

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 VETTORE DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO p53

4.1.1 Sintesi del costrutto

Il primo selettore negativo da noi testato, è la cassetta di espressione per la proteina p53 sotto il controllo del promotore CMV.

Il plasmide allestito per le prove di “gene-targeting” (β -loxTK^{rev}/p53^{rev}) presenta come selettore positivo il gene di fusione HyTk compreso tra un sito *loxP* e un sito *lox* mutato (*lox2272*), e come bersaglio la β -caseina murina da testare in HC11, cellule epiteliali immortalizzate di ghiandola mammaria di topo, e in cellule embrionali staminali murine.

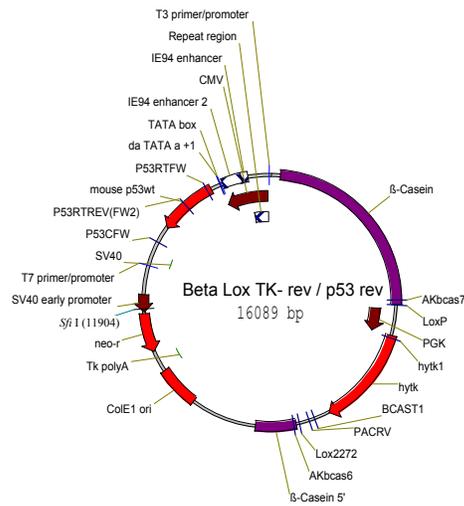


Fig. 4.1

Vettore di ricombinazione avente come bersaglio la β -caseina murina e come selettore negativo una cassetta di espressione per la proteina p53.

4.1.2 Trasfezione in HC11

➤ Valutazione dell'efficienza di HR in HC11 mediante PCR

Dall'utilizzo della p53 come selettore negativo ci attendevamo che i cloni di cellule trasfettate col vettore di "targeting" β -loxTK^{rev}/p53rev ricombinati casualmente, mantenendo la sequenza codificante la proteina p53, andassero incontro ad un processo apoptotico: ipotizzavamo così, tra i cloni sopravvissuti, un arricchimento per l'evento di "gene-targeting".

Gli isolati di HC11 trasfettate col vettore di ricombinazione β -loxTK^{rev}/p53rev sono stati analizzati tramite PCR con primer β casT1 e β casT2: il primo riconosce una sequenza all'interno del vettore di "targeting", mentre il secondo si appaia ad una regione endogena della β -caseina murina (introne1) non compresa nei costrutti utilizzati per la trasfezione. In questo modo si ottiene un amplificato di 1269 pb solo nel caso di avvenuta ricombinazione omologa.

Il controllo positivo della reazione di PCR è un costrutto (BCas PCR targeting control), che comprende entrambe le regioni di appaiamento dei due primer e che genera un amplificato di dimensioni simili (1209 pb), ma non uguali a quelle che si ottengono in caso di avvenuto "gene-targeting", in modo che sia possibile distinguere un'eventuale contaminazione plasmidica.

In parallelo abbiamo eseguito una PCR di controllo sui lisati con i primer GDX1 e GDX2 (prodotto di circa 700 pb), che amplificano il gene GdX, gene murino costitutivamente espresso, che codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle ubiquitine.

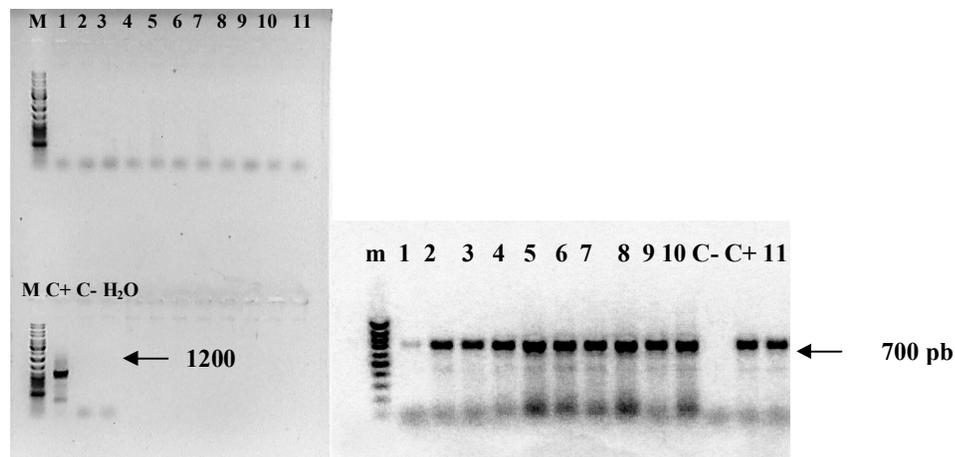


Fig. 4.2

Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR β casT1+ β casT2 a sinistra e PCR di controllo con primer GDX1 e GDX2 a destra

M = marcatore di peso molecolare 1Kb
m = marcatore di peso molecolare 100 pb
1→11 = lisati di cloni HC11 β -loxTK^{rev}/p53rev
C+ = plasmide controllo positivo
C- e H₂O = controlli negativi

Abbiamo isolato e analizzato 11 cloni di HC11 trasfettate β -loxTK^{rev}/p53rev, di cui nessun ricombinante omologo.

➤ Valutazione dell'espressione della proteina p53 mediante Western blot in HC11

I lisati di HC11 trasfettate col costrutto β -loxTK⁻rev/p53rev sono stati caricati su due gel di poliaccrilammide del tipo SDS-PAGE, e sottoposti a Western blot.

Un gel è stato utilizzato per il controllo del trasferimento delle proteine ed è stato incubato con l'anticorpo murino anti- β -actina, che funziona come controllo endogeno.

Sul secondo gel, abbiamo usato un anticorpo sempre di topo anti-p53 per la nostra analisi specifica.

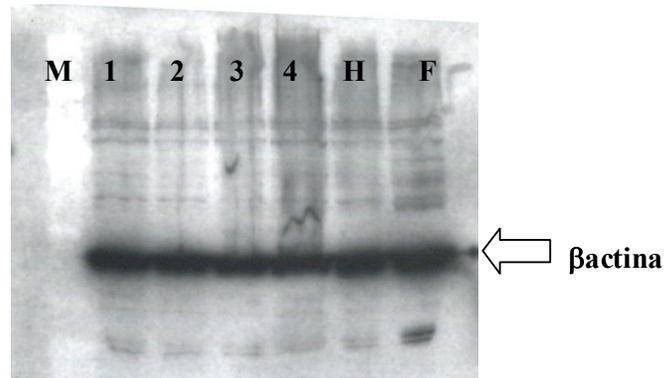


Fig. 4.3

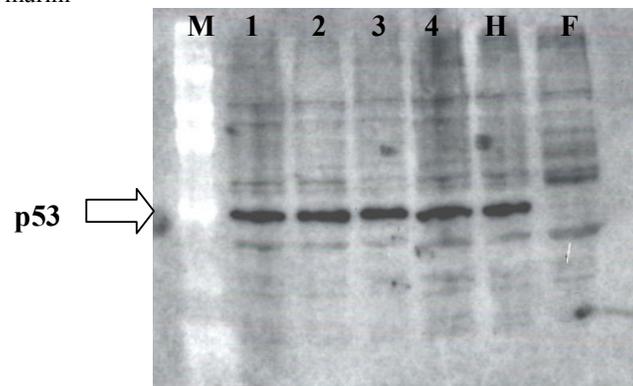
Western blot eseguito con anticorpo anti- β -actina come controllo endogeno sopra, e con anticorpo anti-p53 sotto.

M = marcatore di peso molecolare

1 → **4** = lisati di cloni di HC11 β -loxTK⁻rev/p53rev

H = lisati di HC11 wild-type

F = lisati di fibroblasti embrionali murini



Come si può osservare dalla foto, abbiamo riscontrato la presenza di una proteina p53 mutata sia sui lisati di HC11 β -loxTK⁻rev/p53rev, sia su HC11 wild-type, e assente invece in una coltura primaria di fibroblasti murini. Ciò concorda con quanto riportato in letteratura (Merlo et al., 1993, 1994): le HC11 presentano 2 mutazioni identificate nel cDNA della p53, di cui una comporta uno scambio aminoacidico da cisteina a triptofano a livello del codone 138, e l'altra è una microdelezione dal codone 123 al 130 dell'esone 5. In più vi è anche una mutazione intronica del sito accettore di "splicing" posizionato a livello della giunzione introne 4/esone 5. Tali mutazioni coinvolgono i due alleli separatamente e così nelle HC11 non si riscontra alcun allele wild-type per la proteina p53: tutto ciò sicuramente gioca un ruolo importante nella loro immortalizzazione. Per questo motivo, abbiamo deciso di valutare l'efficacia della cassetta di espressione per la p53 come selettore negativo per la "positive-negative selection" in altri tipi cellulari.

4.1.3 Trasfezione in cellule ES murine

Constatata l'elevata espressione di proteina p53 mutata in HC11, e considerato che l'efficienza di ricombinazione omologa è molto più alta nelle cellule ES rispetto alle cellule somatiche, abbiamo provato a trasfettare col vettore β -loxTK⁻rev/p53rev anche cellule ES murine e abbiamo isolato in totale 95 cloni.

➤ PCR

I cloni isolati sono stati analizzati mediante PCR con primer β casT1 e β casT2 come sopra, e in nessun caso si è riscontrato un evento di ricombinazione omologa (banda attesa di 1269 pb).

