



**Trasferimento genico in
cellule animali
Manipolazione genetica
degli animali**

La manipolazione genetica degli animali rappresenta una rivoluzione nel campo della genetica molecolare degli ultimi decenni.

Analisi genetiche classiche venivano storicamente effettuate sia in *Drosophila* che in topo, mediante mutagenesi e selezione/caratterizzazione fenotipica.

Per creare Animali Geneticamente Modificati è necessario **modificare il DNA di cellule germinali** così che il DNA esogeno sia poi **ereditato in modo mendeliano**.

Se il DNA esogeno si integra nel cromosoma di un **oocite fertilizzato**, si otterrà già **un organismo geneticamente modificato**;

se l'integrazione cromosomica avviene in seguito, in fase **post-zigotica**, allora si otterrà **una chimera** e solo nella progenie, grazie a cellule germinali trasformate, si isolerà l'organismo geneticamente modificato.

I primi esperimenti di trasferimento di DNA esogeno in animali risale ai primi **anni '80**.

In particolare, due aree di interesse si sono maggiormente sviluppate:

- **Studio della funzione genica**

La possibilità di produrre animali transgenici, sia per inserimento di un gene esogeno, che per delezione/modificazione di un gene endogeno, ha fornito uno strumento molto potente per lo studio della funzione genica.

- **Modelli animali per lo studio di malattie umane**

Questa nuova tecnologia permette di mutagenizzare in modo mirato singoli geni, così da mimare mutazioni in geni umani responsabili di malattie, fornendo una grande opportunità per la caratterizzazione fenotipica/molecolare di molte malattie umane.

Per trasformare cellule animali si possono utilizzare tre diverse strategie:

- o Fisiche**
- o Chimiche**
- o Biologiche**

Applicazioni

- o Analisi dell' espressione e della regolazione genica**
- o Analisi della funzione genica mediante inattivazione inserzionale**
- o Analisi degli effetti da sovraespressione (dosaggio genico)**
- o Analisi di dominanti negativi per studio di funzione**
 - o Modelli animali di malattie umane**

Transfection Methods:

physical, chemical and biological

Physical transfection methods

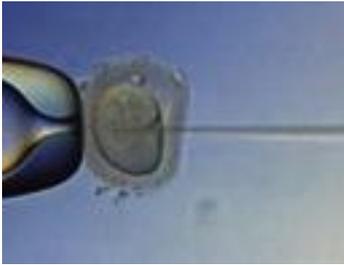
Microinjection, optical transfection, **Particle gun** (biolistic gene delivery), **Electroporation**, **Laser transfection**, Sonoporation, Magnetofection, Electric field-induced molecular vibration.

The first two examples are methods where usually **only one single cell is transfected at a time**

A particular interesting concept of physical transfection is **laser-mediated transfection**. This can be a **direct membrane perforation**, taking advantage of nanoparticles or using wave-guided optical waveguides (WOW). The idea is to use μ Tools that can be moved and navigated by the use of laser beams

A further advantage is that **physical transfection does not depend on particular chemical or biological cell properties** and therefore **cells that are difficult to be transfected** by other methods, like cells of the immune system, **can be successfully manipulated** by physical transfection approaches.

Methods that can be applied to cell suspensions, for ex. electroporation, are particularly popular.

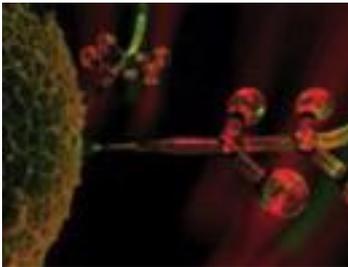


Microinjection

Direct injection of the genetic information into the nucleus of the target cell under microscopic control

Pro: Most direct transfection; high yield of success

Contro: very limited number of transfected cells, more difficult on small cells



Wave-guided optical wave (WOW) by μ Tools

μ Tools can be manipulated by laser beams and thermoperforate the cell by laser energy delivered to the tail of the μ Tools and wave-guided to its tip

Pro: Versatile tool with high potential for special requirements

Contro: Technical demanding; only available in specialized labs

Trasferimento nucleare per microiniezione

Le femmine sono “superovulate” (produzione di 35 ovuli i rispetto a 5-10), con gonadotropina

✓ Sono incrociate con maschi fertili, e le uova fecondate recuperate

✓ Nei mammiferi, dopo l’ingresso dello spermatozoo nell’uovo, il nucleo maschile (pronucleo) e quello femminile rimangono separati. Dopo che il nucleo femminile ha completato la meiosi (pronucleo), allora avviene la fusione nucleare

✓ Il DNA esogeno (transgene), è microiniettato nel pronucleo maschile che è più grande

✓ Dopo l’inoculazione si impiantano microchirurgicamente 25-40 uova in una madre adottiva, resa pseudogravida da accoppiamento con un maschio vasectomizzato

Trasferimento nucleare per microiniezione

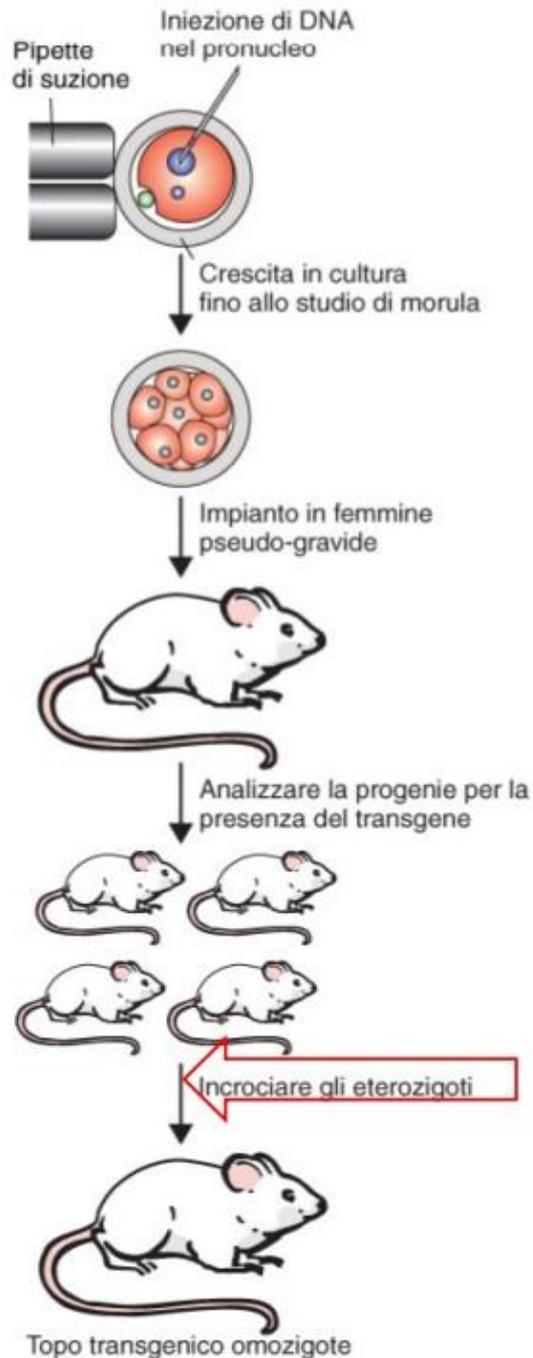
Tale procedura è stata ampiamente utilizzata e presenta vantaggi e svantaggi.

Vantaggi

- ✓ Il DNA esogeno è iniettato **in forma lineare e privo di vettore procariotico** (No clonaggio!!)
- ✓ Possono integrarsi nel genoma **più copie**, in posizioni diverse e casuali

Svantaggi

- ✓ La tecnica non permette di fare knock out gene-specifico
- ✓ L'espressione del transgene è fortemente influenzata dal contesto cromosomico in cui avviene l'inserzione (**sito casuale**)
- ✓ Il livello d'espressione del transgene può variare nelle generazioni successive a seguito di **modificazioni epigenetiche**
- ✓ I topi transgenici possono essere **“a mosaico”** in cui l'espressione del transgene è limitata a diversi tessuti/organi (**se l'integrazione avviene dopo la prima divisione cellulare**)



Le cellule sono coltivate per diversi cicli e l'embrione viene poi impiantato in una femmina pseudogravida. Assumendo che il transgene si integri prima della prima divisione cellulare, la prole sarà eterozigote per il transgene. Nella fase successiva si effettua un reincrocio con un topo selvatico e nella progenie si isolano topini omozigoti per il transgene

Chemical transfection methods

Catalyze DNA cross-membrane transport through the use of Ca²⁺ phosphate, **polycations** or **dendrimers**.

Transfection with Ca²⁺ phosphate is one of the less expensive methods and is therefore still applied, whenever large amounts of cells need to be transfected simultaneously, for example, for the production (and later purification) of particular proteins. The method is effective with many different cultured cell types.

Biological transfection methods

Viruses Vettori retrovirali, Vettori adenovirali



Lipofection

Vesicles of **cationic lipids** bind to DNA and **positively charged complexes** bind to the cell surface followed by uptake into the cells

Pro: Simple and fast procedure with high reproducibility

Contro: Not suitable for most primary isolated cells

Dendrimers

Positively charged dendrimers bind with the negatively charged phosphates of the DNA molecule (electrostatic) and the DNA-**dendrimer complexes with a positive net charge** are taken up by the cell

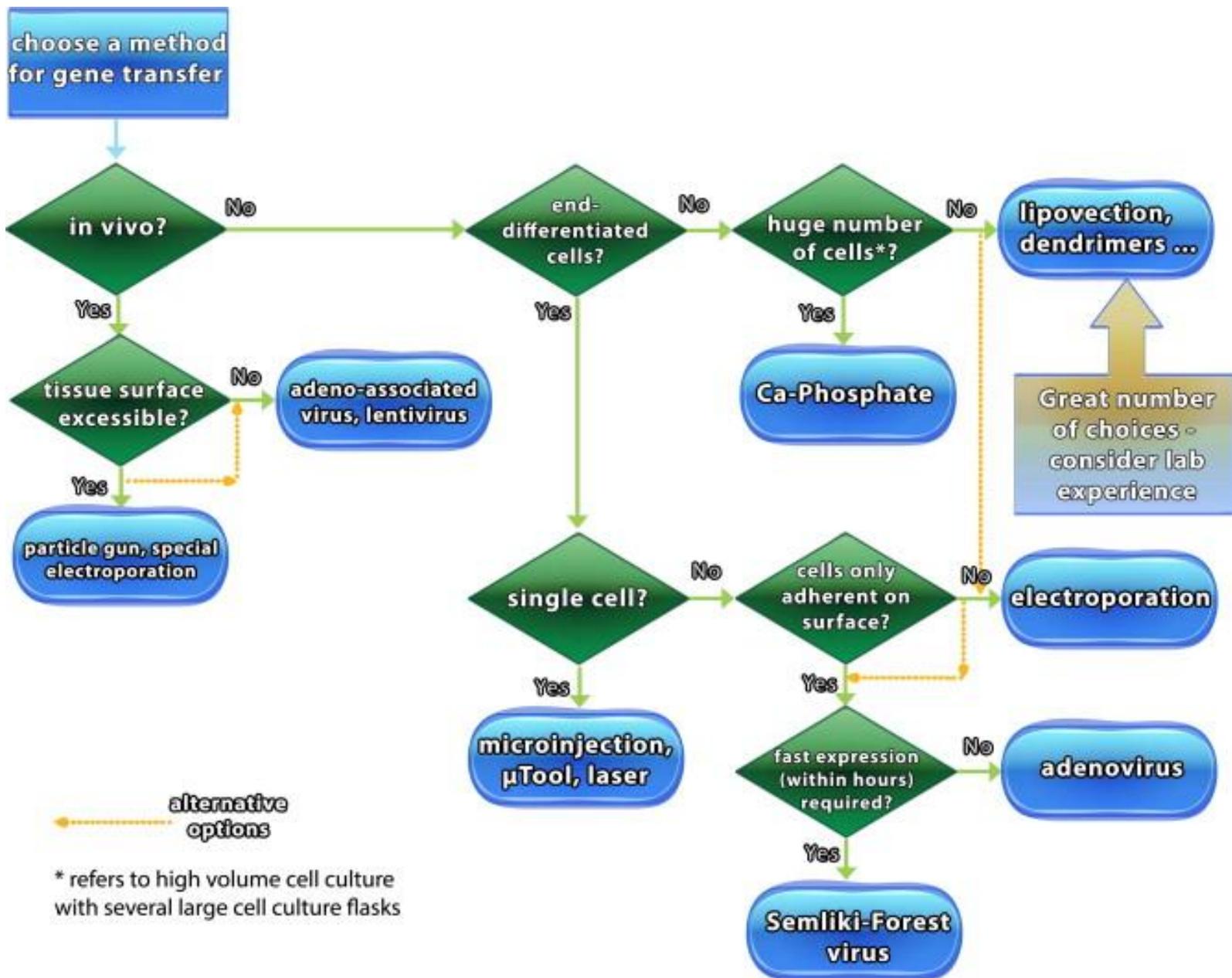
Pro: No or low cytotoxicity; high efficiency in numerous cell lines

