



UNIVERSITA' CATTOLICA DEL SACRO CUORE

Dottorato di ricerca in Biotecnologie Molecolari

ciclo XIX

S.S.D.: AGR/16

MESSA A PUNTO DI SISTEMI PER IL GENE-TARGETING IN CELLULE
IN CULTURA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PRODUZIONI
ANIMALI

Coordinatore: Ch.mo Prof. Lorenzo Morelli

Tesi di Dottorato di: Michela Lizier

Matricola: 3280164

Anno Accademico 2005/2006

1	Introduzione	7
1.1	La transgenesi	9
1.2	Applicazioni	10
1.2.1	Studio della funzionalità genica e di malattie umane	10
1.2.2	Xenotrapianti	10
1.2.3	Produzione di proteine ad uso farmaceutico	12
1.2.4	Miglioramento delle produzioni animali	14
1.3	Tecniche di transgenesi	16
1.3.1	Microiniezione pronucleare	17
1.3.2	Trasposoni	
1.3.3	Vettori retrovirali	
1.3.4	Vettori episomali	19
1.3.5	Utilizzo di gameti per la transgenesi	19
1.3.6	Cellule pluripotenti	20
1.4	Trasferimento nucleare (NT)	23
1.4.1	Tecnologia del “nuclear transfer”	23
1.4.2	Ricombinazione omologa e linee cellulari per il “nuclear transfer”	
1.5	Gene-targeting	28
1.5.1	Strategie di “targeting” classiche basate sulla ricombinazione omologa (HR)	
1.5.1.1	Strategie di selezione	31
1.5.1.2	Strategie a due fasi	33
1.5.2	DSB – double strand breaks –	35
1.5.3	TFOs – triplex forming oligonucleotides –	36
1.5.4	AAV – adeno-associated virus vectors –	36
1.5.5	Strategie di “targeting” basate su ricombinasi sito-specifiche	37
1.5.5.1	Strategie di base – integrazione in un sito bersaglio singolo	40
1.5.5.2	Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE)	42
2	Scopo e strategie adottate	47
2.1	Proteina p53	50
2.2	Short Interfering RNAs (siRNA)	51
2.3	Green fluorescent protein (GFP)	55
3	Materiali e metodi	57
3.1	Vettore di ricombinazione con selettore negativo p53	59
3.1.1	Sintesi dei costrutti	59
3.1.2	Preparazione del DNA per le trasfezioni	61
3.1.3	Colture cellulari di HC11 e trasfezioni	62
3.1.3.1	Analisi mediante PCR dei cloni isolati	65
3.1.3.2	Analisi mediante Western blot	68
3.1.4	Colture di cellule ES murine e trasfezioni	69
3.2	Vettore di ricombinazione con selettore negativo siRNA	71
3.2.1	Disegno degli oligonucleotidi	71
3.2.2	Allestimento del vettore di ricombinazione β cas-HyTk/siRNA	71
3.2.3	Allestimento del vettore di ricombinazione BLG-HyTk/siRNA	73
3.2.3.1	Regione 3’BLG	73
3.2.3.2	Regione 5’BLG	74
3.2.3.3	Plasmide pBS β LG 5’-3’	77
3.2.3.4	Plasmide pBSXba2272	78