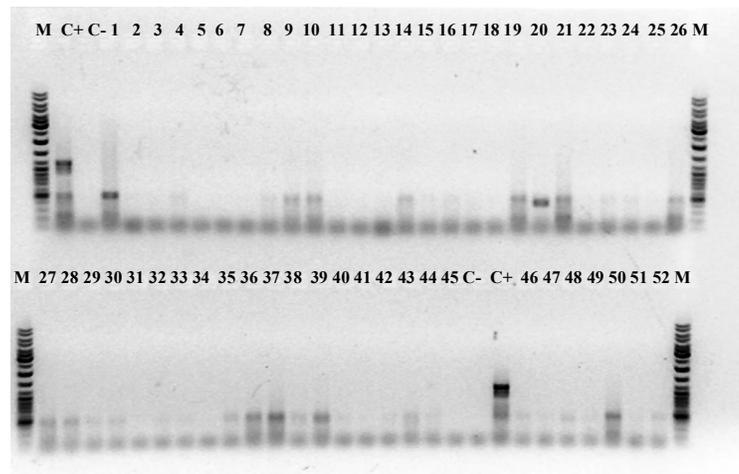


Fig. 4.4

Controllo della PCR con primer β casT1 e β casT2 mediante elettroforesi su gel d'agarosio

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1→52 = lisati di cellule ES murine trasfettate β -loxTK⁻rev/p53rev

C+ = plasmide controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

Esistono, come riportato anche in letteratura, grosse difficoltà nella messa a punto delle PCR per l'individuazione dell'evento di ricombinazione omologa in quanto l'amplificato di solito ha dimensioni piuttosto elevate. Inoltre, tenendo presente che il rapporto tra la lunghezza media del genoma di mammiferi ($3 \cdot 10^9$) e la lunghezza del plasmide trasfettato (in questo caso 16 Kb) è all'incirca $2 \cdot 10^5$ e se si considera che il genoma totale in una cellula pesa all'incirca 3 pg, ne risulta che la quantità che bisogna essere in grado di rilevare mediante PCR, in caso di singola cellula, sia $0,015$ fg (3 pg/ $2 \cdot 10^5$).

Per questo motivo, abbiamo disegnato il terzo primer β -casT3 che si appaia anch'esso, come β -casT1, a una sequenza della β -caseina endogena, assente nel vettore utilizzato per la trasfezione: in questo caso, l'amplificazione genera un frammento di circa 1097 pb se l'allele/gli alleli sono wild-type, in modo da avere direttamente anche un controllo endogeno, e di circa 4507 pb se l'allele ha subito l'evento di HR.

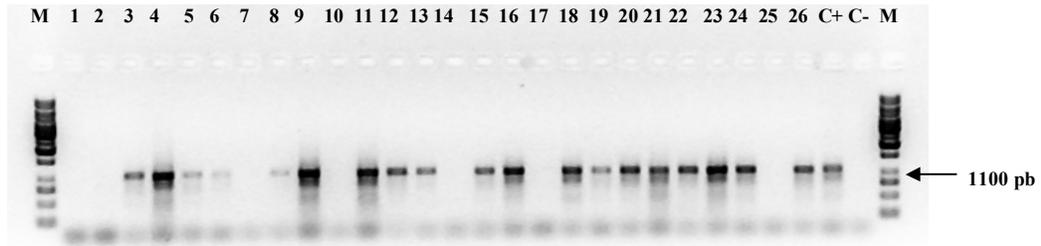


Fig. 4.5

Controllo della PCR eseguita con primer β casT2 e β casT3 mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1→26 = lisati di cellule ES murine trasfettate β -loxTK^{rev}/p53^{rev}

C+ = DNA bovino controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

Anche con questa seconda analisi comunque, non abbiamo evidenziato nessun evento di "gene-targeting": come si può vedere dalla foto, i lisati presentano la banda da 1097 pb dell'allele wild-type, ma non quella di 4507 pb dovuta a ricombinazione omologa.

	TRIAL 1*	TRIAL 2	TRIAL 3	TRIAL 4	TRIAL 5	TRIAL 6	Tot.	N° HR
N° cloni	11	37	7	21	18	12	106	0

Fig. 4.6

La tabella riassume il numero di cloni ottenuti ed analizzati in 6 esperimenti eseguiti con il vettore β -loxTK^{rev}/p53^{rev}, il numero totale di cloni analizzati e il numero di quelli andati incontro a ricombinazione omologa (HR). Nell'esperimento n°1 abbiamo trasfettato HC11, mentre per gli altri abbiamo usato cellule ES murine.

➤ Western blot

Come sopra, abbiamo valutato l'espressione della proteina p53 mediante Western blot in cloni isolati di cellule ES trasfettate β -loxTK⁻rev/p53rev (E9 e G4).

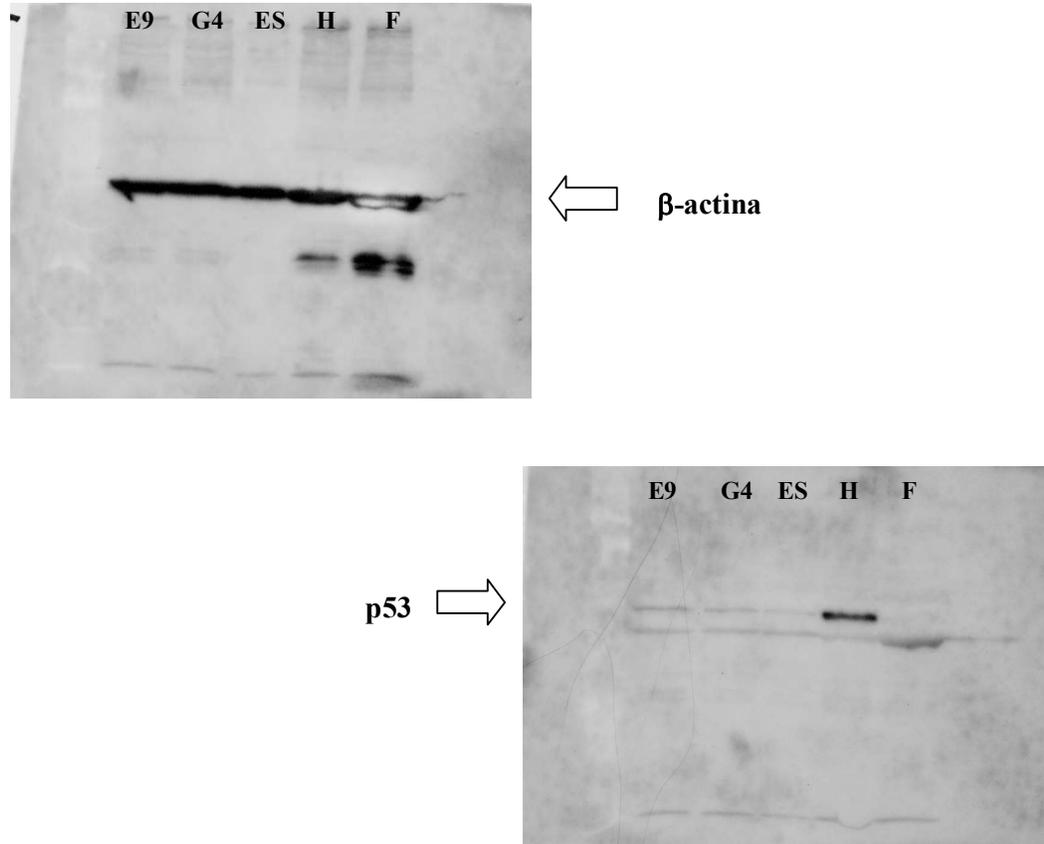


Fig. 4.7

Lastra da Western blot eseguito con anticorpo anti- β -actina come controllo endogeno sopra e con anticorpo anti-p53 sotto

E9 = isolato E9 di cellule ES murine trasfettate β -loxTK⁻rev/p53rev

G4 = isolato G4 di cellule ES murine trasfettate β -loxTK⁻rev/p53rev

ES = cellule ES wild-type

H = HC11 wild-type

F = fibroblasti embrionali murini

Anche in questo caso, i lisati cellulari sono stati caricati su due gel SDS-PAGE in parallelo, trasferiti con “elettroblotting” su membrana PVDF ed una di esse è stata incubata con anticorpo anti- β actina come controllo endogeno dell’avvenuto trasferimento delle proteine, mentre per l’altra abbiamo usato l’anticorpo anti-p53, specifico per la nostra analisi. Come si può vedere dalla lastra, il livello di espressione della proteina p53 è all’incirca uguale negli isolati di cellule ES trasfettati β -loxTK^{rev}/p53rev e nelle cellule ES wild-type. Come sopra, l’espressione risulta alta nel caso di HC11 e la proteina è assente nella coltura primaria di fibroblasti murini.

Alcuni studi (Sabapathy et al., 1997) hanno dimostrato che le cellule ES murine nello stato indifferenziato presentano alti livelli di espressione della proteina p53 nella conformazione wild-type, mentre il processo di differenziamento determina una riduzione del livello di p53 e un cambiamento del suo stato conformazionale.

Come è possibile vedere dalla lastra del nostro Western blot, le cellule ES wild-type da noi utilizzate presentano un certo livello di espressione della proteina p53, ma piuttosto ridotto: da ciò ne possiamo dedurre che le cellule in nostro possesso siano in via di differenziamento.

Per quanto riguarda i cloni isolati di cellule ES trasfettate col vettore β -loxTK^{rev}/p53rev, sembra che la cassetta di espressione utilizzata per la proteina p53 non sia sufficientemente efficace, in quanto non è visibile una sostanziale differenza d’intensità tra le loro bande e quella delle cellule ES wild-type.

4.2 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO siRNA

4.2.1 Sintesi dei costrutti

➤ Disegno degli oligonucleotidi

Dopo aver consultato i programmi EMBOSS siRNA e “siRNA Target Finder” per la ricerca di sequenze bersaglio all’interno del gene HyTk, le linee guida proposte da diversi gruppi di ricerca e aver confrontato le potenziali sequenze con il programma BLAST, abbiamo individuato due regioni bersaglio di 21 nucleotidi: la prima a partire dal 95° nucleotide del gene HyTk, la seconda a livello del 1050° nucleotide. Per questo motivo le abbiamo nominate S95 e S1050.

S95 (5'→3') AAGAATCTCGTGCTTTCAGCT
S1050 (5'→3') AAAAGCCACGGAAGTCCGCCT

Il passo successivo è stato disegnare mediante il programma “Insert Design Tool for the *pSilencer*TM Vector” gli inserti contenenti la sequenza bersaglio con estremità compatibili con quelle del vettore *pSilencer 1.0 – U6* digerito con gli enzimi di restrizione *ApaI* e *EcoRI*.

Inserto S95 forward (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENNO

GAATCTCGTGCTTTCAGCTTCAAGAGAAAGCTGAAAGCACGAGATTCTTTTTT

Inserto S95 reverse (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENNO

AATTA AAAA AAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCTCTTGAAAGCTGAAAGCACGAGATTCTGGCC

Inserto S1050 forward (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENNO

AAGCCACGGAAGTCCGCCTTCAAGAGAAAGGCGGACTTCCGTGGCTTTTTTTT

Inserto S1050 reverse (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENNO

AATTA AAAA AAAAGCCACGGAAGTCCGCCTTCTCTTGAAAGGCGGACTTCCGTGGCTTGGCC

4.2.2 Trasfezione di cellule ES col vettore β cas-HyTk/siRNA

➤ Valutazione dell'evento di ricombinazione omologa mediante PCR

In seguito alla trasfezione delle cellule staminali embrionali murine col vettore β cas-HyTk/siRNA, i cloni risultanti dalla selezione con igromicina, sono stati isolati e analizzati mediante PCR per valutare l'efficienza di ricombinazione omologa.

