

**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:

- ✓ **Fisiche**
- ✓ **Chimiche**
- ✓ **Biologiche**

Transfection Methods:

physical, chemical and biological

Physical transfection methods

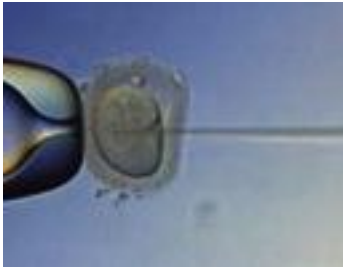
Microinjection, optical transfection, **Particle gun** (biolistic gene delivery), **Electroporation**, **Laser transfection**, Sonoporation, Magnetofection, Electric field-induced molecular vibration.

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.

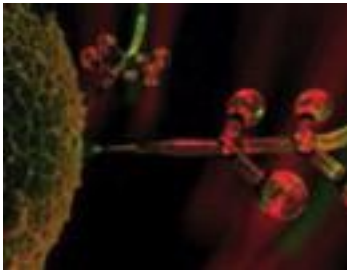


Microinjection

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".

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)**.

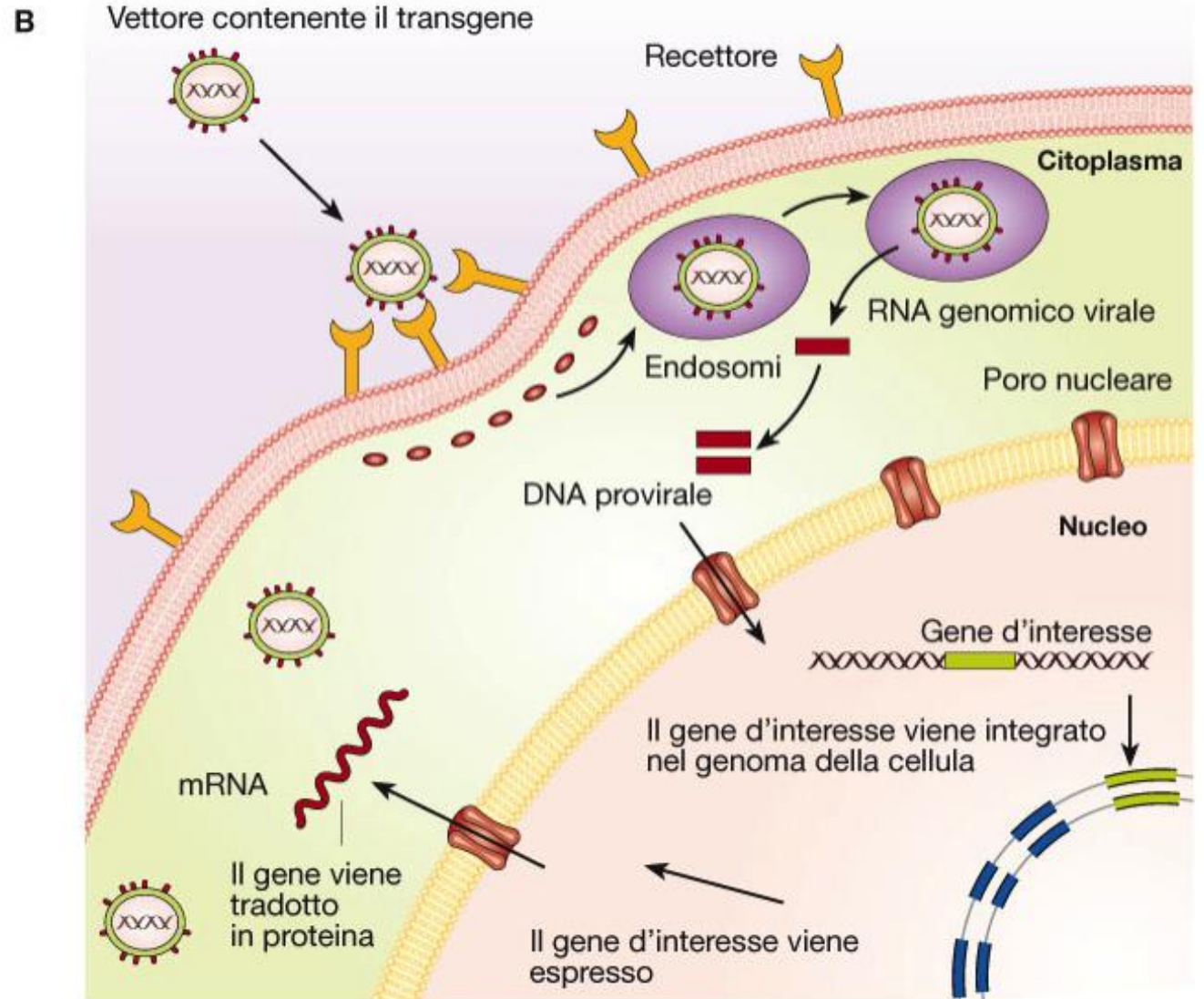
I vettori retrovirali sono virus a RNA che possiedono una funzione di trascrittasi inversa, capace di sintetizzare una forma di DNA complementare che può integrarsi nel DNA genomico

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.

