

Nella ricerca biomedica un modello animale si definisce come “un organismo vivente con un processo patologico ereditario, acquisito naturalmente o indotto, che in un modo o nell'altro ricorda strettamente lo stesso fenomeno nell'uomo”
(Wessler 1976).

Vengono utilizzati a scopi diversi sia **invertebrati** che **vertebrati**

Modelli invertebrati – vengono utilizzati principalmente in studi di tipo neurobiologico, genetico e di sviluppo (*C. elegans*, *Drosophila*)

Modelli vertebrati – sono responsabili dei molti progressi nella biologia, farmacologia e nella medicina e risultano fondamentali nella ricerca traslazionale

Principali modelli vertebrati:

- Ratto
- Topo ←
- Coniglio
- Guinea pig
- Zebrafish

Principali caratteristiche che rendono il
Topo (Mus musculus)
uno dei migliori modelli

- ◆ Piccola taglia
- ◆ Propensione a riprodursi in cattività
- ◆ Durata di vita massima di 3 anni
- ◆ Ampie similitudini fisiologiche e molecolari con l'uomo
- ◆ Genoma interamente sequenziato

MODELLI TRANSGENICI

Animali che contengono in tutte le loro cellule, compresa la linea germinale, elementi genetici estranei introdotti sperimentalmente

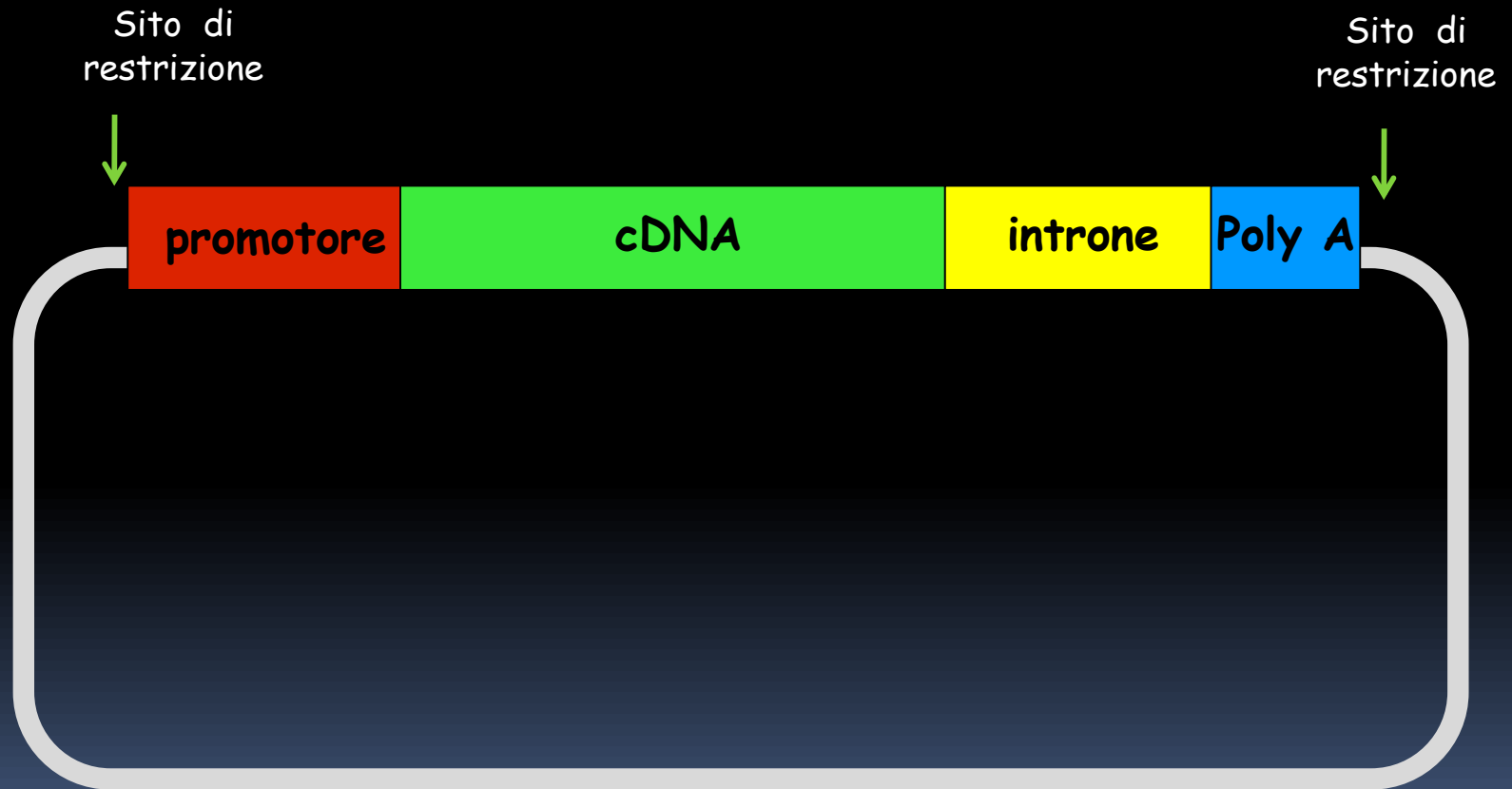
Metodiche principali per la produzione di topi geneticamente modificati (GEM)

- **Microiniezione di DNA** nel pronucleo di oociti fertilizzati (GEM Transgenici)
- **Trasformazione *in vitro* di cellule staminali embrionali (ES)** murine e loro iniezione in blastocisti murine (GEM Endogeni, knock out)

Passaggi fondamentali per la produzione di un modello transgenico

- Costrutto genico (Plasmide)
- Inserimento in uno stadio embrionale precoce
- Analisi per la ricerca di animali transgenici
- Analisi dei profili di espressione (Caratterizzazione)
- Validazione del modello/Sperimentazione

Costrutti per transgenicogenici: Plasmidi



IMPORTANTE !

- Il DNA deve essere linearizzato e privato delle sequenze plasmidiche



- La purificazione del costrutto da iniettare non deve lasciare impurezze che possano bloccare l'ago e tantomeno risultare tossiche per le cellule

Superovulazione di femmine prepuberi:

- iniezione intraperitoneale di PMSF (Folligon), che mima l'azione dell'ormone FSH, tra le 13.00 e le 14.00 da effettuare 3,5 giorni prima della microiniezione

- iniezione intraperitoneale di hCG (Corulon), che mima l'azione dell'ormone LH, tra le 12.00 e le 13.00 da effettuare 1,5 giorni prima della microiniezione



→ nel pomeriggio del giorno dell'iniezione di hCG si accoppiano le femmine superovulate con maschi fertili.

→ Lo stesso giorno o il successivo si accoppiano femmine sessualmente mature con maschi vasectomizzati

day 1:
PMSG injection



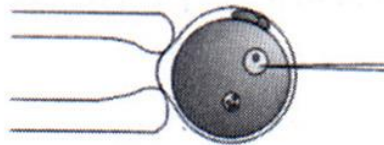
day 3:
hCG injection and
mating



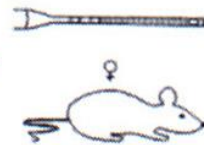
day 3 or 4:
mating of foster mothers
with vasectomized males