Nel caso della PCR eseguita con primer β -casT1 e β -casT2, l'amplificazione si ha solo nel caso sia avvenuto l'evento di HR e genera un frammento di circa 1269 pb (1209 pb nel caso del plasmide usato come controllo positivo).

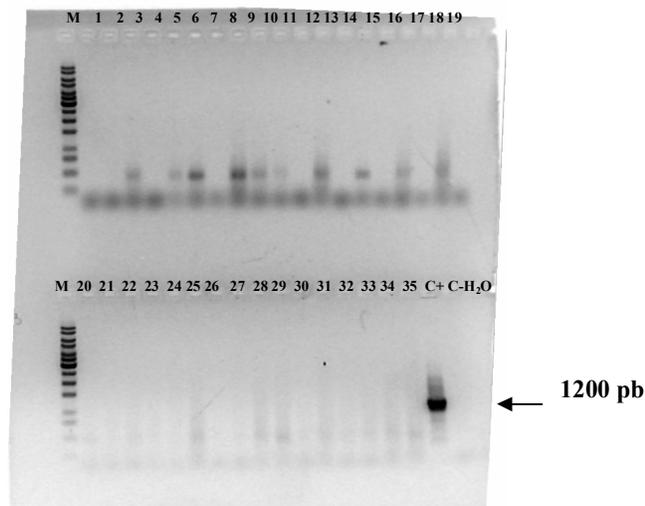


Fig. 4.9

Analisi dei prodotti di PCR con primer β -casT1 e β -casT2 mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1%.

M = marcatore di peso molecolare 1 Kb

1 → 35 = lisati di cloni di cellule embrionali staminali β cas-HyTk/siRNA

C+ = plasmide controllo positivo

C- e H₂O = controlli negativi

Come sopra, abbiamo eseguito la PCR anche con primer β casT2 e β casT3, che si appaiano entrambi a sequenze della β -caseina endogena, assenti nel vettore utilizzato per la trasfezione: in questo caso, l'amplificazione genera un frammento di circa 1097 pb se l'allele/gli alleli sono wild-type, in modo da avere direttamente anche un controllo endogeno, e di circa 4507 pb se l'allele ha subito l'evento di HR.

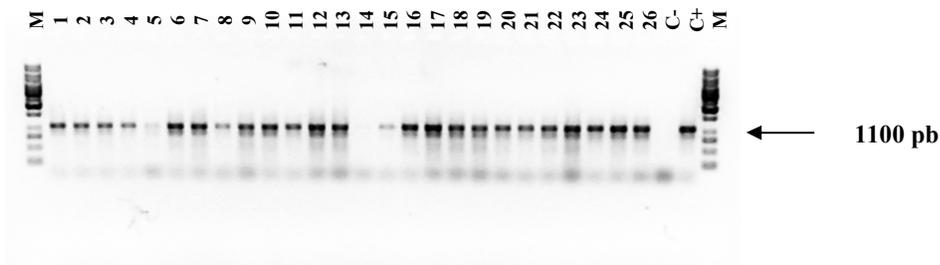


Fig. 4.10

Analisi dei prodotti di PCR con primer β -casT2 e β -casT3 mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1%.

M = marcatore di peso molecolare 1 Kb

1 → 26 = lisati di cloni di cellule embrionali staminali murine β cas-HyTk/siRNA

C+ = controllo positivo DNA murino

C- = controllo negativo H₂O

Sono stati analizzati in totale 35 cloni con entrambi i tipi di PCR, e in nessun caso si è individuato un evento di ricombinazione omologa.

➤ Valutazione del selettore negativo esterno siRNA

Abbiamo cercato di valutare l'effetto di silenziamento dovuto al siRNA, trasfettando in parallelo cellule staminali con il costrutto β cas-HyTk (identico al β cas-HyTk/siRNA ma privo di selettore esterno) e β cas-HyTk/siRNA, e selezionando con igromicina o con G418.

Dal conteggio, non siamo riusciti a valutare una riduzione del numero di cloni dovuta alla presenza del siRNA, anche se si può notare un chiaro effetto a livello di riduzione del metabolismo cellulare (colori dei terreni di coltura).

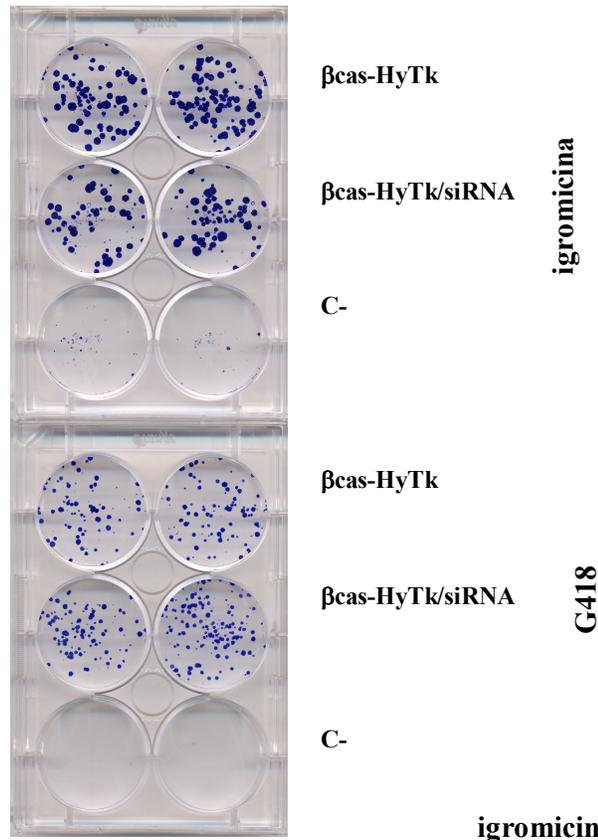
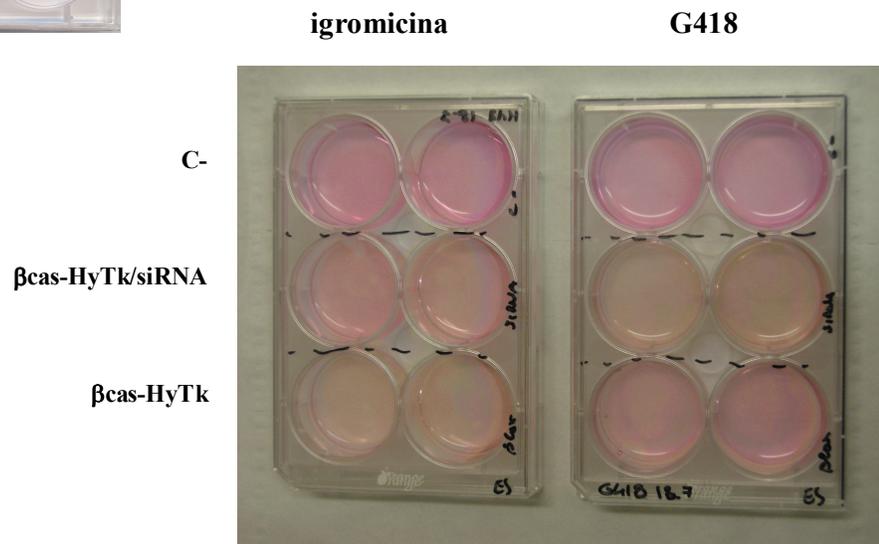


Fig. 4.11

Piastre di cellule embrionali staminali murine trasfettate con i costrutti β cas-HyTk e β cas-HyTk/siRNA e selezionate con igromicina e G418 in parallelo. A sinistra le cellule sono state fissate con metanolo e colorate con Giemsa; sotto abbiamo messo in evidenza i diversi colori dei terreni di coltura delle cellule in selezione.



Come è possibile notare dalla foto delle piastre con i diversi colori dei terreni di coltura delle cellule, si ha una riduzione del metabolismo cellulare (colore tendente al rosso con pH più elevato) nelle cellule trasfettate con il vettore comprendente il siRNA e selezionate con igromicina; mentre nelle cellule trasfettate col vettore privo di siRNA il colore del terreno tende al giallo, indicando acidificazione dello stesso dovuta alla maggiore crescita cellulare. La situazione è invertita per le cellule selezionate con G418.

Oltre a ciò, abbiamo notato che il numero di cloni di cellule ES trasfettate β cas-HyTk/siRNA era più basso nelle fiasche selezionate con igromicina rispetto alle fiasche selezionate con G418, mentre nelle cellule trasfettate β cas-HyTk, prive di cassette di selezione per i siRNA, il risultato era esattamente opposto, come si può vedere dal grafico riportato sotto. Ciò mostra che in assenza di siRNA le cellule trasfettate crescono maggiormente in presenza di igromicina rispetto al G418, indicando che il gene codificante la resistenza all'igromicina (HyTk) sia più attivo rispetto quello di resistenza al G418 (neo-r presente nello scheletro plasmidico).

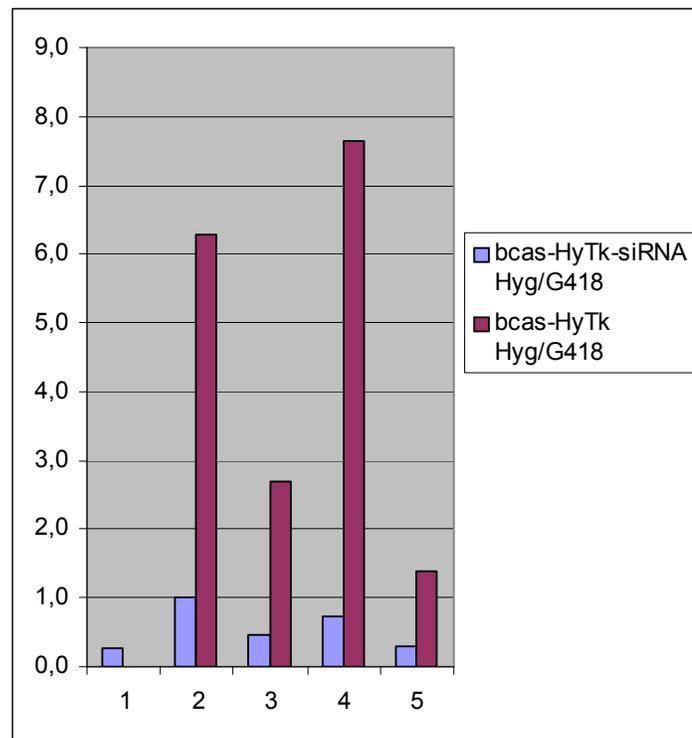


Fig. 4.12

Il grafico rappresenta 5 esperimenti, in cui per ciascuno di essi abbiamo trasfettato in parallelo cellule ES murine con i costrutti β cas-HyTk/siRNA e β cas-HyTk. Ogni trasfezione è stata eseguita in doppio selezionando con igromicina e con G418. Abbiamo contato i cloni sopravvissuti e calcolato il rapporto tra il numero di essi risultanti dalla selezione con igromicina e quelli risultanti dalla selezione con G418.