Contro: Not suitable for most primary isolated cells



I dendrimeri sono molecole che contengono una serie di ramificazioni che si estendono da un nucleo centrale, generalmente presentano diverse copie dello stesso gruppo funzionale al termine delle ramificazioni.

La parola Dendrimer deriva dal greco Dendron "che significa "albero".



Flow chart of a guideline for selecting a method for gene transfer into eukaryotic cells

Vettori retrovirali

Tra le varie strategie, quella basata sull'uso di vettori retrovirali, presenta il vantaggio di costituire un mezzo efficace per **integrare il transgene nel genoma della cellula ricevente**. Questi vettori però possono trasferire soltanto **piccoli tratti di DNA (~ 8kb)**.

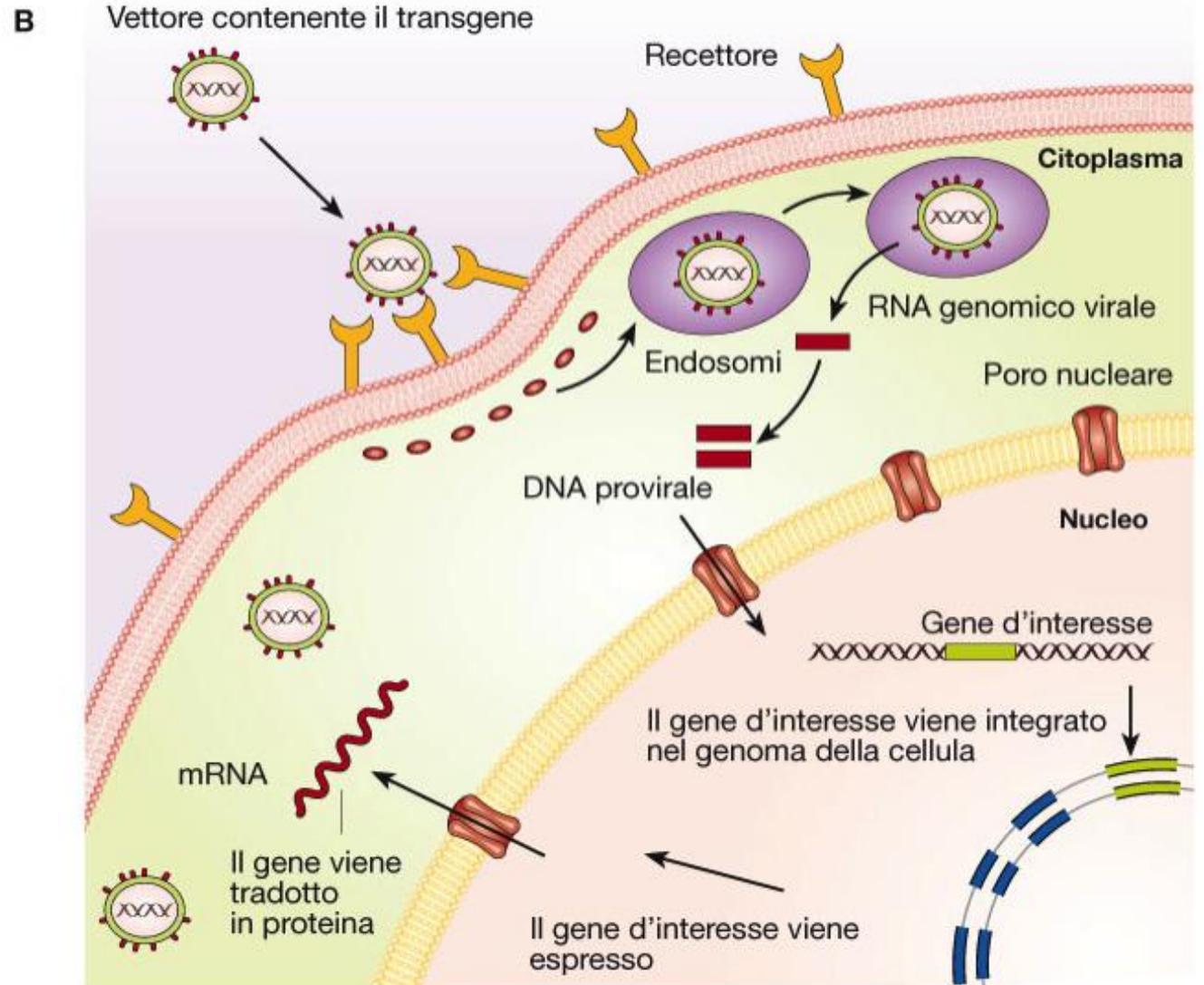
I vettori retrovirali sono virus a RNA che possiedono una funzione di trascrittasi inversa, capace di sintetizzare una forma di DNA complementare che può integrarsi nel DNA genomico

I sistemi virali più utilizzati includono il **retrovirus MoLV (Moloney Leukemia Virus)**, il **Semliki-Forest Virus**, i **lentivirus**

Semliki-Forest virus: rapida espressione del transgene (poche ore)

Lentivirus: espressione del transgene dopo circa una settimana, ma persiste per qualche mese.

Struttura di un vettore retrovirale



Meccanismo di infezione ed integrazione

VETTORI LENTIVIRALI

Caratteristiche:

- virus a RNA;
- enzima trascrittasi inversa permette di sintetizzare un DNA complementare;
- mediano il trasferimento e l'espressione di geni eterologhi (transgeni) in una varietà di cellule;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 8kb.



Vantaggi:

- permettono espressione a lungo termine del transgene;
- possono mediare il trasferimento genico in cellule non in attiva replicazione, ad es.: cellule staminali, linfociti, cellule nervose e dendritiche;
- applicabili a terapia genica *in vivo*.

Svantaggi:

- lunghezza dell'inserto limitata a 8Kb;
- difficoltà nel produrre particelle di vettore stabile ad alto titolo;
- probabilità di attivare o inattivare sequenze di DNA endogeno localizzate vicino al sito di integrazione del DNA provirale;
- genoma dei lentivirus è più complesso di quello dei retrovirus.

VETTORI RETROVIRALI

Caratteristiche:

- virus a RNA;
- enzima trascrittasi inversa permette di sintetizzare un DNA complementare;
- capacità di integrazione del DNA complementare in quello cromosomico;
- veicolano inserti di DNA lunghi sino a 8kb.



Vantaggi:

- DNA integrato in modo stabile anche nella progenie cellulare permette una terapia genica a lungo termine;
- applicazione in tumori di tessuti non proliferanti dove solo cellule cancerogene sono in attiva replicazione consentendo una infezione selettiva rispetto al tessuto circostante.

Svantaggi:

- non applicabile a terapia genica *in vivo* per clearance virale da parte del sistema immunitario;
- bassa produzione;
- infettano solo cellule in attiva replicazione non adatti nelle patologie con tessuti con replicazione cellulare ridotta o nulla (es. tessuto nervoso).

I vettori lentivirali disponibili oggi contengono **meno del 10% del genoma virale** iniziale:

- presenti le sequenze necessarie a retrotrascrivere, trasferire ed integrare la cassetta di espressione nelle cellule bersaglio
- assenti i geni per le proteine virali patogene
- inattivazione del promotore virale originale presente nelle LTR

I vettori lentivirali hanno dimostrato una buona efficienza di transfezione sia in vitro sia in vivo, affiancando alle qualità dei vettori basati su oncoretrovirus la **capacità di transfettare cellule non in attiva proliferazione**, come ad esempio gli epatociti e le cellule muscolari.

Il vettore viene trasferito all'interno della cellula bersaglio dopo interazione con un recettore e attraversamento della membrana plasmatica per endocitosi.

Il genoma a RNA del retrovirus viene retrotrascritto nella cellula ospite e da origine al provirus. Il DNA provirale entra nel nucleo e **si integra nel genoma della cellula infettata**

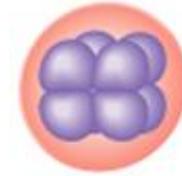
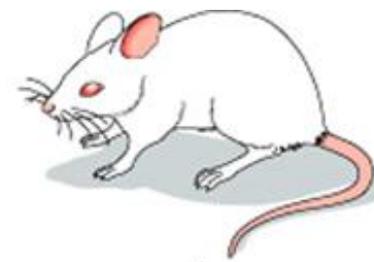
Uno svantaggio dei vettori retrovirali è rappresentato dal fatto che **l'integrazione nel genoma avviene in modo non controllato** e questo può comportare fenomeni di **mutagenesi inserzionale**. Può infatti accadere che il vettore si inserisca all'interno di un gene cellulare essenziale, determinandone la perdita di funzione e provocando la morte della singola cellula. Può anche accadere che il vettore si inserisca all'interno di geni oncosoppressori, inattivandoli, oppure in prossimità di protooncogeni, alterandone i profili di espressione e potenzialmente attivandoli quando non dovrebbero esserlo. In uno di questi ultimi due casi, la cellula contenente quella specifica integrazione potrebbe acquisire un vantaggio proliferativo sulle altre e dare origine a una popolazione cellulare espansa più prona alla trasformazione tumorale.

Produzione di topi transgenici mediante vettori retrovirali.

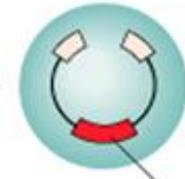
Si infettano gli embrioni nello stadio di divisione (a 8 cellule), con un retrovirus difettivo in cui è clonato il transgene.

Le femmine che hanno subito l'impianto generano dei transgenici. Si effettuano gli accoppiamenti per stabilire quali piccoli portino il transgene nella propria linea germinale.

