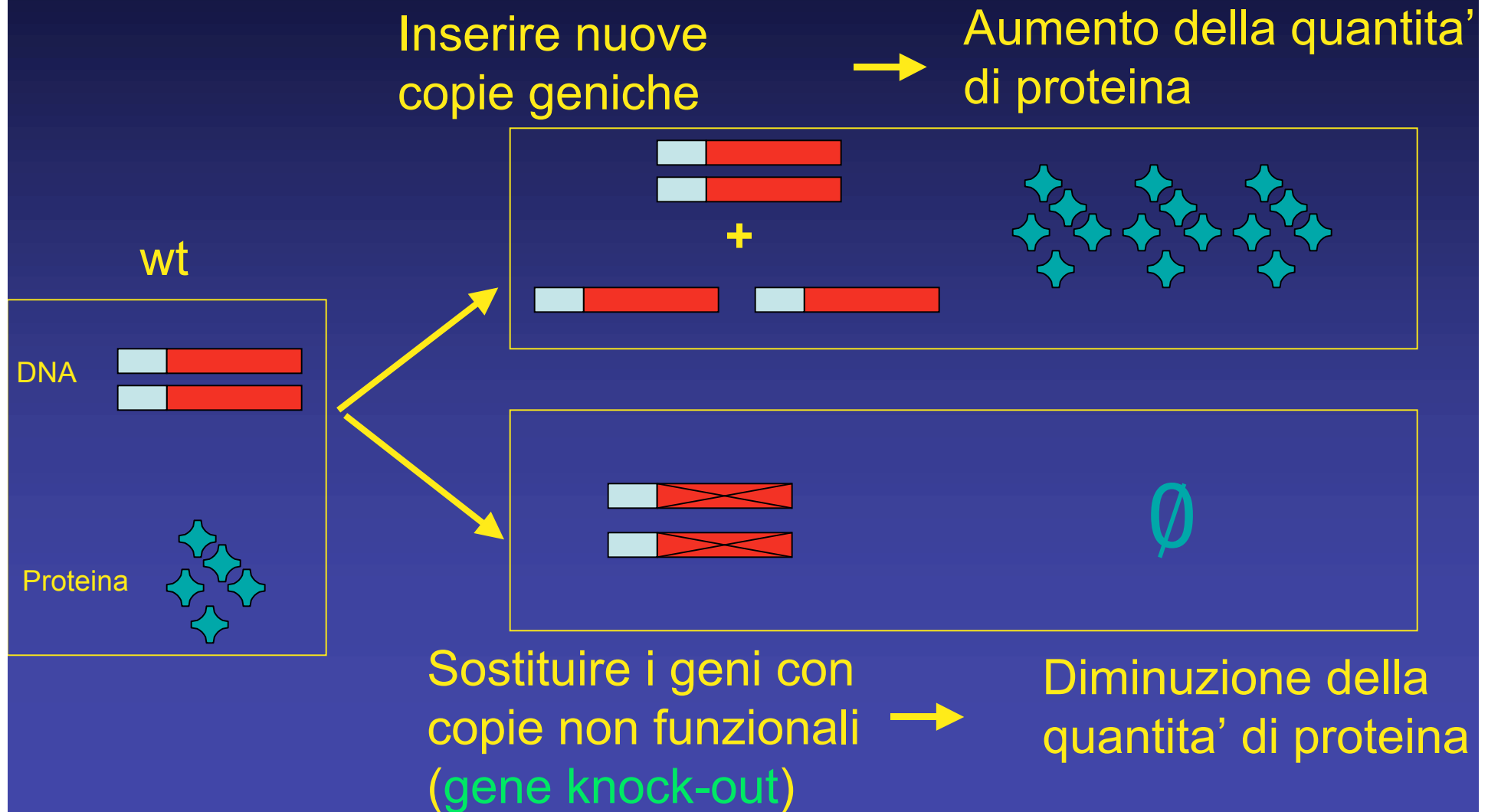


Che significa
animale transgenico
o animale Knock-
out???

ORGANISMI TRANSGENICI

Gli animali che sono stati ingegnerizzati per **inserzione** di un gene, **delezione** di un gene o **sostituzione** di un gene si chiamano **ORGANISMI TRANSGENICI** e qualunque gene estraneo o modificato che è stato aggiunto si chiama *transgene*

Un modo per studiare la funzione di un gene e' la *variazione del dosaggio genico*



Come modificare il genoma di un mammifero in tutte le sue cellule?

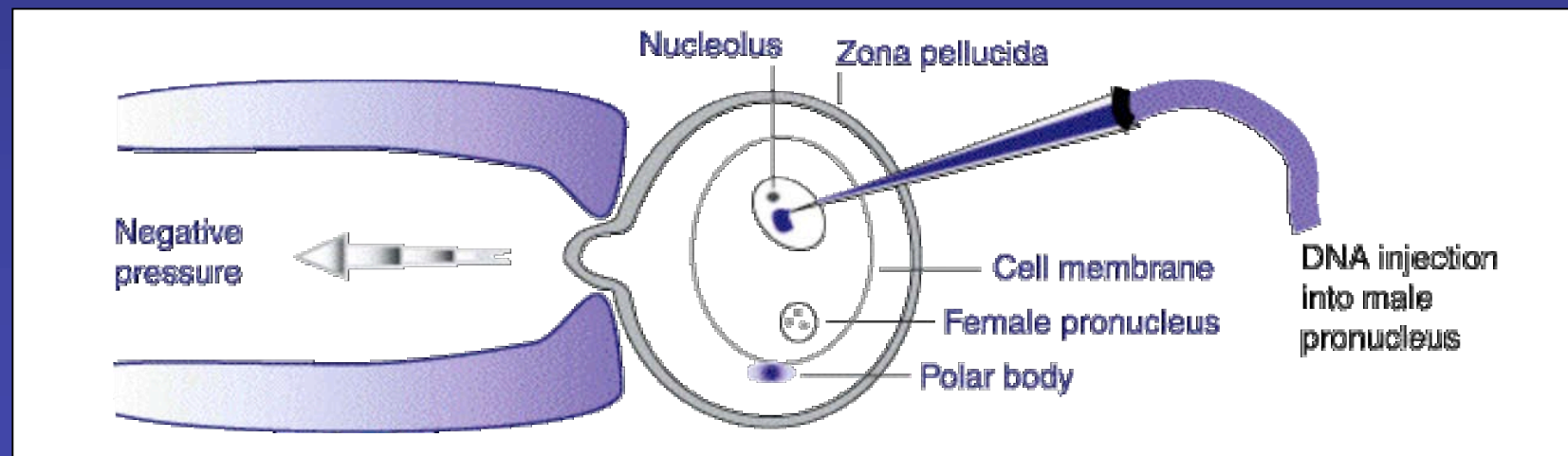
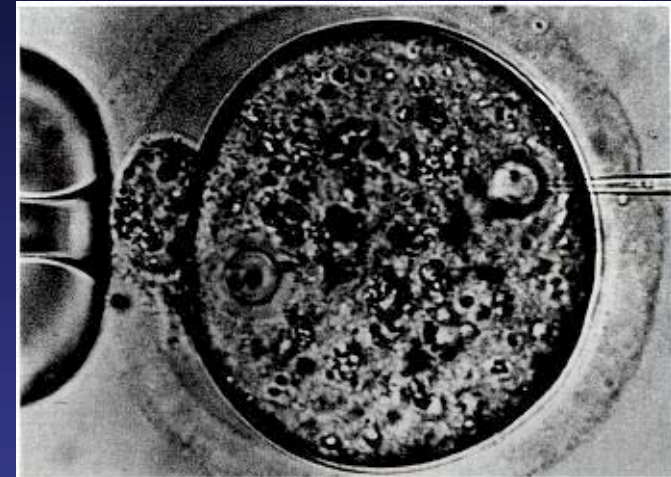
- *Scelta del tipo cellulare da utilizzare*
- *Metodi di inserzione del DNA nelle cellule*
- *Sito di inserzione del DNA nelle cellule*

Utilizzo di zigoti appena fecondati

Metodo di inserzione del
DNA: microiniezione

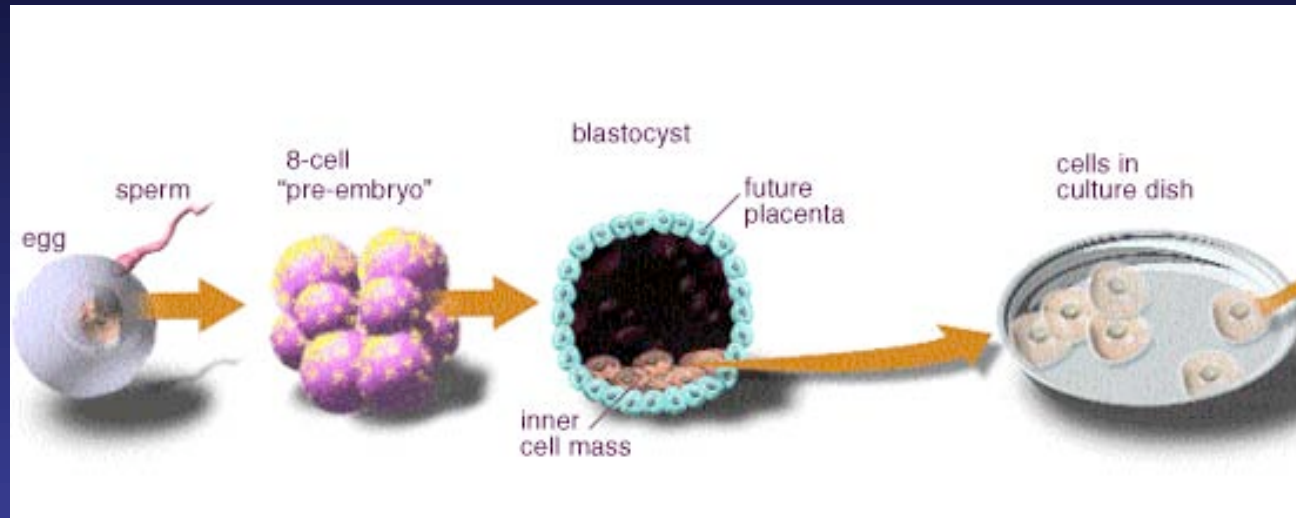


Tutte le cellule
dell'organismo hanno un
genoma modificato

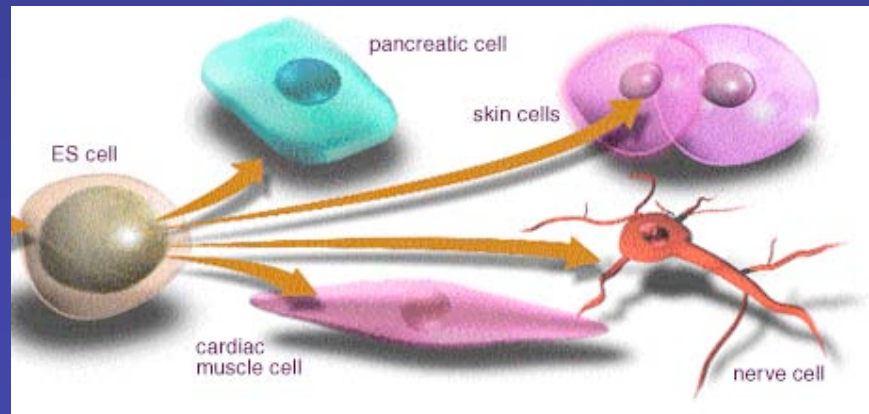


Alternativamente, si possono utilizzare le cellule staminali embrionali (Embryonic Stem cells; ES cells)