	3.2.3.5 Plasmide pBS β LG 5'-3'/2272	80
	3.2.3.6 Inserimento del selettore negativo siRNA e del selettore positivo HyTk	81
	3.2.4 Colture cellulari e trasfezioni	82
	3.2.5 Analisi	83
	3.2.5.1 Cellule ES trasfettate col costrutto β cas-HyTk/siRNA	83
	3.2.5.2 Fibroblasti bovini trasfettati col costrutto BLG-HyTk/siRNA	84
3.3	Vettore di ricombinazione con selettore negativo GFP	87
	3.3.1 CMV-GFP	87
	3.3.1.1 Sintesi del costrutto e trasfezione in HC11	87
	3.3.1.2 Analisi mediante FACS	88
	3.3.1.3 Analisi mediante Southern blot	88
	3.3.2 pCX-EGFP	90
	3.3.2.1 Sintesi dei costrutti	90
	3.3.2.2 Colture cellulari e trasfezioni	92
	3.3.2.3 Analisi dei cloni isolati	93
3.4	Analisi RMCE (recombinase-mediated cassette exchange)	96
	3.4.1 RMCE in HC11	96
	3.4.2 RMCE in fibroblasti bovini	98
4	Risultati e discussione	101
	4.1 Vettore di ricombinazione con selettore negativo p53	103
	4.1.1 Sintesi del costrutto	103
	4.1.2 Trasfezione in HC11	104
	4.1.3 Trasfezione in cellule ES murine	106
	4.2 Vettore di ricombinazione con selettore negativo siRNA	110
	4.2.1 Sintesi dei costrutti	110
	4.2.2 Trasfezione di cellule ES col vettore β cas-HyTk/siRNA	112
	4.2.3 Trasfezione di fibroblasti bovini col vettore BLG-HyTk/siRNA	117
	4.3 Vettore di ricombinazione con selettore negativo GFP	118
	4.3.1 CMV-GFP	118
	4.3.1.1 Sintesi del costrutto	118
	4.3.1.2 Trasfezione in HC11	119
	4.3.1.3 Trasfezione in cellule ES murine	125
	4.3.2 pCX-EGFP	127
	4.3.2.1 Sintesi dei costrutti	127
	4.3.2.2 Trasfezioni dei fibroblasti bovini con il vettore BLG-HyTk/pCXEGFP	128
	4.3.2.3 Trasfezioni dei fibroblasti bovini con il vettore BLG-neo/pCXEGFP	133
	4.4 Analisi RMCE	135
	4.4.1 RMCE in HC11	135
	4.4.2 RMCE in fibroblasti bovini	136
5	Conclusioni	137
6	Bibliografia	143

Messa a punto di sistemi per il “gene-targeting” in cellule in coltura per il miglioramento delle produzioni animali (riassunto)

Il “gene-targeting” in colture cellulari associato alla tecnica del trasferimento nucleare oggi rappresenta il sistema d’elezione nella creazione di animali transgenici, in quanto garantisce inserzioni/delezioni mirate. Purtroppo il sistema della ricombinazione omologa (HR) è poco efficiente soprattutto in cellule somatiche, uniche disponibili per gli animali d’interesse zootecnico: risulta così necessaria una strategia di selezione per inibire la crescita di cellule con evento di ricombinazione casuale. La “positive-negative selection” (PNS) è la tecnica per geni non attivamente trascritti nel tipo cellulare utilizzato. I classici vettori PNS presentano una bassa efficienza di arricchimento, a causa delle cassette di selezione negativa; in più determinano un effetto tossico generale sulle cellule, implicando l’utilizzo di solito di due antibiotici. In questo lavoro abbiamo scelto come locus bersaglio quello della β -lattoglobulina bovina e testato tre cassette di selezione negativa in fibroblasti: una cassetta codificante la p53, proteina chiave nel processo apoptotico, una codificante siRNA (Short Interfering RNAs) in grado di silenziare i selettori positivi e due diverse cassette d’espressione per la GFP (Green Fluorescent Protein). Questi nuovi vettori di ricombinazione permettono l’utilizzo di un unico antibiotico, determinando condizioni di coltura meno tossiche.

Optimization of gene-targeting in cell culture to improve animal production (abstract)

Gene-targeting of cultured cells combined with nuclear transfer currently is the most effective procedure to produce transgenic livestock, because it provides the means for modifying, in a defined manner, virtually any gene. Nevertheless homologous recombination (HR) is a low frequency event in mammalian cells, above all in somatic cells, therefore a selection strategy is required to enrich for homologous recombination among vector integration events in cell culture. Positive-negative selection (PNS) is the preferred option to target genes that are not actively transcribed in the cell type of choice. The classical PNS targeting vectors have a low efficiency due to the negative selection cassettes. Moreover, the classical selection of recombinants with two different selective drugs has the drawback of a general toxic effect on the whole cell population. In this work we chose to target the bovine β -lactoglobulin gene and we tested three different negative selection cassettes in bovine fibroblasts: a p53 protein expressing cassette, a siRNA (Short Interfering RNAs) expressing cassette directed against the positive selector and two different GFP (Green Fluorescent Protein) expressing cassettes. Such new targeting vectors allow a single selective drug employ and produce less toxic culture conditions.