Femmina donatrice



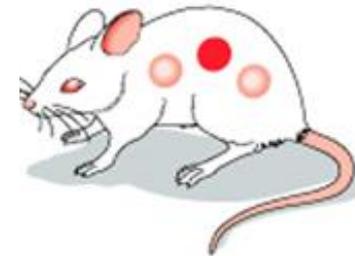
Embrione a 8 cellule



retrovirus

transgene

Femmina che ha subito l'impianto

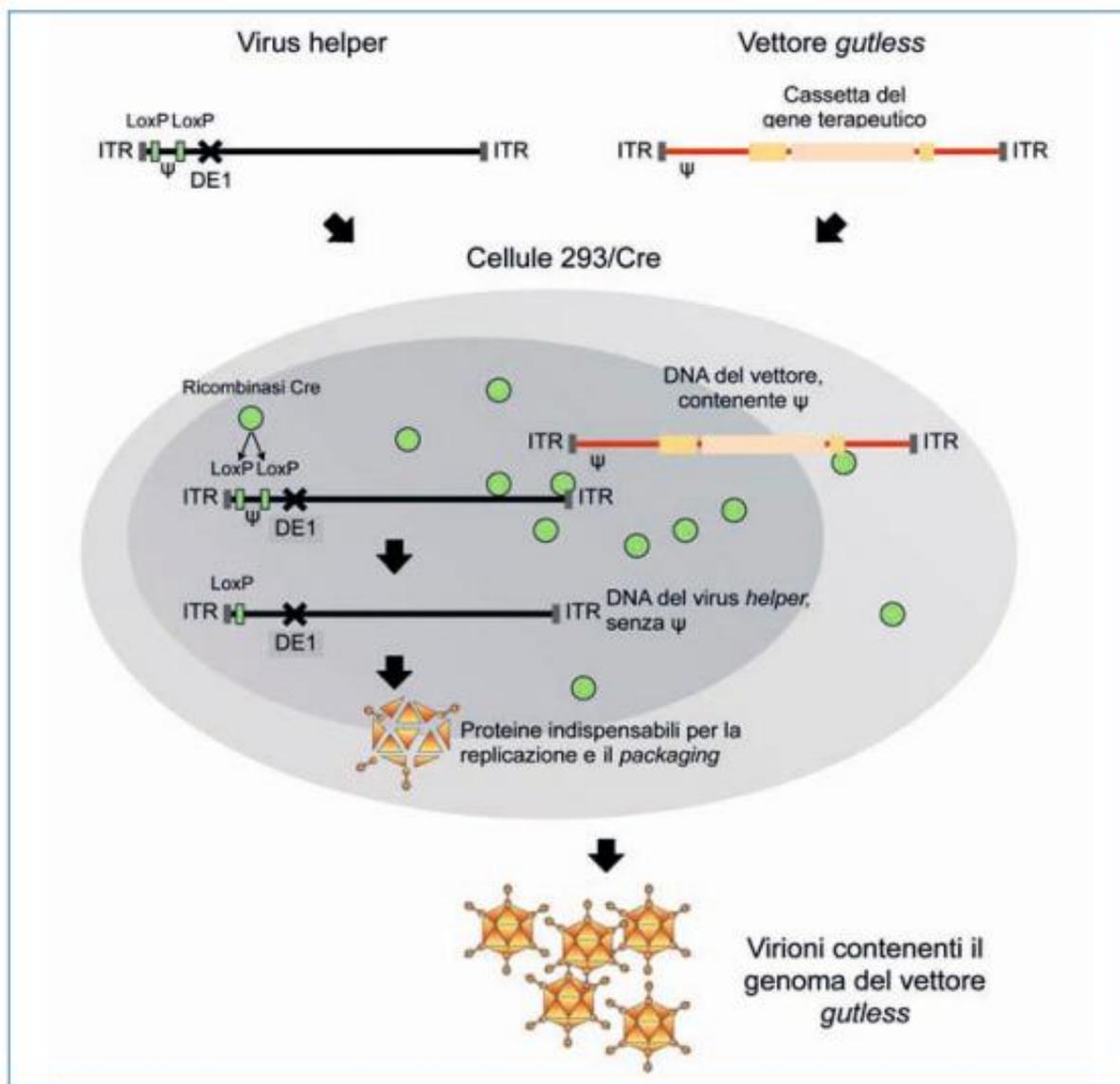


topo transgenico

Vettori adenovirali

Gli adenovirus hanno genoma a DNAds, di 36 kb nel caso di Ad2 e di Ad5, che porta alle proprie estremità due sequenze ripetute identiche, ITR; queste regioni fungono da origini di replicazione del DNA virale. Il genoma contiene: 5 unità trascrizionali precoci, 2 unità trascrizionali precoci tardive; 1 unità maggiore tardiva (major late, ML). Tutte trascritte dall'RNA polimerasi II

I vettori adenovirali di 3° generazione sono caratterizzati da delezione completa del genoma di adenovirus per fare posto al DNA esogeno, con l'eccezione delle ITR e del segnale di packaging ψ . **Questi vettori vengono definiti “gutless” (“eviscerati”) o “helper-dependent”,** in quanto la loro replicazione dipende interamente dalla co-infezione delle cellule in cui avviene il packaging da parte di un vettore helper che fornisce in trans tutte le proteine indispensabili; sono “high capacity” (HC), in quanto essi possono contenere fino a 37 kb di DNA esogeno **(analogia con il sistema vettore Ti disarmato-vettore binario)**



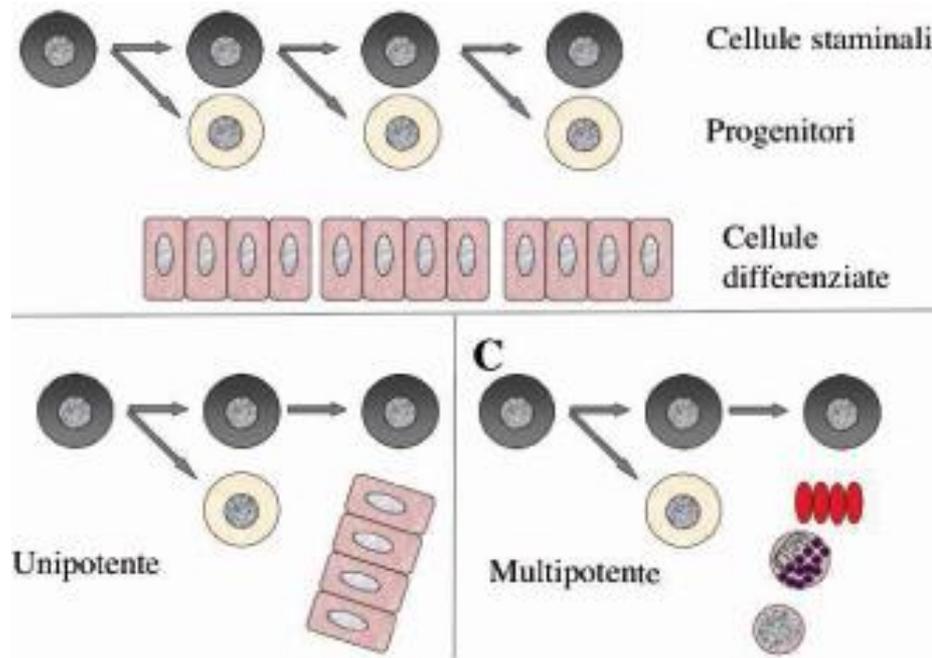
Produzione dei vettori adenovirali *gutless*. I vettori sono prodotti nelle cellule 293/Cre trasfettate con il DNA linearizzato del vettore *gutless* e con **un vettore helper adenovirale in cui la regione ψ è fiancheggiata da due siti loxP**. **All'interno delle cellule, la ricombinasi Cre rimuove la regione ψ dal genoma del vettore helper**, prevenendo quindi la sua incorporazione nei virioni e consentendo l'incapsidazione selettiva del DNA del vettore *gutless*

Cellule staminali

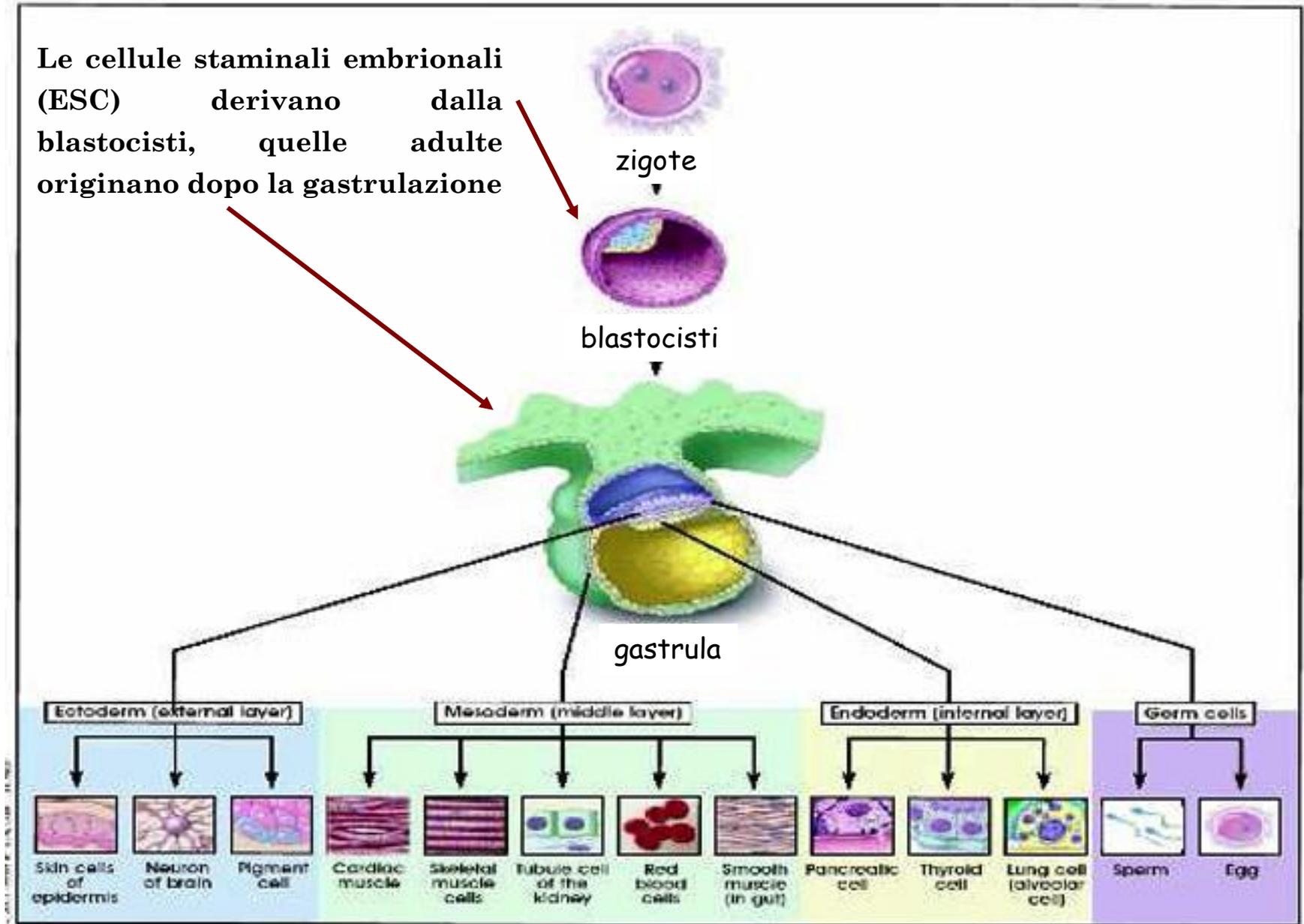
Cellule che abbiano la capacità di differenziare in cellule adulte, come l'**oocita fertilizzato** in quanto totipotente. Altra classe di cellule target sono le **cellule staminali embrionali (Embrionic Stem Cells, ESC)**, derivate dalle prime fasi embrionali.