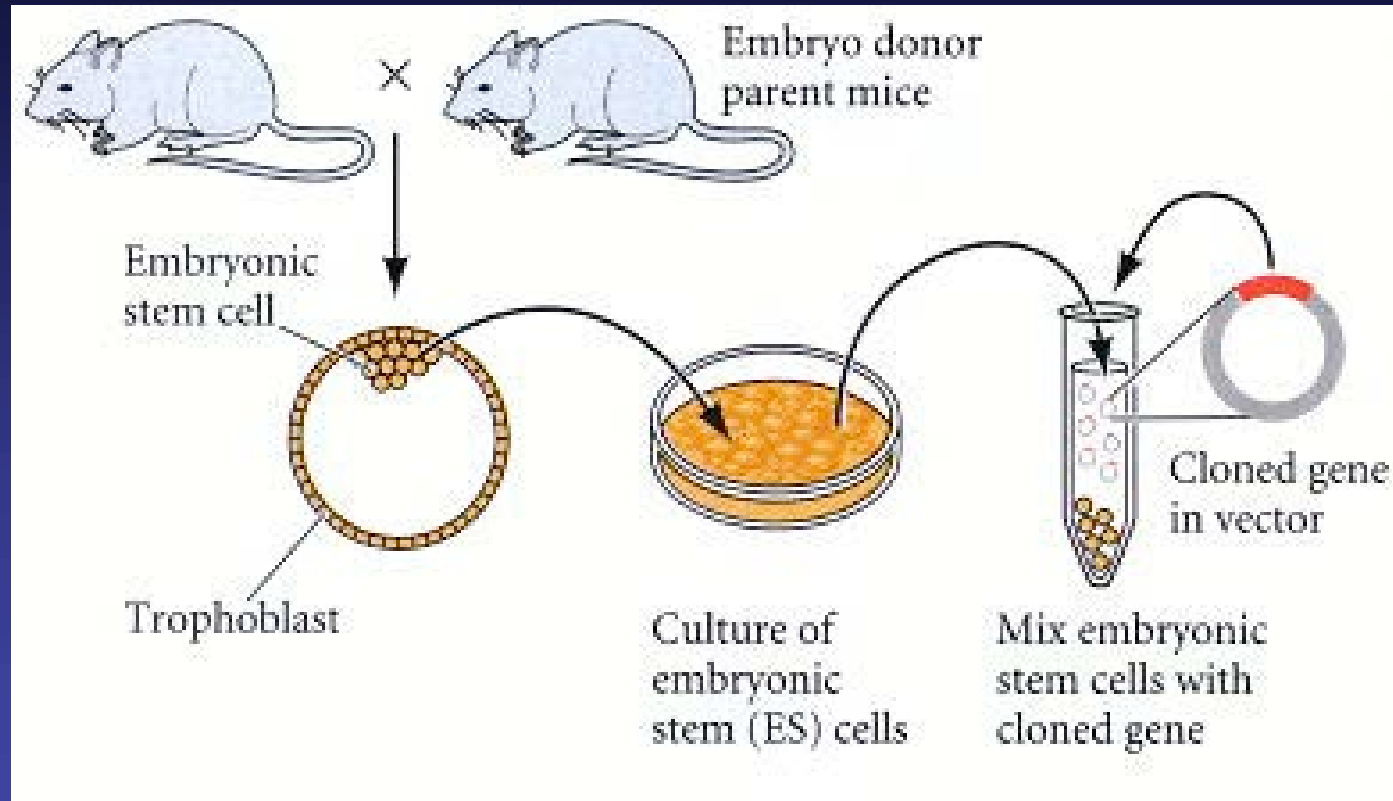
Le ES cells sono la parte della blastocisti di mammifero che darà luogo all'embrione



Le ES cells sono pluripotenti ovvero possono dare origine a tutti gli istotipi dell'organismo



Le ES cells possono essere modificate (per esempio inserendo DNA nel loro genoma) pur rimanendo pluripotenti

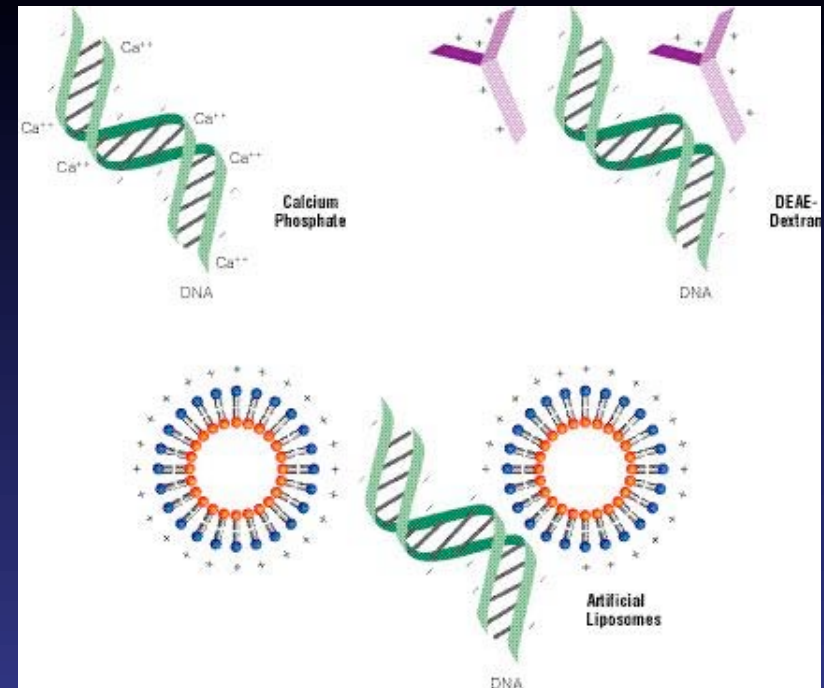


-Trasfezione

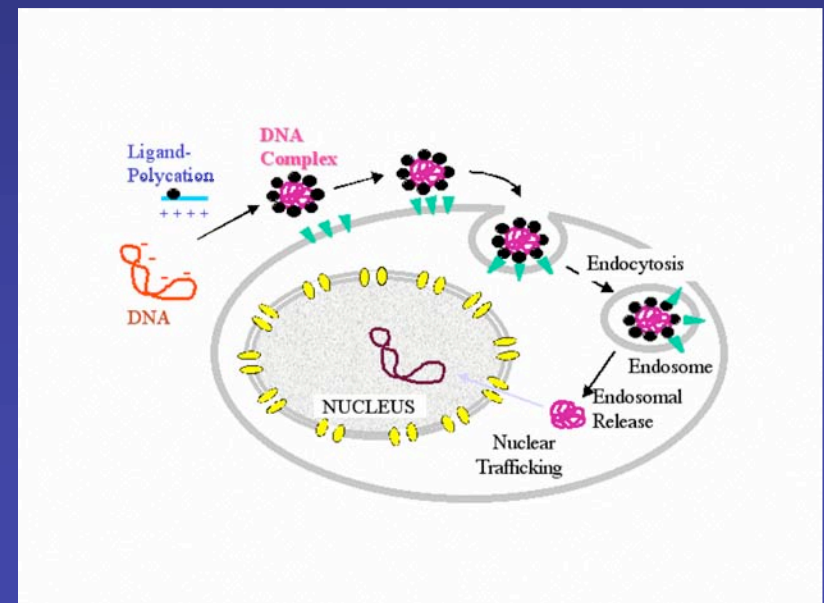
-Elettroporazione

La trasfezione

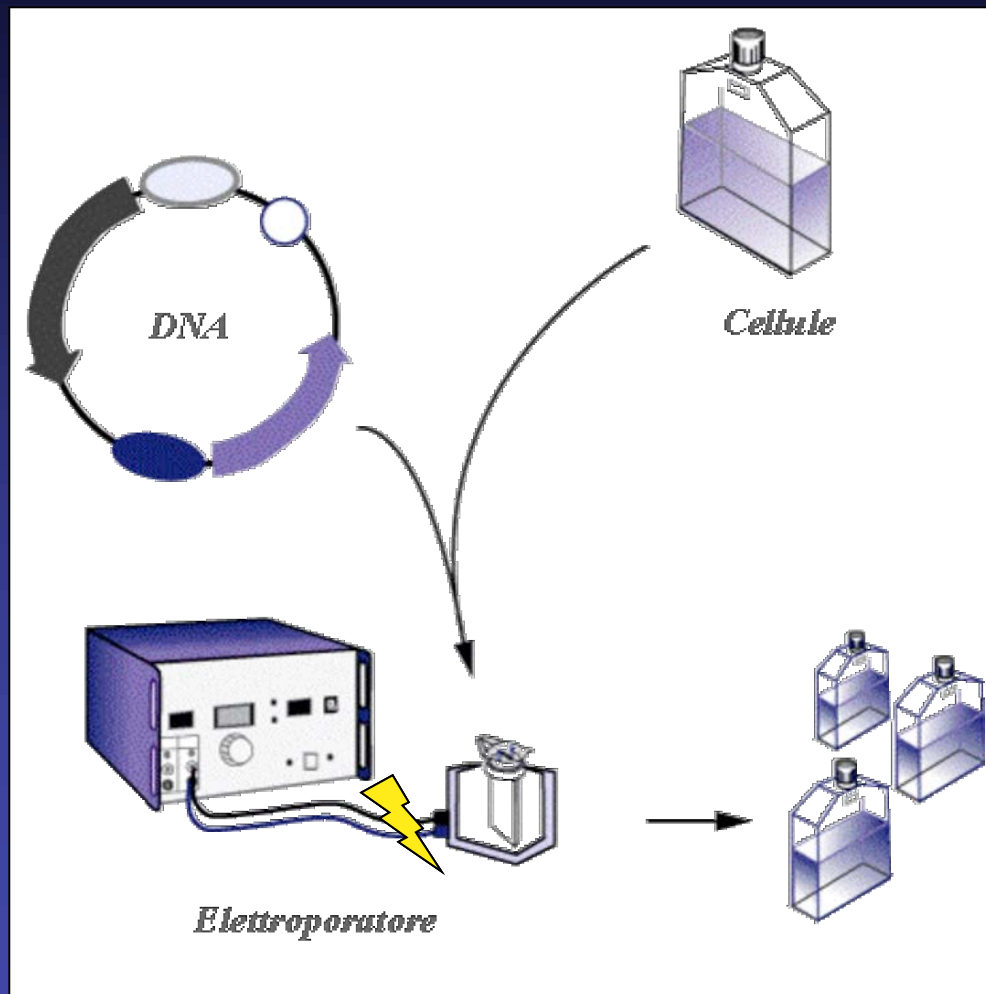
Diversi tipi di sostanze chimiche sono in grado di legarsi al DNA e ne mediano l'ingresso nella cellula



Il DNA entra nella cellula mediante sostanze chimiche che alterano la permeabilit  della membrana



L'elettroporazione



Il DNA entra nella cellula
mediante una scarica
elettrica controllata
che altera la permeabilità
della membrana

*Ricapitolando:
Che cellule posso usare e come le modifico?*

*Se uso gli zigoti appena
fertilizzati*



*Microinietto il DNA nel
pronucleo maschile*

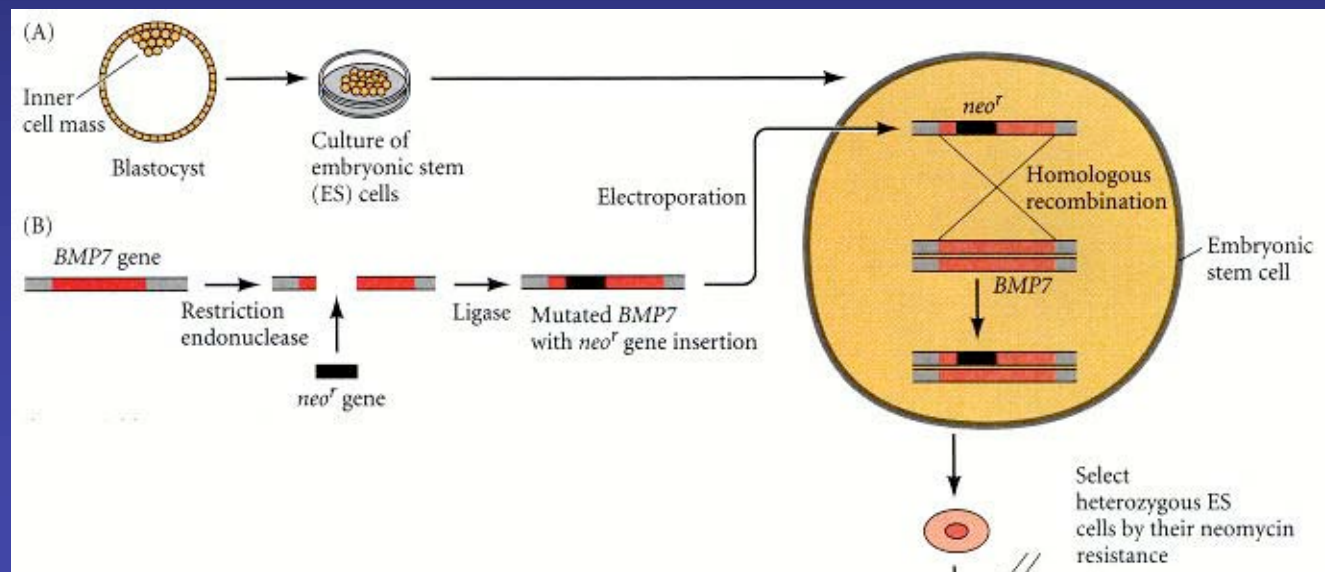
*Se uso le ES cells totipotenti
(prelevate allo stadio di
blastocisti)*