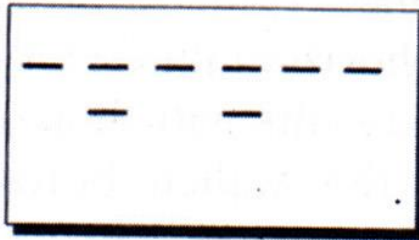
day 4:
isolation of oocytes and
microinjection of DNA



day 5:
oviduct transfer to pseudo-
pregnant foster mothers

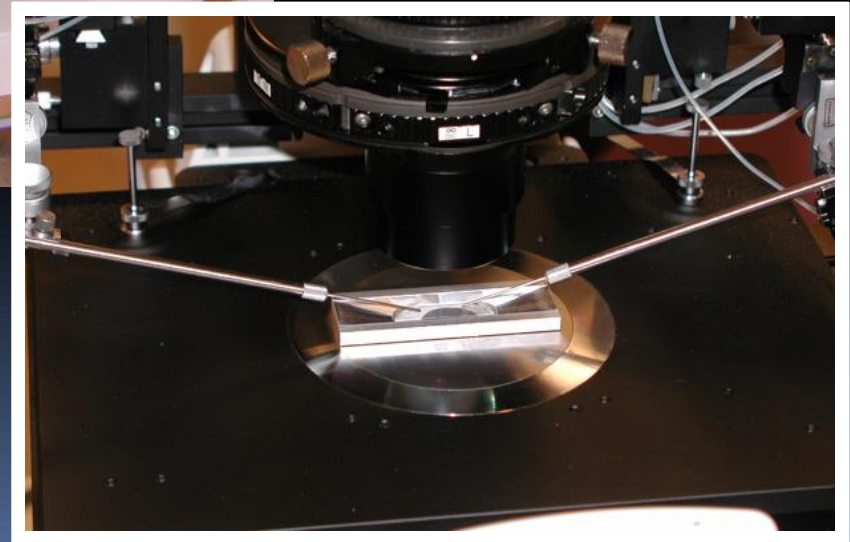


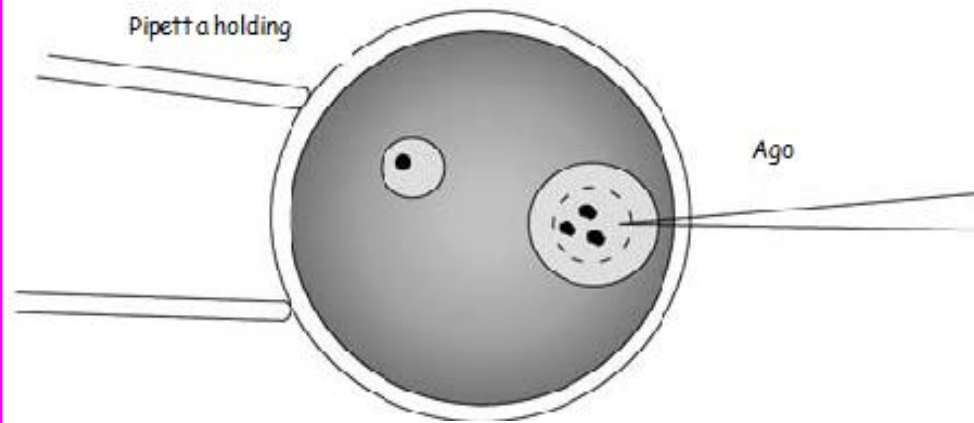
day 46:
tail tipping and
analysis of offspring



day 25:
birth of offspring







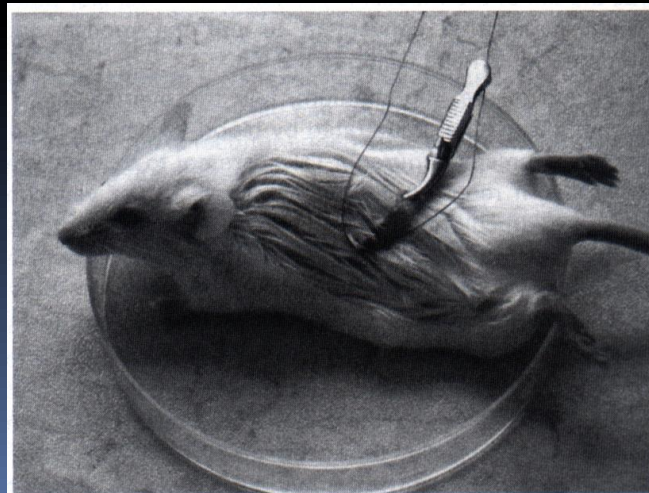
Dopo la microiniezione le cellule vengono lasciate per tutta la notte in incubatore a 37°C, così da poter distinguere le cellule sopravvissute all'iniezione da quelle morte in seguito al trattamento.

La percentuale di cellule che sopravvivono alla microiniezione può variare dal 60-65% fino al 90% sulla base del ceppo murino utilizzato e dell'abilità dell'operatore.

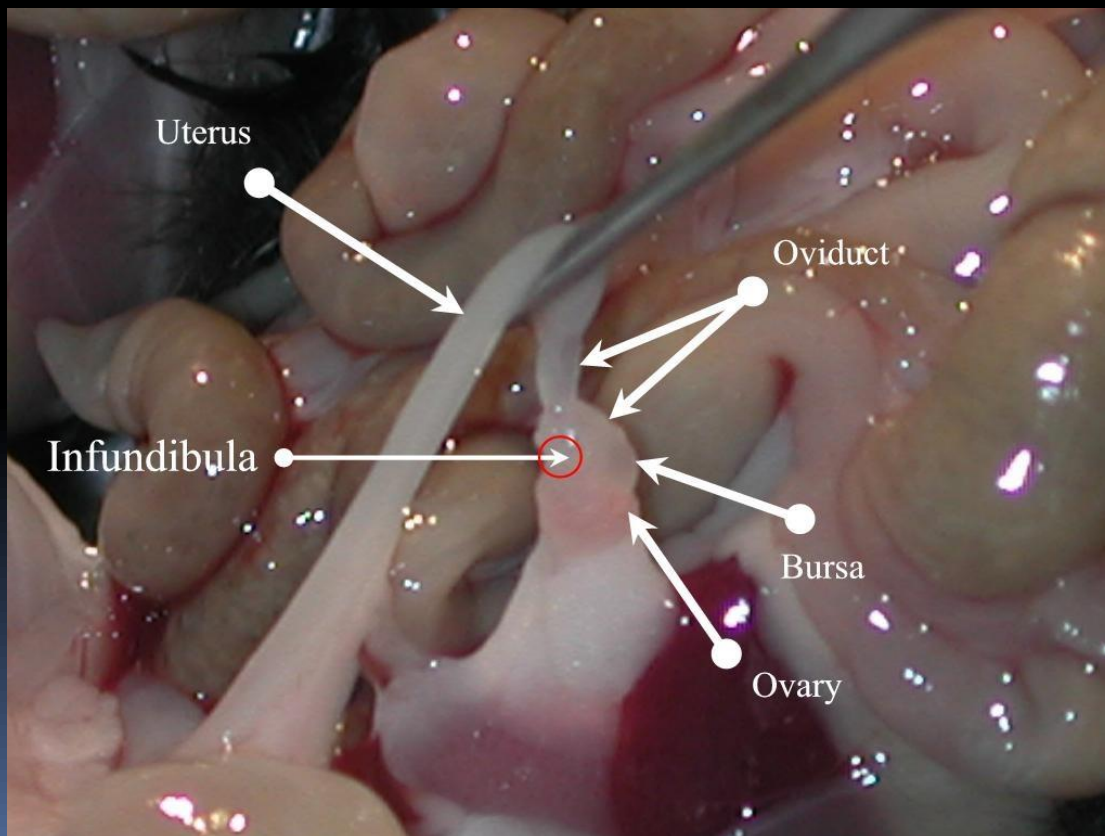
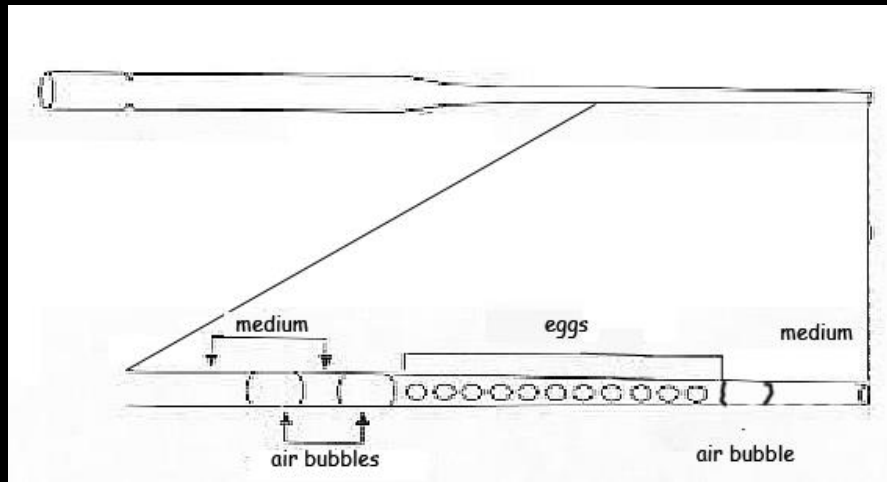
Dopo la microiniezione le cellule vengono reimpiantate
nell'ovidutto di una femmina pseudogravida
il giorno stesso o il successivo
quando hanno effettuato la prima divisione (stadio di due cellule)



La femmina pseudogravida
viene anestetizzata



Ago da microiniezione





... Dopo circa 20 giorni



CARATTERIZZAZIONE DI UN TOPO TRANSGENICO

E' presente il transgene?