Stem Cells

“una cellula che si divide dando origine a due cellule diverse tra loro: una cellula figlia è uguale alla cellula madre (staminale), mentre l'altra cellula figlia è diversa (progenitore), non può più dividersi indefinitamente e la sua progenie si differenzierà in un solo tipo (unipotente) o in più tipi (multipotente)



Le cellule staminali embrionali (ESC) derivano dalla blastocisti, quelle adulte originano dopo la gastrulazione

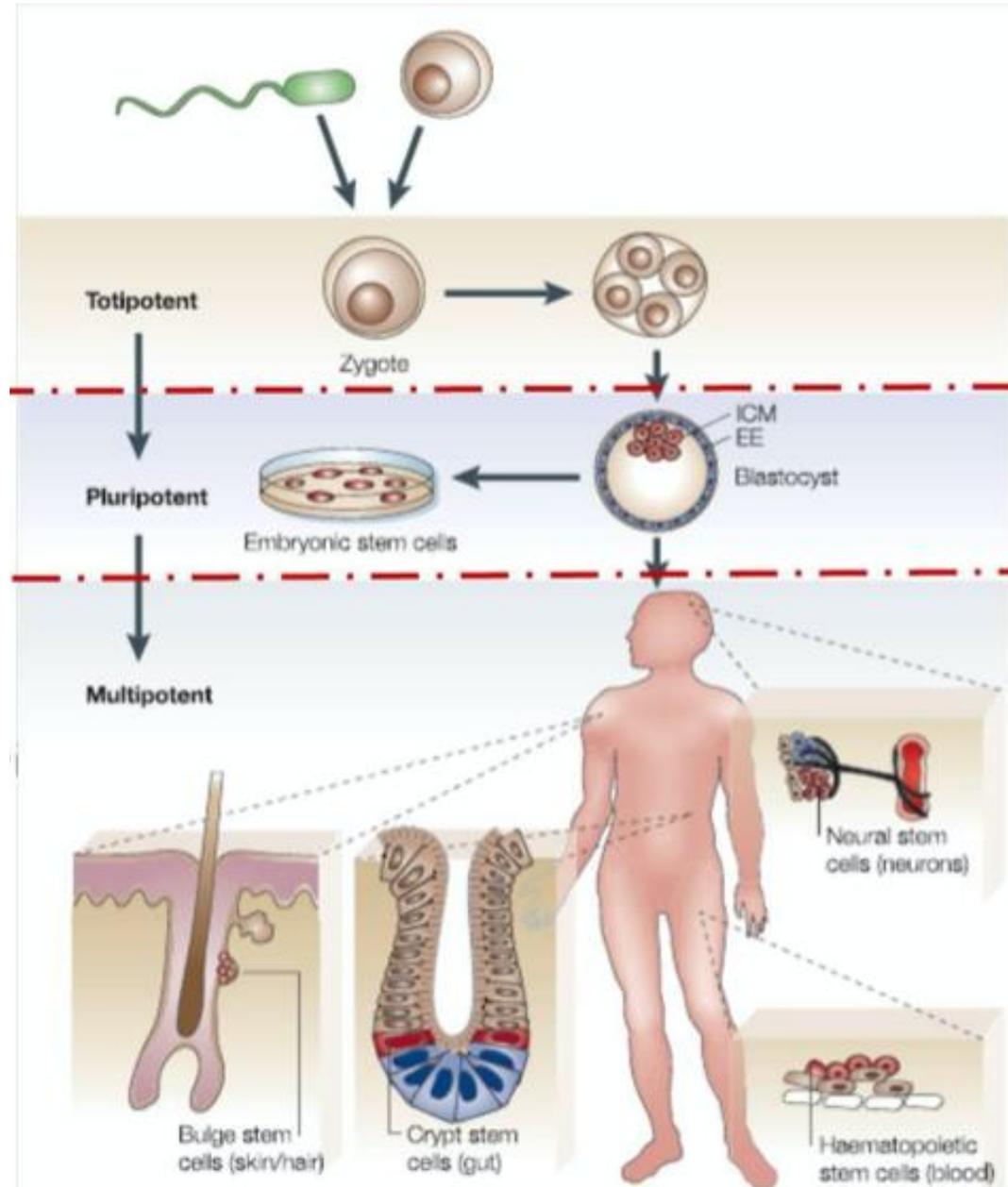


Totipotent: possono dare origine ad un intero organismo, cioè differenziarsi in tutte le cellule dell'organismo **incluse** cellule della placenta e del cordone ombelicale (zigote e blastomeri)

Pluripotent: **non** possono dare origine ad un intero organismo, cioè possono differenziarsi in tutte le cellule dell'organismo **escluse** cellule della placenta e del cordone ombelicale

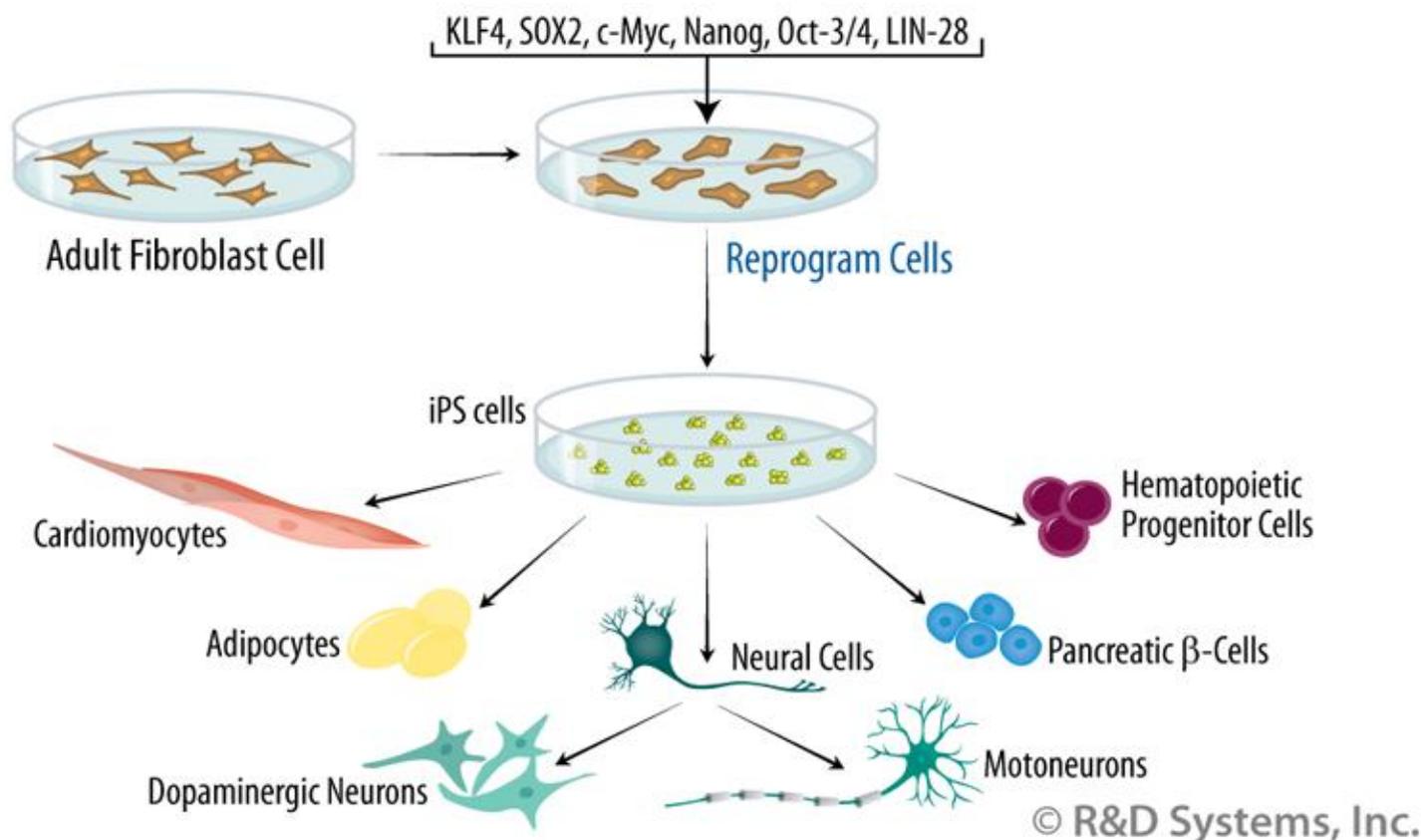
Multipotent possono differenziare in tipi cellulari diversi ma con precursori comuni.

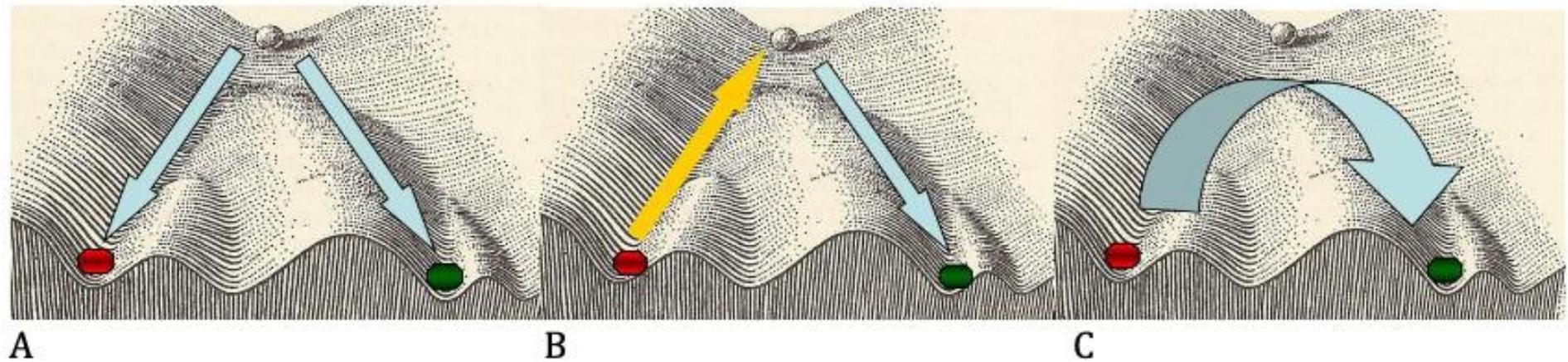
Unipotent possono differenziarsi in un solo tipo cellulare



Induced Pluripotent Stem Cells

Nel 2006 sono state generate le “induced Pluripotent Stem Cells” (iPS). Al contrario delle cellule staminali adulte ed embrionali le iPS non esistono in natura, ma sono generate artificialmente in laboratorio. Si parte da una qualsiasi cellula, generalmente un fibroblasto. Si inseriscono 4 geni detti anche “**Yamanaka factors**” (Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012) e la cellula si trasforma in una cellula staminale pluripotente sostanzialmente identica ad una ESC