*Trasferisco il DNA
Per trasfezione o
elettroporazione*

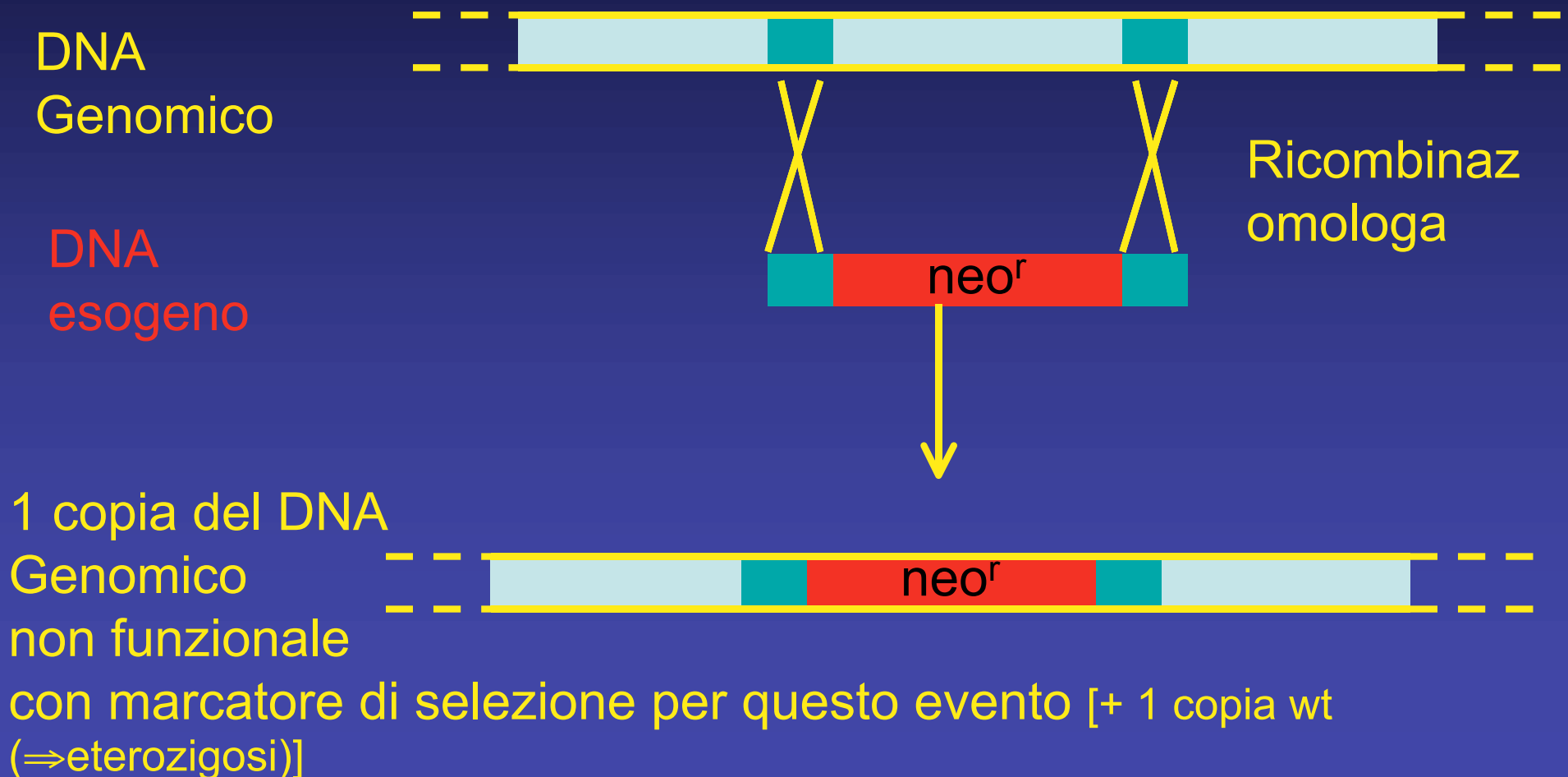
Dove si deve inserire il DNA nella cellula?

- Nei transgenici in cui si ha l'inserzione di nuove copie geniche il DNA puo' inserirsi casualmente nel genoma ospite (a patto che non modifichi altri geni o sia silenziato)
- Nei "gene Knock-out" il DNA deve ricombinare esattamente con la copia del medesimo gene del genoma ospite (TECNICA DEL GENE TARGETING)

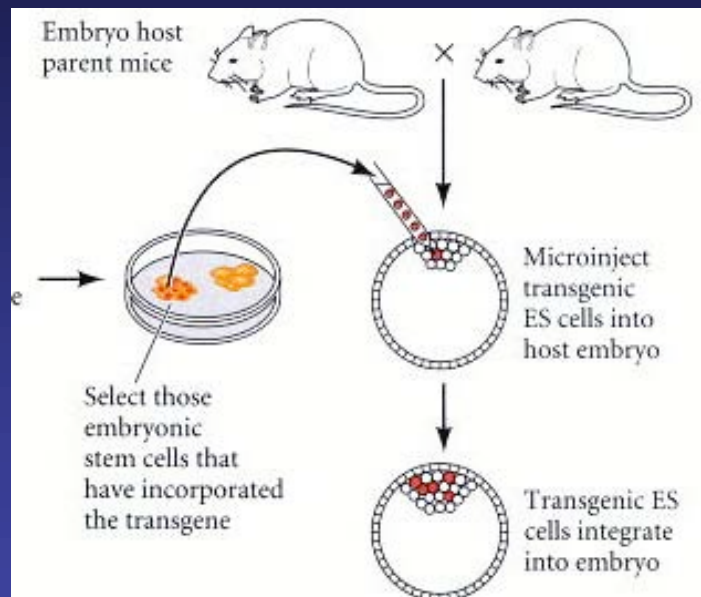


Nei “gene Knock-out” il DNA deve ricombinare esattamente con la copia del medesimo gene del genoma ospite (TECNICA DEL GENE TARGETING)

Per questo la copia non funzionale che inserisco avrà delle regioni di omologia

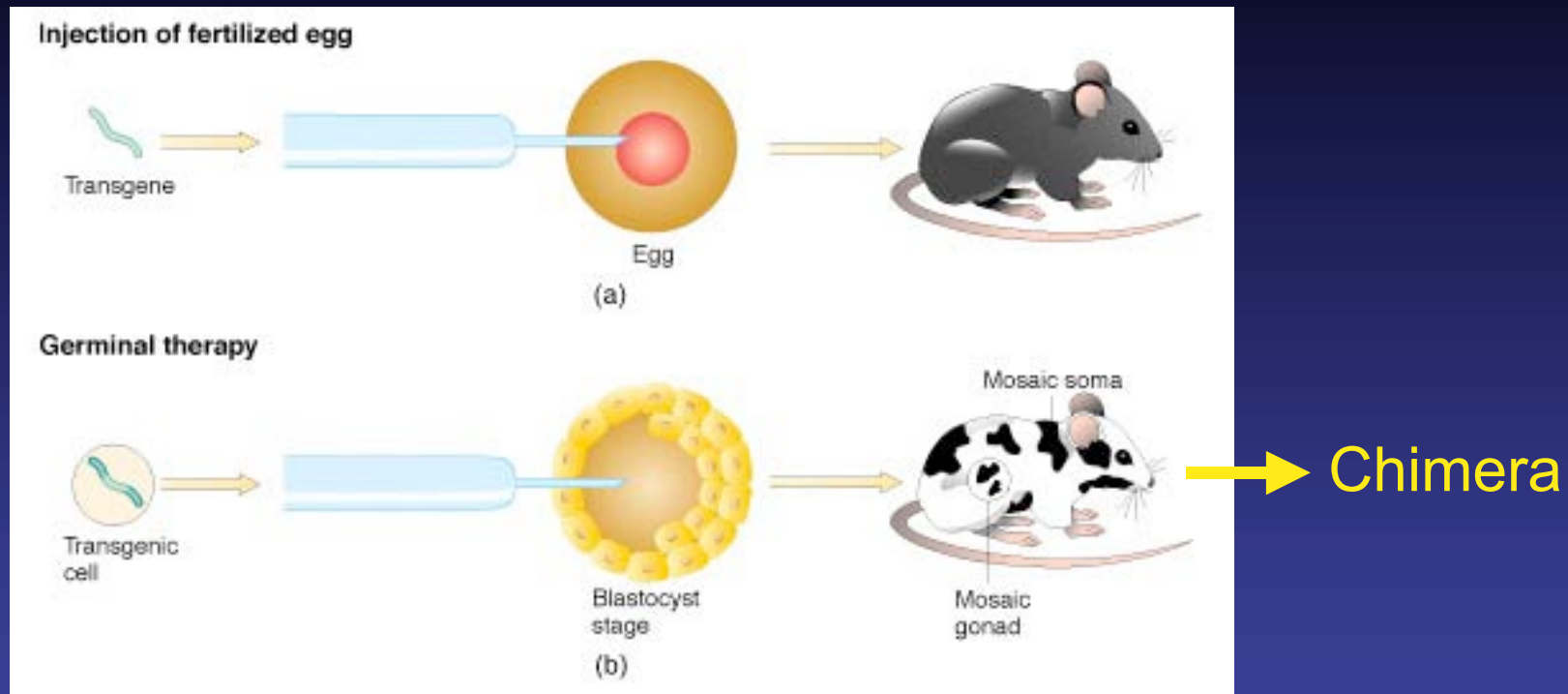


Le ES cells modificate possono essere reinserite in una blastocisti ospite tramite microiniezione



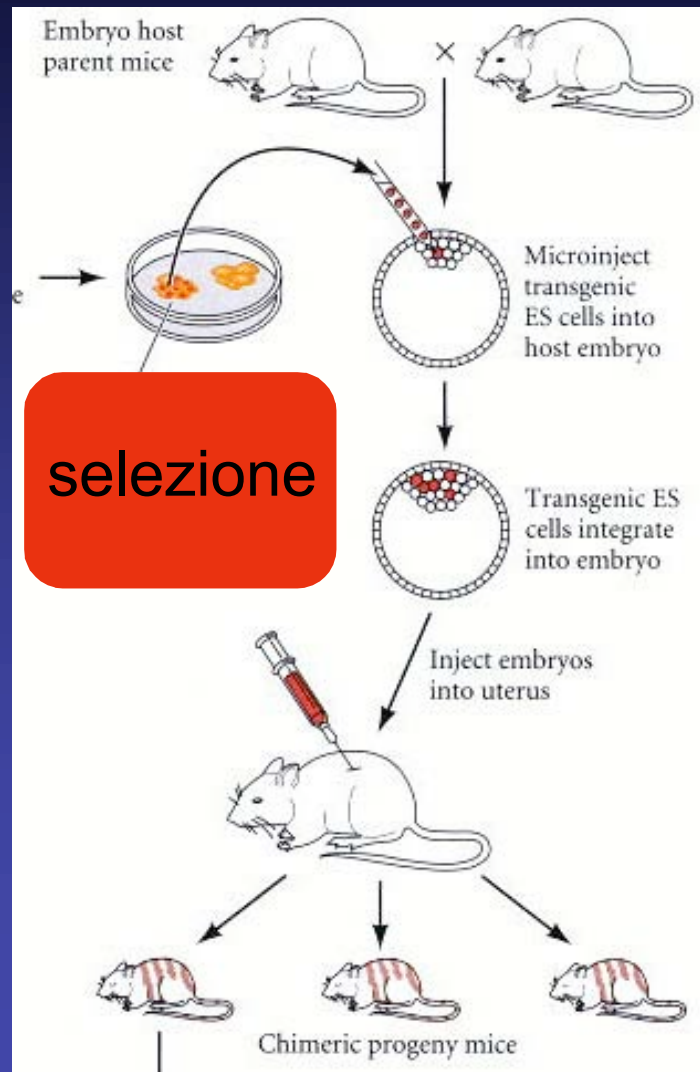
Si ottiene quindi una blastocisti
“mista”, composta
da ES cells wt e da ES cells modificate

Esiste per cui una differenza fondamentale tra l'uso delle cellule ES e di una cellula germinale



L'animale generato possiede solo in alcuni tessuti il transgene o la copia non funzionale del gene (quelli derivati dalle ES cells modificate e reinserite); viene pertanto detto "chimera". Solo le chimere che avranno incorporato la copia genica nella linea germinale potranno passarla alle generazioni future.