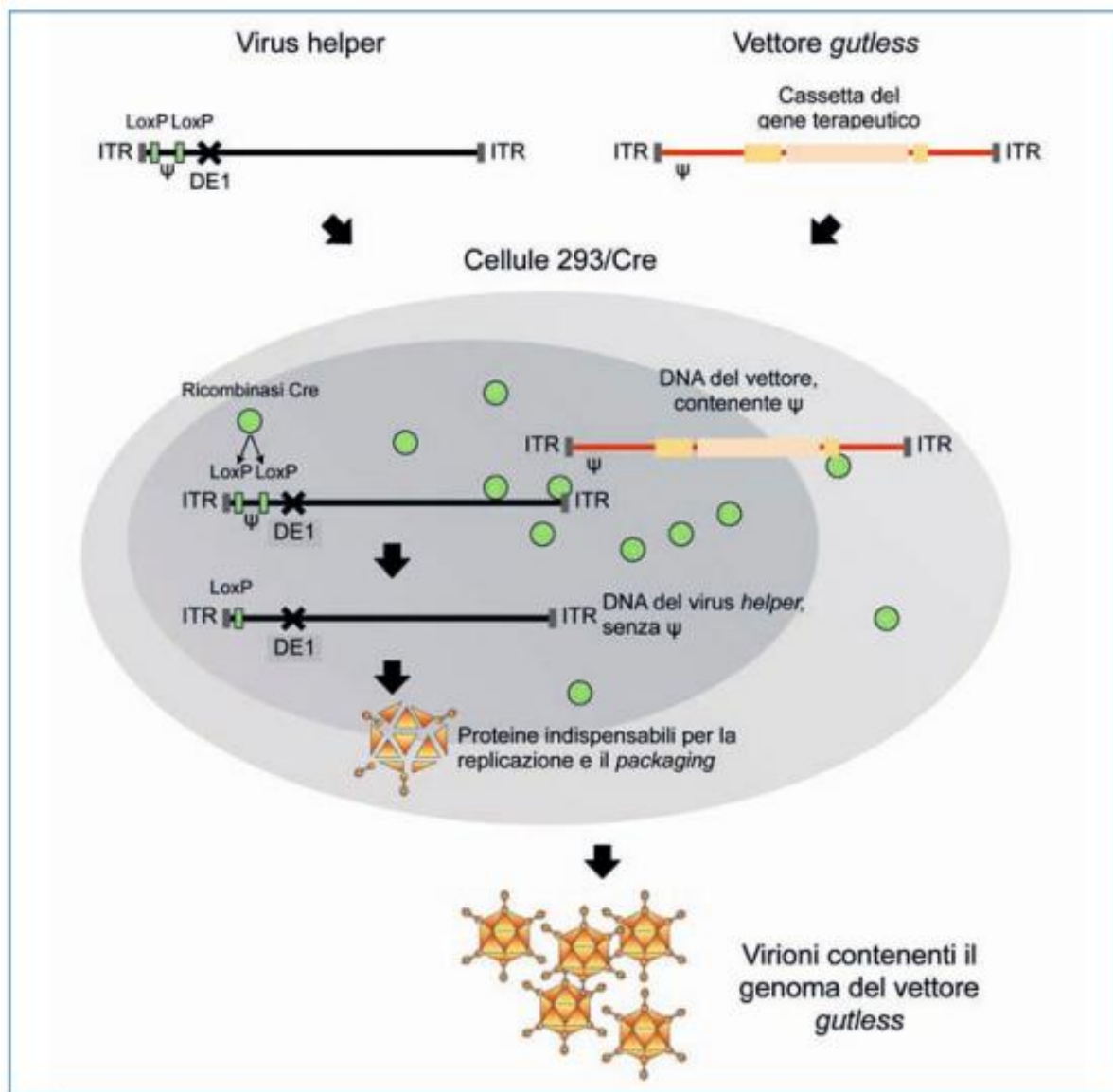
Svantaggi:

- 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).

Vettori adenovirali

Gli adenovirus hanno genoma a dsDNA, 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)



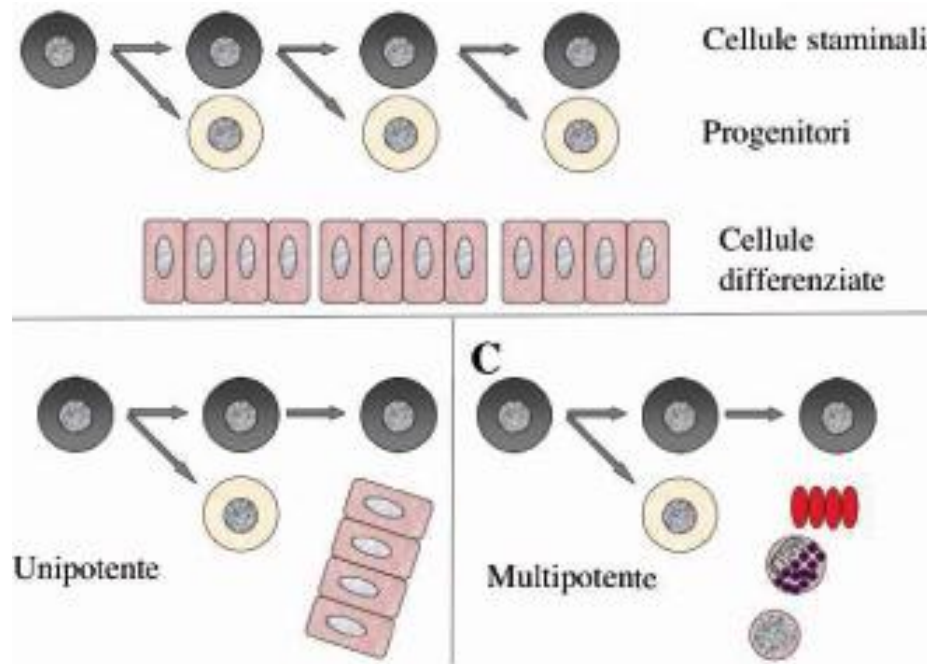
Produzione dei vettori adenovirali *gutless*. I vettori sono prodotti nelle cellule 293/Cre trasfettate con il DNA linearizzato del vettore *gutless* e con un vettore helper adenovirale in cui la regione ψ è fiancheggiata da due siti loxP. All'interno delle cellule, la ricombinasi Cre rimuove la regione 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