In esperimenti precedenti eseguiti nel nostro laboratorio, abbiamo cotrasfettato in HC11 un plasmide comprendente il gene di fusione HyTk con i vettori codificanti per 2 tipi di siRNA diretti contro 2 differenti regioni bersaglio del gene HyTk (S95 e S1050), più un terzo in cui si è riscontrata una delezione di un nucleotide durante il sequenziamento. Abbiamo così cercato di valutare l'effetto di silenziamento a livello di resistenza all'igromicina da parte delle cellule, dovuta alla degradazione del trascritto del gene HyTk o all'interferenza con il processo di traduzione dello stesso.

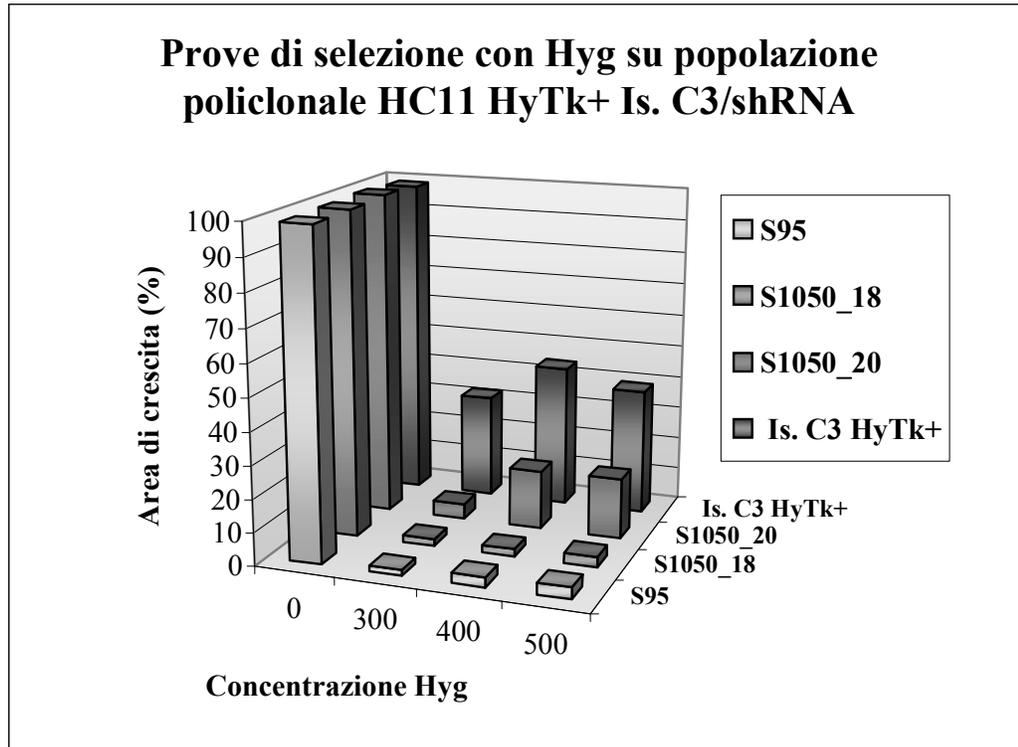


Fig. 4.13

Grafico rappresentante le prove preliminari di trasfezione di HC11 HyTk+ (isolato C3) con 3 tipi di siRNA, sottoposti a concentrazioni crescenti di igromicina.

In queste prove, abbiamo trasfettato stabilmente HC11 con un costrutto contenente il gene di fusione HyTk e abbiamo isolato alcuni cloni, tra cui il C3 visibile nel grafico sopra. Gli isolati sono stati successivamente trasfettati con i vettori comprendenti i 3 tipi di siRNA menzionati sopra (S95, S1050_18 e S1050_20) e sottoposti a selezione con concentrazioni crescenti di igromicina. Come si può vedere dal grafico, l'isolato C3 trasfettato con i siRNA S1050_18 e S95 ha subito una forte riduzione a livello di crescita cellulare, indicando interferenza da parte degli RNA sulla resistenza all'igromicina. Dopo queste prove preliminari, abbiamo scelto il siRNA che dava l'effetto di silenziamento più evidente e abbiamo allestito i vettori di ricombinazione per la β -caseina murina (trattata in questo paragrafo) e per la β -lattoglobulina bovina (trattata nel paragrafo successivo), utilizzando il *pSilencer* 1.0-U6 s1050_18 come selettore negativo per la "positive-negative selection". Quindi, sebbene avessimo ottenuto un chiaro effetto di silenziamento da parte del siRNA sulla resistenza all'igromicina nelle prove preliminari di cotrasfezione di HC11, questo non trova corrispondenza con l'effetto ridotto ottenuto col vettore di ricombinazione recante il siRNA come selettore negativo: ciò implica che il vettore di "targeting" stesso e la posizione della cassetta codificante il siRNA potrebbero avere una certa importanza nell'espressione del siRNA stesso.

4.2.3 Trasfezione di fibroblasti bovini col vettore BLG-HyTk/siRNA

In seguito alla trasfezione dei fibroblasti bovini col vettore BLG-HyTk/siRNA, i cloni risultanti dalla selezione con igromicina, sono stati isolati e analizzati mediante PCR per valutare l'efficienza di ricombinazione omologa.

L'amplificazione è stata eseguita con primer BLGT3 e BLGT4 entrambi disegnati su sequenze della β -lattoglobulina bovina, di cui il primo si appaia ad una regione compresa nel vettore di ricombinazione, mentre il secondo si trova all'esterno. In questo caso si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1395 pb) e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4897 pb) (5364 pb nel caso dell'amplificazione del plasmide controllo positivo).

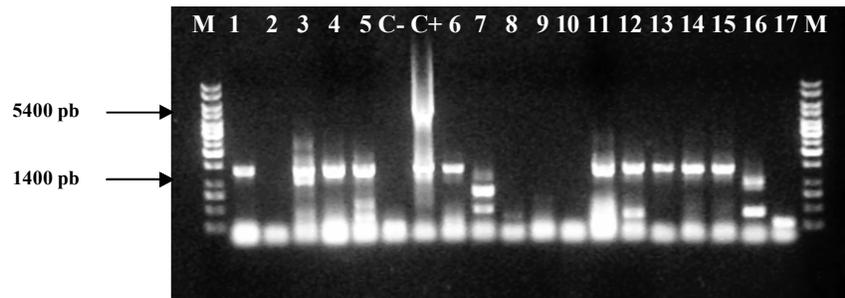


Fig. 4.14

Controllo della PCR con primer BLGT3 e BLGT4 mediante elettroforesi su gel d'agarosio

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1→17 = cloni isolati di fibroblasti bovini trasfettati BLG-HyTk/siRNA

C+ = controllo positivo: plasmide di controllo per l'evento di HR + DNA bovino

C- = controllo negativo H₂O

Abbiamo analizzato 56 cloni, di cui nessun ricombinante omologo.

In questi primi esperimenti con i fibroblasti bovini, abbiamo riscontrato difficoltà nell'espansione clonale a partire da singola cellula: ciò è in linea con quanto riportato in letteratura per le cellule primarie in generale.

Anche per quanto riguarda l'analisi mediante PCR, dobbiamo sottolineare la difficoltà nella messa a punto, oltre che per le ragioni già citate sopra, anche per il fatto che il numero di cellule che si ottengono dall'espansione clonale dei fibroblasti bovini è notevolmente ridotto rispetto a quello di HC11 o cellule ES.

	TRIAL 1*	TRIAL 2	TRIAL 3	TRIAL 4	TRIAL 5	Tot.	N° HR
N° cloni	35	12	15	18	11	91	0

Fig. 4.15

La tabella riassume il numero di cloni ottenuti ed analizzati in 5 esperimenti eseguiti per testare l'arricchimento dell'evento di "gene-targeting" mediante l'utilizzo di siRNA come selettore negativo per la PNS. Sono inoltre evidenziati il numero totale di cloni analizzati e il numero di quelli andati incontro a ricombinazione omologa (HR). Nell'esperimento n°1 abbiamo trasfettato cellule ES murine con il vettore β cas-HyTk/siRNA, mentre per gli altri abbiamo usato fibroblasti bovini con il plasmide BLG-HyTk/siRNA.

4.3 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO GFP

4.3.1 CMV-GFP

4.3.1.1 Sintesi del costrutto

Il primo tipo di cassetta d'espressione per la GFP, utilizzata come selettore negativo, presenta la sequenza codificante sotto il controllo del promotore CMV (CMV-GFP). Il vettore di ricombinazione ha come bersaglio la β -caseina murina e come selettore positivo il gene di fusione HyTk compreso tra un sito *loxP* e un sito *lox* mutato (*lox2272*) (β -loxTK⁻rev/GFP^{rev}).

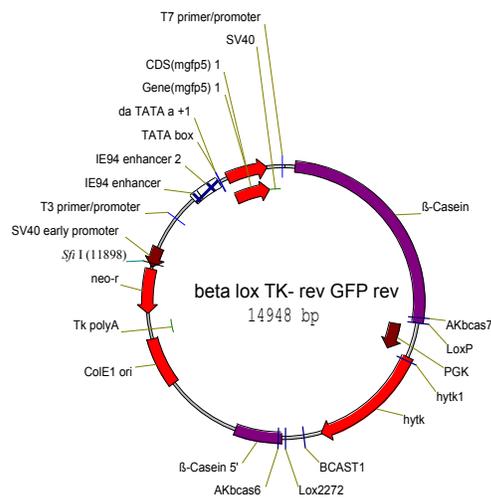


Fig. 4.16

Vettore di ricombinazione avente come bersaglio la β -caseina murina, come selettore positivo il gene di fusione HyTk fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272* e come selettore negativo la cassetta d'espressione CMV-GFP.