Quante copie sono presenti?

Quanti siti di integrazione ci sono?

- Il transgene è funzionale?

SOUTHERN BLOTTING

DNA estratto da piccoli frammenti di coda del topo viene digerito con appositi enzimi di restrizione, fatto correre su gel di agarosio, trasferito su membrana e fatto ibridare con una sonda specifica per il transgene.



Numero di copie presenti in ciascuna linea fondatrice

Numero di siti d'integrazione del transgene


PCR

DNA estratto da piccoli frammenti di coda del topo viene amplificato con primers specifici per il transgene ed i prodotti di PCR fatti correre su gel di agarosio

PRO


Più rapida di un Southern blot

Più sensibile. (Può evidenziare un basso numero di copie)

CONTRO


Non può determinare il numero di copie o il sito di integrazione

Per tali caratteristiche è generalmente utilizzata per lo screening di linee transgeniche già stabilite

Se si va a inattivare un determinato gene

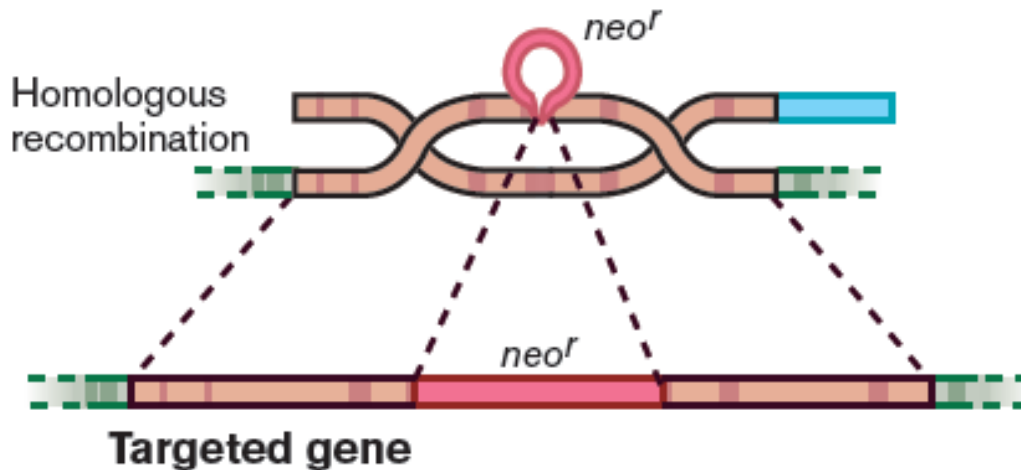
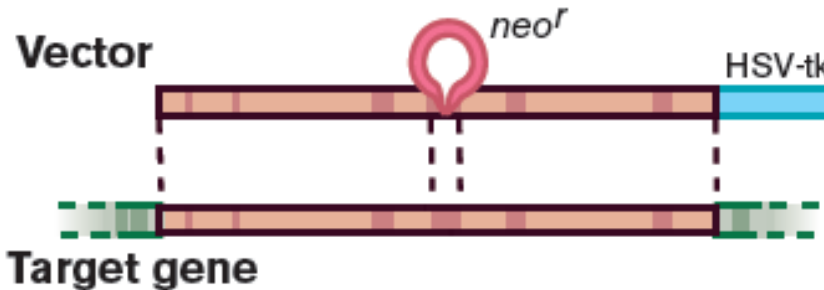
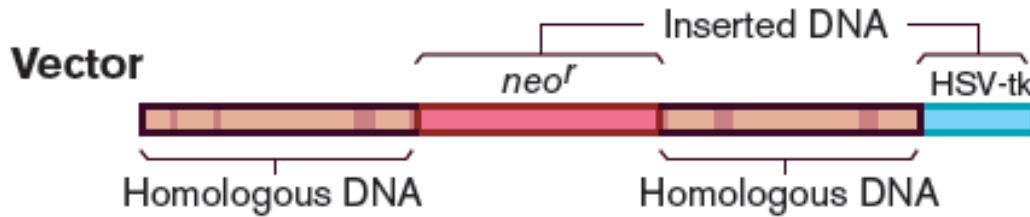


**Knock out
(GEM Endogeni)**

Prevede la:

Trasformazione *in vitro* di cellule staminali embrionali (ES) murine e loro iniezione in blastocisti murine (GEM Endogeni)

Vettore per knock out



Selezione
positiva :
neomicina
(G418)

Selezione
negativa :
HSV
timidina
chinasi (TK)
(ganciclovir)

Gene targeting in cellule ES

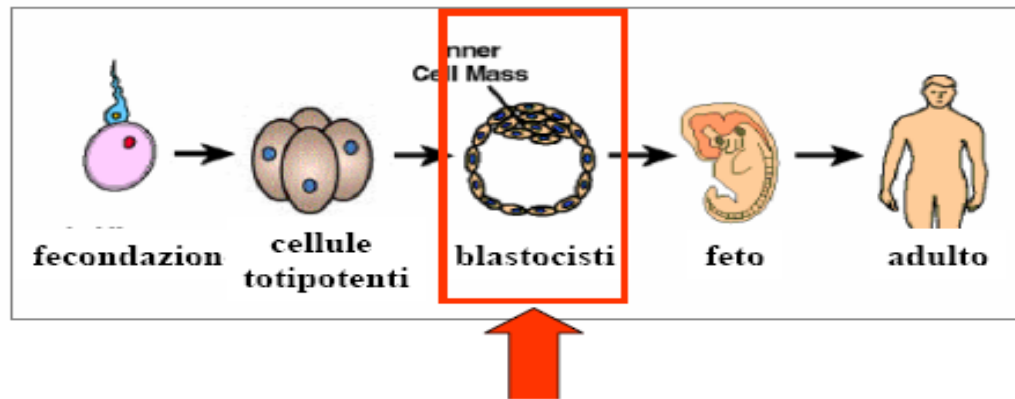
Poiché la ricombinazione omologa è un evento raro se confrontato con la ricombinazione non omologa, sono necessari metodi di screening per selezionare i cloni che hanno integrato il transgene in modo appropriato

Selezione positiva : neomicina (G418)