Le ES cells modificate possono essere reinserite nella blastocisti tramite microiniezione



Si ottiene una blastocisti composta da ES cells wt e da ES cells modificate

Di norma, le ES cells modificate sono di un ceppo di colore di pelo diverso rispetto a quello della blastocisti ospite

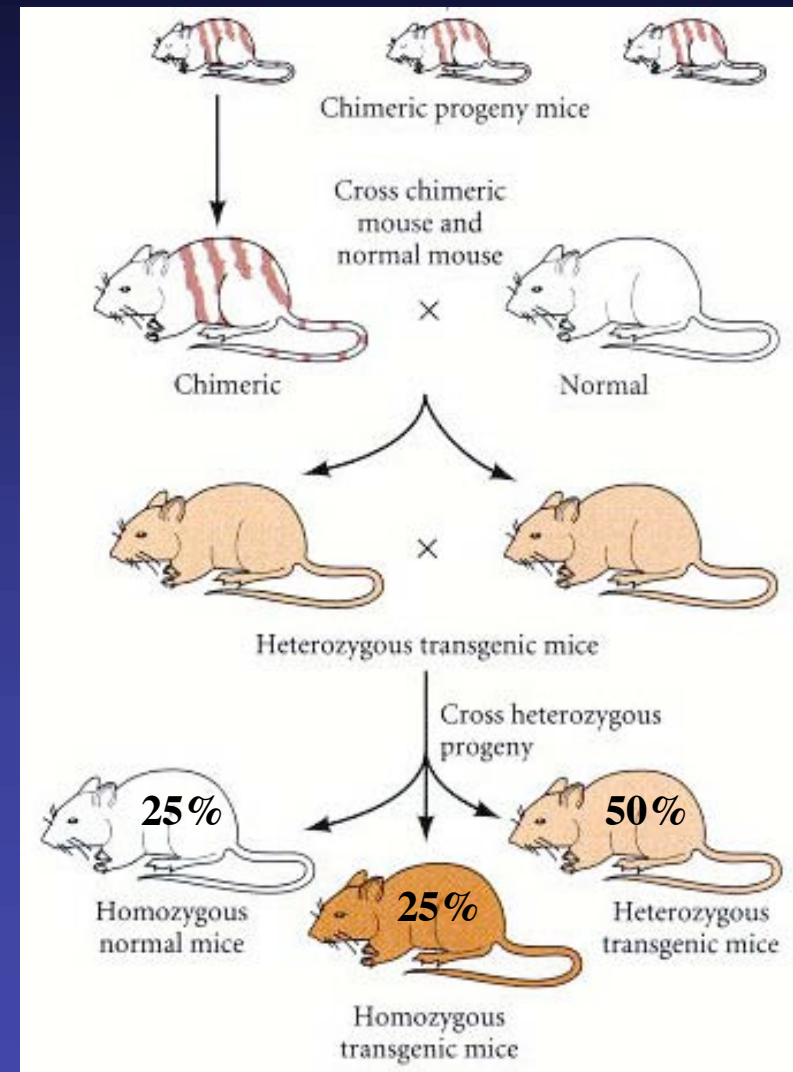
Le blastocisti modificate vengono iniettate in una femmina pseudogravida (lei non contribuisce al genotipo delle blastocisti)

E' dunque necessario selezionare la progenie per ottenere topi con un genotipo omogeneo eterozigote o omozigote

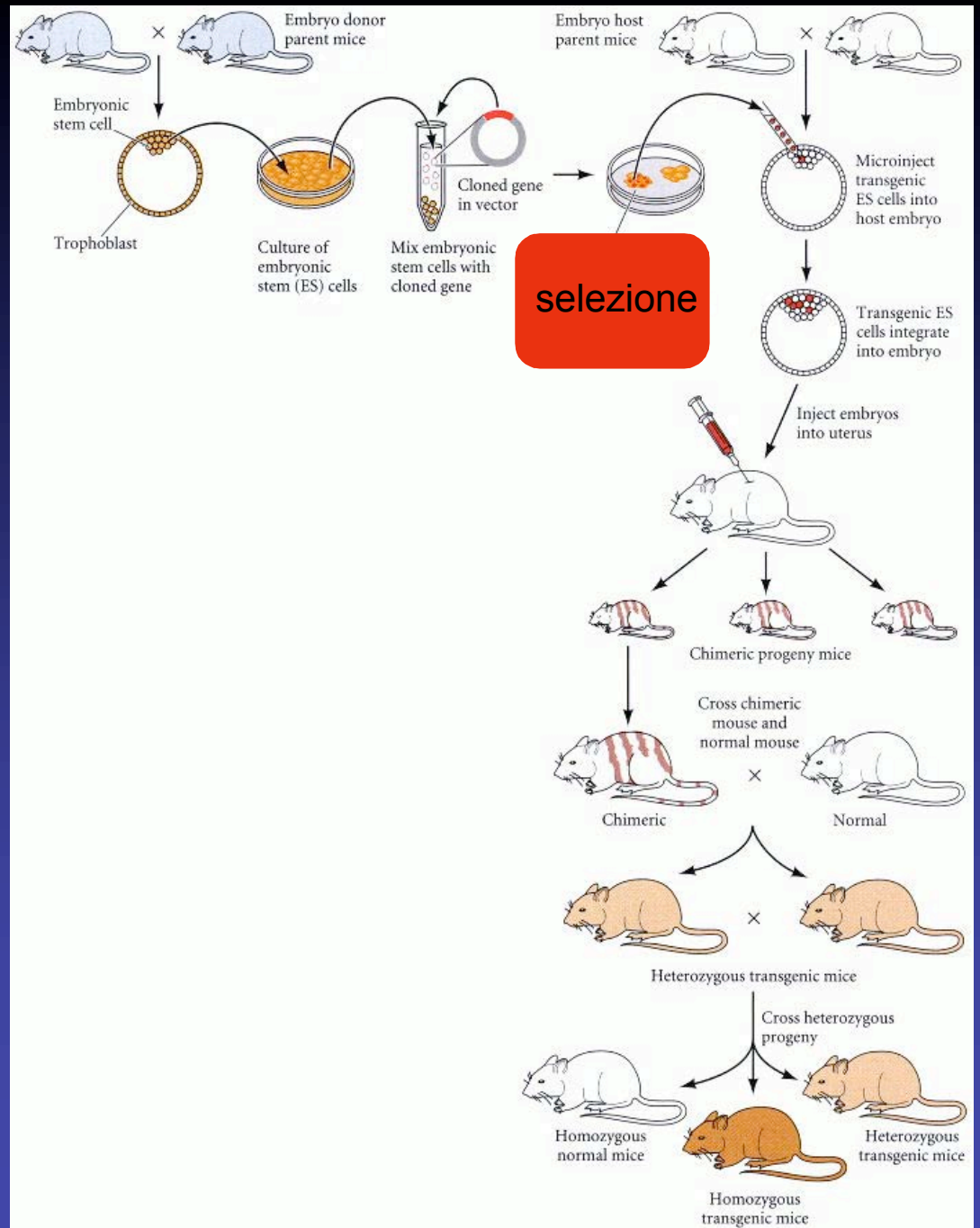
Il topo chimerico (P1) puo' avere la mutazione nella linea germinale (in eterozigosi) oppure no.

Conseguentemente, nel primo caso, in P2 ci saranno topi eterozigoti o wt (nel secondo caso solo wt)

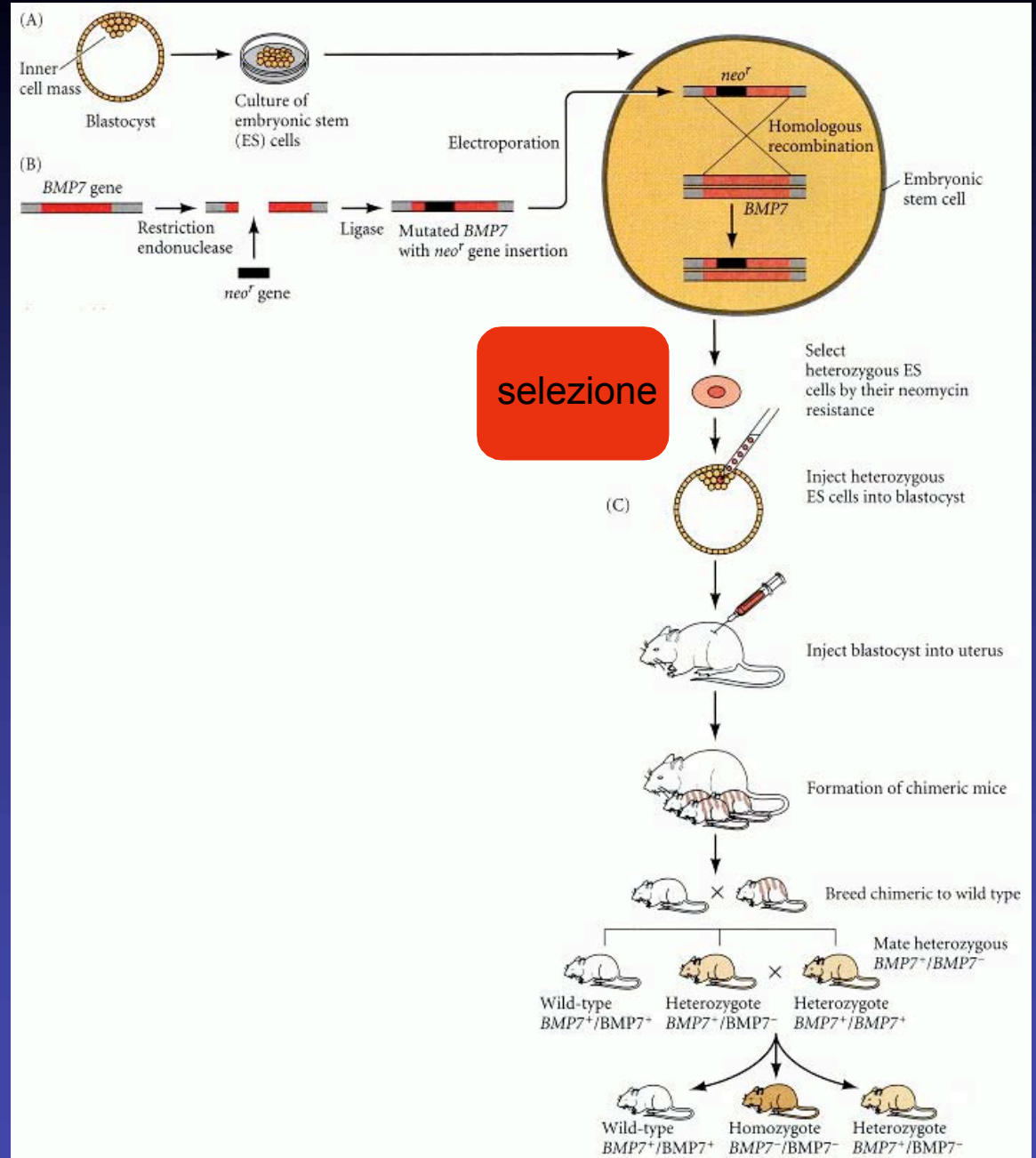
In P3 l'assortimento genotipico segue le regole mendeliane per l'incrocio tra due eterozigoti



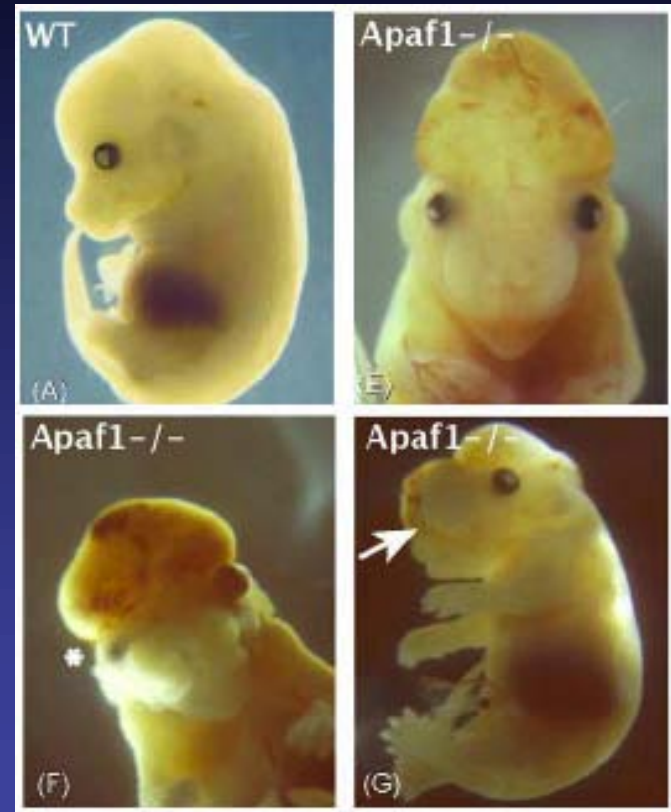
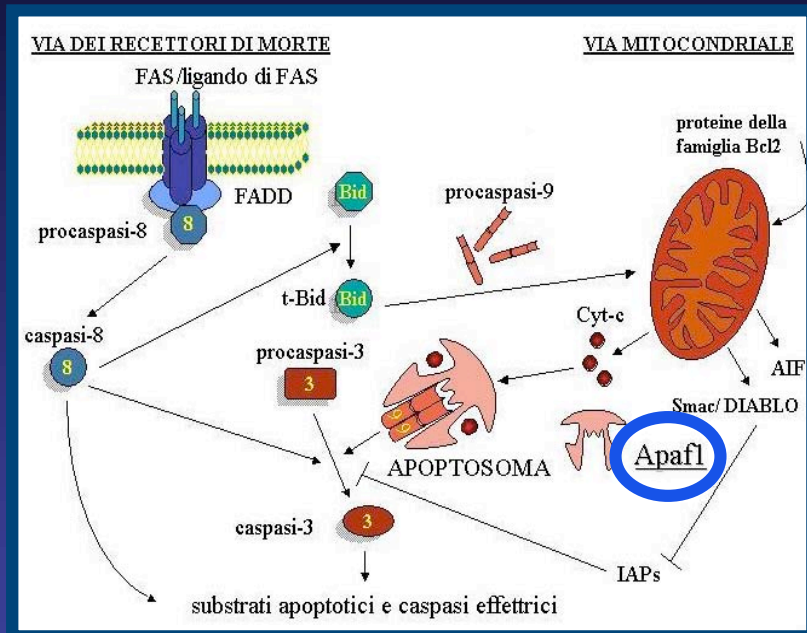
Ricapitolando: per i topi transgenici (metodo ES cells)



...mentre per i
“gene Knock-out”



Esempi di animali Knock-out: il gene Knock-out di Apaf1



From Cecconi F *et al.*, 1998

Apaf1 è una proteina che induce l'apoptosi, ossia la morte cellulare programmata in cui un programma "suicida" viene attivato all'interno della cellula e si verifica spesso durante lo sviluppo embrionale.