4.3.1.2 Trasfezione in HC11

➤ Valutazione dell'efficienza di HR in HC11 mediante PCR

Gli isolati di HC11 trasfettate col vettore di ricombinazione β -loxTK^{rev}/GFP^{rev}//SfiI sono stati analizzati tramite PCR con primer β casT1 e β casT2: il primo riconosce una sequenza all'interno del vettore di "targeting", mentre il secondo si appaia ad una regione endogena della β -caseina murina (introne1) non compresa nei costrutti utilizzati per la trasfezione. In questo modo si ottiene un amplificato di 1269 pb solo nel caso di avvenuta ricombinazione omologa.

Il controllo positivo della reazione di PCR è un costrutto (Bcas PCR targeting control-c), che comprende entrambe le regioni di appaiamento dei due primer e che genera un amplificato di dimensioni simili (1209 pb), ma non uguali a quelle che si ottengono in caso di avvenuto "gene-targeting", in modo che sia possibile distinguere un'eventuale contaminazione plasmidica. I lisati sono stati analizzati anche con primer GDX1 e GDX2, come controllo endogeno.

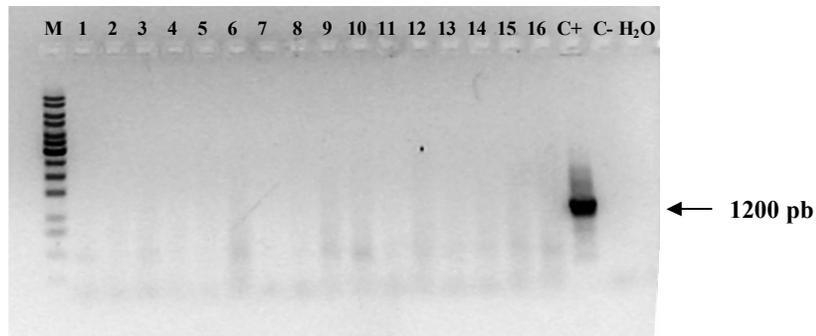


Fig. 4.17

Corsa elettroforetica dei prodotti di PCR β casT1+ β casT2.

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1→16 = lisati di cloni HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev}

C+ = plasmide controllo positivo

C- e H₂O = controlli negativi

Abbiamo analizzato 1131 lisati tramite PCR e in nessun caso si è individuato un evento di ricombinazione omologa.

	TRIAL 1	TRIAL 2	TRIAL 3	TRIAL 4	Tot.	N° HR
N° cloni	384	336	66	345	1131	0

Fig. 4.18

La tabella riassume il numero di cloni ottenuti ed analizzati in 4 esperimenti eseguiti trasfettando il vettore β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} in HC11, il numero totale di cloni analizzati e il numero di quelli andati incontro a ricombinazione omologa (HR).

➤ Valutazione dell'espressione della GFP mediante FACS

Dall'utilizzo della GFP come selettore negativo, ci attendevamo che i cloni fluorescenti fossero andati incontro a ricombinazione casuale e che quindi sicuramente non avessero subito il "gene-targeting", e per questo motivo li abbiamo esclusi dalla procedura d'isolamento. Il possibile evento di HR doveva eventualmente risultare tra i cloni visualizzati come "non-fluorescenti".

Tuttavia abbiamo notato che la GFP presentava alcuni problemi di espressione: innanzitutto la percentuale di cloni "verdi" era piuttosto bassa (vedi grafico sotto), l'intensità era variabile e nella maggior parte dei casi non tutte le cellule di un clone risultavano fluorescenti.

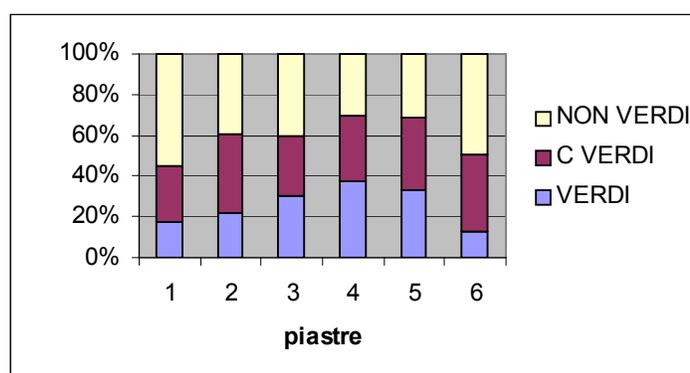


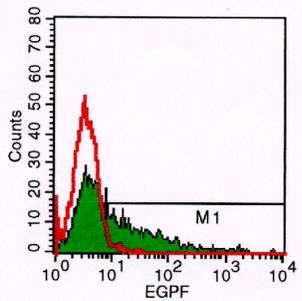
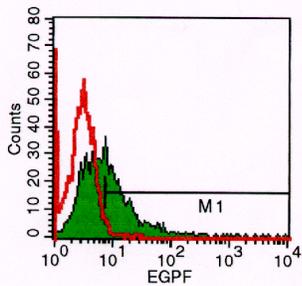
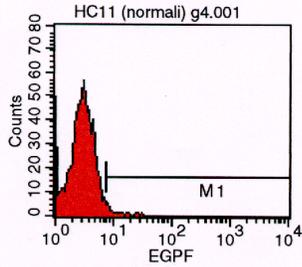
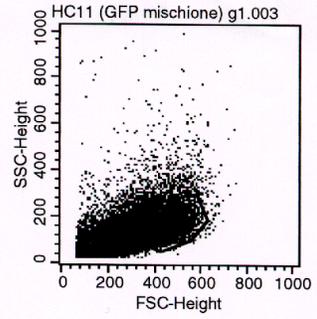
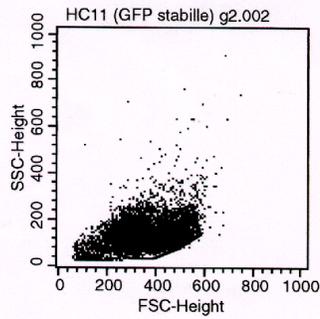
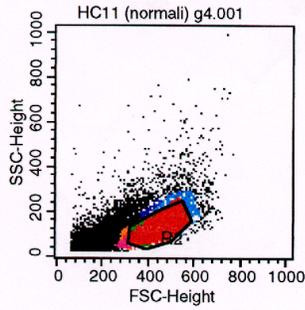
Fig. 4.19

Percentuale di cloni fluorescenti di HC11 trasfettate col vettore β -loxTK^{rev}/GFP^{rev}. Nel grafico sono visualizzati 6 esperimenti e per ciascuno si è calcolata la percentuale di cloni identificati come fluorescenti (verdi), non fluorescenti (non verdi) e misti (c verdi).

All'inizio abbiamo ipotizzato che fosse un problema di rilevazione del segnale al microscopio a fluorescenza e abbiamo deciso di far eseguire anche un'analisi citofluorimetrica su un clone identificato da noi come fluorescente, uno non fluorescente e uno misto.

Tuttavia tali cellule analizzate mediante FACS, hanno confermato i nostri dati: solo il 40% delle cellule di un clone riespanso classificato come fluorescente risultavano effettivamente "verdi", indicando così un chiaro problema di espressione e non di visualizzazione della GFP.

Nelle pagine seguenti vengono riportati i tracciati e l'analisi statistica che ci sono stati forniti in seguito all'analisi effettuata mediante citofluorimetro FACScan-3 colori (Becton Dickinson).



Histogram Statistics

File: HC11 (normali) g4.001 Sample ID: HC11 (normali) g4
 Patient ID: g4 Acquisition Date: 18-Dec-03
 Gate: G2 Gated Events: 4539
 Total Events: 9358 X Parameter: FL1-H EGPF (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	4539	100.00	48.50	3.19
M1	46	1.01	0.49	11.35

Histogram Statistics

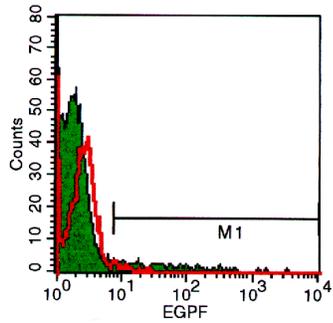
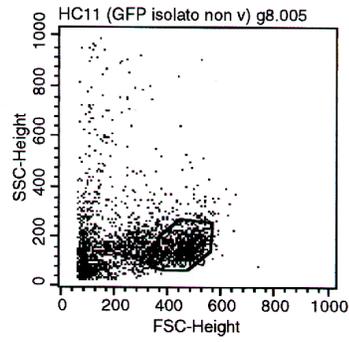
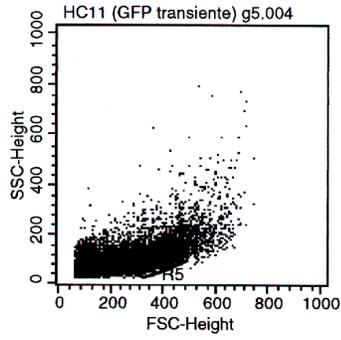
File: HC11 (GFP stabile) g2.002 Sample ID: HC11 (GFP stabile) g2
 Patient ID: g2 Acquisition Date: 18-Dec-03
 Gate: G3 Gated Events: 4896
 Total Events: 7985 X Parameter: FL1-H EGPF (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	4896	100.00	61.31	20.03
M1	1937	39.56	24.26	43.88

Histogram Statistics

File: HC11 (GFP mischione) g1.003 Sample ID: HC11 (GFP mischione) g1
 Patient ID: g1 Acquisition Date: 18-Dec-03
 Gate: G4 Gated Events: 3743
 Total Events: 14774 X Parameter: FL1-H EGPF (Log)

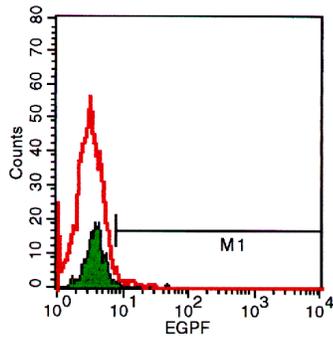
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	3743	100.00	25.34	24.53
M1	1418	37.88	9.60	57.97