1. INTRODUZIONE

1.1 LA TRANSGENESI

Gli esseri viventi sono in grado di evolvere rapidamente a causa della pressione selettiva esercitata dall'ambiente. Questa capacità è stata notevolmente esplorata dall'uomo a partire dalla nascita dell'agricoltura e dell'allevamento. I nostri antenati furono in grado di creare, mediante incroci, varietà e razze a loro utili e queste specie selezionate vennero utilizzate come fonti di cibo, animali da compagnia o piante ornamentali.

Per aumentare le possibilità di scelta, gli scienziati iniziarono a indurre numerose mutazioni casuali nel genoma utilizzando sostanze chimiche o radiazioni.

Gli studi di genetica successivamente fecero grandi progressi grazie all'utilizzo di mutanti di *Drosophila*.

Qualche anno dopo vennero indotte mutazioni sistematiche in topi, somministrando etilnitrosourea ai maschi: nel migliore dei casi, questo portava alla generazione di nuove linee di animali con diverse anomalie che mimavano all'incirca malattie umane.

Ovviamente questo approccio non era preciso, poiché venivano mutati geni sconosciuti, inclusi quelli responsabili del fenotipo osservato.

La selezione genetica classica non presuppone la conoscenza dei geni coinvolti nelle mutazioni che vengono introdotte tramite gli incroci tra piante o animali. Questo sistema oggi sta migliorando grazie all'utilizzo di marcatori genetici. Tuttavia con queste tecniche convenzionali, un carattere nuovo richiede tempi piuttosto lunghi per emergere all'interno di una specie.

L'utilizzo di piante e animali transgenici offre nuove possibilità: innanzitutto permette l'inserimento stabile di un'unica informazione genetica conosciuta, proveniente dalla stessa o da un'altra specie, all'interno del genoma. Questo metodo è dunque più preciso ed è in grado di creare un livello maggiore di biodiversità rispetto alla selezione classica. Dall'altra parte, le tecniche di transgenesi potrebbero indurre effetti collaterali imprevedibili dovuti all'interferenza del gene esogeno nel sito d'inserzione o all'interazione dell'RNA o della proteina corrispondente con i vari meccanismi cellulari.

La transgenesi presenta oggi diverse applicazioni: è diventata uno strumento essenziale per lo studio della funzionalità genica; ha contribuito a creare modelli importanti per lo studio di malattie umane e a ridurre i fenomeni di rigetto di organi di suino trapiantati nell'uomo. Inoltre alcune proteine utilizzate in farmacologia vengono prodotte nel latte di animali transgenici. Oltre a ciò le tecniche di transgenesi possono incrementare le produzioni di origine animale.

Dalla nascita del primo animale transgenico, il cosiddetto "mighty mouse" (Palmiter et al., 1982), ad oggi sono stati fatti molti passi in avanti, anche per quanto riguarda costi e riduzione del numero di animali sacrificati negli esperimenti.

Nonostante i numerosi successi tuttavia, l'utilizzo di animali transgenici presenta ancora oggi diversi problemi tecnici, in quanto il trasferimento genico risulta ancora poco efficace in alcune specie e l'espressione del gene esogeno e l'interferenza col genoma ospite non sono completamente prevedibili.

1.2 APPLICAZIONI

1.2.1 Studio della funzionalità genica e di malattie umane

La principale applicazione degli organismi geneticamente modificati riguarda lo studio della funzionalità e della regolazione genica, in relazione soprattutto alle malattie umane. Ci si aspetta che nel prossimo ventennio vengano create oltre 300000 linee di topi transgenici e che i 22000-25000 geni murini siano silenziati o espressi a livelli inferiori. Si ritiene che entro 5 anni saranno disponibili linee di cellule embrionali staminali (ES) in cui verranno silenziati quasi tutti i geni murini per generare animali mutati (Abbott, 2004).

Gli animali transgenici sono utilizzati come modelli per studiare malattie umane in diversi campi: malattie genetiche, malattie neurodegenerative, infezioni, apoptosi cellulare, invecchiamento, arteriosclerosi, cancro, xenotrapianti, endocrinologia, riproduzione e sviluppo.

Si stanno creando modelli sempre più sofisticati per mimare malattie umane. Linee di topo recanti diversi alleli dello stesso gene umano sono state generate per valutare il loro coinvolgimento nell'efficacia di nuove molecole farmaceutiche. Ciò riduce il numero di sperimentazioni della fase III (studi terapeutici su larga scala), per l'immissione sul mercato di nuovi farmaci per l'uomo.

