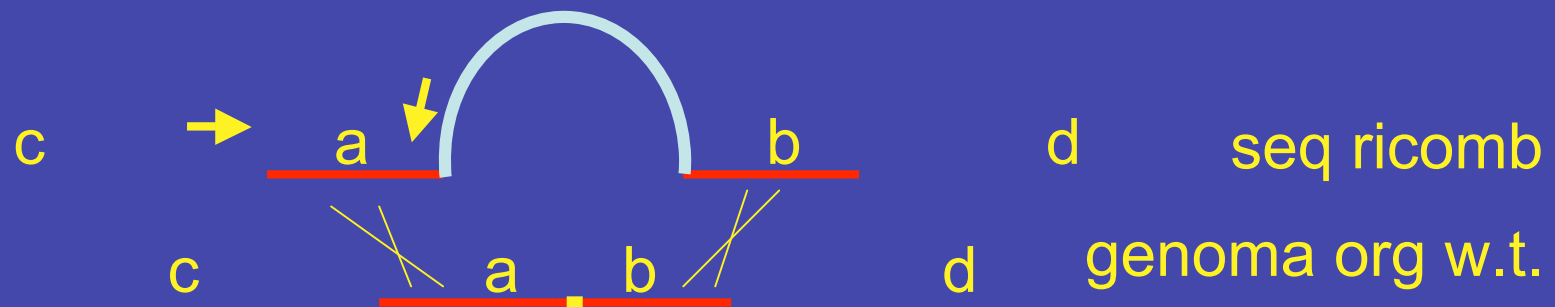
Controlli delle cellule staminali ES con cui si devono ottenere successivamente i topi transgenici.

- trasformazione delle cellule ES con elettroporazione o con metodi trasfettanti (permeabilizzazione di membrana),
- clonaggio aliquotando le cellule e selezione per l'antibiotico.
- espansione delle cellule: i cloni sono isogenici (tutte le cellule di un clone hanno avuto lo stesso evento di ricombinazione).
- Si analizzano i diversi cloni per PCR per vedere se la ricombinazione è avvenuta come desiderata, tramite le spalle del vettore nel sito omologo. Il vettore conterrà un gene per una resistenza, un marcatore reporter di espressione (lac z che può far colorare di azzurro le cellule ricombinanti). Si amplifica per PCR dal vettore ed una regione esterna



PCR di controllo di integrazione

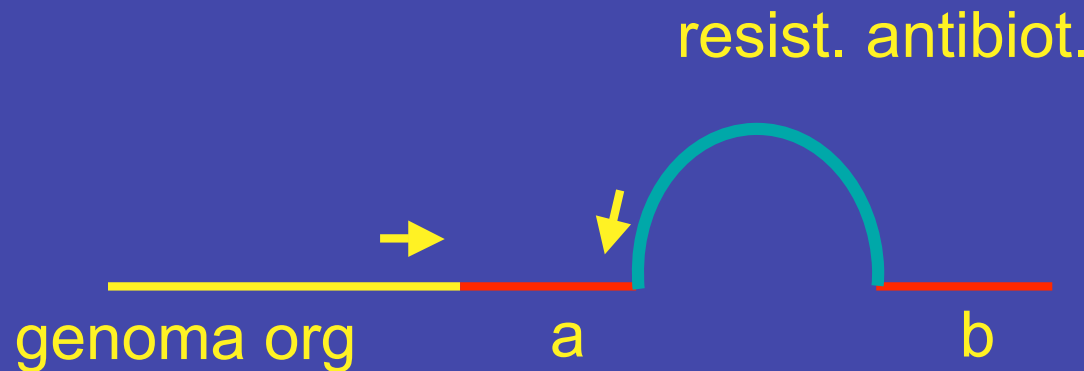
resist. antibiot. + marcatore (lac z)



a e **b** sono le sequenze omologhe al gene con cui si vuole fare avvenire la ricombinazione ed il Knock-Out della funzione,

- per verificare l'integrazione con PCR un primer dovrà essere nella regione esogena e l'altro nella regione genomica limitrofa "c" alla sequenza "a-b" che è stata inserita nel vettore e che è presente nel genoma wt e così permette la ricombinazione omologa

PCR di controllo di integrazione



a e **b** sono le sequenze omologhe al gene con cui si vuole fare avvenire la ricombinazione ed il Knock-Out della funzione,