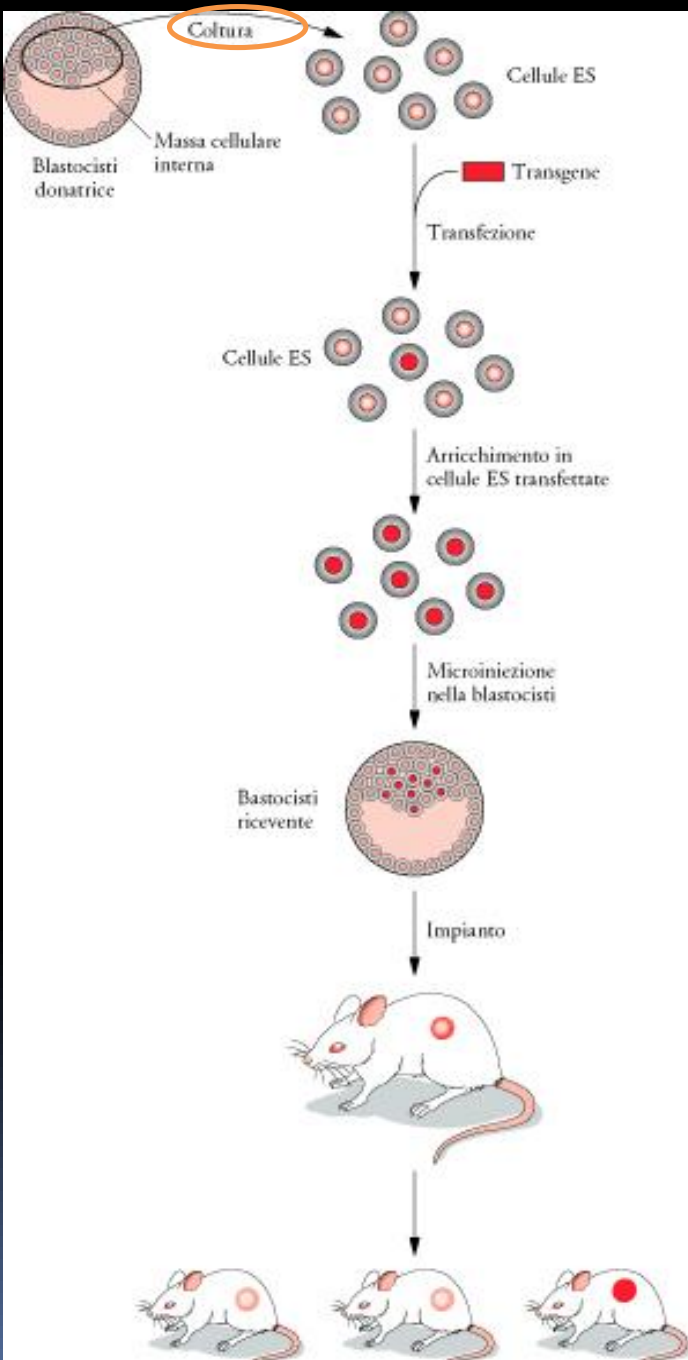
Selezione negativa : HSV timidina chinasi (TK)
(ganciclovir)

CELLULE STAMINALI

Una cellula staminale è una cellula derivata da un embrione, feto o organismo adulto che mantiene in particolari condizioni la capacità di riprodursi e rimanere uguale a se stessa per periodi lunghi o, come nel caso delle cellule staminali adulte, per tutta la durata della vita di un organismo.



Le cellule staminali **pluripotenti** sono in grado di generare tutte le cellule dell'organismo animale, ma NON le cellule extraembrionali (es placenta)

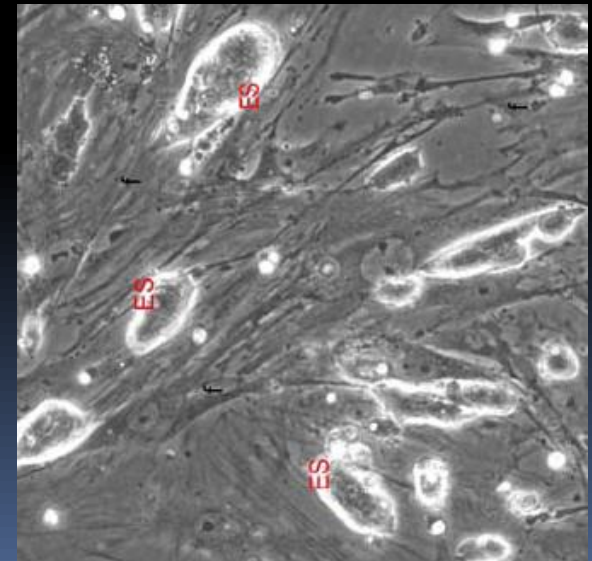


Le cellule staminali embrionali (ES) derivano dalla "massa cellulare interna" (ICM) ed hanno il grosso vantaggio di potere essere espanse quasi indefinitamente *in vitro*. Per essere mantenute indifferenziate e quindi pluripotenti richiedono la coltivazione su un substrato cellulare (**feeder layer di fibroblasti**), che fornisce determinate sostanze (**LIF= leukemia inhibitor factor**) oppure e' necessario fornire queste sostanze nel medium di coltura.

LIF= leukemia inhibitor factor

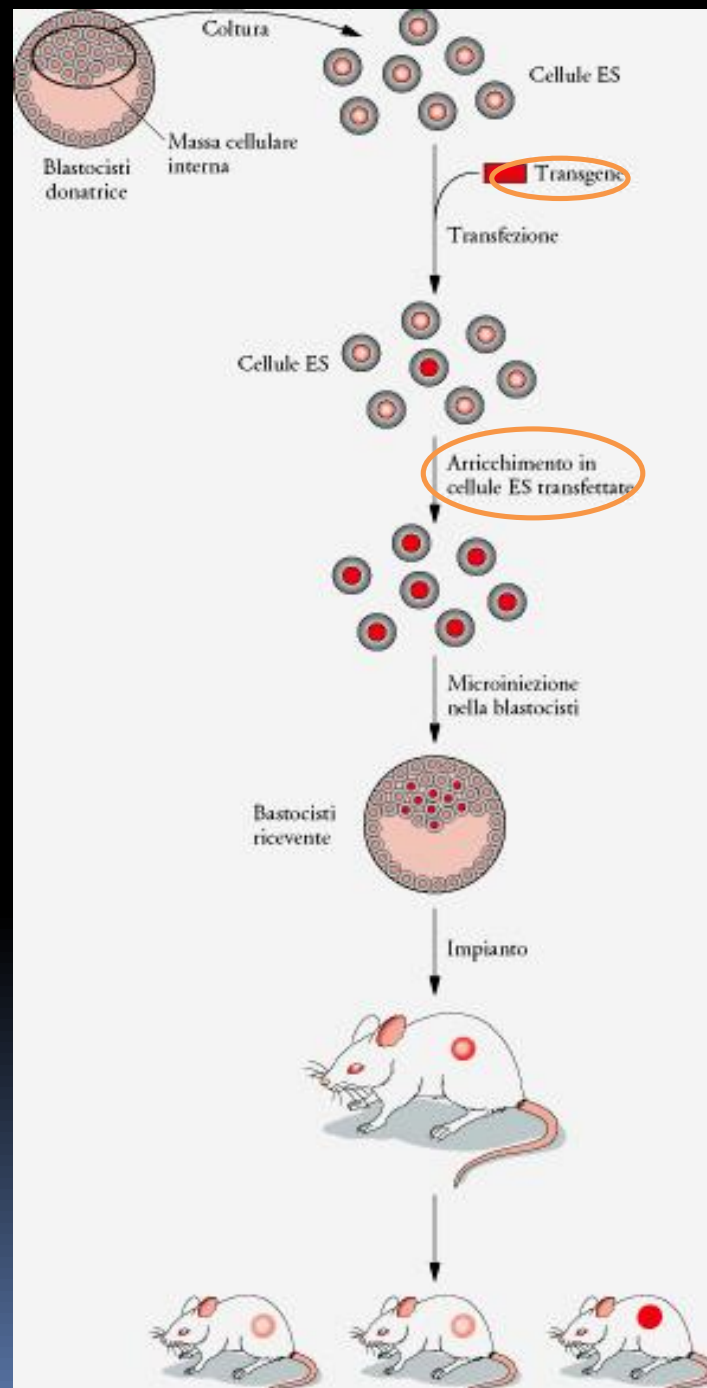
- favorisce la moltiplicazione cellulare
- blocca la differenziazione
- reprime l'apoptosi

Murine ES



Cellule ES pluripotenti possono dare origine a cellule differenziate appartenenti ai tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma, ed ectoderma).