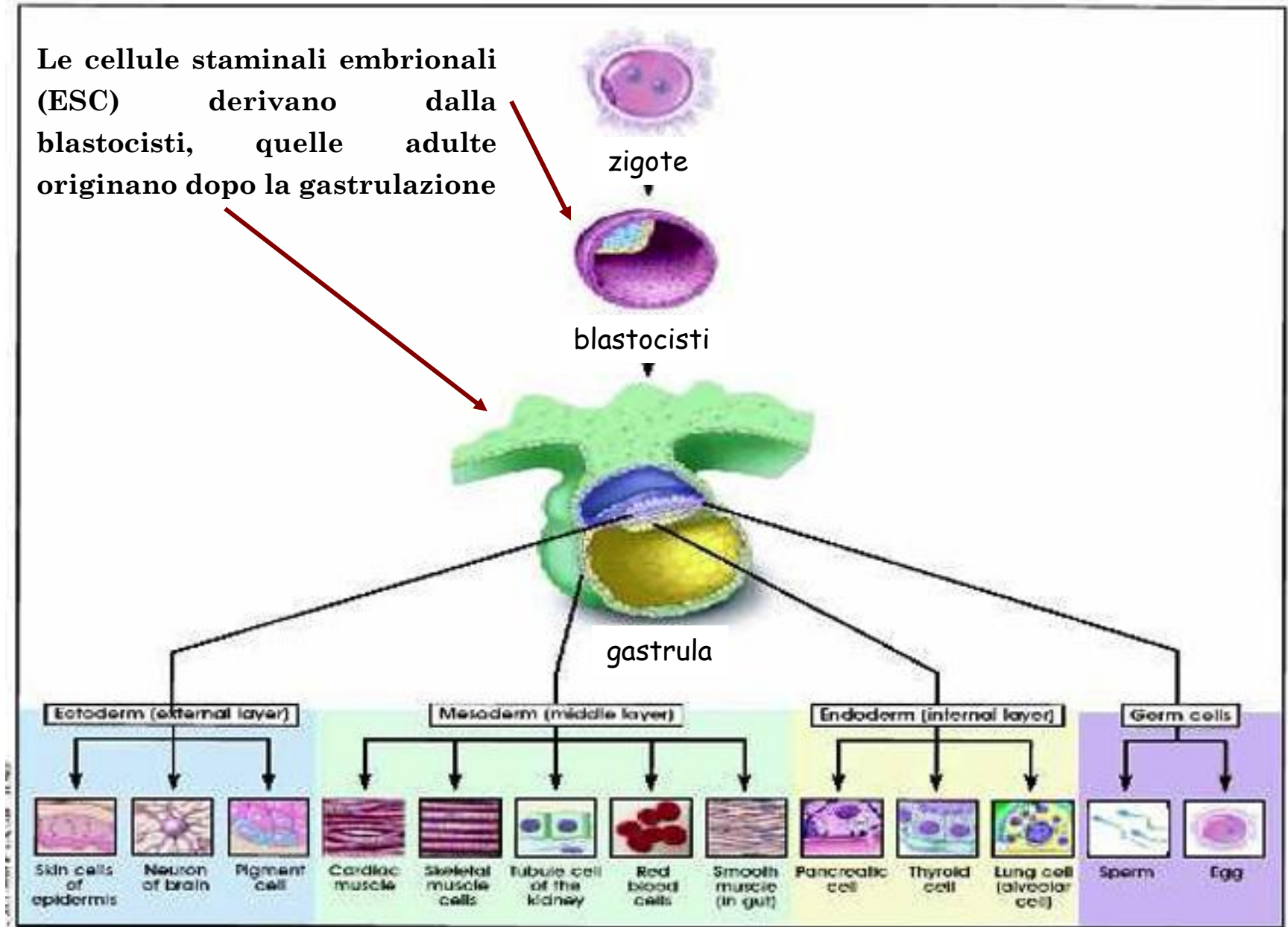
Cellule che abbiano la capacità di differenziare in cellule adulte, come l'**oocita fertilizzato** in quanto totipotente. Altra classe di cellule target sono le **cellule staminali embrionali (Embrionic Stem Cells, ESC)**, derivate dalle prime fasi embrionali.