Il topo è un buon modello per studiare molte malattie umane, ma non tutte, tra queste il metabolismo lipidico e l'arteriosclerosi. Per questo motivo, sono largamente utilizzati conigli transgenici per studiare malattie umane dovute a disordini del metabolismo lipidico (Fan et al., 2003). Anche i suini possono essere usati per lo stesso tipo di studi, ma in questo caso le tecniche di transgenesi risultano più complesse e costose. Altre malattie possono essere studiate con successo mediante modelli di suini transgenici (Kues e Niemann, 2004). Il ratto risulta appropriato per alcune malattie specifiche e i recenti successi nella loro clonazione permetteranno in teoria il silenziamento genico in questa specie e la creazione quindi di nuovi importanti modelli (Zhou et al., 2003).

Anche le capre transgeniche vengono utilizzate come modelli per alcune malattie umane. Per esempio, linee di capre omozigote senza corna sono sterili: ciò è dovuto ad una mutazione responsabile del differenziamento anomalo delle gonadi fetali (Pailhoux et al., 2001). Tale anomalia è simile ad alcune malattie genetiche nell'uomo.

1.2.2 Xenotrapianti

Circa 250000 persone oggi sopravvivono grazie al trapianto di organi umani (allograpianti): in molti casi infatti non esistono trattamenti terapeutici alternativi e il ricevente morirebbe senza trapianto. Tuttavia, la richiesta a livello mondiale è due volte superiore rispetto alle reali disponibilità di organi. Ciò ha portato alla triste realtà che diverse centinaia di pazienti ogni anno muoiono a causa della mancanza di organi da trapiantare. Per superare questo problema, la soluzione oggi è rappresentata dagli xenotrapianti (trapianto di organi tra specie diverse, per esempio dagli animali all'uomo).

L'idea del trapianto di organi di animali nell'uomo risale a circa un secolo fa. Il trapianto fu un successo dal punto di vista chirurgico in molti casi. Gli organi trapiantati tuttavia di solito non sopravvivevano a causa del rigetto. Così questo tipo di approccio fu abbandonato fino all'avvento degli immunosoppressori, tutt'ora utilizzati negli allograpianti. L'utilizzo di immunosoppressori però non riduce il rigetto

nel caso di xenotrapianti. Ciò indica che alcuni dei meccanismi di rigetto nel caso di xenotrapianti siano diversi rispetto agli allotrapianti.

Il maiale sembra essere l'animale donatore ottimale in quanto:

- gli organi hanno dimensioni simili a quelle umane
- l'anatomia e la fisiologia del maiale non sono molto diverse da quelle umane
- i maiali hanno cicli di riproduzione brevi e prole numerosa
- i suinetti crescono rapidamente
- il mantenimento è possibile con alti standard igienici e costi relativamente bassi
- i maiali sono una specie addomesticata
- la transgenesi è possibile in questa specie

I prerequisiti essenziali per xenotrapianti efficaci sono:

1. la prevenzione di trasmissione di zoonosi dall'animale donatore al paziente ricevente. Questo aspetto è molto importante in quanto qualche anno fa è stato dimostrato che retrovirus endogeni del maiale (PERV) possono essere prodotti da linee cellulari suine e sono in grado d'infettare anche linee cellulari umane (Patience et al., 1997). Tuttavia ad oggi, nessuna infezione è stata riscontrata in pazienti che hanno ricevuto varie forme di tessuti di maiali. Recenti studi hanno dimostrato che i PERV non rappresentano un rischio rilevante per il ricevente, qualora vengano adottate tutte le misure precauzionali necessarie. In più è stata identificata una razza di maiali nani che non produce PERV infettivi (Oldmixon et al., 2002).
2. compatibilità degli organi del donatore per anatomia e fisiologia con quelli del ricevente
3. superamento del rigetto immunologico dell'organo trapiantato. Gli ostacoli immunologici sono essenzialmente quattro:
 - a. la risposta da rigetto iperacuto (HAR) avviene nel giro di secondi o minuti. Nel caso di xeno-organi, gli anticorpi naturali già presenti nel sangue del paziente prima del trapianto reagiscono con le strutture antigeniche situate sulla superficie dell'organo del maiale, inducendo il rigetto iperacuto, mediante l'attivazione della cascata del complemento generata dalla formazione del complesso antigene-anticorpo. Questo porta alla formazione di complesso di attacco alla membrana (MAC). Tuttavia la cascata del complemento può essere bloccata in vari punti mediante l'espressione di geni regolatori che prevengono la formazione del MAC. Regolatori della cascata del complemento ben noti sono CD55 (decay accelerating factor, DAF), CD46 (membrane cofactor protein, MCP) e CD59. Il MAC è in grado di distruggere lo strato di cellule endoteliali dei vasi sanguigni e determinare così lisi, trombosi, perdita d'integrità vascolare e infine rigetto dell'organo trapiantato.
 - b. Il rigetto vascolare acuto (AVR) avviene nel giro di qualche giorno. Si pensa che gli anticorpi xenoreattivi indotti siano i responsabili dell'AVR. Le cellule endoteliali dei vasi capillari dell'organo trapiantato perdono le loro proprietà anti-trombotiche, attirano leucociti, monociti e piastrine, causando anemia e perdita dell'organo trapiantato.
 - c. Il rigetto cellulare avviene qualche settimana dopo il trapianto. In questo processo i vasi sanguigni dell'organo trapiantato vengono danneggiati dai linfociti T, che invadono gli spazi intercellulari e distruggono l'organo. Il rigetto si osserva in seguito all'allograpianto e di solito si risolve con la somministrazione a vita di farmaci immunosoppressivi.