Sono capaci di integrarsi e contribuire ad ogni tessuto anche dopo lunghi periodi in coltura se reintrodotte in un embrione e di colonizzare la linea germinale e quindi dare origine a cellule uovo e spermatozoi.

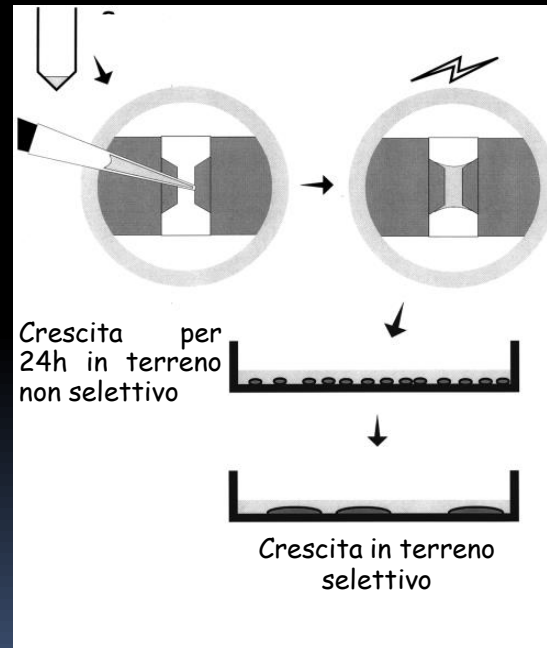


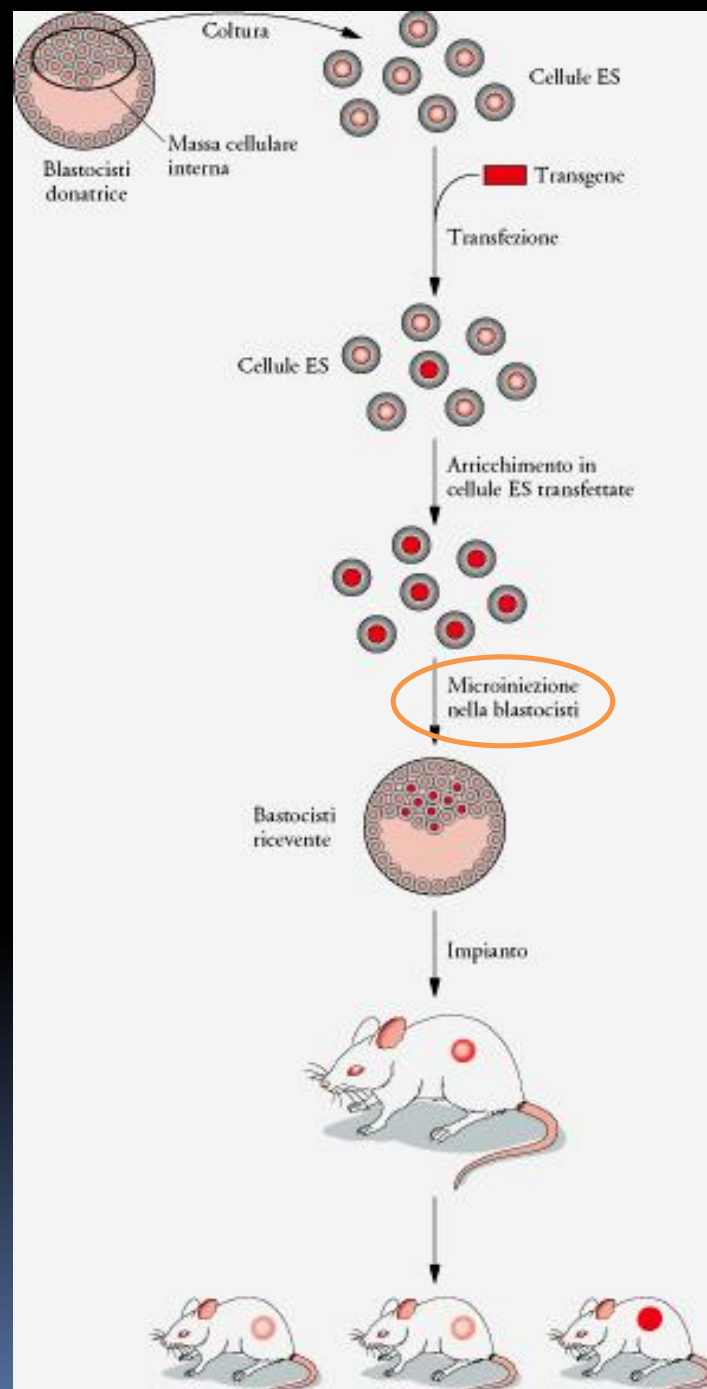
Elettroporazione: scarica elettrica che altera la permeabilità della membrana generando "buchi" e permettendo l'entrata di DNA esogeno

Il numero di passaggi che le cellule staminali devono aver subito prima dell'elettroporazione deve essere tra 10 e 20, possibilmente non superiore a 15



Per l'integrazione stabile, i plasmidi sono linearizzati con opportuni enzimi di restrizione prima dell'elettroporazione.