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

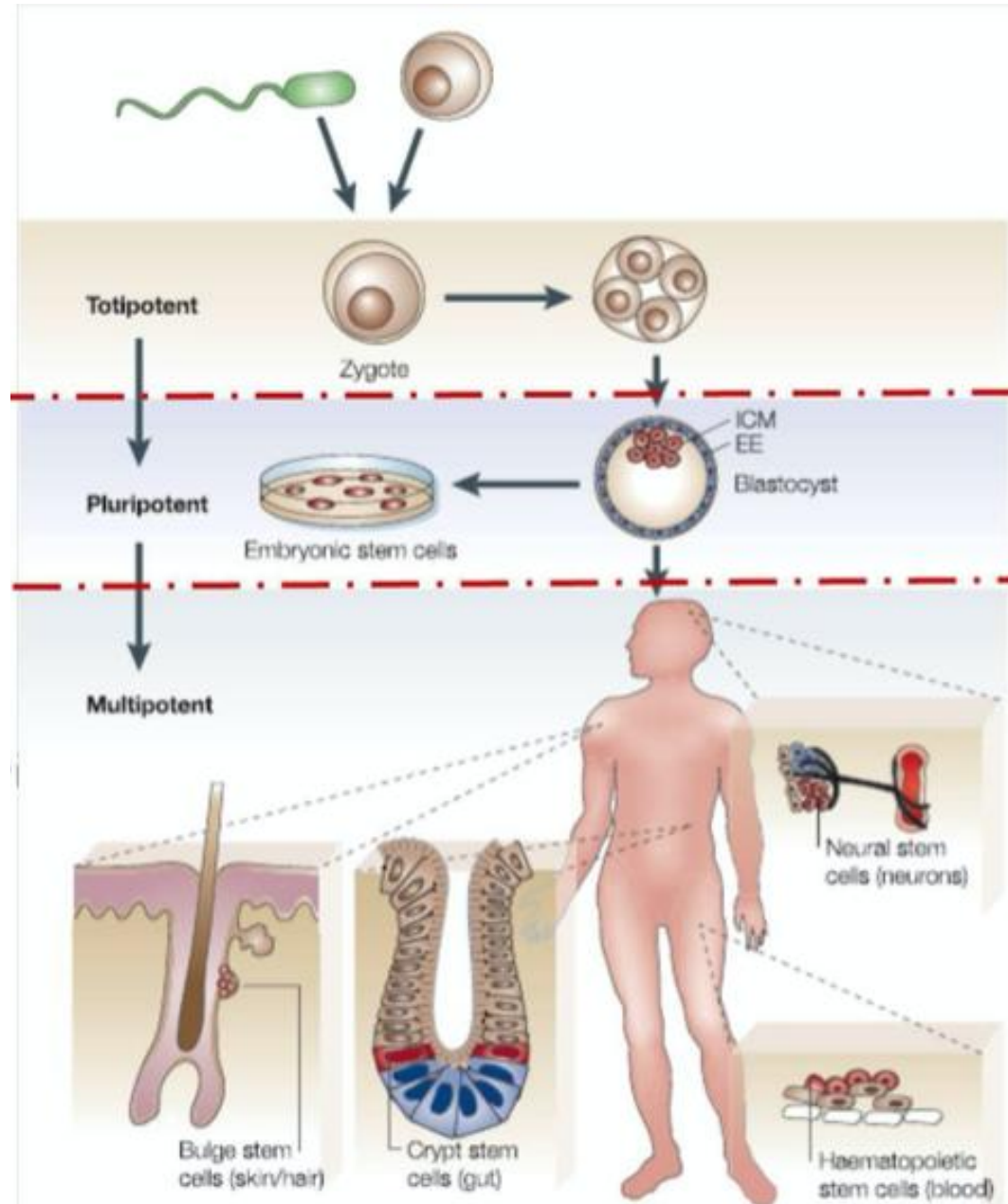


Totipotent: possono dare origine ad un intero organismo, cioè differenziarsi in tutte le cellule dell'organismo **incluse** cellule della placenta e del cordone ombelicale (zigote e blastomeri)