- d. Il rigetto cronico è un processo immunologico complesso che porta al rigetto dell'organo trapiantato dopo alcuni anni. Questo processo è lento e progressivo e le cause sono sconosciute. In questi casi, l'unica possibilità è un ulteriore trapianto.

Per quanto riguarda l'utilizzo di maiali come donatori d'organi, lo scopo principale è superare il problema del rigetto iperacuto, e ciò non si può risolvere con la somministrazione di farmaci immunosoppressivi, in quanto non hanno effetti sul processo di rigetto regolato dal complemento. La strategia più promettente per risolvere questo ostacolo è la sintesi di proteine umane regolatrici del complemento in maiali transgenici (Cozzi e White, 1995; White 1996b; Bach, 1998; Platt e Lin, 1998). In seguito al trapianto, l'organo del maiale produce proteine che regolano l'attività del complemento, prevenendo l'attacco del complemento stesso sul ricevente. Sono stati generati suini transgenici per il DAF e i loro cuori sono stati trapiantati in primati non umani. In seguito al trapianto, la sopravvivenza media del ricevente raggiungeva un massimo di 40-90 giorni, mentre gli organi controllo non transgenici venivano distrutti nel giro di pochi minuti. I primati dovevano essere trattati con alte dosi di farmaci immunosoppressivi per riuscire a mantenere in vita gli xenotrapianti. In un altro esperimento, reni di suini transgenici sono stati mantenuti in scimmie trattate con immunosoppressori per 78 giorni mentre i reni dei suini di controllo sono stati distrutti il giorno stesso del trapianto (Cozzi et al., 2000). Questo esperimento pionieristico è stato la prova che questi suini transgenici potrebbero essere una risorsa di organi per l'uomo, una volta compreso quali geni dovranno essere aggiunti o deleti dal genoma suino.

Un'altra strategia promettente per quanto riguarda gli xenotrapianti è l'inattivazione di strutture antigeniche situate sulla superficie degli organi del maiale. L'antigene principale del suino è il disaccaride galattosio- α (1,3)-galattosio legato covalentemente a diverse proteine presenti sulla superficie delle cellule. La sintesi del galattosio- α (1,3)-galattosio è catalizzata dall'enzima α (1,3)galattosil transferasi presente in tutti gli organismi tranne nei primati: questi ultimi presentano quindi anticorpi contro il galattosio- α (1,3)-galattosio. La presenza di questi anticorpi non è dunque dovuta ad una reazione immunitaria indotta dalle cellule estranee: questo è il motivo per cui il primo meccanismo di rigetto è così veloce e potente. È stato dimostrato che la rimozione di questi anticorpi dal sangue del paziente impedisce il rigetto d'organo, ma solo temporaneamente fino alla ricomparsa di tali anticorpi. In due studi indipendenti del 2002 il gene dell' α -galattosil transferasi è stato silenziato utilizzando la ricombinazione omologa e le tecniche di clonazione. I reni provenienti da questi animali non mostravano rigetto iperacuto quando trapiantati in scimmie immunosopresse (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002). Utilizzando lo stesso tipo di approccio, si stanno studiando altri geni coinvolti nel secondo e nel terzo meccanismo di rigetto, rigetto acuto vascolare e cellulare rispettivamente.