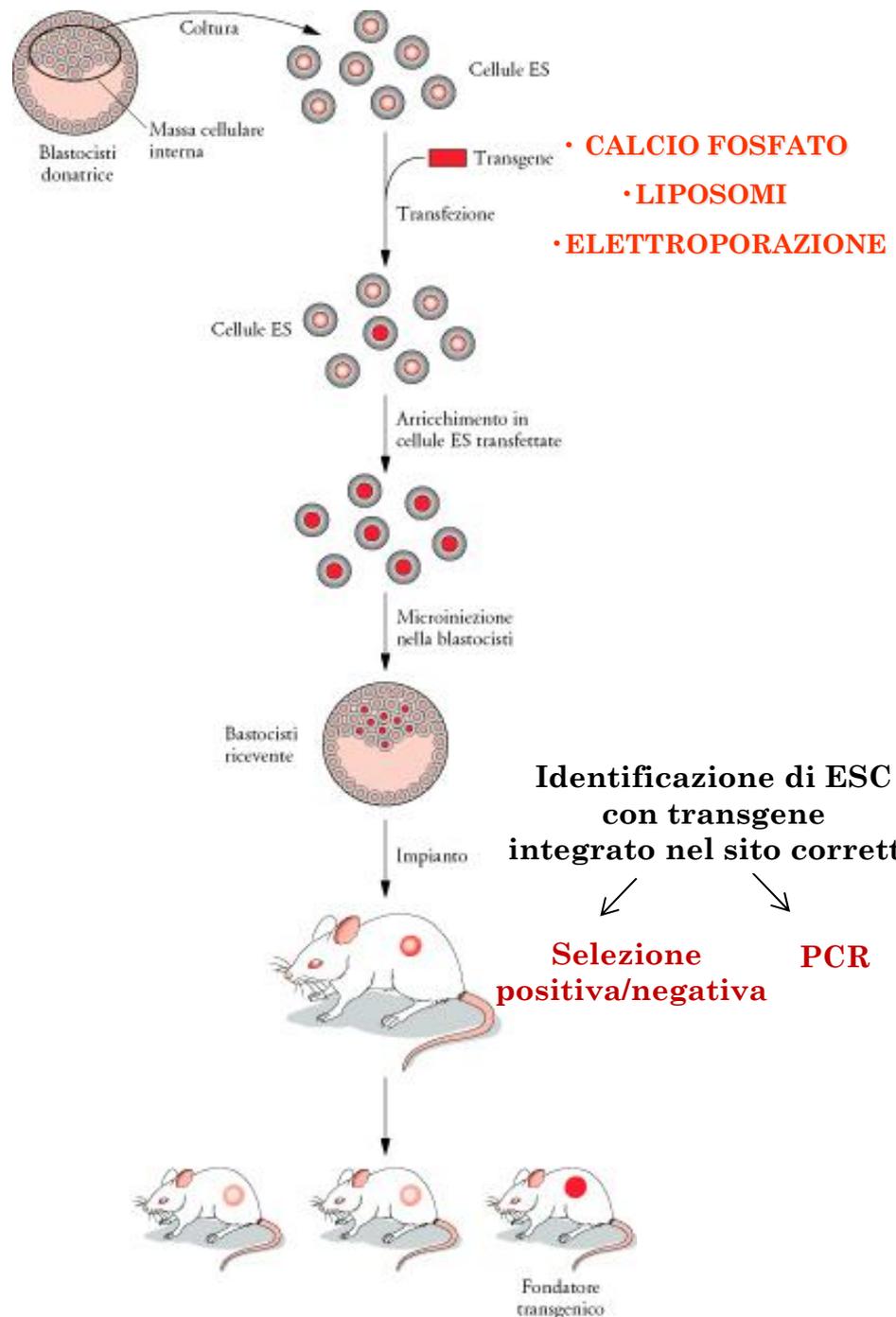
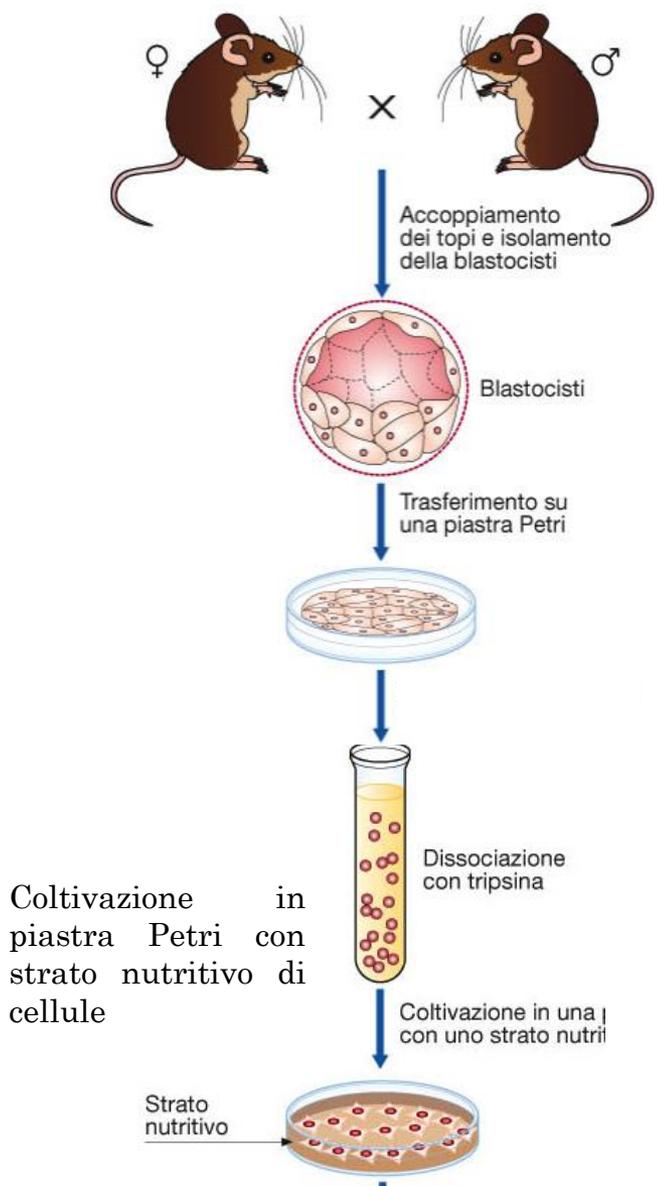




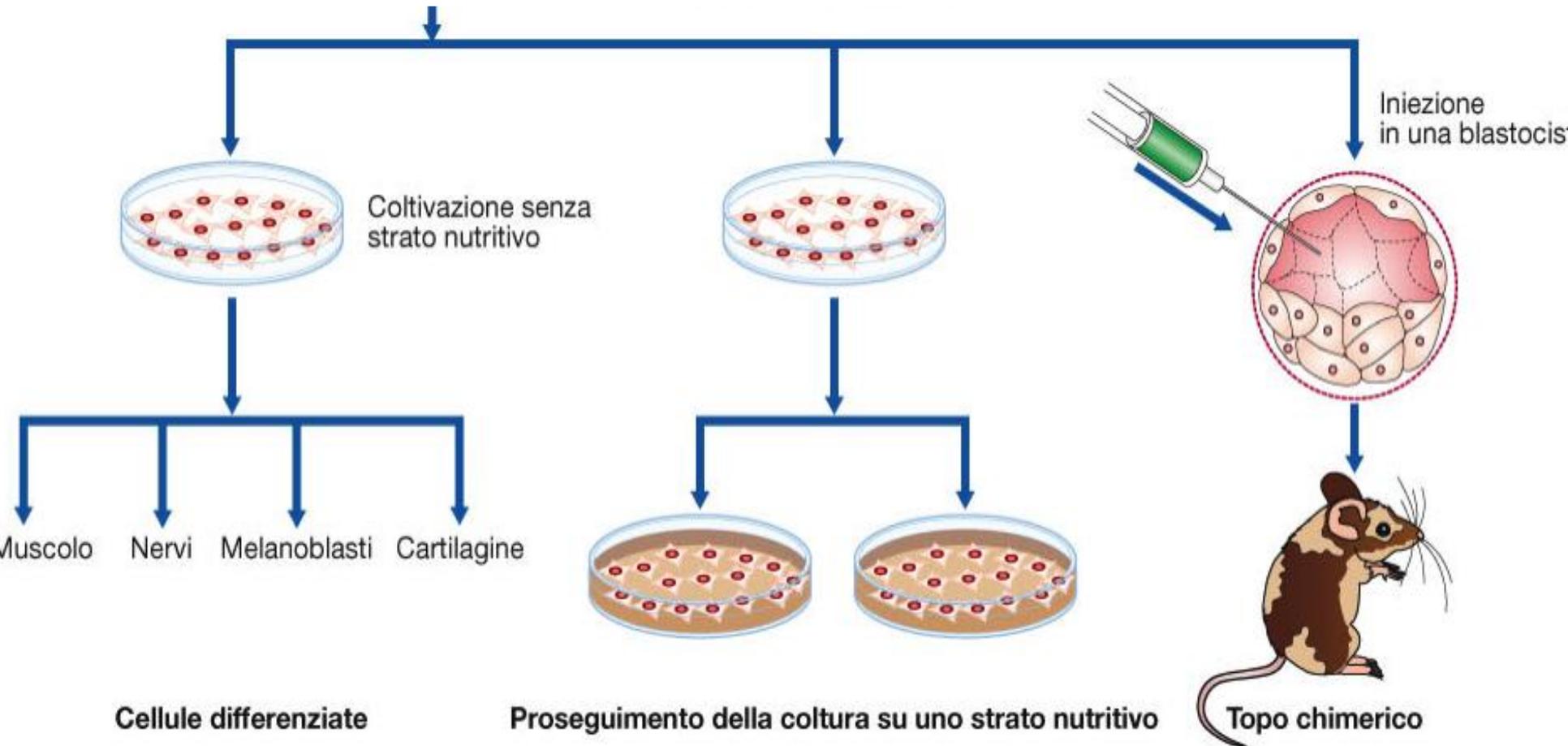
Come funzionano i diversi tipi di cellule staminali pluripotenti. (A): le **ESC** partono dallo stadio indifferenziato, tipico appunto degli embrioni, e possono dare origine a tutti i tipi cellulari del nostro corpo. (B): le **iPS** invece partono da una cellula adulta e differenziata, vengono riprogrammate ritornando allo stadio embrionale e poi si possono differenziare nuovamente in un altro tipo cellulare. (C): La **conversione diretta** consente di trasformare un tipo cellulare in un altro senza passare dallo stadio indifferenziato di tipo embrionale.

Metodo delle ESC

In coltura le ESC si possono manipolare geneticamente **senza alterarne la totipotenza**. Con tale sistema è possibile integrare un transgene funzionale in un sito specifico. Poi si **potrà selezionare, coltivare e utilizzare le cellule modificate geneticamente per generare animali transgenici**. Le ESC in coltura rappresentano quindi un'ottima strategia per la modificazione genetica della linea germinale. Le ESC di topo derivano da embrioni di 3.5/4.5 giorni e originano dalla massa cellulare interna (embrioblasto) della blastocisti. Sono coltivate in vitro e mantengono **il potenziale di differenziamento in tutti i tessuti del topo, quando vengono reintrodotti in una blastocisti e reimpiantati in una femmina ospite**. **L'embrione che si sviluppa è una chimera**, in quanto contiene due popolazioni di cellule derivate da differenti zigoti: quelli della blastocisti e quelli delle ESC impiantate. Se i due ceppi di cellule sono derivate da topi con diverso colore del manto, la progenie chimera può essere facilmente identificata. Siccome le ESC possono formare tutte o parte delle cellule germinali funzionali della chimera, è possibile derivarne dei topi transgenici. Ciò in genere si ottiene per screening della progenie derivata dall'incrocio fra la chimera e topi con un manto recessivo rispetto a quello del ceppo da cui sono derivate le ESC.