- per verificare l'integrazione con PCR un primer dovrà essere nella regione esogena e l'altro nella regione genomica limitrofa alla sequenza che è stata inserita nel vettore che è presente in entrambe e così permette la ricombinazione omologa

cercare geni nuovi

provare a fare un vettore che integri all'interno di geni con la speranza di trovare geni nuovi

si parte sempre da cellule ES per poi fare i topi transgenici con le cellule ES che diano dei topi col gene mutato di interesse

ma non si preparano singole trasformazioni

un singolo vettore con cui ottenere una library

con un vettore ad integrazione intronica “olistico”

non si può sapere dove integra

cosa si andrà a guardare per trovare il gene di integrazione?

obbiettivo

ottenere una libray o meglio collezione di cellule ES clonate con il vettore che faccia da marcatore

quindi il vettore deve essere integrato in ogni clone di ES in esoni di geni diversi

per poter ottenere topi transgenici con l'inattivazione di un gene scelto dalla collezione delle cellule ES in cui sono presenti i cloni di ogni gene con una integrazione in eterozigosi

la mutazione non deve essere dominante letale sennò il topo muore, ma la cellula può essere utile per averlo identificato

come si procede

il vettore o i vettori di integrazione ed espressione di geni reporter

per trovare un gene si deve integrare all'interno del gene e dare un prodotto di fusione riconoscibile

vogliamo un messaggero di fusione

quindi dove si deve integrare?

se si integrasse in un esone?

avremmo il knock out ma ci sarebbe il cDNA di fusione e l'espressione del gene reporter? dove finisce la "reading frame" ?

se l'inserzione fosse in introne c'è maggior facilità di espressione del cDNA di fusione e del processamento - maturazione

vettori per analisi olistica

il genoma dei mammiferi:

basso numero di geni (trascritti e tradotti) rispetto alla grandezza dell'intero genoma

A) ricerca di geni nel topo non ancora conosciuti a partire da ricombinanti ES con vettore intelligente

B) ricerca di regioni regolative non ancora conosciute a partire da ricombinanti ES con vettore con reporter

(vettore con gene reporter a promotore debole da essere attivato da una regione enhancer) ancora pochi esperimenti

A analisi olistica per cercare geni

A) analisi chiamata di “trapping” a seconda se si cercano regioni codificanti = “gene trapping”

B) se si cercano regioni regolative = “regulative region trapping”

olistico perchè non si sa a priori cosa andiamo a trovare, il meccanismo di ricerca dipende dal costrutto, si deve preparare un costrutto intelligente che possa rispondere alle possibilità che il ricercatore ha saputo prevedere con la sua creatività e informazione

che vuol dire olistico

L'Olismo (dal greco holon, cioè "tutto") è una posizione filosofica basata sull'idea che le proprietà di un sistema non possano essere spiegate esclusivamente tramite le sue componenti. Relativamente a ciò che può essere chiamato "olistico", per definizione, la sommatoria funzionale delle parti è sempre maggiore/differente della somma delle prestazioni delle parti prese singolarmente. Un tipico esempio di struttura olistica è l'organismo biologico, perché un essere vivente, in quanto tale, va considerato sempre come un'unità-totalità non esprimibile con l'insieme delle parti che lo costituiscono.

Con questo non si nega l'importanza dello studio dei singoli meccanismi, ma il problema della comprensione dei fenomeni prodotti dalle interazioni singole. Piuttosto si dubita della possibilità di capire come nasce la vita dai singoli meccanismi.