La mancanza della proteina Apaf1 provoca gravi difetti nello sviluppo embrionale, tra i quali

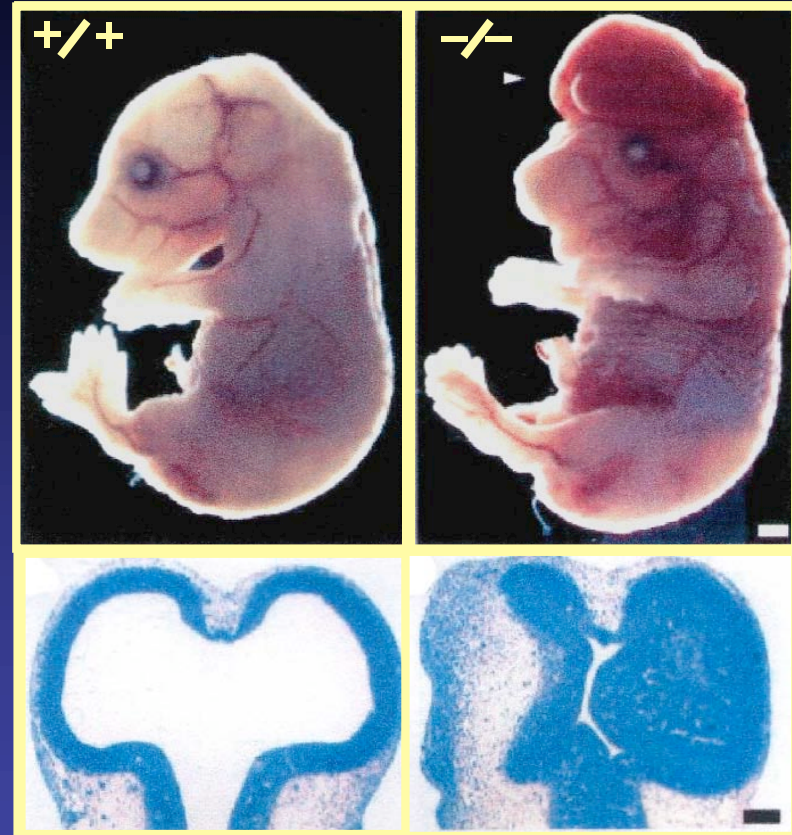
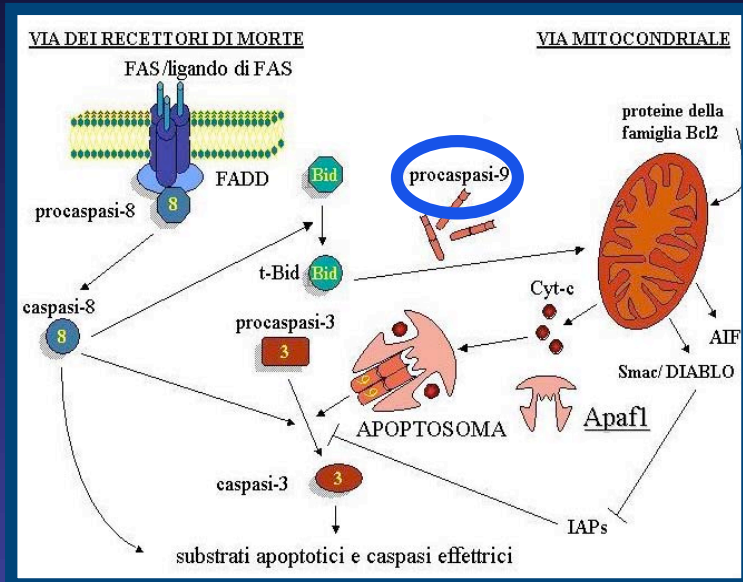
crescita eccessiva delle cellule nervose,

persistenza degli spazi interdigitali, crescita smisurata della retina e mancata chiusura del palato secondario.



From Cecconi F *et al.*, 1998

Il gene Knock-out della Caspasi 9



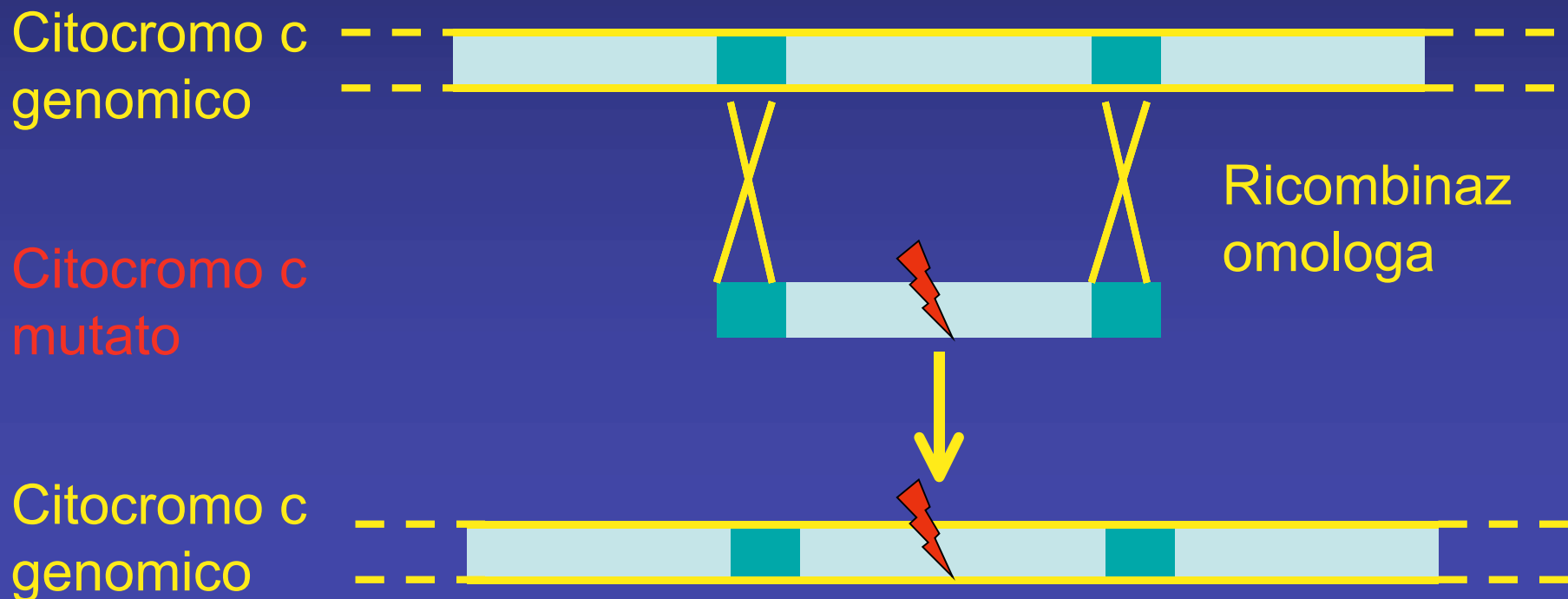
La Caspasi 9 è una proteina che induce l'apoptosi, partecipando alla stessa via di trasduzione del segnale di morte che regola lo sviluppo del sistema nervoso.

From Kuida K et al., 1998

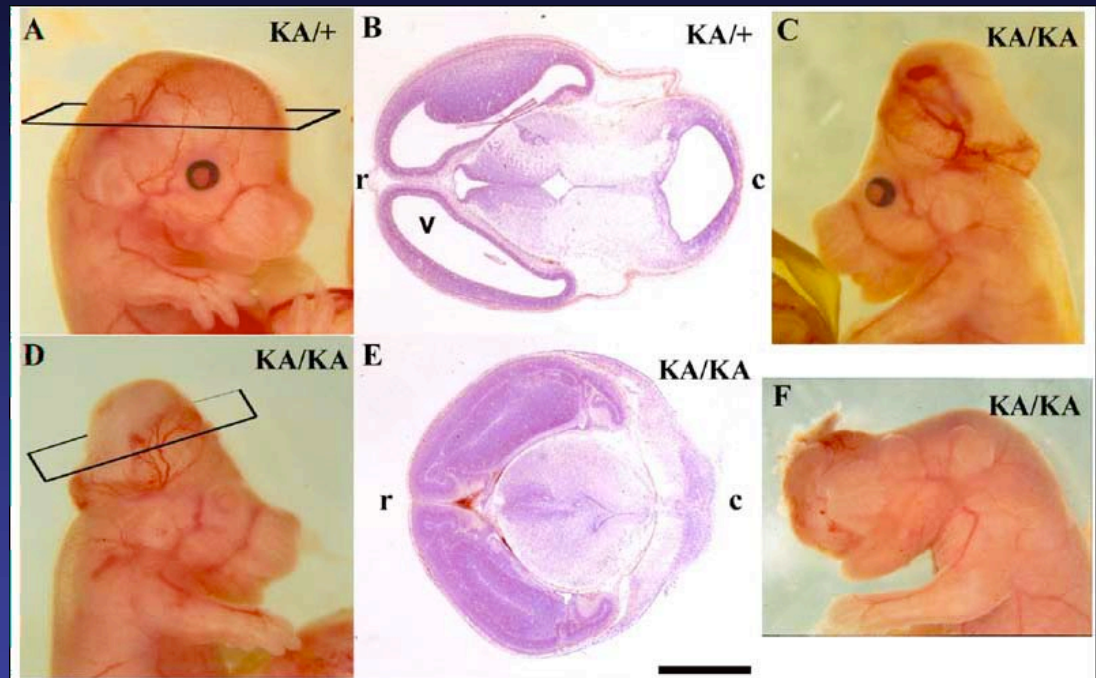
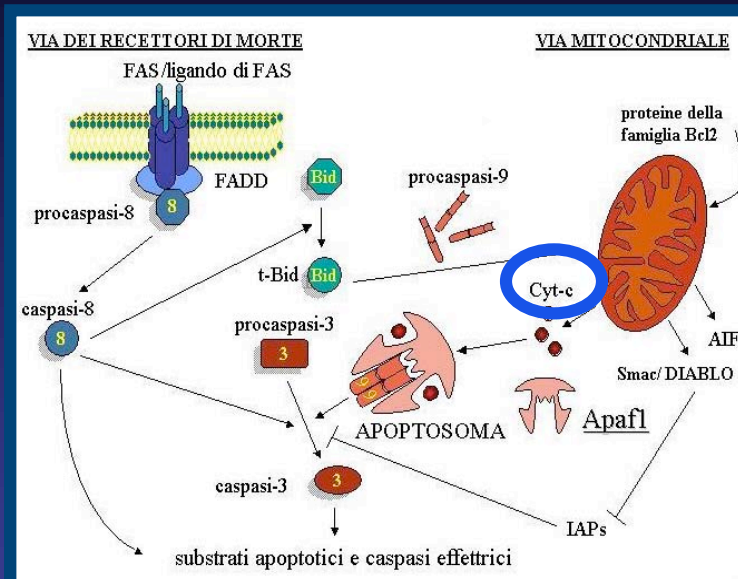
Il gene Knock-in del Citocromo c

Nel “gene Knock-in” il DNA deve ricombinare esattamente con la copia del medesimo gene del genoma ospite

La copia del gene che ricombina (**citocromo c mutato**) differisce da quella del genoma ospite solo a livello di un aminoacido specifico: questa piccola mutazione conferisce al gene la sua funzionalità nella catena respiratoria ma non gli permette di legare Apaf1 e quindi di indurre apoptosi



Il gene Knock-in del Citocromo c

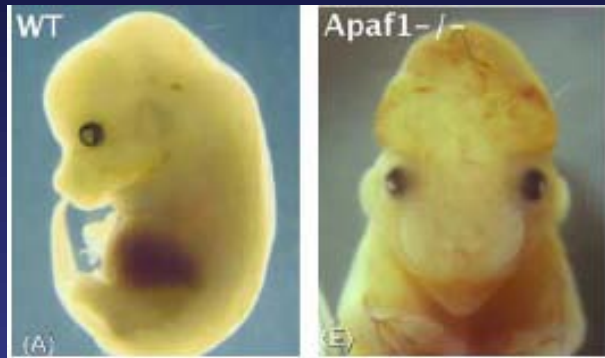


From Hao Z. et al., 2005

Il Citocromo c è una proteina che partecipa alla respirazione mitocondriale e che se rilasciata dal mitocondrio induce l'apoptosi, partecipando alla stessa via di trasduzione del segnale di morte che regola lo sviluppo del sistema nervoso.