1.2.3 Produzione di proteine ad uso farmaceutico

Uno dei sistemi migliori per produrre proteine ad uso farmaceutico su scala industriale a basso costo è direttamente nel latte degli animali, utilizzando promotori specifici per la ghiandola mammaria. Nel 1987 vennero creati topi transgenici in grado di secernere il TPA (attivatore del plasminogeno tissutale) umano attivo e la β -lattoglobulina ovina nel loro latte. Negli anni successivi furono prodotte diverse proteine con questo sistema: fattori del sangue, albumina, enzimi, seta del ragno, vaccini e soprattutto

anticorpi monoclonali. Sono state utilizzate diverse specie come bioreattori tra cui conigli, pecore, capre, maiali e vacche, cercando di bilanciare la quantità di proteina prodotta e le modificazioni post-traduzionali necessarie. La possibile trasmissione di patogeni presenti nel latte ai pazienti non sembra essere un problema cruciale di questo sistema, anche se alcuni ricercatori hanno ipotizzato la trasmissione di prioni. È interessante a questo proposito la produzione di proteine anche nel latte di conigli che, sebbene ne producano ridotte quantità, sono una specie insensibile al prione.

Tra i vantaggi di questa tecnologia vi sono anche ridotte implicazioni di ordine etico e nessun problema di tipo ambientale.

Infine le cellule di mammifero forniscono automaticamente alle proteine le modificazioni post-traduzionali necessarie (glicosilazioni, tagli, ecc.): questa è la principale differenza tra gli animali utilizzati come bioreattori e altri sistemi. Infatti i batteri sono appropriati quando non sono necessarie modificazioni post-traduzionali delle proteine e il lievito non è in grado di glicosilarle così come fanno le cellule animali. Anche le piante possono produrre grandi quantità di proteine a basso costo: in questo caso sono correttamente processate, ma non perfettamente glicosilate.

Sono state generate circa 100 proteine in via sperimentale nel latte e 5-10 di esse sono ora sottoposte a studi clinici. Tra le proteine che potranno entrare nel mercato nei prossimi anni ci sono l'antitrombina III umana (ATIII) (Meade, 1999), un vaccino contro la malaria (Stowers et al., 2002), l'inibitore C1 umano (Koles et al., 2004), un vaccino contro i rotavirus (Soler et al., 2004) e l' α -anti-tripsina (α -AT).

Recentemente è stata prodotta anche la lattoferrina umana in grandi quantità nella ghiandola mammaria di vacche transgeniche (van Berkel et al., 2002).

Sulla base dei livelli medi d'espressione delle proteine, i volumi di latte giornalieri e l'efficienza di purificazione, si è calcolato che saranno necessarie 5400 vacche per produrre 100000 kg di albumina sierica umana (HSA), quantità richiesta in un anno in tutto il mondo, 4500 pecore per produrre 5000 kg di α -AT, 100 capre per 100 kg di anticorpi monoclonali, 75 capre per 75 kg di ATIII e due maiali per 2 kg di fattore di coagulazione IX umano (Rudolph, 1999).

Quindi la produzione di proteine ad uso farmaceutico nel latte di animali sembra essere il sistema migliore per la produzione su larga scala oggi. Tuttavia sebbene una varietà di proteine siano già state prodotte, non tutte possono essere espresse agli alti livelli desiderati. L'eritropoietina (EPO) per esempio non può essere espressa nella ghiandola mammaria di bestiame transgenico (Hytinen et al., 1994). Costrutti con cDNA del fattore di coagulazione VIII umano (hFVIII) possono essere espressi nella ghiandola mammaria di topi, conigli e pecore transgeniche. Ciononostante, le quantità di proteina hFVIII ottenute sono basse e dipendono dal donatore, dalla temperatura di conservazione e dalla diluizione dei campioni di latte. hFVIII viene rapidamente sequestrata nel latte ovino (Halter et al., 1993; Espanion et al., 1997; Niemann et al., 1999; Hiripi et al., 2003). Questi ultimi risultati mostrano che questa tecnologia necessita ulteriori miglioramenti per ottenere alti livelli d'espressione di geni di grosse dimensioni e regolati in modo complesso, come per esempio hFVIII, sebbene livelli elevati di questa proteina siano riportati in maiali transgenici (Paleyanda et al., 1997).