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

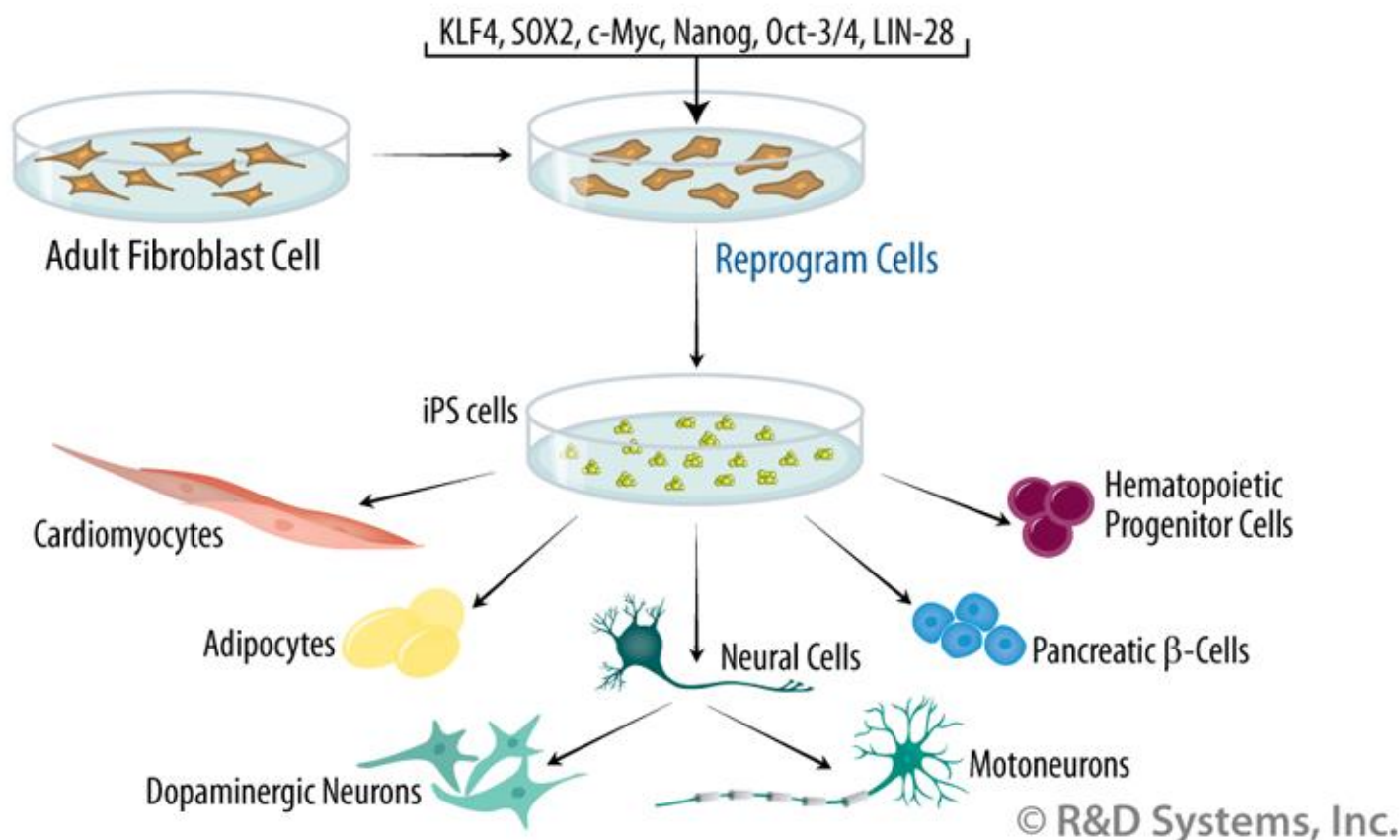
Multipotent possono differenziare in tipi cellulari diversi ma con precursori comuni.

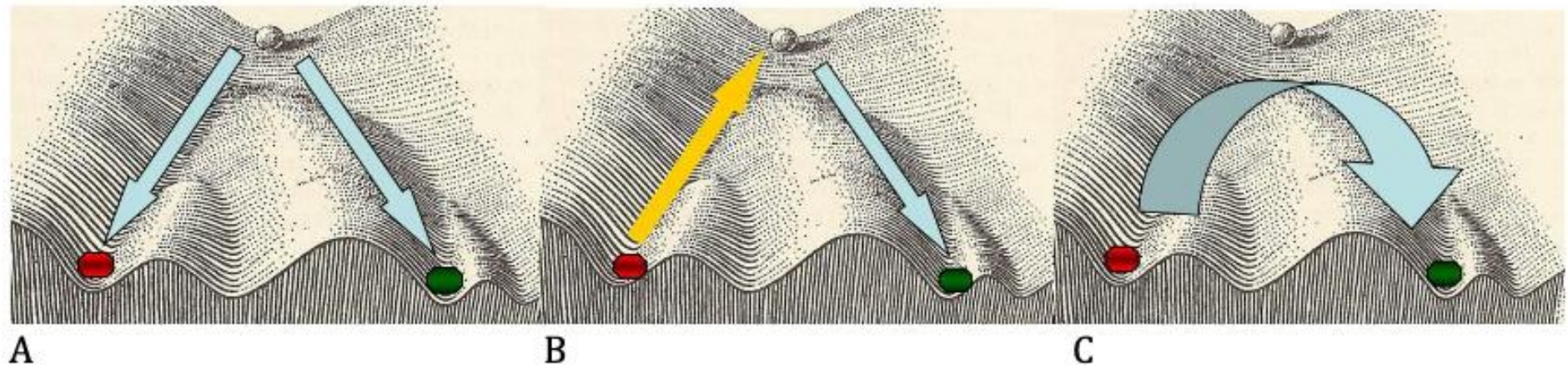
Unipotent possono differenziarsi in un solo tipo cellulare