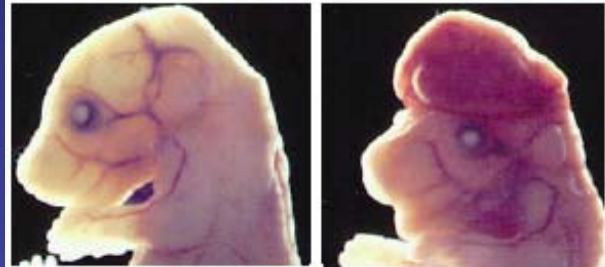
Gli animali Knock-out del gene Apaf1, Caspasi 9 e Knock-in del gene Citocromo c

Apaf1

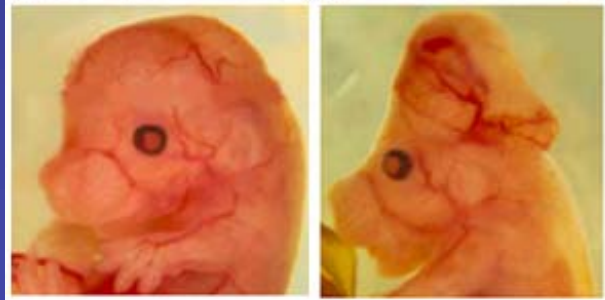


*esempio di geni diversi
che partecipano alla
stessa via di trasduzione
del segnale:*

Caspase 9

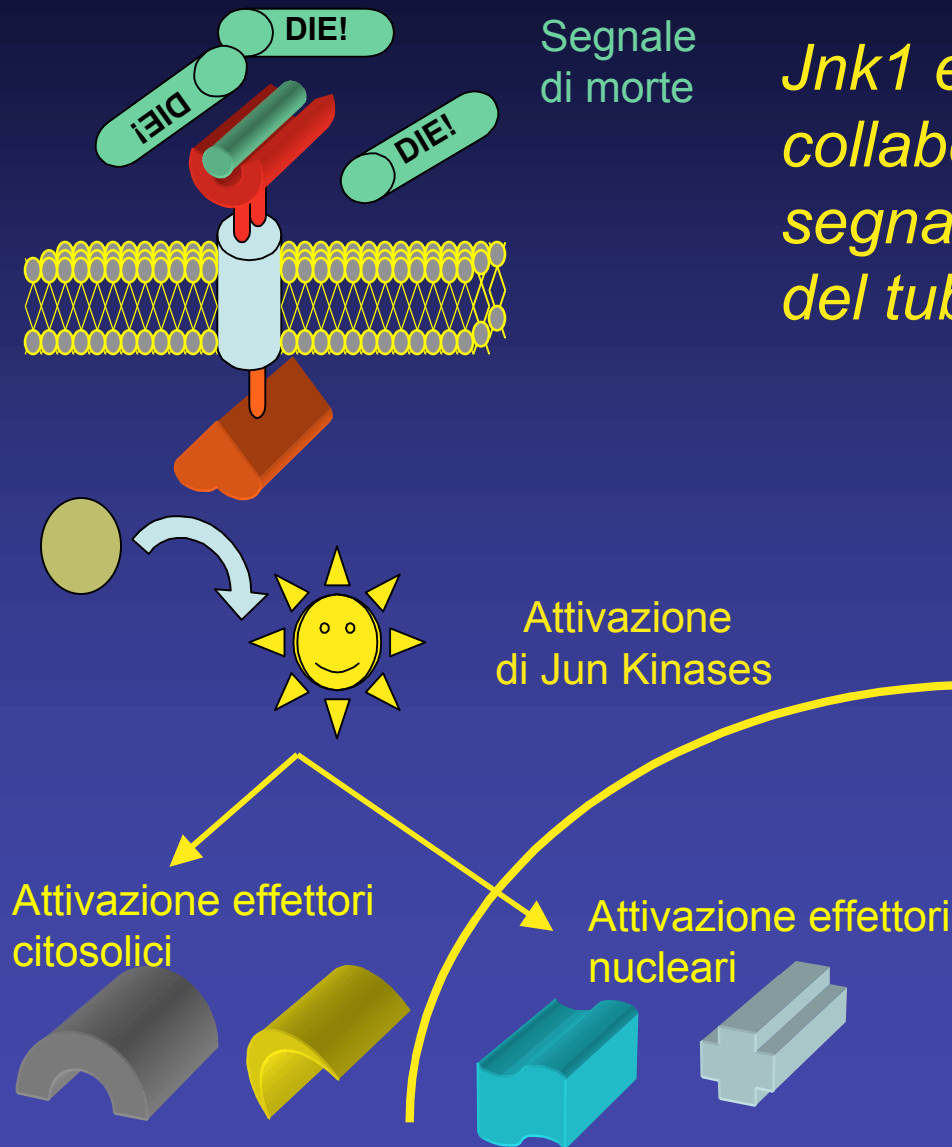


Citocromo c

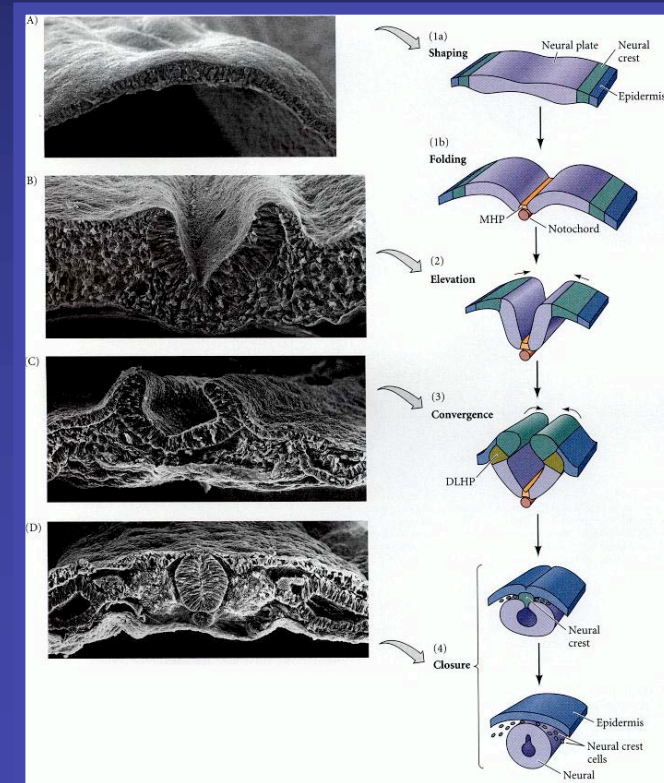


*la loro mancanza
determina un fenotipo
simile*

Esempi di animali doppi Knock-out: Il gene Knock-out di *Jnk1* e 2,



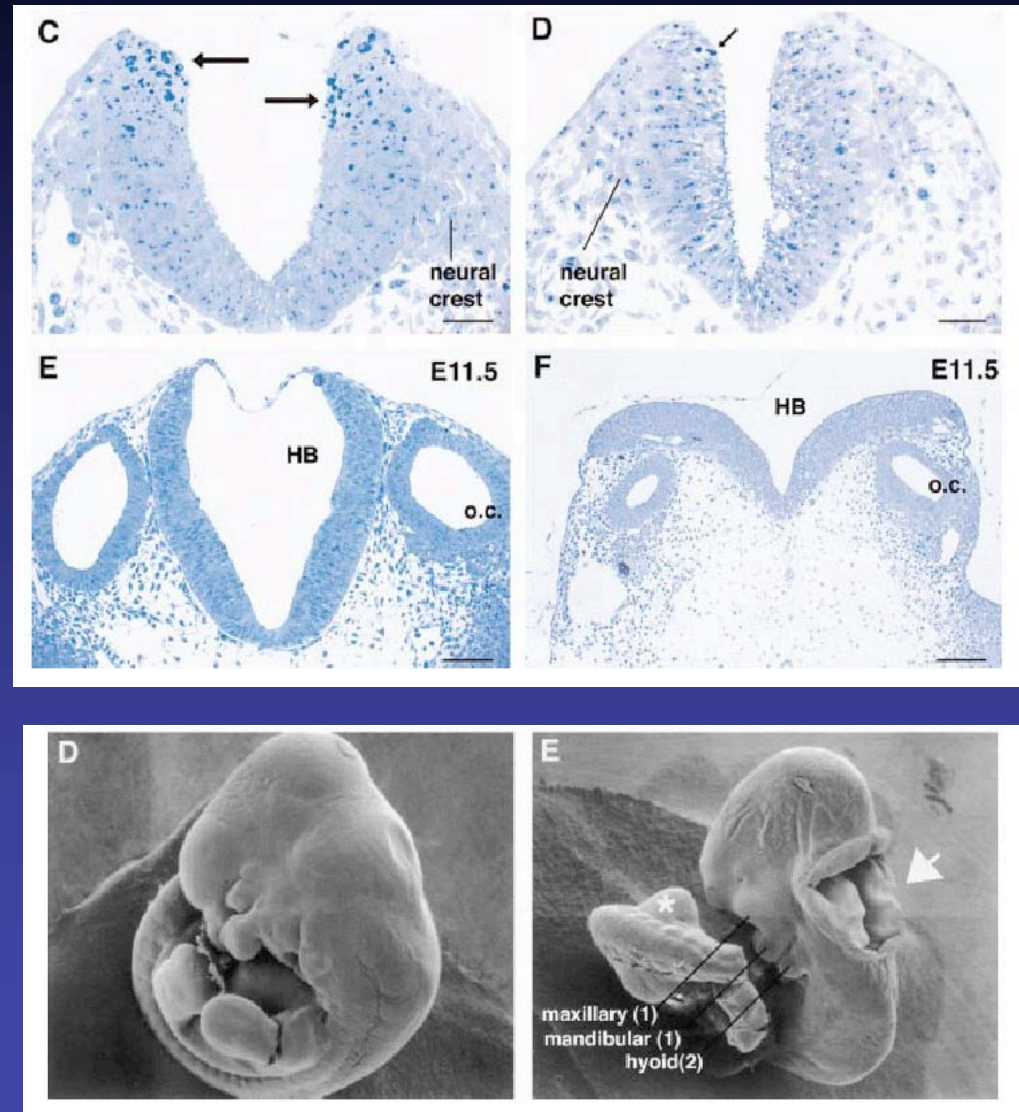
Jnk1 e 2 sono due enzimi che collaborano alla trasduzione del segnale di morte durante la chiusura del tubo neurale



L'assenza di Jnk1 e 2 comporta la mancata trasduzione del segnale di morte e quindi provoca la mancata chiusura del tubo neurale e morte embrionale

wt

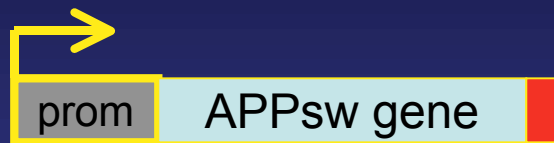
KO Jnk1\2



From Kuan CY *et al.*, 1999

*Esempio di animale transgenico sovraesprimente il gene **APP: tg2576***

Il topo *tg2576* e' il modello per la Malattia di Alzheimer



Microiniettando il gene APPsw nello zigote di topi wt si sovraesprime il gene APPsw in tutti i tessuti. Il gene APPsw presenta una mutazione (sw) che favorisce la formazione del peptide **β -amiloide** ritenuto la causa della malattia.



From Hsiao K *et al.*, 1996

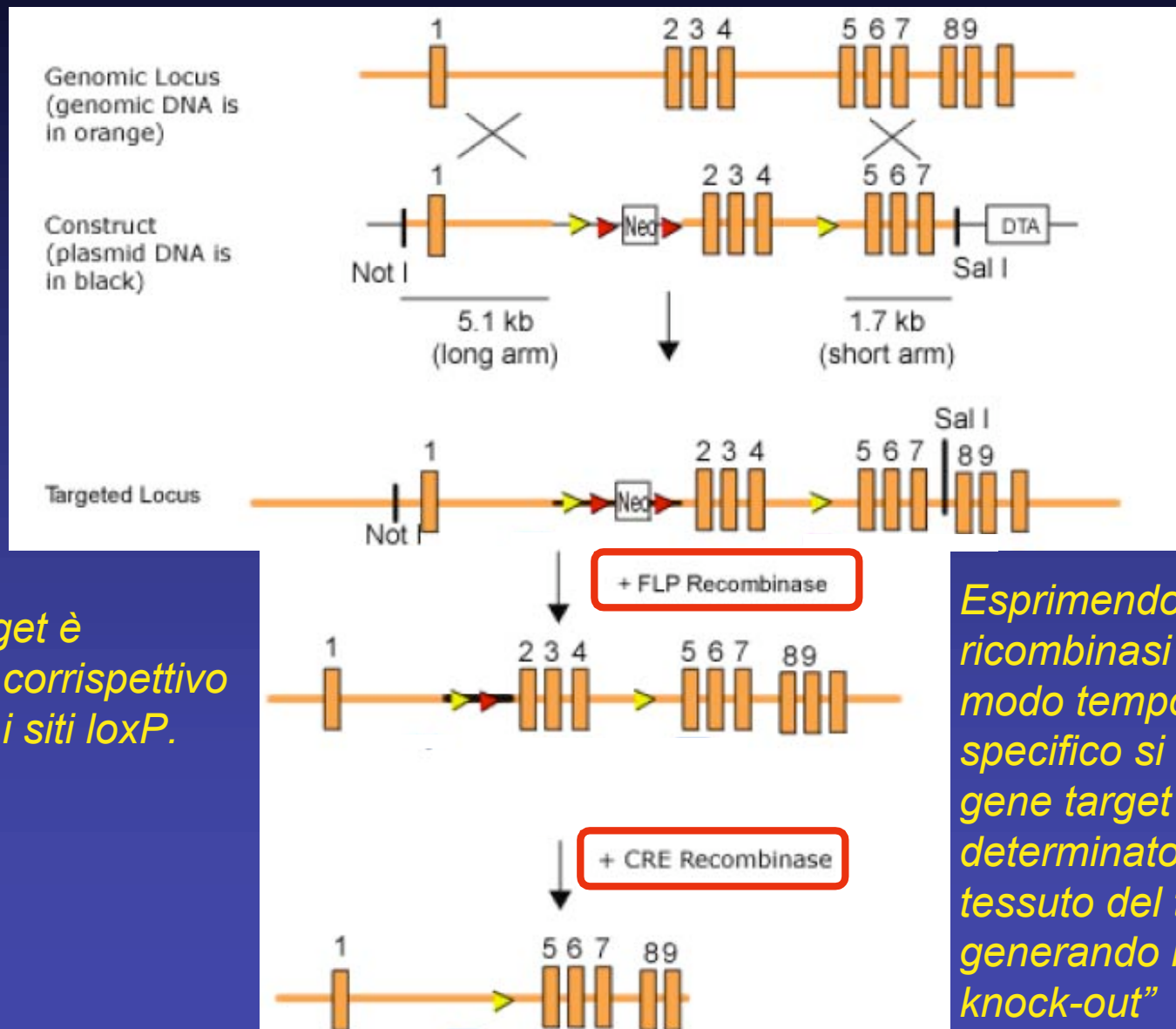
Che cos'è il topo “knock-out condizionale”