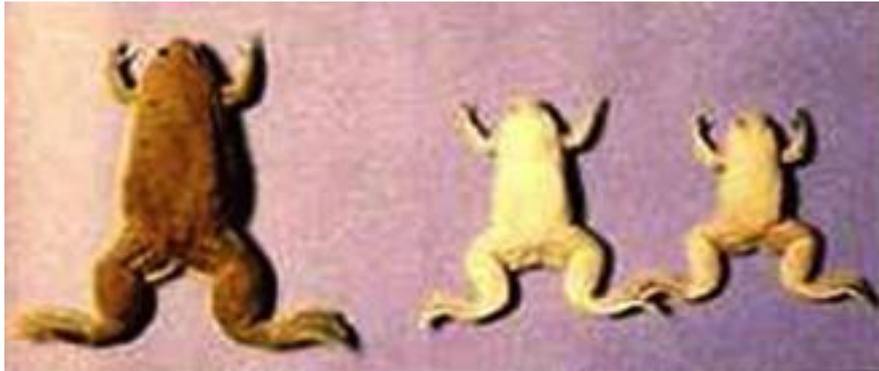
Inserimento del DNA esogeno nelle cellule ES mediante elettroporazione e selezione delle cellule ES contenenti il transgene



La clonazione riproduttiva

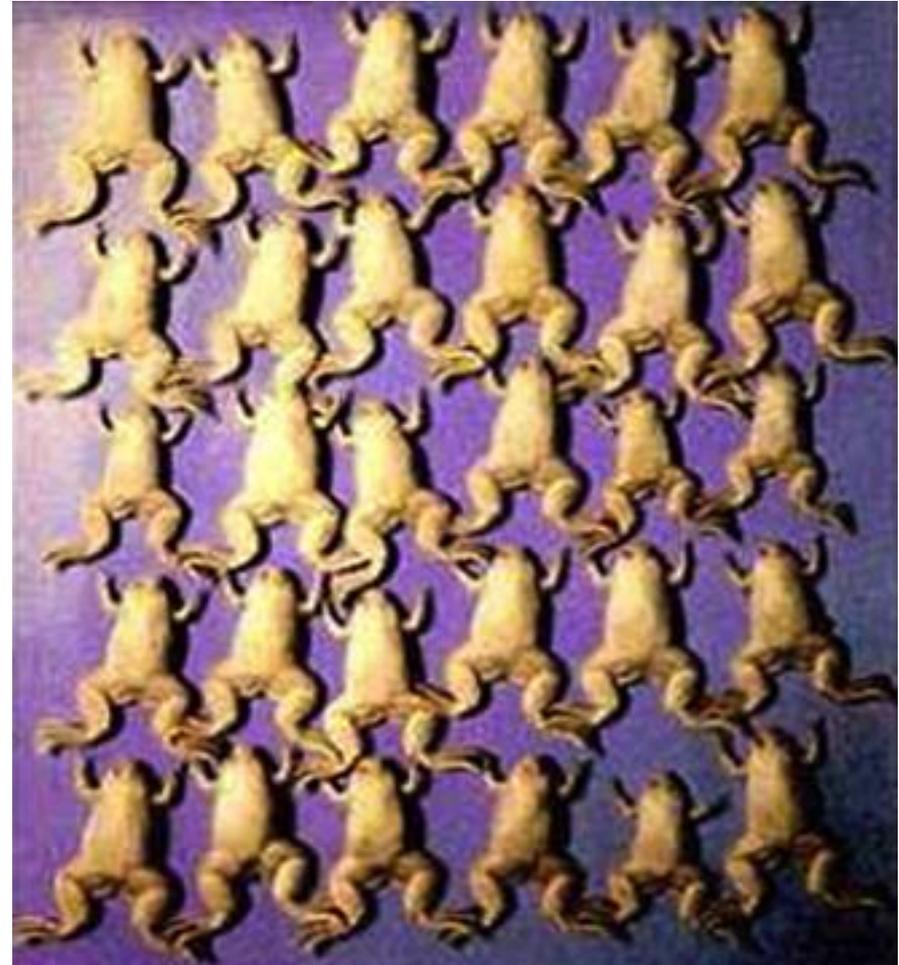
Questo processo, descritto già negli anni '60 da John Gurdon per gli anfibi, si ottiene quando l'embrione prodotto per trasferimento nucleare (**da una cellula somatica**) viene lasciato sviluppare fino a generare un nuovo individuo.

Inizialmente non si riteneva possibile per i mammiferi, tuttavia nel 1997 Wilmut riportò la nascita della famosa pecora Dolly, ottenuta per trasferimento nucleare e successivo impianto nell'utero di una madre ospite.