Histogram Statistics

File: HC11 (GFP transiente) g5.004 Sample ID: HC11 (GFP transiente) g5
 Patient ID: g5 Acquisition Date: 18-Dec-03
 Gate: G5 Gated Events: 5785
 Total Events: 15045 X Parameter: FL1-H EGPF (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	5785	100.00	38.45	4.62
M1	188	3.25	1.25	86.61



Histogram Statistics

File: HC11 (GFP isolato non v) g8.005 Sample ID: HC11 (GFP isolato non v) g8
 Patient ID: g8 Acquisition Date: 18-Dec-03
 Gate: G6 Gated Events: 825
 Total Events: 2454 X Parameter: FL1-H EGPF (Log)

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	825	100.00	33.62	4.00
M1	7	0.85	0.29	16.79

Ogni campione è stato analizzato in citofluorimetria nel seguente modo:

- 1 Dot plot Forward scatter (FSC)
Side scatter (SSC)
per delimitare la popolazione omogenea di cellule di nostro interesse;
- 2 Istogramma, che presenta sull'asse delle ascisse l'intensità della GFP in scala logaritmica, mentre sull'asse delle ordinate è riportato il numero di cellule presenti;
- 3 Statistica dell'istogramma, che presenta i seguenti valori per le cinque popolazioni cellulari analizzate:

	HC11 wild-type	Is. fluorescente	Is. misto	Is. Non fluorescente	HC11 GFP-transiente
% cloni fluorescenti	1,00	39,56	37,88	0,85	3,25

Fig. 4.20

Statistica degli istogrammi. La tabella indica la percentuale di cellule rilevate fluorescenti all'analisi tramite FACS. I campioni analizzati sono cellule wild-type, un isolato di cellule trasfettate β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} e identificato al microscopio come "fluorescente", uno misto, uno identificato come "non fluorescente" e HC11 trasfettate in modo transiente con solamente la cassetta di espressione per la GFP introdotta nel nostro vettore di ricombinazione β -loxTK^{rev}/GFP^{rev}.

➤ Valutazione dell'integrazione del gene della GFP mediante Southern blot

Per assicurarci che il problema della GFP fosse dovuto all'espressione e non all'integrazione, abbiamo eseguito un Southern blot sul DNA digerito *SalI* di due isolati di HC11 trasfettate β -loxTK^{rev}/GFP^{Prev} identificati al momento dell'isolamento come "fluorescenti" (H9 e F8) e di due identificati "non fluorescenti" (G3 e E5).

La fluorescenza della GFP non è omogenea all'interno di un clone e sembra perdersi col tempo: cloni inizialmente identificati come verdi, in seguito a congelamento e riespansione non sembrano più tali. Infatti in seguito ad espansione dei cloni isolati, F8 risultava essere quello col maggior numero di cellule verdi, ma non completamente fluorescente; E5 non presentava alcuna cellula fluorescente; G3 e H9 erano pressoché uguali con poche cellule verdi.

La banda attesa nel caso d'integrazione era di 3153 pb.

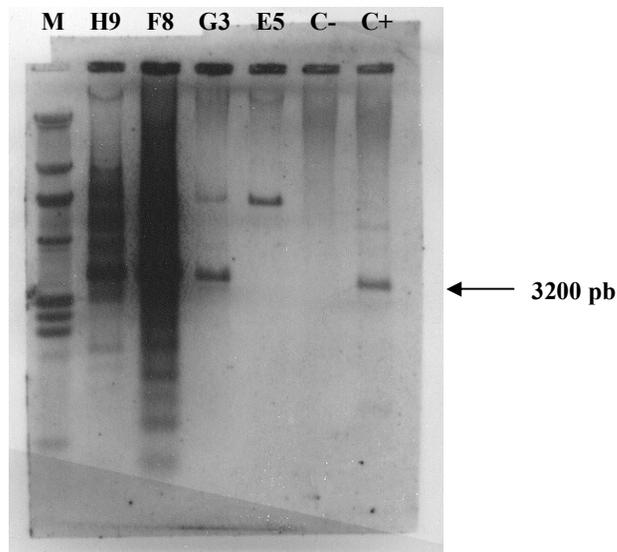


Fig. 4.21

Southern blot eseguito su DNA di cloni isolati di HC11 trasfettate β -loxTK^{rev}/GFP^{Prev} digeriti *SalI* e ibridati con sonda GFP

M = marcatore di peso molecolare λ // *HindIII* marcato con digossigenina

H9 e F8 = cloni isolati di HC11 trasfettate β -loxTK^{rev}/GFP^{Prev} identificati come "fluorescenti"

G3 e E5 = cloni isolati di HC11 trasfettate β -loxTK^{rev}/GFP^{Prev} identificati come "non fluorescenti"

C- = HC11 wild-type controllo negativo

C+ = plasmide β -loxTK^{rev}/GFP^{Prev} controllo positivo

Come si può vedere dalla foto, l'integrazione è avvenuta non solo nei cloni H9 e F8 identificati come "fluorescenti", ma anche nel G3 che invece è stato classificato come "non fluorescente".

4.3.1.3 Trasfezioni in cellule ES murine

Dato che l'efficienza di ricombinazione omologa è molto più alta nelle cellule ES rispetto alle cellule somatiche, abbiamo provato a trasfettare col vettore β -loxTK⁻rev/GFP^{rev} anche cellule ES murine. Abbiamo isolato in totale 394 cloni, escludendo dalla procedura d'isolamento e analisi quelli identificati come "fluorescenti" e che sicuramente non erano andati incontro a ricombinazione omologa. Dobbiamo sottolineare che le percentuali di cloni fluorescenti erano pressoché identiche a quelle degli esperimenti eseguiti sulle HC11.

➤ PCR

I cloni sono stati analizzati mediante PCR con primer β casT1 e β casT2 come sopra, e in nessun caso si è riscontrato un evento di ricombinazione omologa (banda attesa di 1269 pb).

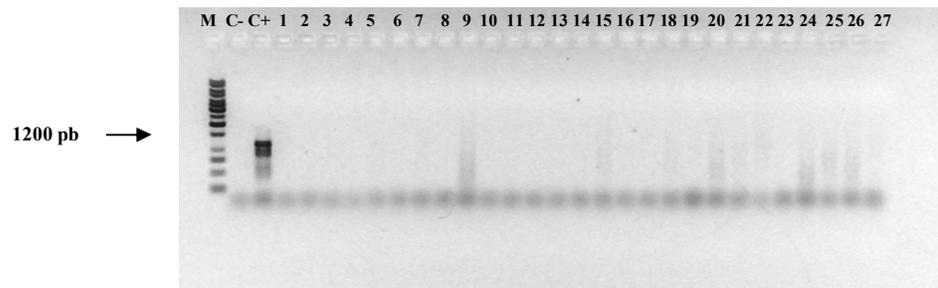


Fig. 4.22

Controllo della PCR con primer β casT1 e β casT2 mediante elettroforesi su gel d'agarosio

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1→27 = lisati di cellule ES murine trasfettate β -loxTK⁻rev/GFP^{rev}

C+ = plasmide controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

Per sicurezza, tali cellule sono state analizzate anche con primer β casT2 e β casT3, che si trovano entrambi su sequenze della β -caseina endogena, assenti nei vettori utilizzati per la trasfezione. In questo caso, si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1097 pb) e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4507 pb). In questo modo, a differenza della PCR con primer β casT1 e β casT2, si ha direttamente anche un controllo endogeno dell'amplificazione.

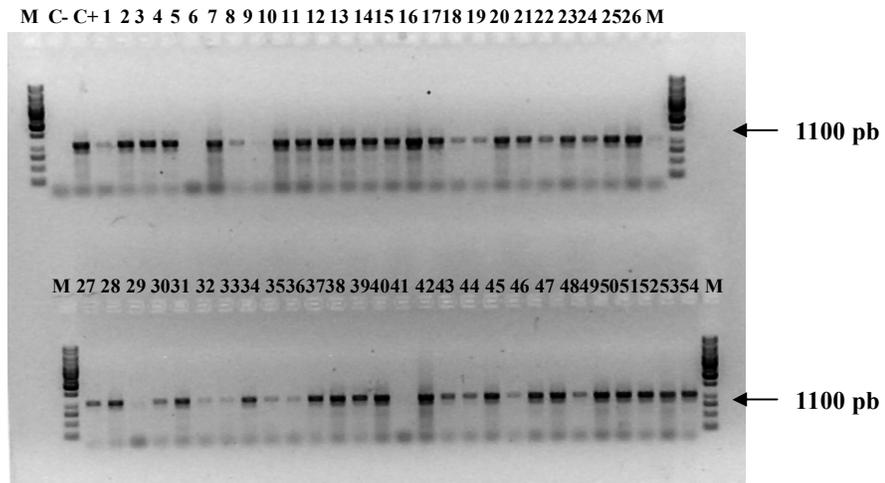


Fig. 4.23

Controllo della PCR eseguita con primer β casT2 e β casT3 mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1→54 = lisati di cellule ES murine trasfettate β -loxTK^{rev}/GFP^{rev}

C+ = DNA bovino controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

Anche con questa seconda analisi comunque, non abbiamo evidenziato nessun evento di "gene-targeting": come si può vedere dalla foto, i lisati presentano la banda da 1097 pb dell'allele wild-type, ma non quella di 4507 pb dovuta a ricombinazione omologa.

	TRIAL 1	TRIAL 2	TRIAL 3	TRIAL 4	TRIAL 5	Tot.	N° HR
N° cloni	68	148	4	89	85	394	0

Fig. 4.24

La tabella riassume il numero di cloni ottenuti ed analizzati in 5 esperimenti eseguiti trasfettando il vettore β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} in cellule ES murine, il numero totale di cloni analizzati e il numero di quelli andati incontro a ricombinazione omologa (HR).

4.3.2.2 Trasfezioni dei fibroblasti bovini con il vettore *BLG-HyTk/pCXEGFP*

➤ Estrazione del DNA

Come abbiamo descritto nel capitolo 3, avevamo iniziato a lisare i cloni cellulari di HC11 con il sistema PBND (PCR Buffer with Non-ionic Detergents), in quanto l'estrazione con il classico metodo del fenolo/cloroformio risulta sconveniente quando si hanno un gran numero di campioni d'analizzare, essendo una procedura a più fasi. Inoltre l'isolamento di DNA con fenolo/cloroformio è tossico, richiede tempi lunghi, utilizza digestioni con proteasi, estrazione con solventi organici, precipitazione con alcol e diverse centrifugazioni. A questo proposito è importante sviluppare nuove procedure d'estrazione rapida, che però conservino un'ottima qualità di DNA.