E' un organismo che possiede un **gene target** inattivo (KNOCK-OUT) solo in certe condizioni tempo e/o tessuto specifiche (CONDIZIONALE)

VANTAGGI:

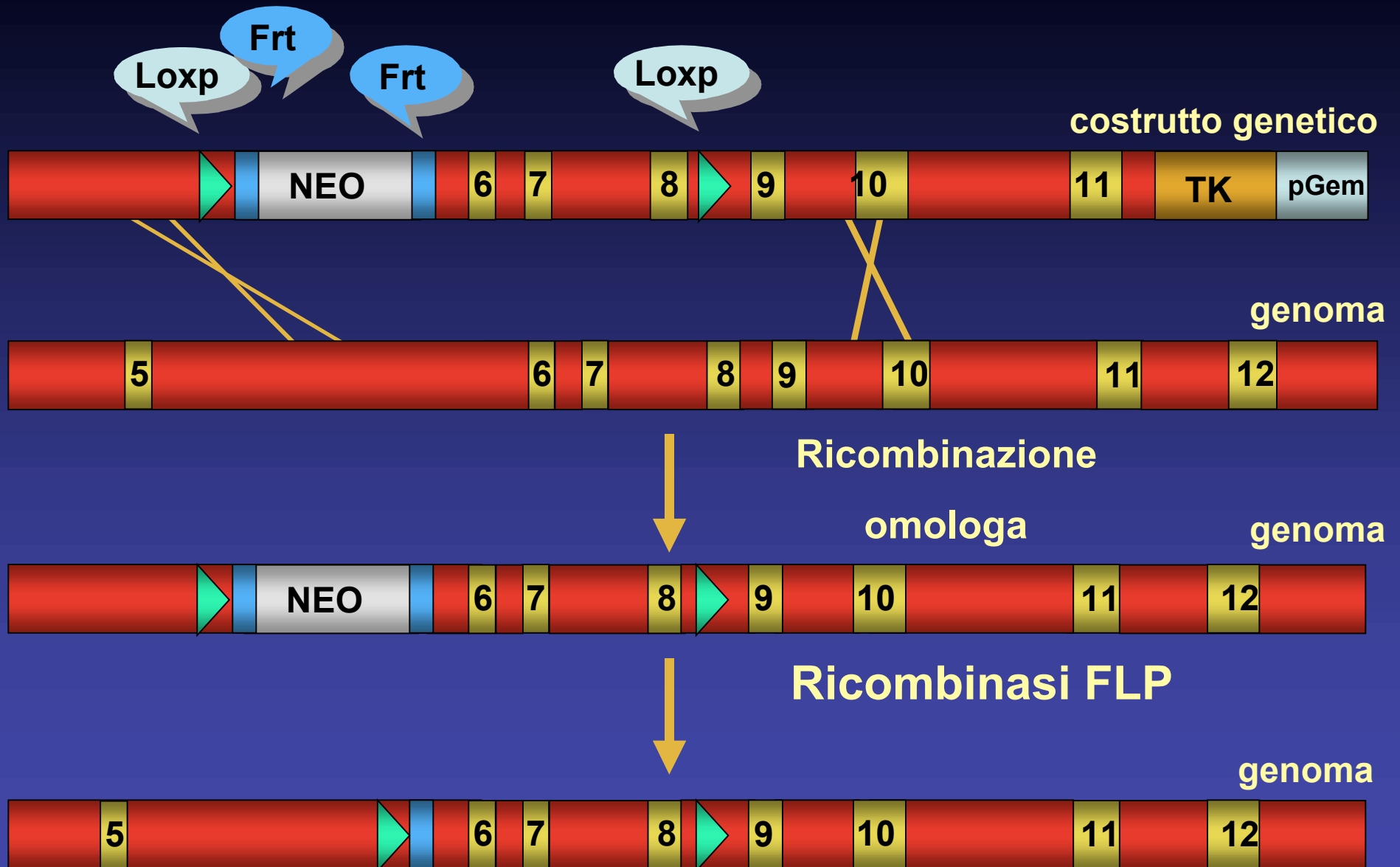
- 1) E' possibile studiare la funzione del **gene target** in età adulta (in genere i topi knock-out muoiono a stadio embrionale)
- 2) E' possibile studiare la funzione del **gene target** in un tessuto specifico e/o una determinata fase embrionale o adulta dell'organismo
- 3) E' possibile studiare la funzione del **gene target** in una determinata patologia (tramite modelli animali che sviluppino malattie e tumori)

Il topo knock-out condizionale....come si genera?



Il gene target è identico al corrispettivo wt eccetto i siti loxP.

Esprimendo la ricombinasi CRE in modo tempo/tessuto-specifico si inattiva il gene target in un determinato momento e tessuto del topo, generando il "vero knock-out"



Differenti linee di topo CRE possono essere utilizzate per generare un “vero KNOCK-OUT”, a seconda del tipo di promotore che controlla l’espressione di CRE

Alcuni esempi.....

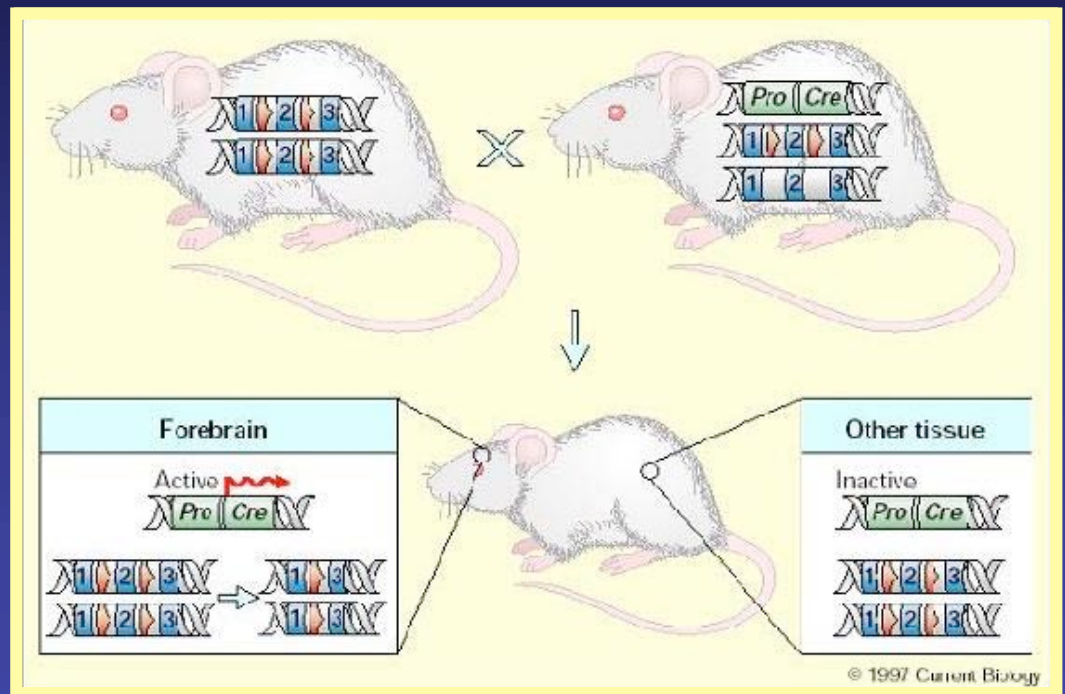
Nestin/Cre: Cre espressa nei precursori neuronali

D6/Cre: Cre espressa nel telencefalo da stadio e10.5 e nell’ippocampo e nella neocorteccia durante ultimi stadi di sviluppo del cervello

Six3/Cre: Cre espressa nell’occhio e nel cervello anteriore

Pax6/Cre: Cre espressa nella retina e nella glia radiale

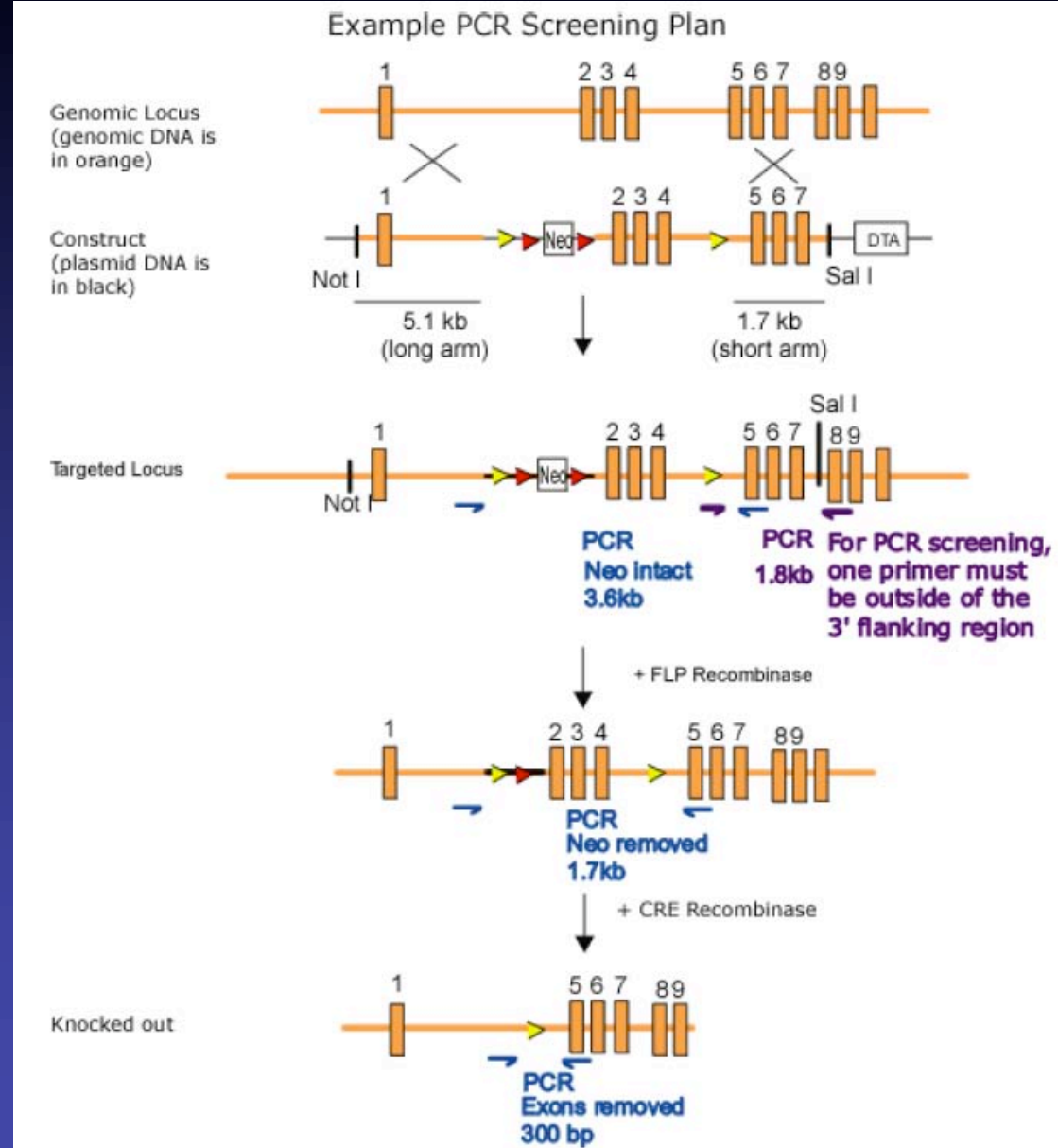
CamKIIalpha/Cre: Cre espressa nei neuroni postmitotici