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

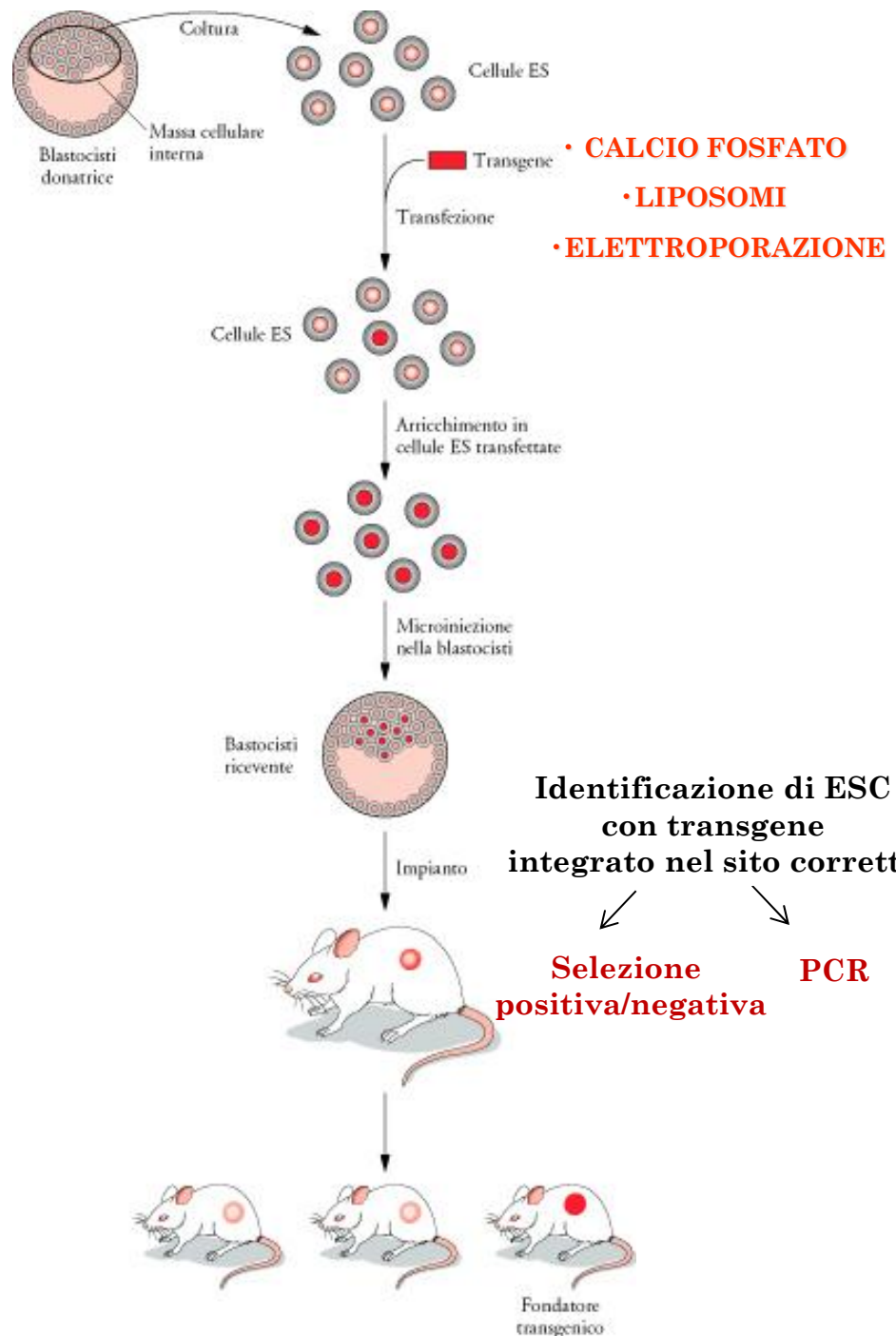
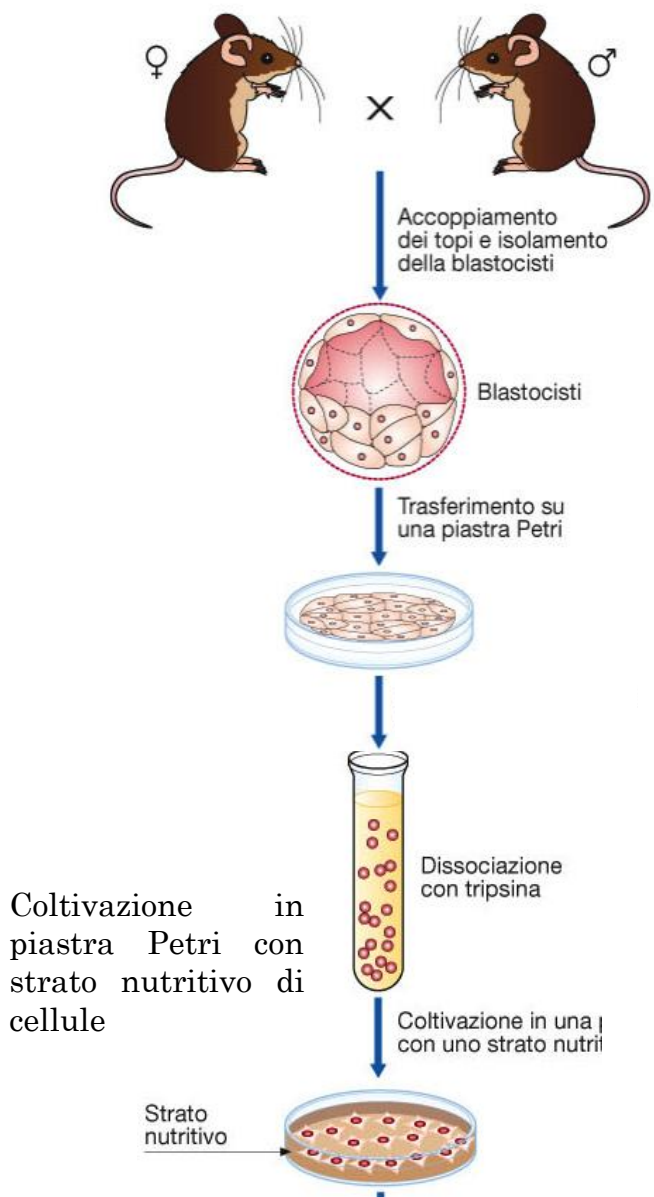