Successivamente abbiamo provato ad utilizzare il metodo HotSHOT (Hot Sodium Hydroxide and Tris), che, a differenza del sistema PBND, risulta più rapido e non utilizza proteinasi K.

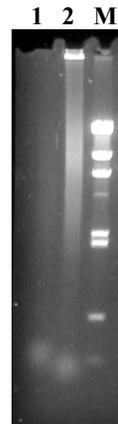
Tuttavia, il DNA che si ottiene con questa tecnica risulta notevolmente frammentato e la sua concentrazione è spesso troppo bassa: tutto ciò ovviamente va a inficiare la realizzazione di amplificazioni di frammenti di grosse dimensioni, come possono essere ad esempio quelli per l'individuazione degli eventi di "gene-targeting".

Inoltre tali lisati non possono essere utilizzati per altri tipi di analisi, come il Southern blot.

Le foto sotto rappresentano alcune delle prove eseguite per valutare i metodi di lisi cellulare.

Fig. 4.26

A destra, lisi del tipo PBND (1) e HotSHOT (2), contando lo stesso numero di cellule lisate.



M 1 2 3

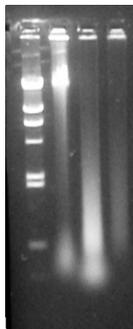


Fig. 4.27

A sinistra, estrazione classica con fenolo/cloroformio (1), metodo PBND (2) e PBND+EDTA (3), sempre contando lo stesso numero di cellule lisate.

Dalle foto è possibile notare la frammentazione del DNA estratto con i sistemi di lisi rapida PBND e HotSHOT, e confrontarla con l'aspetto intatto del DNA estratto con fenolo/cloroformio.

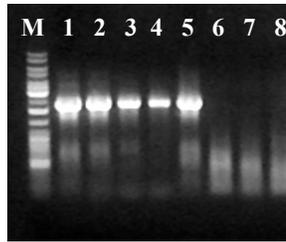


Fig. 4.28

PCR eseguita su concentrazioni decrescenti di un plasmide controllo e sul medesimo miscelato ad un lisato cellulare del tipo HotSHOT

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1 = 2 pg di plasmide controllo

2 = 200 fg di plasmide controllo

3 = 20 fg di plasmide controllo

4 = 2 fg di plasmide controllo

5 = 2 pg di plasmide controllo + 1 µl di lisato

6 = 2 pg di plasmide controllo + 2 µl di lisato

7 = 2 pg di plasmide controllo + 4 µl di lisato

8 = 2 pg di plasmide controllo + 8 µl di lisato

Nella foto della PCR di prova sopra, è evidente che quantitativi crescenti di lisati cellulari HotSHOT compromettono la realizzazione dell'amplificazione.

Visti i numerosi dubbi sui due tipi di lisi cellulare rapida sopraccitati, per quanto riguarda questi ultimi esperimenti sui fibroblasti bovini con i vettori di ricombinazione BLG-HyTk/pCXEGFP e BLG-neo/pCXEGFP, abbiamo deciso di estrarre il DNA dai cloni direttamente con il classico metodo del fenolo/cloroformio, anche perché il numero dei campioni d'analizzare risultava ridotto.

➤ PCR

In seguito alla trasfezione dei fibroblasti bovini col vettore BLG-HyTk/pCXEGFP, i cloni risultanti dalla selezione con igromicina sono stati controllati al microscopio a fluorescenza e abbiamo isolato solo quelli risultanti “non fluorescenti” e che potevano così aver subito l’evento di “gene-targeting”. Essi poi sono stati analizzati mediante PCR per valutare l’efficienza di ricombinazione omologa. I primer utilizzati sono BLGT3 e BLGT4 esattamente come sopra, che danno due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1395 pb) e allele di cloni che hanno subito l’evento di ricombinazione omologa (4897 pb) (5364 pb nel caso dell’amplificazione del plasmide controllo positivo).

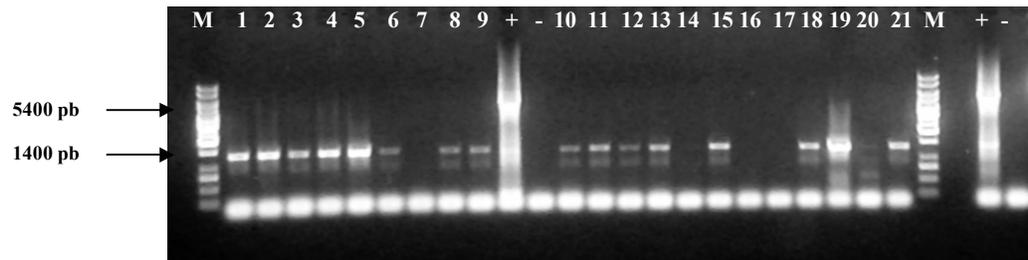


Fig. 4.29

Analisi dei prodotti di PCR con primer BLGT3 e BLGT4 mediante elettroforesi su gel d’agarosio all’1%.

M = marcatore di peso molecolare 1 Kb

1 → 21 = DNA di cloni di fibroblasti bovini trasfettati BLG-HyTk/pCXEGFP

+ = controllo positivo: plasmide di controllo per l’evento di HR + DNA bovino

- = controllo negativo: H₂O

Come si può vedere dalla foto, in nessun caso abbiamo riscontrato la banda da 4897 pb dovuta all’evento di “gene-targeting”, ma solo quella dell’allele wild-type di 1395 pb.

	N° cloni	Cloni verdi	Cloni isolati	Cloni analizzati	N° HR
TRIAL 1	50	3 (6%)	47	9	0
TRIAL 2	92	6 (6,5%)	86	12	0
Tot.	142	9 (6,3%)	133	21	0

Fig. 4.30

La tabella riassume i dati dei 2 esperimenti eseguiti trasfettando il vettore BLG-HyTk/pCXEGFP in fibroblasti bovini: in particolar modo abbiamo visualizzato il numero di cloni ottenuti, la percentuale di quelli fluorescenti, il numero di quelli isolati, di quelli che sono stati in grado di espandersi per poter essere analizzati e di quelli andati incontro a ricombinazione omologa (HR).

Utilizzando questo vettore di ricombinazione, che presenta come selettore positivo il gene di fusione HyTk, abbiamo notato percentuali molto basse di cloni fluorescenti. Tali percentuali ci hanno fatto pensare a una possibile interferenza a livello di espressione della GFP da parte dell’igromicina, soprattutto se tali dati vengono confrontati con quelli ottenuti utilizzando lo stesso vettore che reca però come selettore positivo il gene di resistenza al G418 (vedi paragrafo successivo).

Altra importante considerazione da fare è che, a causa della bassa capacità di espansione clonale da parte di queste colture primarie e della forte tossicità dell'igromicina, il numero effettivo di cloni che si espandono a sufficienza per poter essere analizzati è molto basso.

➤ Southern blot

Oltre all'analisi mediante PCR, abbiamo eseguito anche un Southern blot per essere sicuri di non aver tralasciato nessun possibile evento di ricombinazione omologa, date le difficoltà nella messa a punto della PCR con due prodotti di lunghezze diverse come in questo caso (1395 pb nel caso di allele wild-type, 4897 pb nel caso di ricombinazione omologa e 5364 pb sul plasmide controllo, in modo che sia possibile distinguere un'eventuale contaminazione plasmidica).

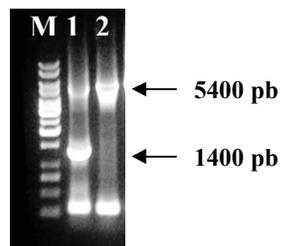


Fig. 4.31

Messa a punto della PCR eseguita con primer BLGT3 e BLGT4 sul plasmide controllo che genera una banda di 5364 pb

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1 = plasmide di controllo per l'evento di HR + DNA bovino

2 = plasmide di controllo per l'evento di HR

I DNA dei vari cloni di fibroblasti bovini trasfettati coi costrutti BLG-HyTk/pCXEGFP sono stati digeriti *Eco*RI e sottoposti a Southern blot con sonda BLG 1+3 new marcata con digossigenina.
La banda attesa in caso di allele / alleli wild-type è di circa 4334 pb, mentre nel caso di allele con evento di ricombinazione omologa deve comparire una banda di circa 3133 pb.

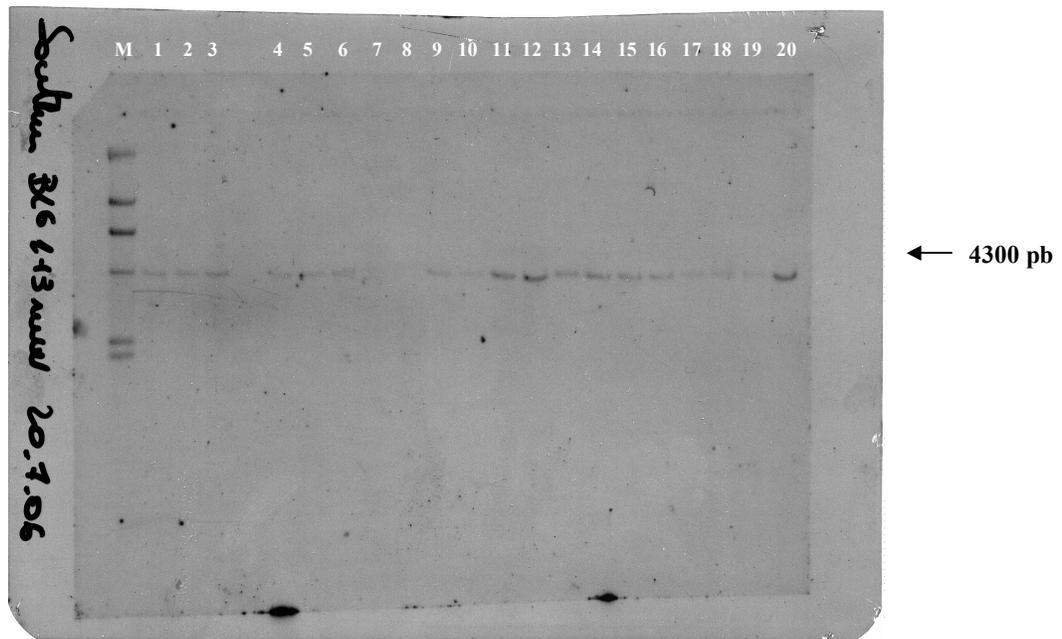


Fig. 4.32

Lastra da Southern blot eseguito con sonda BLG 1+3 new.