Metodo del gene trapping

Per fare topi transgenici su vasta scala generalizzata, senza un solo target

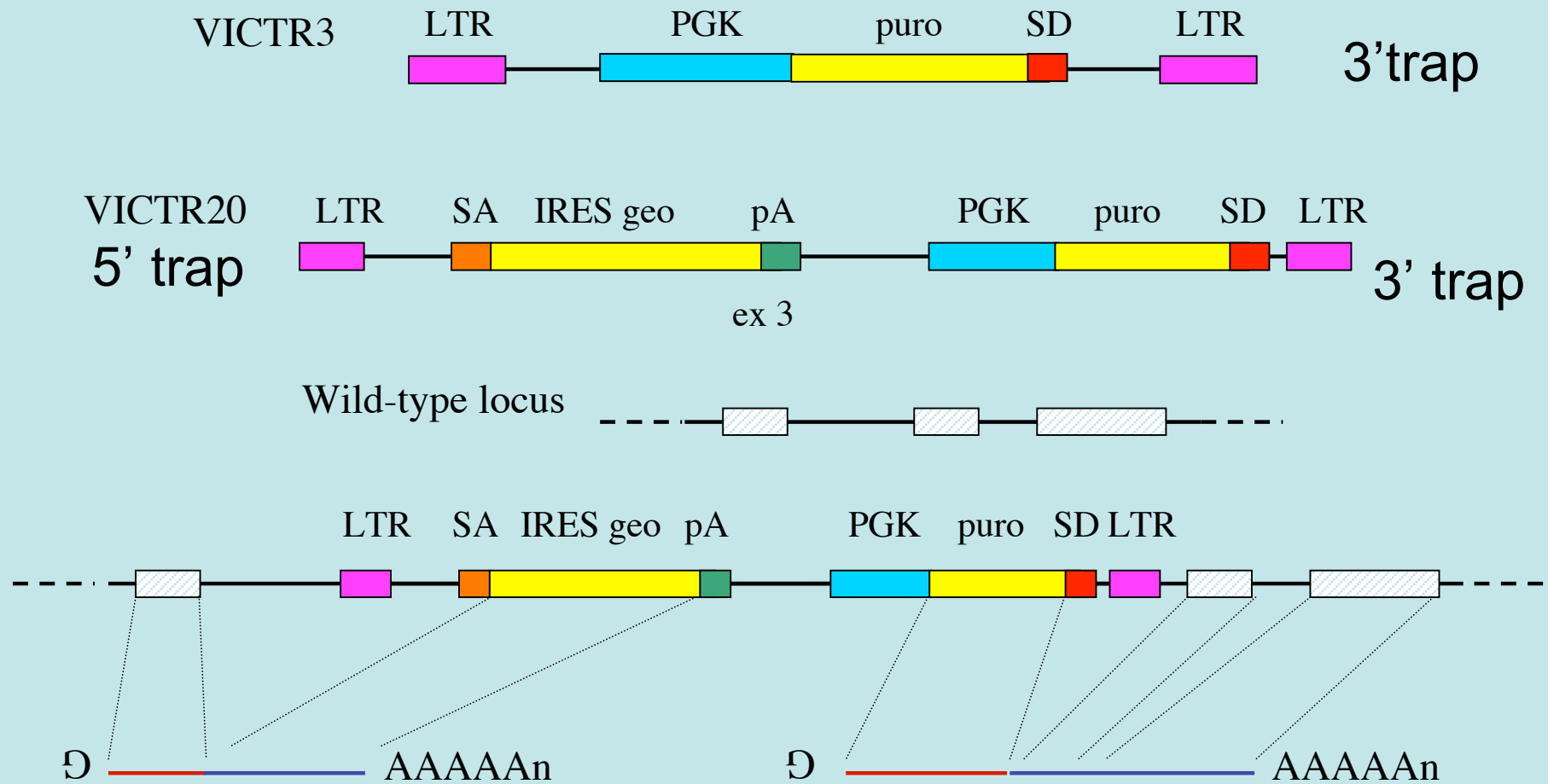
In realtà il topo transgenico “trapped” si ottiene solo dopo aver selezionato la cellula staminale,

-la fase cruciale è lo screening per ottenere la collezione di cloni di cellule staminali ES mutagenizzate nei diversi geni.

- il buon trapping mi deve anche trovare i geni noti che danno la rappresentatività della collezione di cellule ES mutagenizzate (trasfettate col vettore)