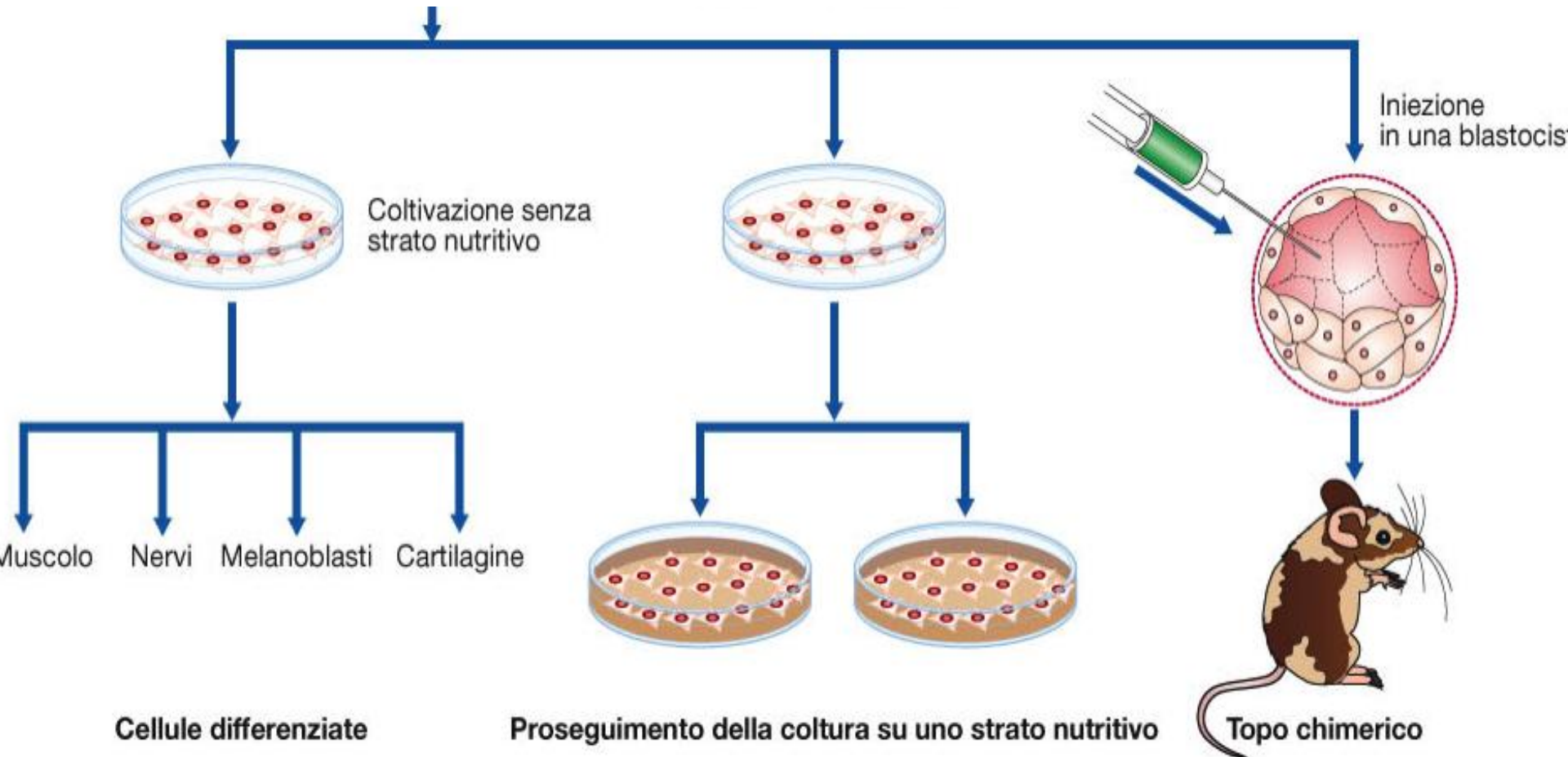
Come funzionano i diversi tipi di cellule staminali pluripotenti. (A): le **ESC** partono dallo stadio indifferenziato, tipico appunto degli embrioni, e possono dare origine a tutti i tipi cellulari del nostro corpo. (B): le **iPS** invece partono da una cellula adulta e differenziata, vengono riprogrammate 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

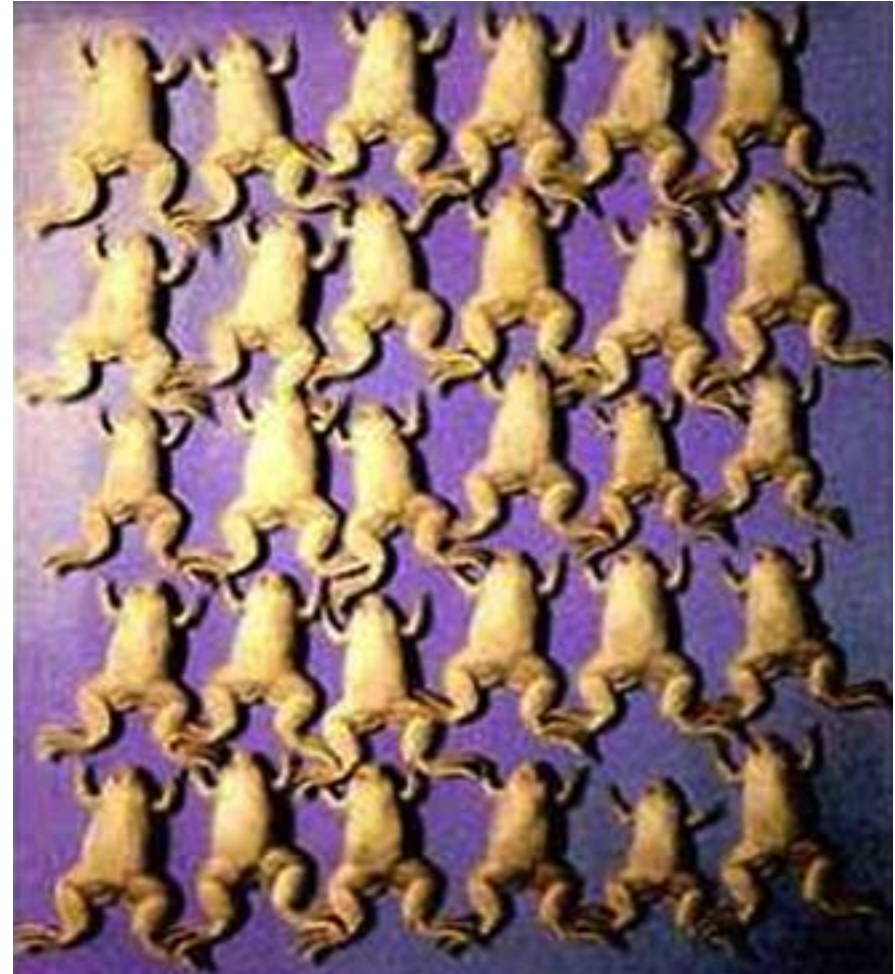
Questo processo, descritto già negli anni '60 da John Gurdon per gli anfibi, si ottiene quando l'embrione prodotto per trasferimento nucleare (da una cellula somatica) viene lasciato sviluppare fino a generare un nuovo individuo.