M = marcatore di peso molecolare λ DNA // *Hind*III marcato con digossigenina
1 → **19** = DNA di cloni di fibroblasti bovini trasfettati BLG-HyTk/pCXEGFP
20 = DNA di fibroblasti bovini wild-type

Come si può vedere dalla lastra abbiamo evidenziato la banda di 4334 pb dell'allele wild-type, ma in nessun clone cellulare si è individuato un evento di ricombinazione omologa (banda da 3133 pb).

4.3.2.3 Trasfezioni dei fibroblasti bovini con il vettore *BLG-neo/pCXEGFP*

Proseguendo con le trasfezioni dei fibroblasti, ci siamo accorti che una causa importante delle difficoltà di espansione clonale di questo tipo cellulare era dovuto alla presenza dell'antimicotico nel terreno, che è stato così eliminato dalle colture successive.

Con quest'ultimo vettore di ricombinazione *BLG-neo/pCXEGFP*, la percentuale di cloni neo-resistenti fluorescenti (cellule che quindi sono andate sicuramente incontro a ricombinazione casuale) era molto alta: essi sono stati scartati dalla procedura d'isolamento e solo quelli risultanti "non fluorescenti" sono stati analizzati mediante PCR con primer BLGT3+BLGT4+NEO1 in un caso e con BLGT3+BLGT4+NEO2: oltre alle bande generate dai primer BLGT3 e BLGT4 di 1395 pb nel caso di allele wild-type e di 3429 nel caso di allele con HR, in caso di "gene-targeting" ci attendevamo di visualizzare anche una banda di 1838 pb con NEO1 o di 2100 con NEO2.

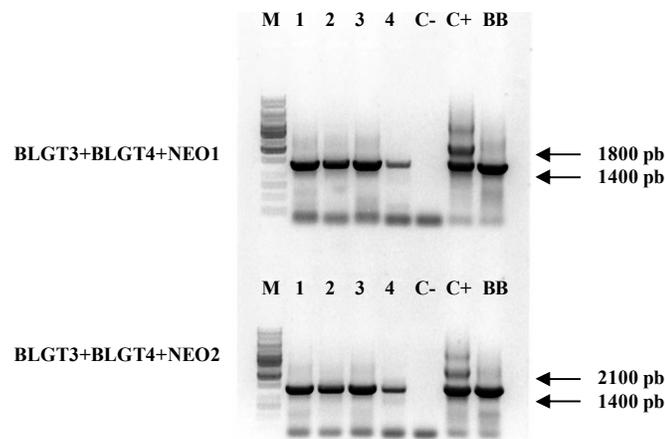


Fig. 4.33

Analisi di PCR su cloni *BLG-neo/pCXEGFP* non fluorescenti

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1→4 = DNA di cloni *BLG-neo/pCXEGFP* non fluorescenti

C- = controllo negativo H₂O

C+ = plasmide controllo positivo

BB = DNA bovino

Come si può vedere dalla foto, i cloni analizzati presentano solo la banda da 1395 pb corrispondente all'allele wild-type e non si è verificato alcun evento di "gene-targeting".

	N° cloni	Cloni verdi	Cloni isolati	Cloni analizzati	N° HR
TRIAL 1	11	9 (81,8%)	2	0	0
TRIAL 2	347	318 (91,6%)	29	4	0
TRIAL 3	58	35 (60,3%)	23	8	0
TRIAL 4	77	62 (80,5%)	15	13	0
TRIAL 5	215	150 (69,8%)	65	58	0
Tot.	708	574 (81,1%)	134	83	0

Fig. 4.34

La tabella riassume i dati dei 5 esperimenti eseguiti trasfettando il vettore BLG-neo/pCXEGFP in fibroblasti bovini: in particolar modo abbiamo visualizzato il numero di cloni ottenuti, la percentuale di quelli fluorescenti, il numero di quelli isolati, di quelli che sono stati in grado di espandersi per poter essere analizzati e di quelli andati incontro a ricombinazione omologa (HR).

Dal crescente numero di cloni isolati e analizzati mostrati nella tabella a partire dall'esperimento 1 fino all'esperimento 5, è evidente l'aumento di efficienza nella messa a punto della coltura e trasfezione dei fibroblasti. In particolar modo nell'esperimento 1 addizionavamo ancora il terreno con anfotericina; nel 2 e nel 3 abbiamo iniziato a togliere l'antimicotico; nel 4 e nel 5 abbiamo tolto il terreno di selezione 24 ore prima dell'isolamento dei cloni. Tutti questi accorgimenti ci hanno portato ad avere cloni con maggiore vitalità e ad incrementare la loro capacità di espansione clonale.

Come si può vedere dalla tabella, le percentuali di cloni fluorescenti sono molto più alte rispetto quelle precedentemente ottenute utilizzando come selettore positivo il gene di fusione HyTk. Questo effetto potrebbe essere influenzato dall'igromicina stessa che agisce inibendo la sintesi proteica a livello della traslocazioni sul ribosoma 70S e causando una lettura scorretta dell'mRNA. Questo meccanismo d'azione potrebbe essere una delle cause di tossicità dell'igromicina su alcuni tipi cellulari particolarmente sensibili, come abbiamo avuto modo di rilevare anche noi in vari esperimenti e su tipi cellulari diversi, e come è riportato anche da altri gruppi.

Inoltre dobbiamo sottolineare che i cloni fluorescenti BLG-neo/pCXEGFP risultano completamente verdi e l'intensità di fluorescenza più forte, a differenza delle cellule trasfettate con i costrutti precedenti, che avevano come selettore negativo la cassetta di espressione CMV-GFP, ciò a sottolineare in modo evidente il più alto livello di espressione ottenuto con la seconda cassetta pCX-EGFP.

4.4 ANALISI RMCE

Pur non essendo riusciti ad ottenere un evento di ricombinazione omologa con i vari vettori di “targeting” da noi allestiti, abbiamo comunque voluto valutare l’efficienza di scambio di cassette mediata dalla ricombinasi Cre (RMCE).

4.4.1 RMCE in HC11

I DNA dei pool di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} (vedi paragrafo 4.3.1.2) trasfettate in parallelo con il costrutto pB-2272-luc-PGKneo e cotrasfettati con lo stesso plasmide assieme al pPGKCre sono stati digeriti con l’enzima di restrizione *Pst*I, sottoposti a Southern blot e la membrana è stata ibridata con la sonda LUC1+2 marcata con digossigenina.

La banda attesa in caso di integrazione casuale del plasmide pB-2272-luc-PGKneo nel genoma murino è di 5502 pb, mentre nel caso di avvenuto RMCE si origina una banda di 2242 pb.



Fig. 4.35
Southern blot su DNA di HC11 sottoposte a RMCE.

- M = marcatore di peso molecolare λ // *Hind*III marcato con digossigenina
1 = isolato di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} E5 non fluorescente
2 = isolato di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} H9 fluorescente
3 = isolato di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} E5 non fluorescente trasfettato con pB-2272-luc-PGKneo
4 = isolato di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} H9 fluorescente trasfettato con pB-2272-luc-PGKneo
5 = isolato di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} E5 non fluorescente cotrasfettato con pB-2272-luc-PGKneo+pPGKCre
6 = isolato di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} H9 fluorescente cotrasfettato con pB-2272-luc-PGKneo+pPGKCre
C+ = plasmide pB-2272-luc-PGKneo controllo positivo

Come si può vedere dalla lastra i cloni sottoposti alla cotrasfezione presentano la banda attesa di 2242 pb dell’avvenuto scambio di cassette (RMCE).

4.4.2 RMCE in fibroblasti bovini

I DNA dei pool di fibroblasti bovini BLG-HyTk/siRNA (vedi paragrafo 4.2.3) trasfettati in parallelo con il costrutto pB2272/pCXEGFP-PGKneo e cotrasfettati con lo stesso plasmide assieme al pTurboCre sono stati digeriti con l'enzima *Xba*I, sottoposti a Southern blot e la membrana è stata ibridata con la sonda pCX 3+4 marcata con digossigenina.

La banda attesa in caso d'integrazione casuale del plasmide pB2272/pCXEGFP-PGKneo nel genoma bovino è di 4360 pb, mentre nel caso di avvenuto RMCE si origina una banda di 1483 pb.

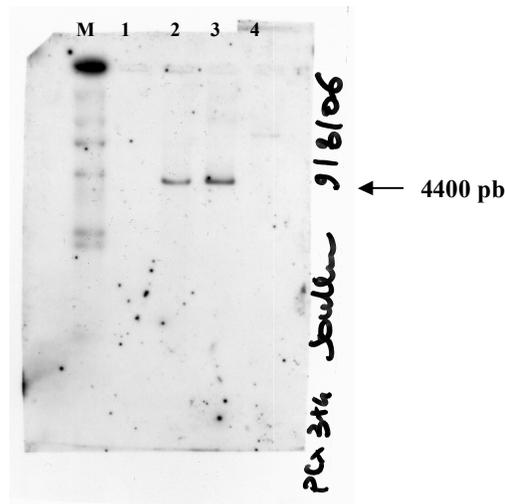


Fig. 4.36

Lastra da Southern blot eseguito con sonda pCX 3+4

M = marcatore di peso molecolare λ DNA // *Hind*III marcato con digossigenina

1 = isolato di fibroblasti bovini BLG-HyTk/siRNA

2 = isolato di fibroblasti bovini BLG-HyTk/siRNA trasfettato pB2272/pCXEGFP-PGKneo

3 = isolato di fibroblasti bovini BLG-HyTk/siRNA cotrasfettato pB2272/pCXEGFP-PGKneo e pTurboCre

4 = fibroblasti bovini trasfettati pCXEGFP-MAR-PGKneo (controllo positivo per la sonda)

Pur essendo elevato il numero di fibroblasti andati incontro a senescenza alla fine dell'esperimento a causa dei numerosi passaggi a cui sono stati sottoposti per le due trasfezioni successive, siamo comunque riusciti a ottenere una quantità di DNA sufficiente per eseguire un Southern blot e visualizzare la banda di 4360 pb derivante dall'integrazione casuale, ma non quella di 1483 pb originata dallo scambio di cassette (RMCE).