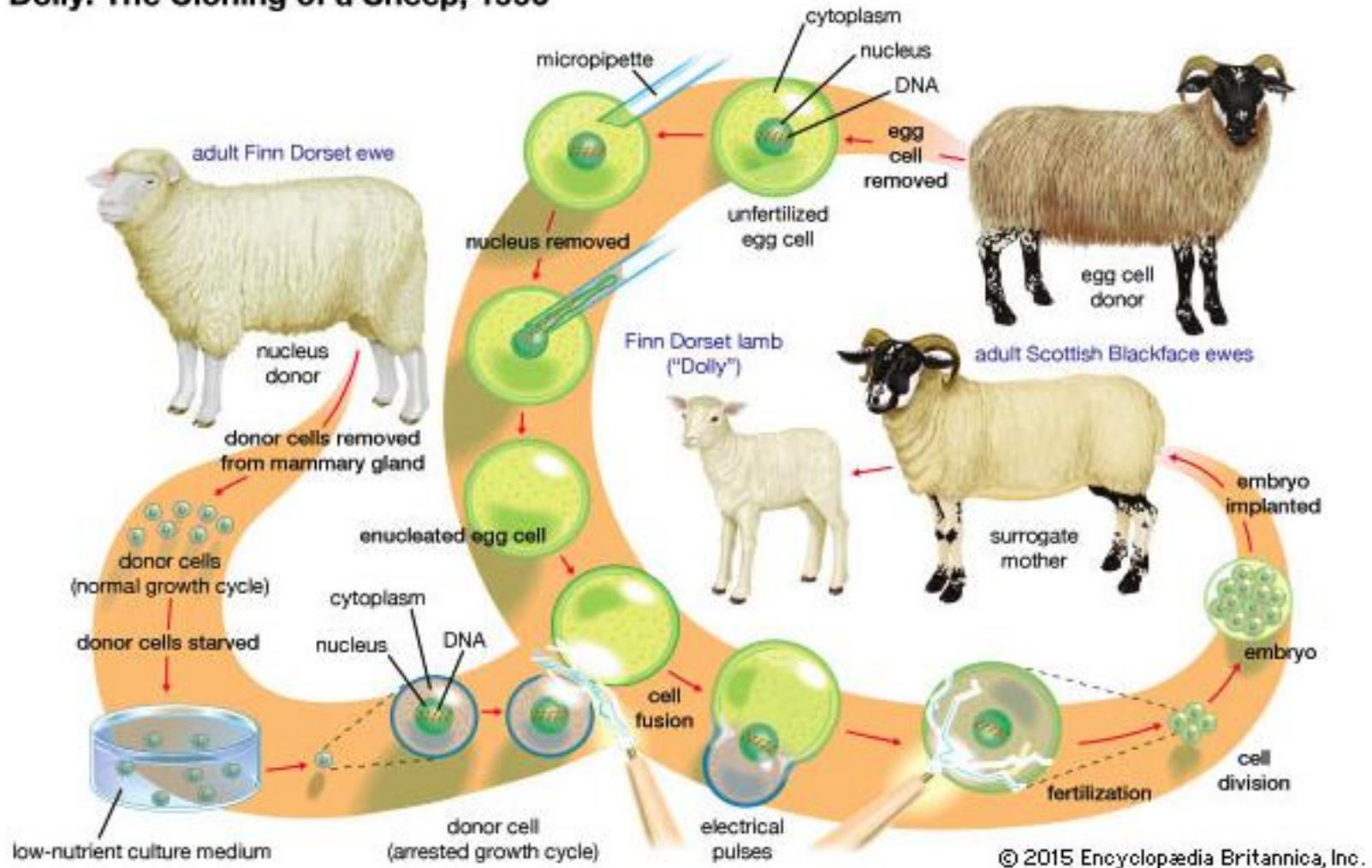


Wt femmina
donatrice di
uova enucleate

Mutanti albino
donatori di
nuclei

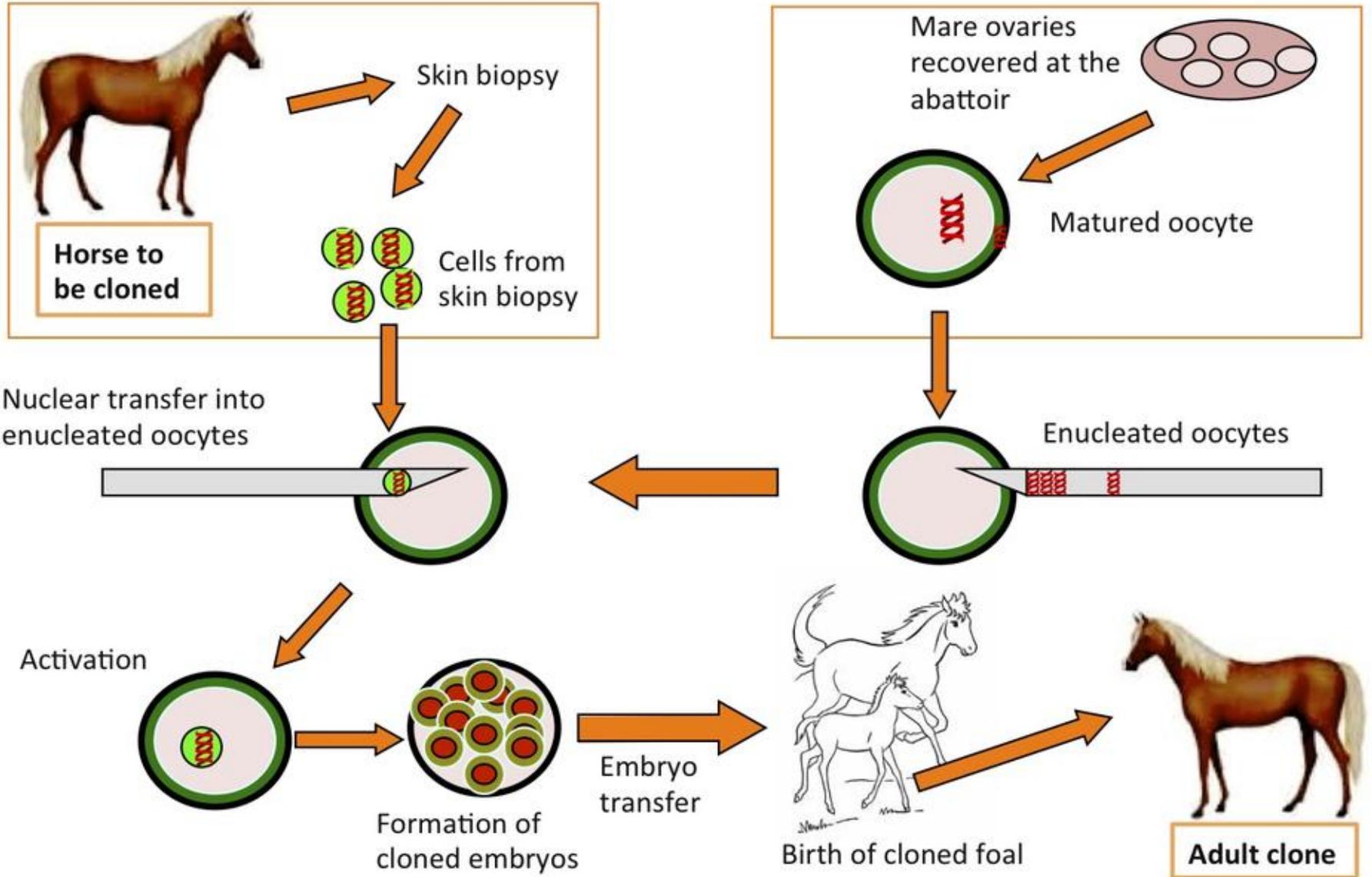


Dolly: The Cloning of a Sheep, 1996



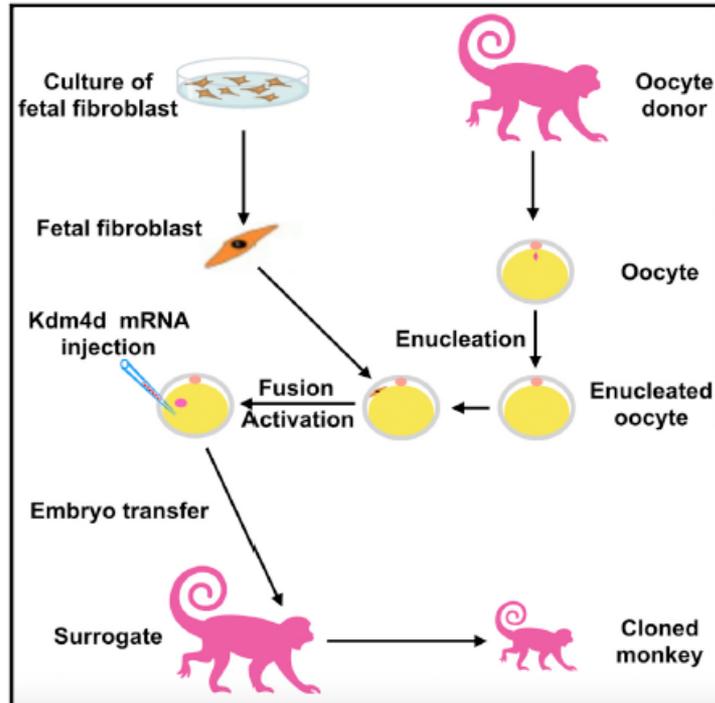
La clonazione di una pecora mediante trasferimento nucleare. Si allontana il nucleo di un uovo con una pipetta. Si coltivano le cellule tratte dall'epitelio della mammella di un animale adulto e si induce lo stato G₀ inibendo la crescita delle cellule. Si fondono una cellula G₀ ed un uovo privo di nucleo e si fa crescere l'uovo rinucleato in coltura fino allo stadio embrionale dopo di che lo si impianta nella madre adottiva dove lo sviluppo procede fino al termine.

My horse can be cloned!!!!!!



Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer

Graphical Abstract



Authors

Zhen Liu, Yijun Cai, Yan Wang, ...,
Zhangyang Wang, Muming Poo, Qiang Sun

Correspondence

qsun@ion.ac.cn

In Brief

Generation of cloned cynomolgus monkeys by somatic cell nuclear transfer using fetal monkey fibroblasts.

Highlights

- Somatic cell nuclear transfer (SCNT) using fetal fibroblasts yielded two live monkeys
- Epigenetic modulators promoted development and pregnancy rate of SCNT embryos
- SCNT using adult cumulus cells yielded live births of monkeys that were short-lived
- Genetic analysis confirmed the clonal origin of the SCNT monkey offspring

- Cloning of animals by somatic cell nuclear transfer (SCNT) has been achieved in more than 23 mammalian species
- Previous failure of SCNT appears to be caused by **poor and inappropriate reprogramming of the somatic nucleus for supporting the development of transplanted embryos.**
- Histone deacetylase inhibitors such as trichostatin A have been used **to improve the efficiency of mammalian SCNT** in several species, including mouse, bovine, pig, monkey, and human.
- **Reprogramming-resistant regions (RRRs)** that are enriched for histone 3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) modification were identified in SCNT embryos. Expression of human H3K9me3 demethylase *Kdm4d/4a* could reduce the H3K9me3 levels and **significantly improve the efficiency of both mouse and human SCNT**
- They **applied both histone demethylase *Kdm4d* mRNA and histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA)** to the cloning of macaque monkeys.
- They performed SCNT using fetal monkey fibroblasts and successfully produced live birth of monkey offspring **carrying nuclear DNA of the donor cell and mitochondria DNA of the oocyte donor monkey.**

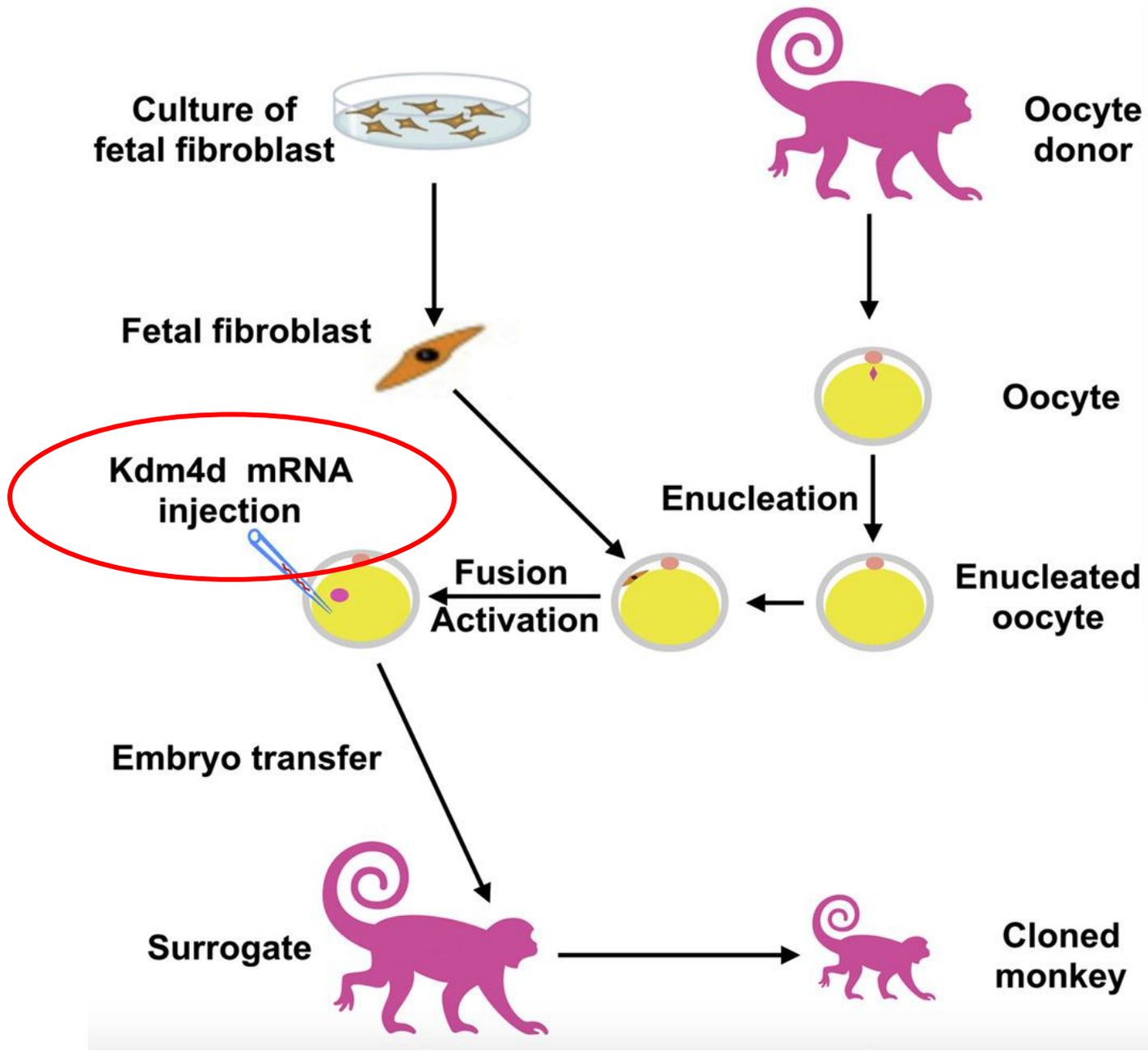
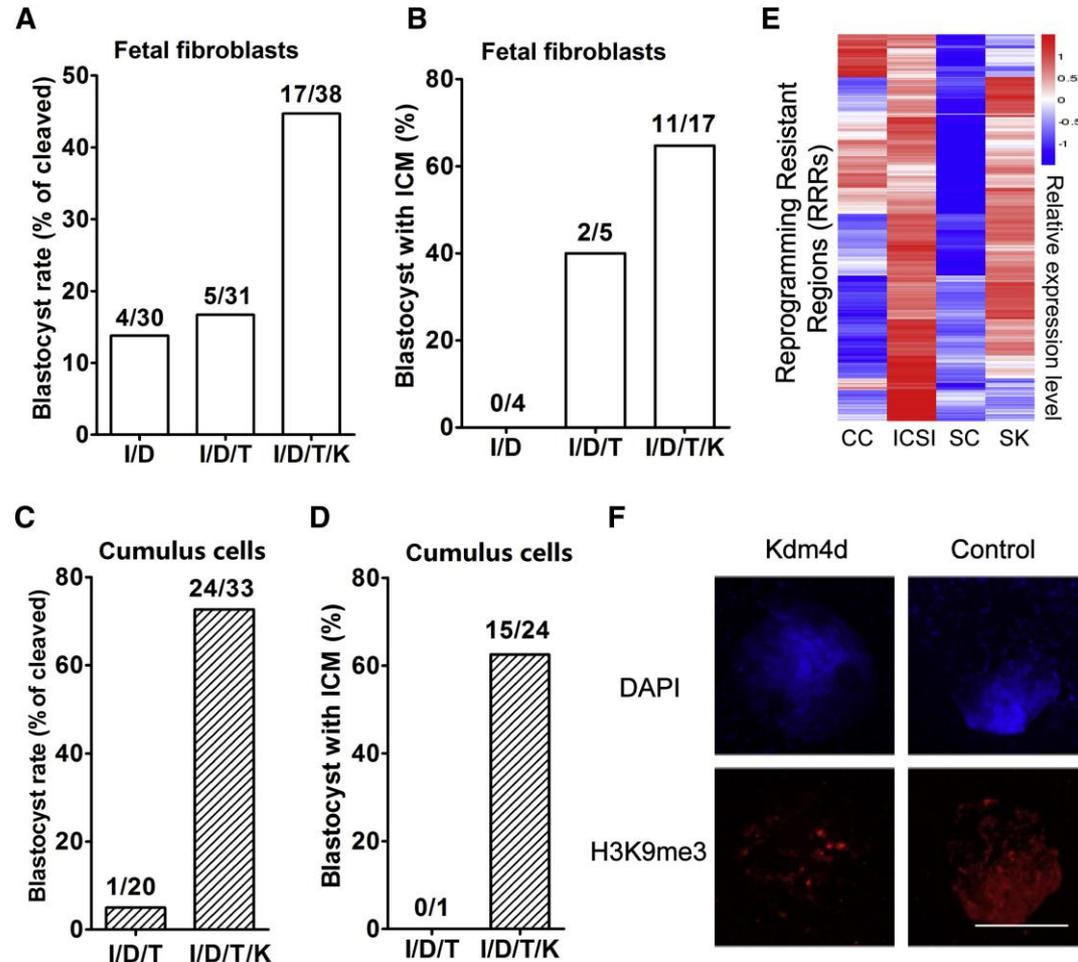


Figure 2. Blastocyst Development of SCNT Monkey Embryos

(A and C) % of cleaved embryos that developed into blastocysts (blastocyst rate) of SCNT embryos using fetal fibroblasts (A) and adult cumulus cells (C) under different conditions. (B and D) Percentages of blastocysts showing prominent ICM in SCNT embryos using fetal fibroblasts (B) and adult cumulus cells (D).