1.2.4 Miglioramento delle produzioni animali

La transgenesi è importante per migliorare le produzioni animali così come lo sono state e lo sono ancora le classiche tecniche di selezione (Houdebine, 2002; Clark and Whitelaw, 2003; Niemann and Kues, 2003; Zbikowska, 2003). Tra le principali applicazioni delle tecniche di transgenesi nel settore zootecnico ci sono il miglioramento della salute dell'animale, della crescita, della composizione di latte e carcasce, della crescita e composizione della lana.

Tra gli aspetti più importanti vi è sicuramente il miglioramento della salute degli animali, in particolar modo la riduzione dell'utilizzo di farmaci e soprattutto di antibiotici negli allevamenti, il miglioramento del benessere animale, la messa a punto di incroci, la riduzione di perdite di animali in allevamento e della frequenza di trasmissione di malattie dall'animale all'uomo.

In questi ultimi anni, svariati sono stati gli studi eseguiti con gli scopi sopracitati.

Un gruppo australiano ha creato maiali transgenici recanti il costrutto hMt-pGH, che può essere strettamente regolato dalla somministrazione di zinco. Gli animali transgenici mostravano significanti miglioramenti in tratti importanti a livello economico, come il tasso di crescita, l'indice di conversione degli alimenti e il rapporto grasso-massa muscolare (Nottle et al., 1997, 1999).

In un altro esperimento pecore transgeniche per il costrutto cheratina-IGF-I mostravano l'espressione a livello di pelle e vello in quantità superiore del 6,2% rispetto animali non-transgenici (Damak et al., 1996a, b). In entrambi i lavori non sono stati osservati effetti collaterali del gene esogeno sulla salute e la riproduzione degli animali.

Un'altra applicazione importante è rappresentata dalla resistenza alle malattie (Müller e Brem, 1991). Castilla e colleghi nel 1998 hanno creato un modello murino in cui anticorpi monoclonali ricombinanti, che neutralizzano il virus della gastroenterite trasmissibile (TGV), venivano secreti nel latte e costituivano così una protezione passiva contro le infezioni intestinali nei suinetti (Castilla et al., 1998). Sono stati creati anche topi che esprimevano una forma solubile del virus della pseudorabbia e che risultavano così resistenti alla malattia di Aujeszky (Ono et al., 2004).

Kuroiwa e colleghi hanno generato vacche con il gene PrP inattivato mediante ricombinazione omologa e che dovrebbero risultare resistenti alla malattia del prione (Kuroiwa et al., 2004).

Sono stati prodotti inoltre animali transgenici che secernono latte che esprime proteine con attività antimicrobica: lattoferrina umana (Zuelke, 1998), lisostafina (Mitra et al., 2003) e lisozima umano (Murray et al., 2003): queste proteine dovrebbero proteggere sia le ghiandole mammarie degli animali, sia il consumatore da infezioni batteriche.

E ancora, sono stati creati topi transgenici che esprimono il gene della lattasi nel loro latte garantendo un contenuto di lattosio ridotto (Jost et al., 1999): questo studio ha risvolti importanti, dato il crescente numero di individui intolleranti a questo zucchero a causa della mancanza di lattasi attive nel loro intestino.

Sono state create anche vacche che esprimono ad alti livelli i geni della β - e K-caseina e sono attualmente in via di studio (Brophy et al., 2003).

Golovan e collaboratori nel 2001 hanno generato maiali transgenici che esprimono il gene della fitasi di *Escherichia coli* sotto il controllo trascrizionale di un promotore specifico per le ghiandole salivari: in questo modo i maiali erano in grado di digerire il fosforo in fitati, che potevano poi essere metabolizzati dall'intestino. Gli animali in questo modo richiedono quantitativi inferiori di fosforo inorganico e secernono il 75% in meno di fosfati, determinando una significativa riduzione di inquinamento (Golovan et al., 2001).

Mediante l'espressione transgenica dell' α -lattalbumina nella ghiandola mammaria di scrofe, si sono aumentate le performance di lattazione, pur rimanendo invariata la composizione, i quantitativi di latte e la crescita dei suinetti (Wheeler et al., 2001): ciò ha determinato un aumento di suinetti sopravvissuti allo svezzamento, producendo significativi benefici per il benessere animale e per le produzioni.