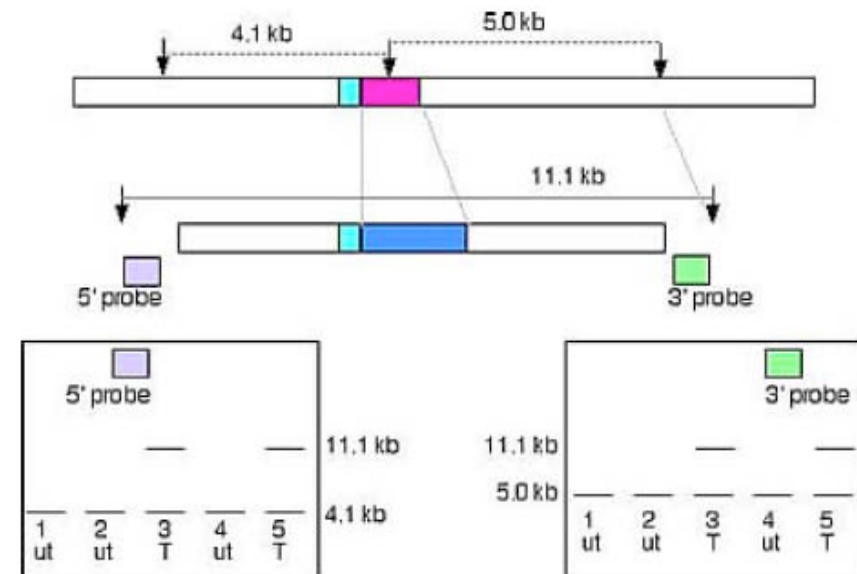
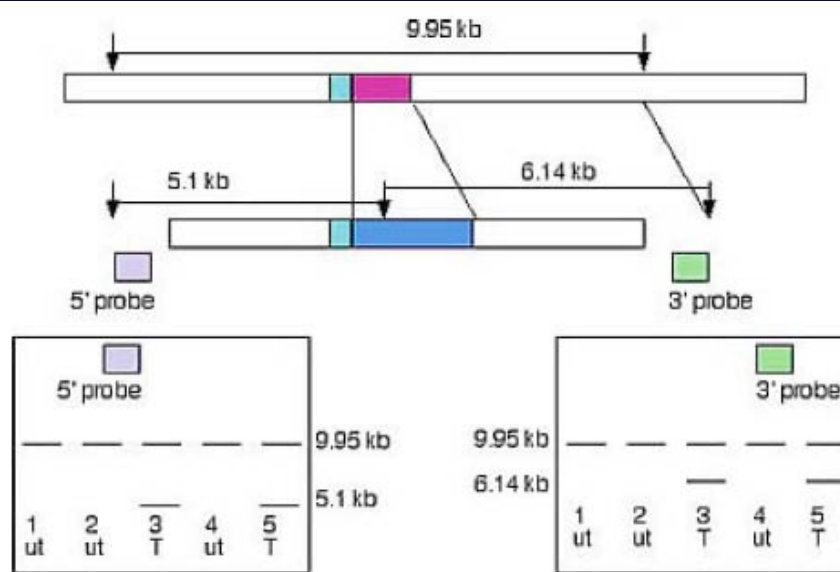
Tecniche per selezionare i cloni ES che hanno ricombinato in maniera omologa (*topi knock-out, knock-in, knock-out condizionale*):

la PCR e il SOUTHERN BLOTTING

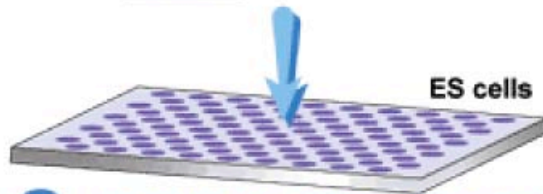
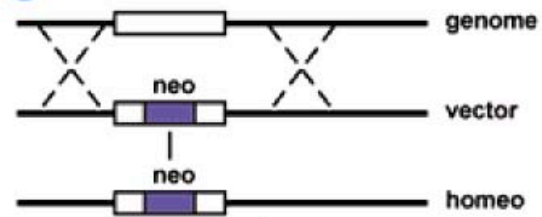
la PCR...



il SOUTHERN BOTTING....



1 Targeting vector design

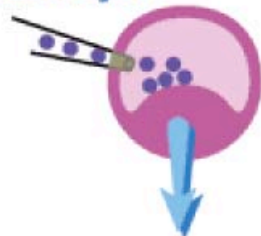


2 Selection for recombination

3 Determination of homologous recombinants



4 Injection into E3.5 host blastocyst



5 Transfer into pseudo-pregnant foster mother, birth of chimeras



6 Breed for germline transmission



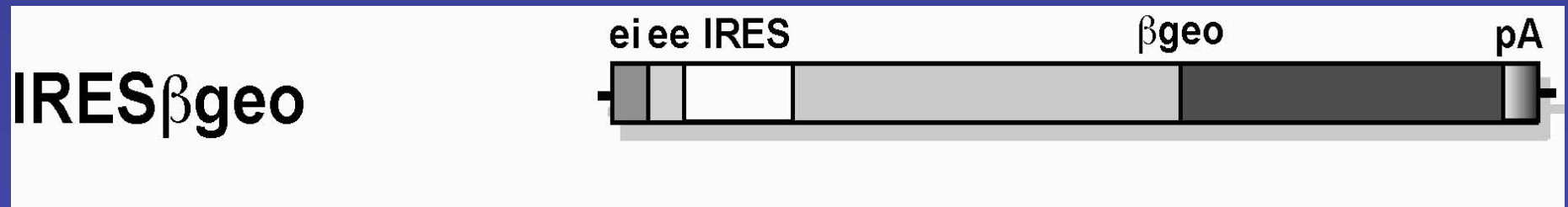
**I topi knock-out possono essere generati
tramite la tecnica del**

1) GENE TARGETING

2) GENE TRAP

Il vettore GENE TRAP si inserisce a caso nel genoma del topo *intrappolando* un gene X a caso e generando così il KNOCK-OUT del gene X

Esempio di un vettore GENE TRAP



Il vettore GENE TRAP viene trascritto grazie al promotore del gene X intrappolato

L'inserzione del GENE TRAP genera un trascritto di fusione, composto dalla prima parte del gene X e dal GENE TRAP

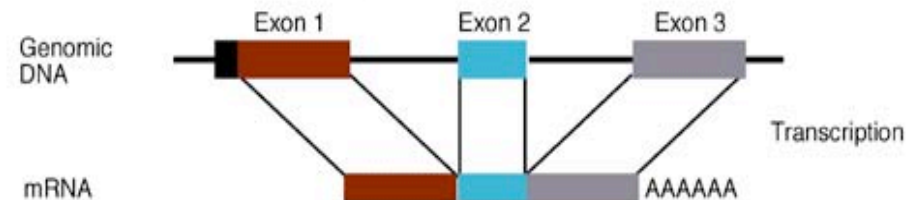
L'espressione del vettore GENE TRAP mima l'espressione del gene X

Il risultato è l'inattivazione del gene X e quindi la generazione di un KNOCK-OUT

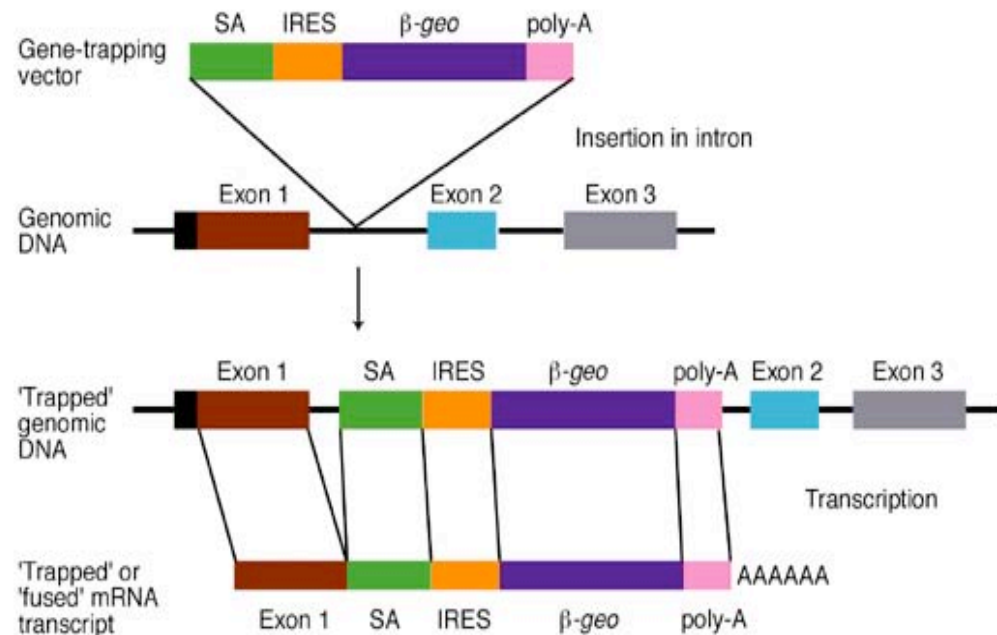
a IRES β geo gene-trapping vector



b Gene structure before insertion of gene-trapping vector



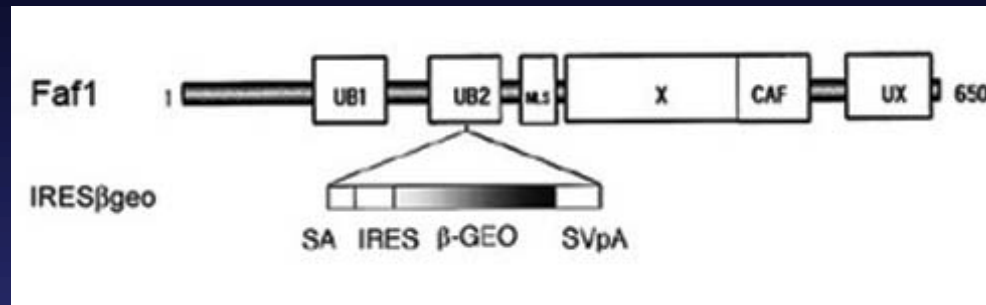
c Gene structure after insertion of gene-trapping vector



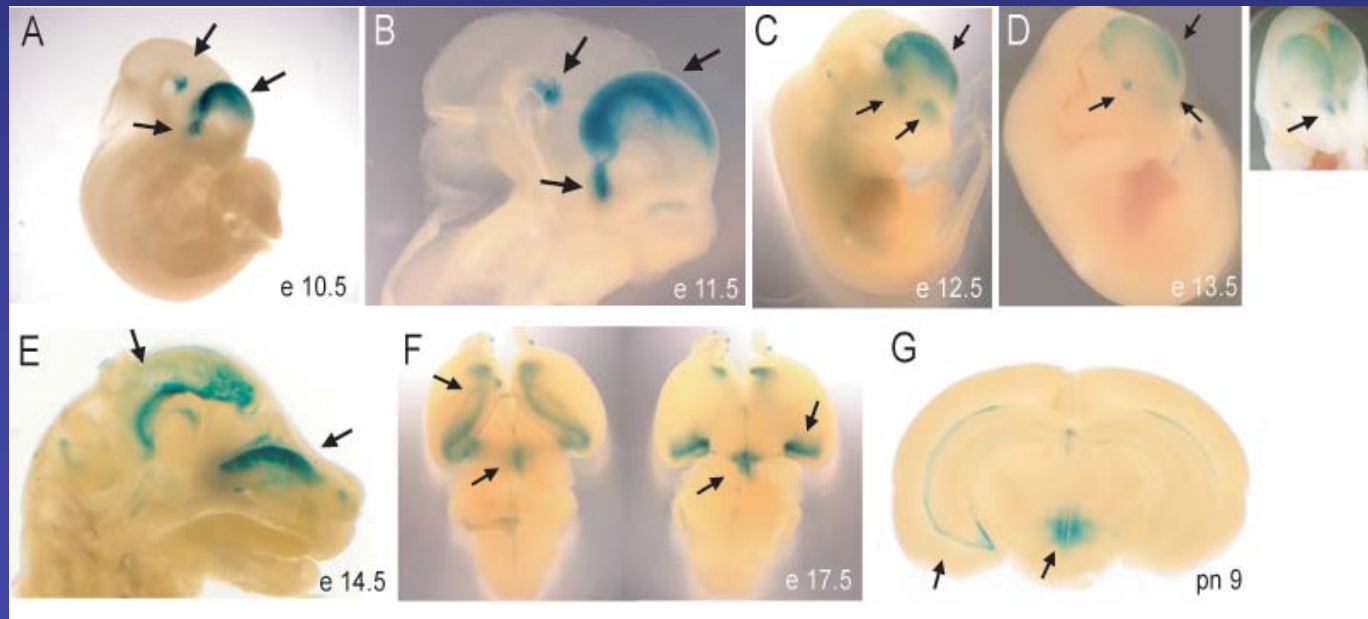
The IRES β geo gene-trapping vector and gene-trapping strategy

Expert Reviews in Molecular Medicine © 2000 Cambridge University Press

UN ESEMPIO: il vettore GENE TRAP ha intrappolato il gene FAF1



Il profilo d'espressione del vettore GENE TRAP (LacZ)
del topo "FAF1 GENE TRAP"



From De Zio D *et al.*, 2008

La strategia del GENE TRAP

- 1. Consente l'isolamento di nuovi geni**
- 3. Consente la determinazione del profilo d'espressione del gene intrappolato**
- 4. E' di per se' mutagenica: da' luogo ad un knockout**

La sequenza della strategia del GENE TRAP