(E) Upregulation of RRRs resulting from *Kdm4d* modification in SCNT embryos.

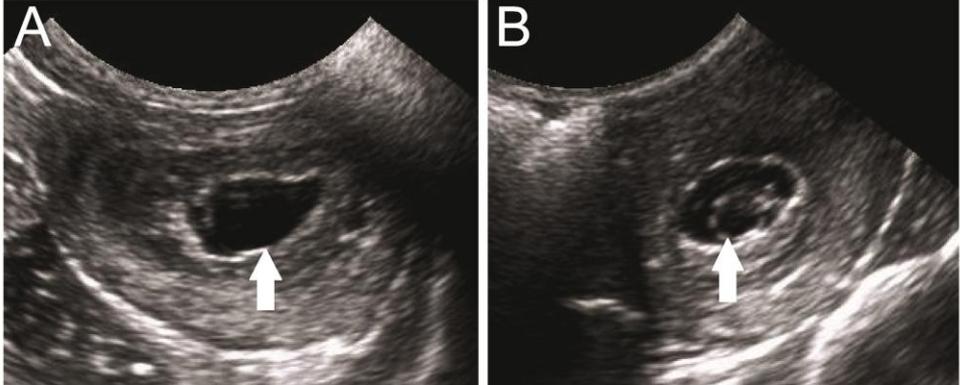
CC: Expression levels of RRRs in native donor cumulus cells. ICSI: Expression levels of RRRs in 8 cell-stage monkey embryos obtained by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), indicating upregulation of RRRs. SC: expression levels of RRRs in cumulus cells derived 8cell-stage control SCNT embryos in the absence of *Kdm4d* mRNA injection, showing low-level expression of RRRs. SK: expression levels of RRRs in cumulus cells derived 8cell-stage SCNT embryos injected with *Kdm4d* mRNA, showing elevated expression of many RRRs, some of which correspond to those of ICSI 8 cell-stage embryos. (F) Representative nuclear images of cumulus cells derived one-cell stage SCNT embryos stained with anti-H3K9me3 and DAPI at 5 hr after *Kdm4d* mRNA injection.



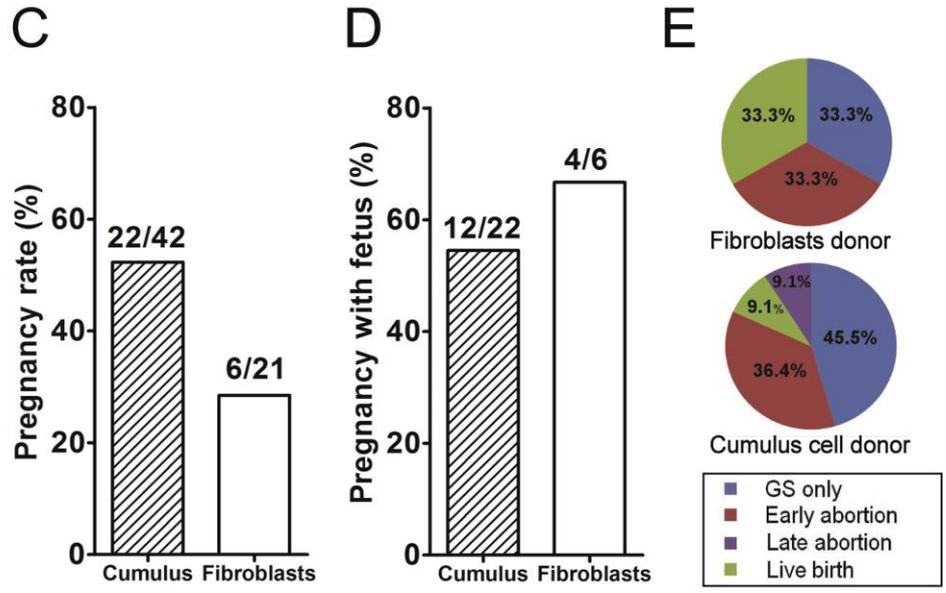
I: ionomycin, D: 6-dimethylaminopurine, T: TSA, K: *Kdm4d* mRNA.

Figure 3. Pregnancy and Fetal Development of SCNT Embryos

(A and B) Ultrasound imaging of the pregnancy status from SCNT with **cumulus cells**, showing example images of a surrogate uterus containing a gestational sac (arrow) without a fetus (A) and with a fetus (B, arrow).

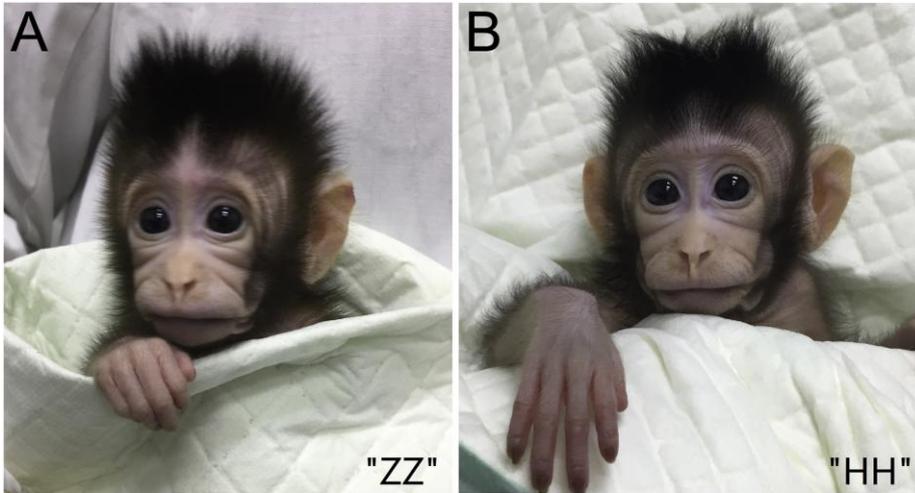


(C and D) Pregnancy rates (C) and % of pregnancies with a fetus (D) for two groups of SCNT embryos **using fetal fibroblasts and adult cumulus cells, respectively**.



(E) Overall % of pregnancies that yielded gestational sacs (GS) without a fetus, pregnancies with fetuses that led to early abortion (within 2 months) without a fetus, late abortion with a fetus, and live births (by caesarian section) for SCNT using fetal fibroblasts (in healthy condition) and adult cumulus cells (lived for a short time), respectively.

Analysis of Cloned Monkeys

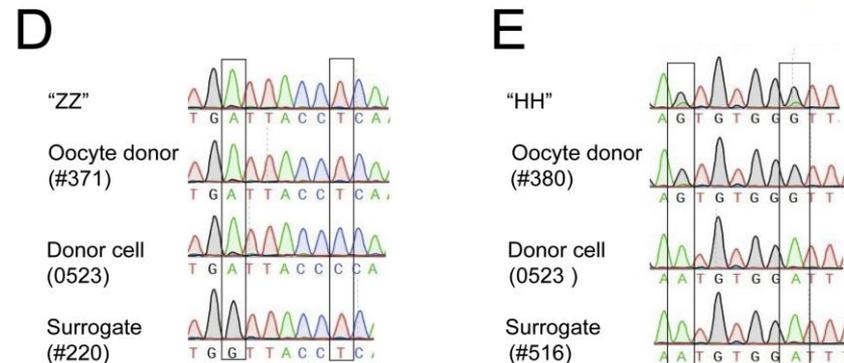


(A and B) Images of **Zhong Zhong (ZZ)** and **Hua Hua (HH)**, two monkeys generated by SCNT using fetal monkey fibroblasts, at 20 and 34 days after birth, respectively.

(C) Three examples of **STRs** from ear tissues of “ZZ” and “HH,” showing that their **nuclear DNA was identical to that of the donor fibroblast but different from those of their oocyte donor and surrogate monkeys.**

Monkey/Donor cell	D6S2741	D16S409	D18S72
Cloned monkey “ZZ”	250/277	135/148	200/217
Cloned monkey “HH”	250/277	135/148	200/217
Fibroblast donor cell (0523)	250/277	135/148	200/217
Oocyte donor for “ZZ” (#371)	274/278	255/255	202/223
Surrogate for “ZZ” (#220)	268/268	254/256	202/208
Oocyte donor for “HH” (#380)	271/271	133/148	198/204
Surrogate for “HH” (#516)	262/262	131/131	207/210

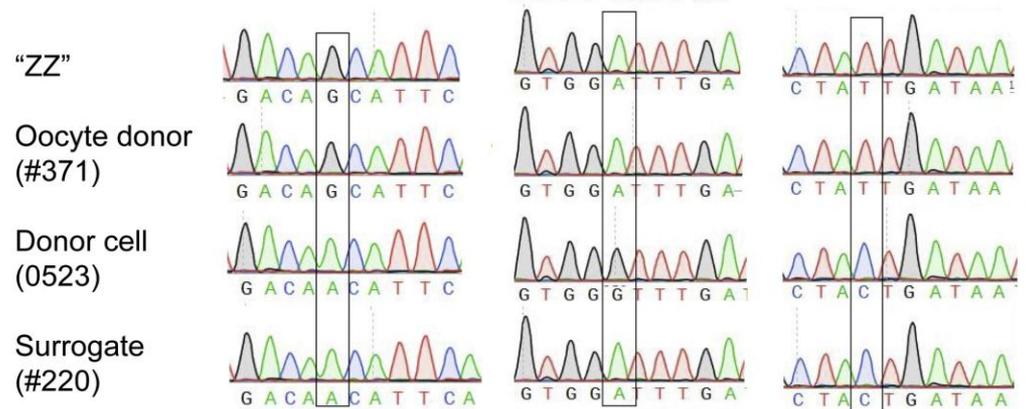
(D and E) Examples of **SNPs** for “ZZ” and “HH,” respectively, showing **mitochondria DNA SNPs that were identical to those of the oocyte donor monkey but different from those of surrogate monkey and donor fibroblast.**



SNP Analysis of **“ZZ”** and **“HH”** Generated by SCNT Using **Fetal Fibroblasts**, Related to Figure 4

(A and B) Three examples of SNP for “ZZ” and “HH,” showing that their mitochondria DNA SNPs were identical to those of the oocyte donor monkey, but different from those of the surrogate monkey and donor cell.

A



B