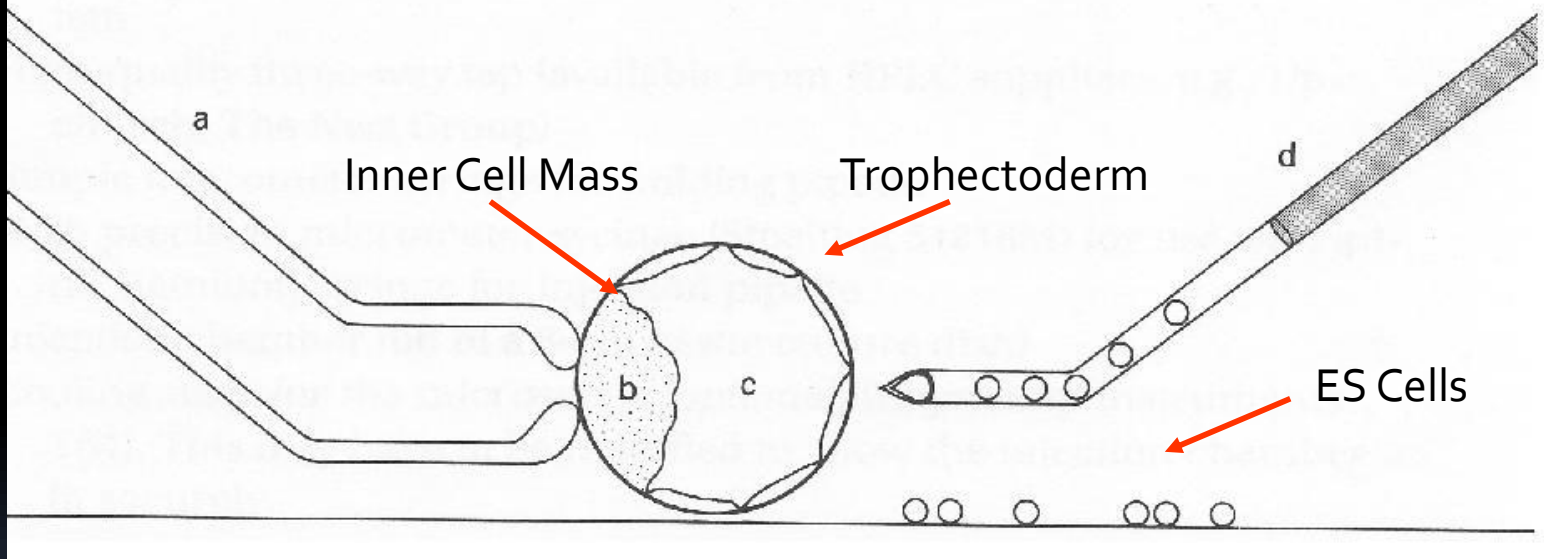


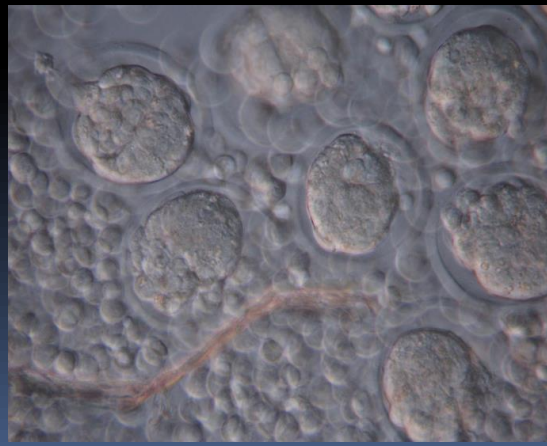
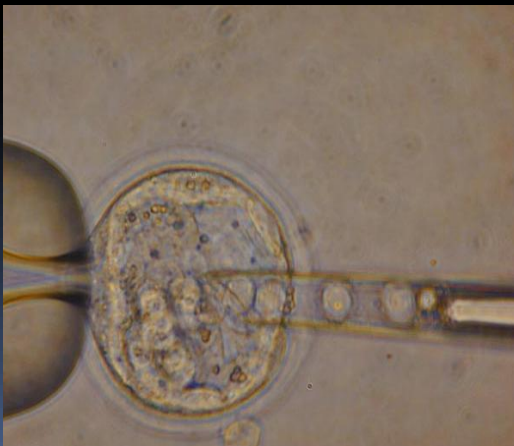
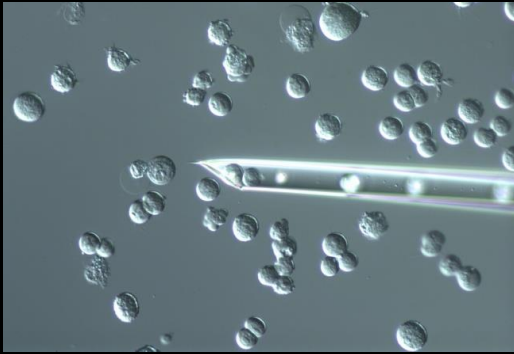
Superovulazione di femmine prepuberi:

- iniezione intraperitoneale di PMSF (Folligon), che mima l'azione dell'ormone FSH, tra le 13.00 e le 14.00 da effettuare 3,5 giorni prima della microiniezione
- iniezione intraperitoneale di hCG (Corulon), che mima l'azione dell'ormone LH, tra le 12.00 e le 13.00 da effettuare 1,5 giorni prima della microiniezione

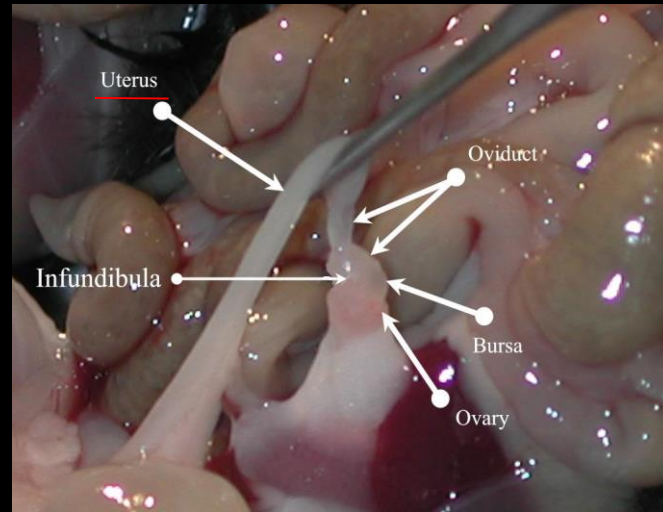
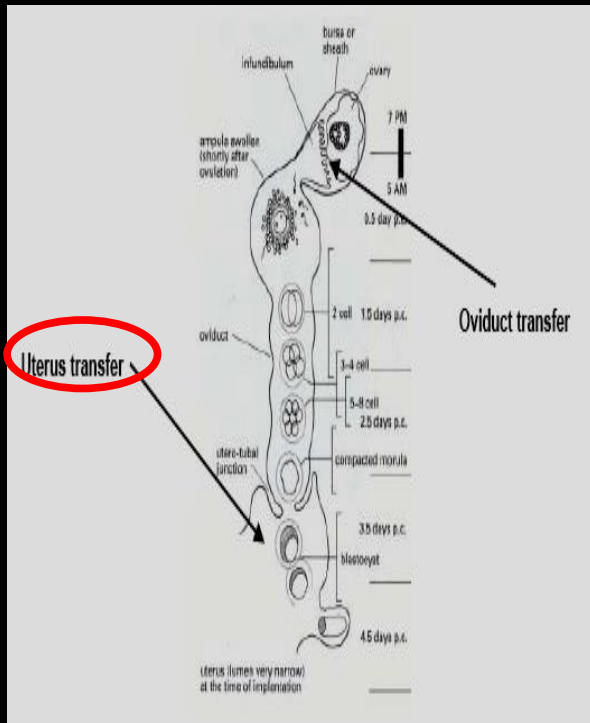


(Hogan, et. Al.)