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.

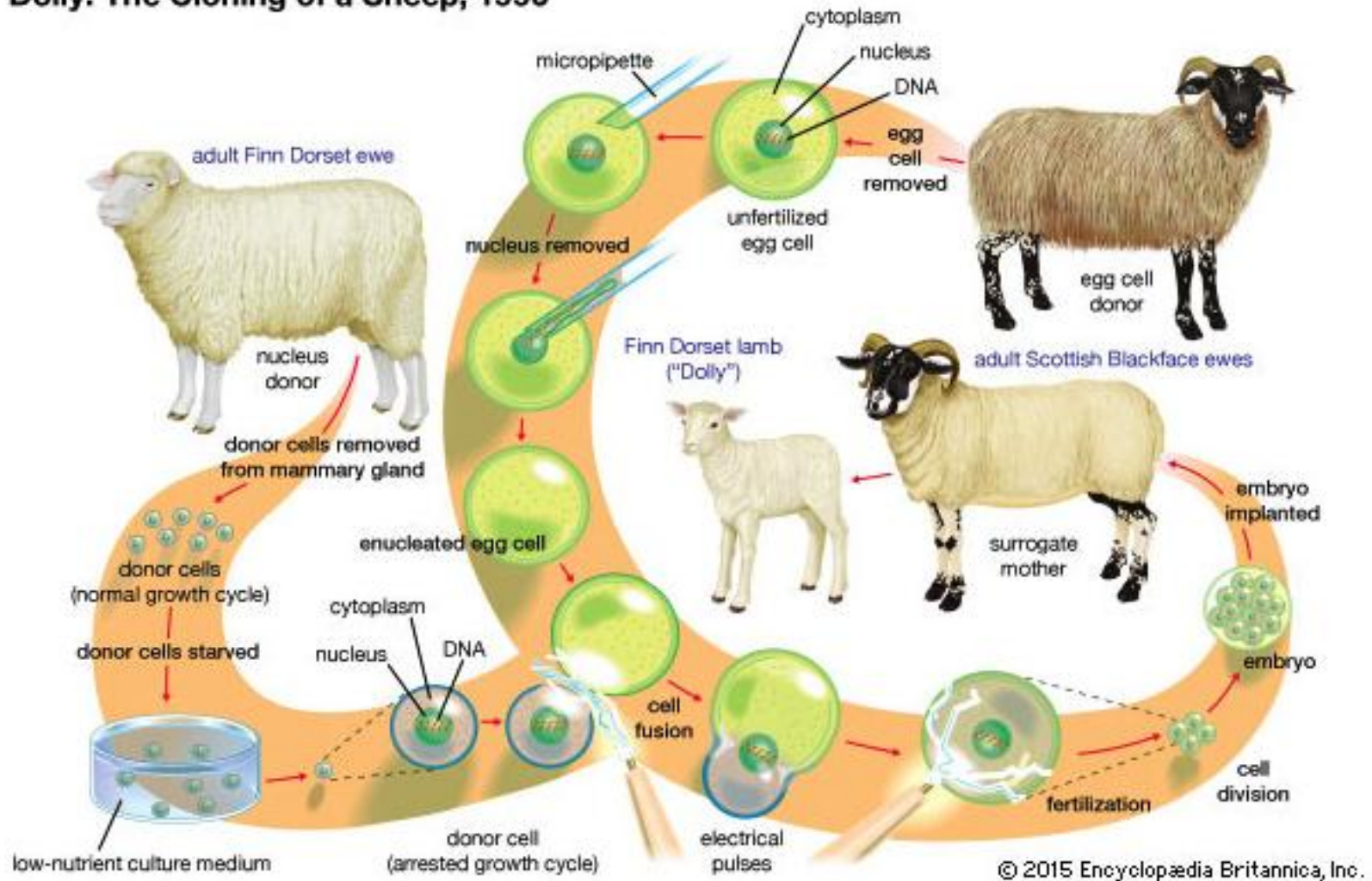


Wt femmina
donatrice di
uova enucleate

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!!!!!!