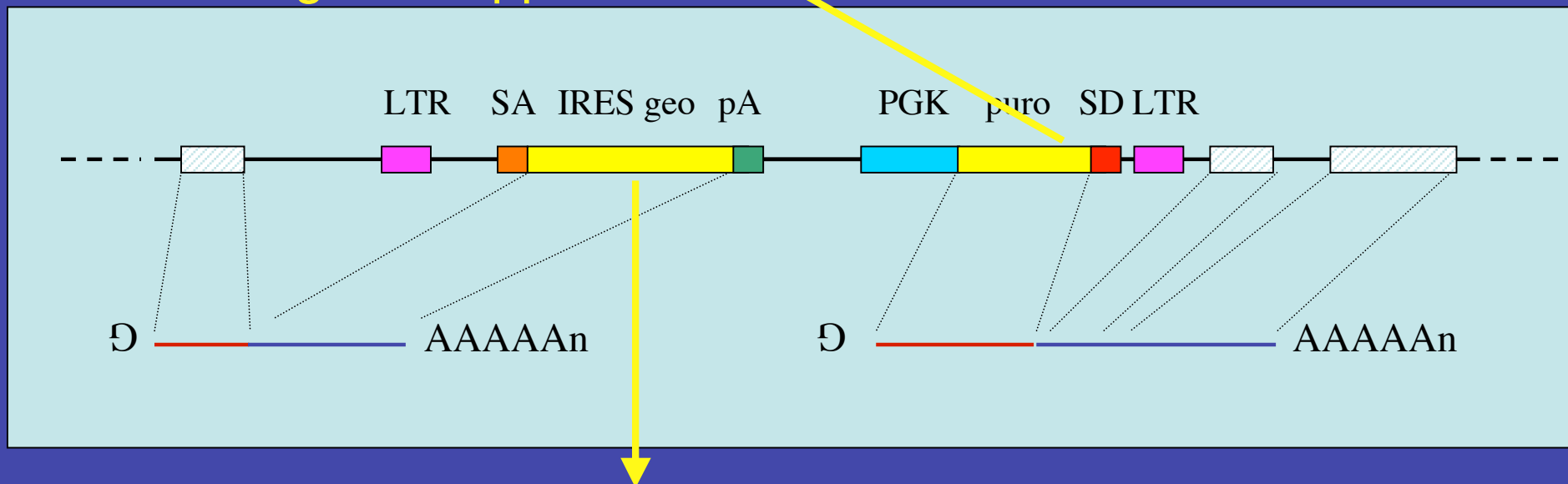
Gene trapping tramite Victr 3 e 20

vettori per il 3' o 5' "trapping" (presenza di LTR virali per l'integrazione nel genoma ospite)



Victr 20 fa trovare la tessuto specificità del promotore

l'espressione della porzione al 3' è dipendente dal
promotore costitutivo del vettore PGK (mRNA puro. fuso con
mRNA del gene trapped)



espressione dipendente dal promotore naturale del gene
pescato o "trapped"

dove si devono integrare i due vettori

dalla struttura si capisce che devono far avvenire uno splicing

quindi dove si devono integrare per dare un mutante utile ?

Costrutti VICTR3 VICTR20

- 2 componenti : - a) acquisizione di sequenza con promotore della PGK (fosfo glicerokinase) di topo attiva nelle cellule ES fuso alla Puromicina N-acetiltransferase senza polyA ma con un sito SD (splice donor)
- b) SA (splice acceptor) fuso ad un marker selettivo e reporter (colorimetrico) con sito polyA (SA β geobpA o SAIRES β geobpA)

Questi costrutti non hanno bisogno di inserirsi in geni attivi per essere marcati (trapped) e la sequenza si individua tramite RACE 3' del cDNA di fusione e ricerca in banca dati del gene.

-Prova di efficienza del vettore PGKpuroSD ricercando il gene della Hgprt = Hprt (ipoxantina-guanina fosforibosiltransferase per ricombinazione omologa nell' introne II. (I geni Hprt e tk timidino-kinasi mutati danno la sensibilita' al terreno HAT hypoxanthine, aminopterin and thymidine e solo Hprt⁺ resistenza alla 6-thioguanina). La sequenza della 3'RACE di colonie Purom. res. hanno confermato l'integrazione nel sito corretto confermando la capacita' mutagenica del costrutto.

Race per gene trapping

gene trapping di VICTR-3/VICTR-20

VICTR-3 è costruito per funzionare con l'integrazione all'interno geni attivi e non attivi.

Per individuare il gene di fusione che si ottiene si deve fare RACE 3' ed eventualmente gene walking al 5' dopo aver individuato la regione.

le cose cambiano con le conoscenze più approfondite sui genomi delle specie (ricerca dei cloni EST in banche genomiche, cloni di solito parziali, di tessuti diversi)

a parte i geni trascritti sono le regioni regolative quelle meno note di cui determinare i meccanismi di funzione

quando alla fine le cellule ES sono pronte

dopo l'analisi della library di cellule staminali si vanno a fare i topi transgenici

vale ancora la pena visto che si conosce l'intero genoma di topo?

non di tutti i ko dei geni si conosce il fenotipo
p.es. quelli pleiotropici o mutanti letali

se non si ha fenotipo per letalità ?

ricaduta

il fatto di identificare i mutanti letali a sua volta può essere utile perchè saranno quelli i geni su cui cercare di fare dei topi mutanti condizionali