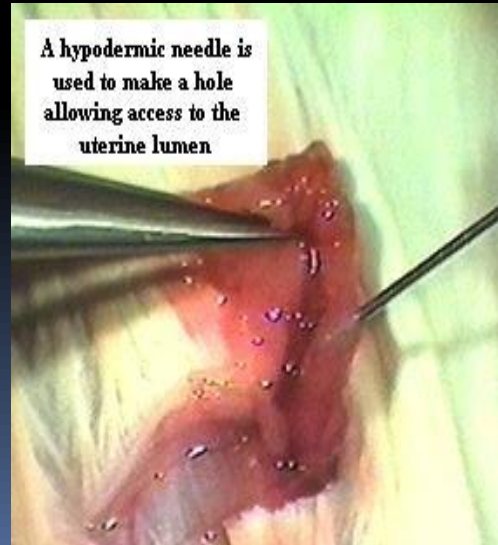




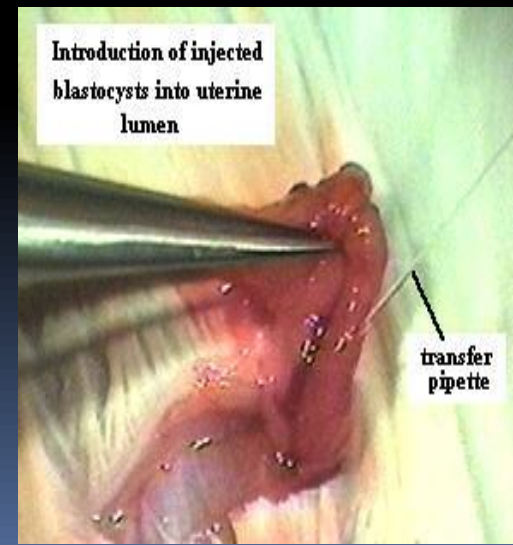
Reimpianto Blastocisti



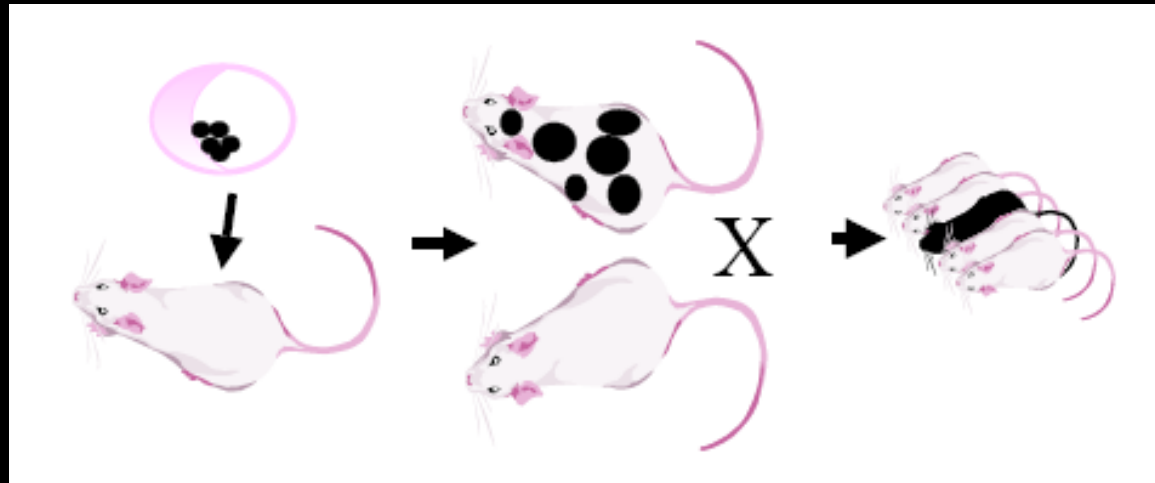
A hypodermic needle is used to make a hole allowing access to the uterine lumen



Introduction of injected blastocysts into uterine lumen



NASCITA DI TOPI CHIMERA



Limitazioni dei metodi classici:

Non sono applicabili a tutti i processi biologici:

- il KO di geni che hanno un ruolo durante lo sviluppo embrionale può portare a fenotipo letale; l'introduzione di geni può portare a letalità embrionale.
- Necessità di limitazioni spazio-temporali dell'espressione del transgene o dell'inattivazione del gene

TRANSGENICI CONDIZIONALI

Sistemi alternativi per ottenere un'inattivazione/attivazione tempo e/o tessuto specifica

I sistemi attualmente sono BINARI (effettore/substrato):

Si dividono in due grandi categorie in base all'effettore:

induttori di silenziamento/attivazione per riarrangiamento (Cre);

induttori di trascrizione senza riarrangiamento (TET).

In entrambi la specificità è data dall'effettore (il substrato viene espresso/KO solo dove c'è espressione dell'effettore).

Sistema TET

Deriva dal sistema di resistenza alla tetraciclina di *E.coli*.

Due componenti:

-tetR recettore che lega la tetraciclina (recettore/repressore):

-TRE (tet responsive element) nel promotore del gene della resistenza alla tetraciclina (Tet-operator)

Situazione fisiologica: in assenza di tetraciclina il recettore si lega al promotore e blocca la trascrizione (repressore trascrizionale).

Esiste in due varianti: TET OFF e TET ON

Sistema TET

Tet OFF: (primo ad essere sviluppato): (tTA-tet controlled transactivator)

I primi 207 AA del recettore legante la tetraciclina (repressore) sono uniti con i 127 AA c-terminali dell'activation domain della proteina VP16 di herpes virus. Il recettore così ottenuto funziona da attivatore e solo in presenza di tetraciclina si blocca la trascrizione.

Tet ON: (rtTA- reverse tet controlled transactivator)

-sono state introdotte 4 mutazioni AA nel repressore: il recettore si lega al TRE solo in presenza di tetraciclina, la cui somministrazione attiva l'espressione genica

Il gene da transattivare deve avere nel promotore le sequenze TRE (tet responsive promoter, es minimal CMV con 7 tet operator).

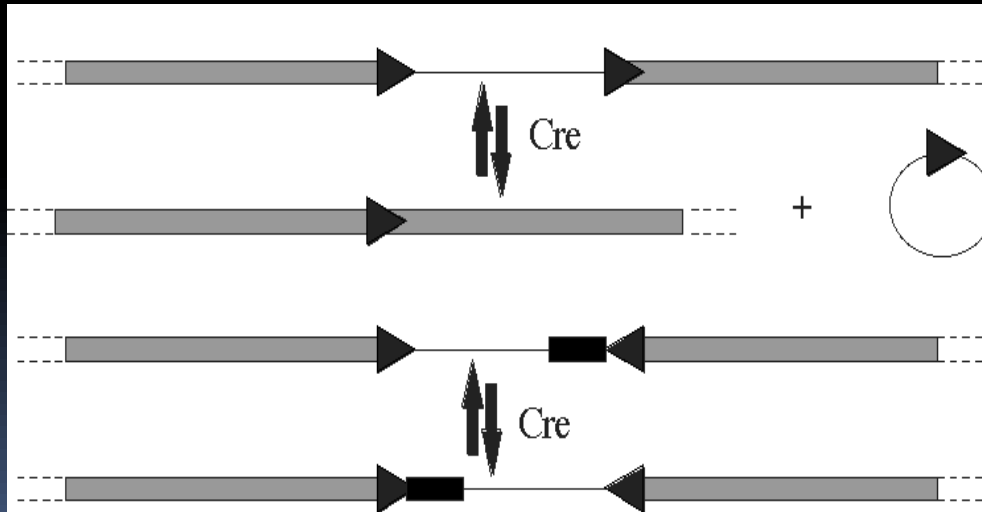
Ricombinasi Cre

Ricombinasi Cre (cyclization recombination): 38 Kd. Derivata dal batteriofago P1 di *E. coli*.

"Substrato": sequenze loxP (34bp). Costituite da un core asimmetrico centrale 8bp, circondato da 13 bp ripetute invertite

loxP

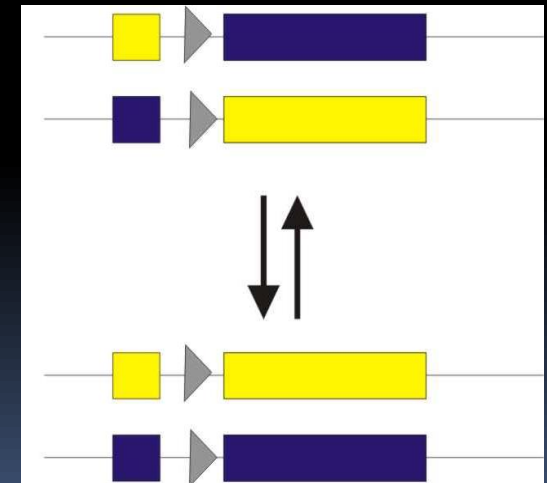
```
5' ATTACTTCGTATAA TGATGCTATACGAAGTTAT 3'  
3' TAATGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATA 5'
```



Escissione

Inversione

Traslocazione

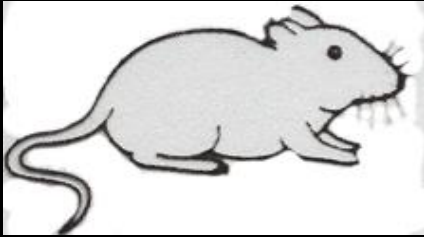


Cre/lox: usi

- Knock-out tessuto specifico:
Transgenico binario: Cre-promotore
tessuto specifico, topo bersaglio con
gene floxed
- Espressione condizionale transgene (RAGE)
Il transgene contiene una floxed stop cassette

Knock out tessuto specifico mediato da Cre

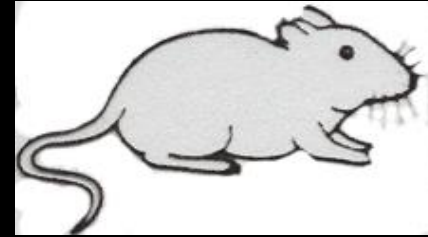
Transattivatore



Transgenico
convenzionale

Cre

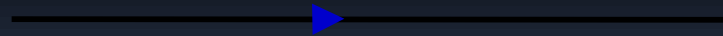
Topo floxato



Topo derivato da ES



Fegato



Delezione del gene nel
fegato

Altrove



Espressione normale

RAGE

-attivazione genica mediata da ricombinazione. Può essere utilizzata per ottenere attivazione genica tempo e tessuto specifica.



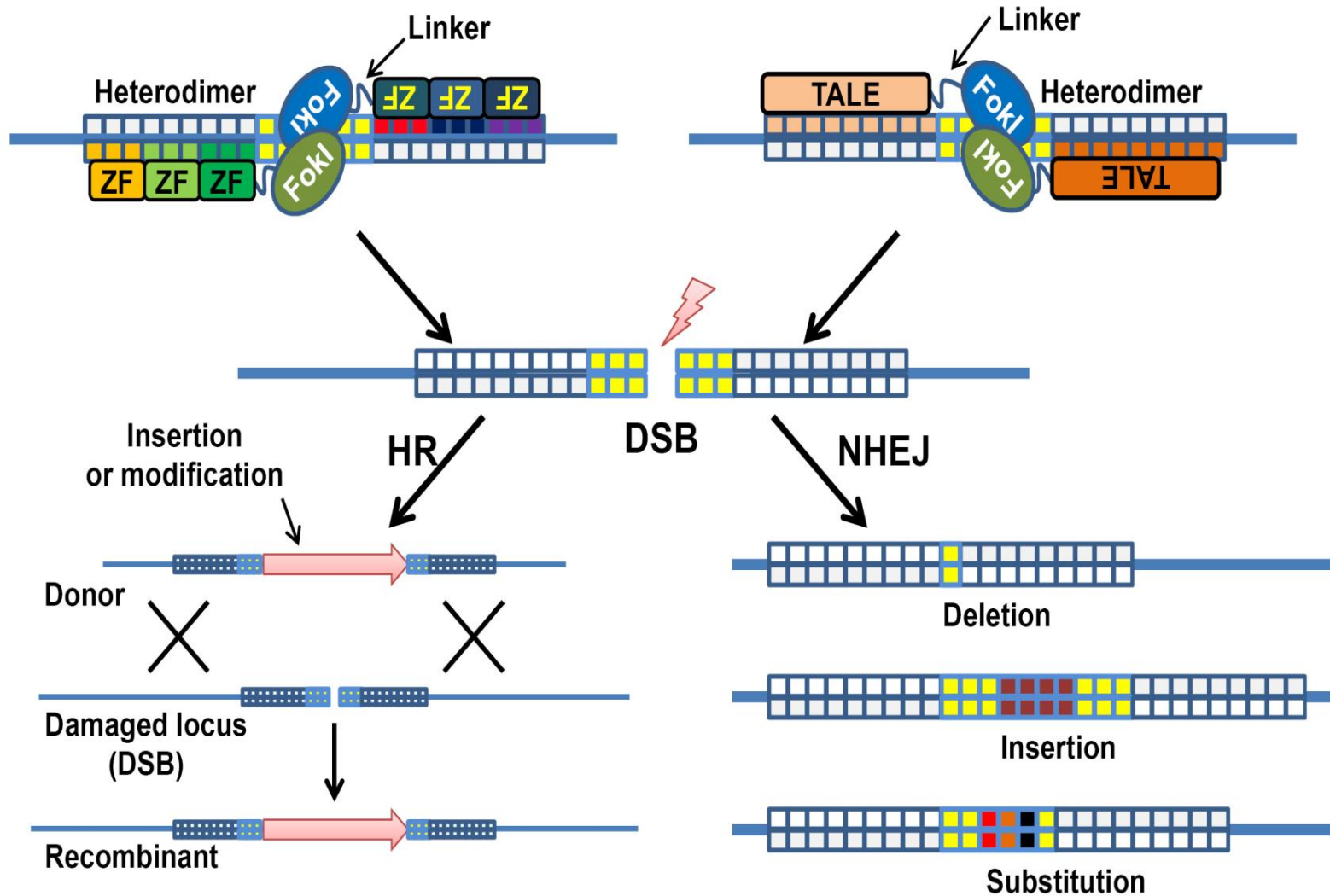
Nuove metodiche in grado di accelerare il processo di modificazione genica

Iniezione diretta di DNA o mRNA di nucleasi sito-specifiche in embrioni allo stadio di una cellula per generare rotture sulla doppia elica di DNA (DNA double-strand break -DBS) in specifici locus.

Zn-finger Nucleases (ZNFs)

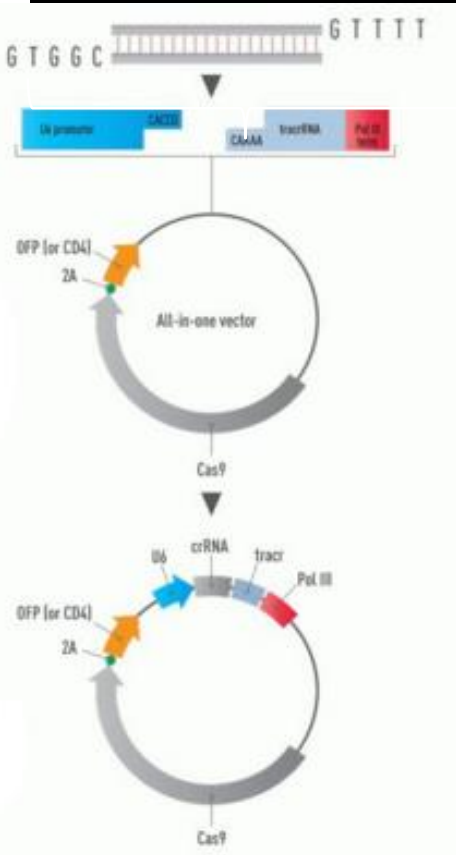
transcription activator-like effector nucleases (TALENs)

CRISPR/Cas (CRISPR associated) systems



CRISPR **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats

1



Gli oligo di DNA codificanti gli specifici crRNA vengono clonati nel vettore che porta la nucleasi *cas9*

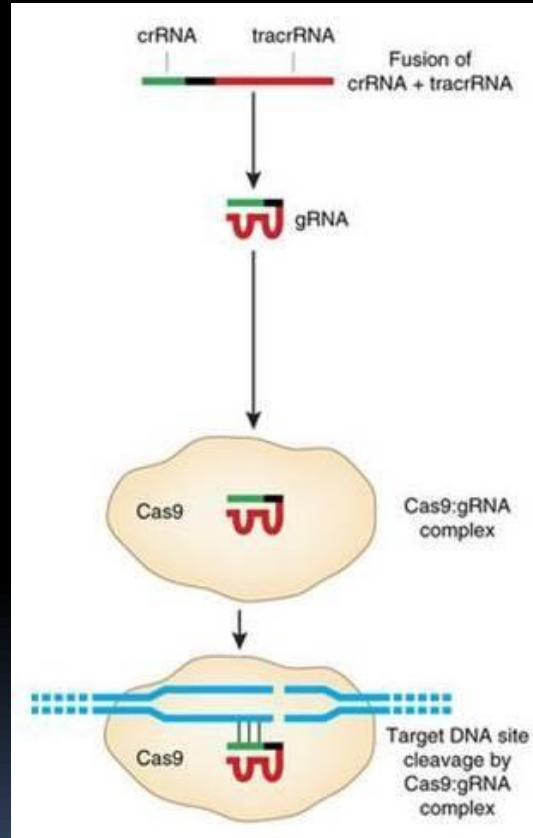
Con questo vettore vengono **trasformati** batteri competenti.

Estrazione del vettore dalle cellule trasformate e analisi tramite **sequenziament**

o

2

Espressione della *cas9* nelle HCT-116, si unisce al gRNA e taglia sul DNA bersaglio



3

Dopo la trasfezione le cellule fluorescenti (esprimenti la proteina *cas9*) vengono separate mediante citofluorimetria

Per ottenere cloni, derivanti ognuno da una singola cellula trasfettata, si effettua una diluizione limite.

Ogni clone verrà analizzato singolarmente per verificare se nel genoma è avvenuta la modifica (silenzimento di hERG)

Trasfezione con i vettori in cellule HCT-116