Questi sono solo alcuni esempi degli svariati studi condotti sugli animali transgenici e sulle diverse loro applicazioni.

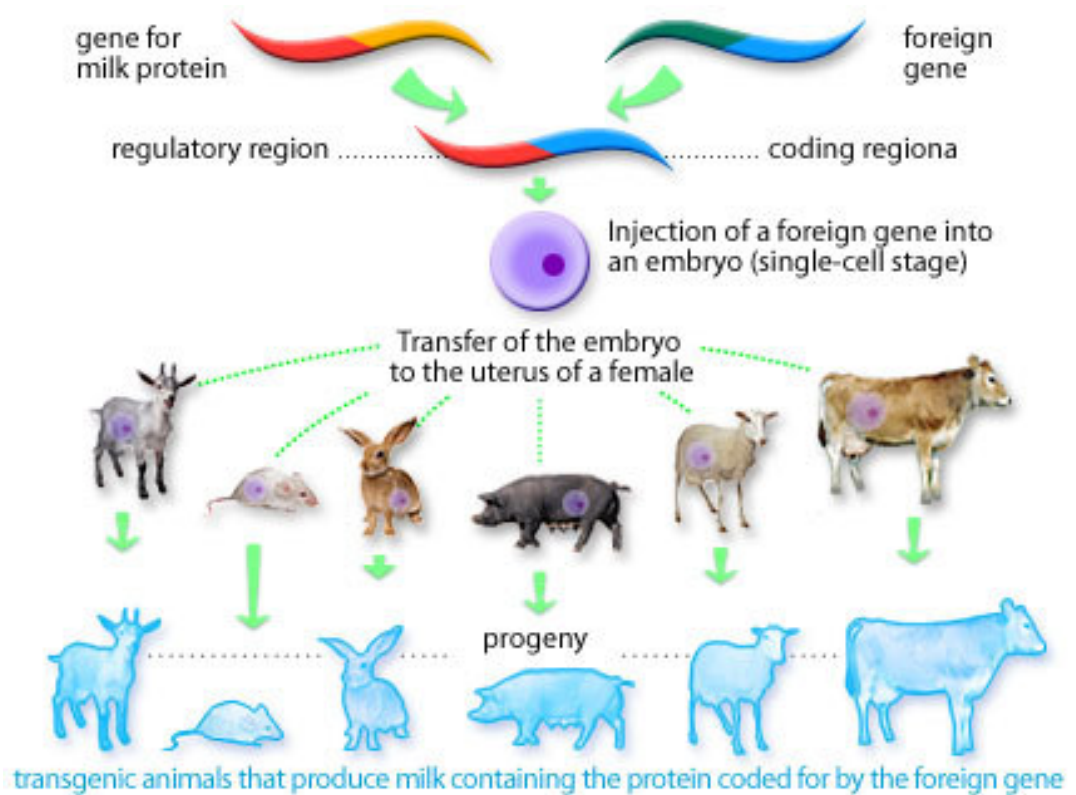


Fig. 1.1
Produzione di proteine ad uso farmaceutico in animali transgenici.

1.3 TECNICHE DI TRANSGENESI

Sono state stilate ad oggi diverse linee guida per ottimizzare l'espressione del gene esogeno, dato che questa risulta essere il limite principale nella creazione di animali transgenici.

I transgeni devono contenere almeno un introne che favorisca la maturazione del premRNA e il trasferimento del mRNA maturo al citoplasma.

I transgeni non devono contenere regioni troppo ricche di GC e soprattutto di motivi CpG nei loro promotori: queste strutture infatti sono riconosciute come elementi estranei dalle cellule, probabilmente durante lo sviluppo dell'embrione nei primi stadi, e le loro citosine vengono così metilate. La metilazione inattiva i promotori in maniera reversibile o irreversibile e può essere trasmessa alla progenie.

Alcuni ricercatori inoltre sostengono che i geni esogeni debbano venir integrati preferibilmente in un basso numero di copie per avere alti livelli d'espressione.

I primi esperimenti condotti negli anni '80 mostrarono che i transgeni sono spesso espressi a bassi livelli e sotto il controllo parziale di "enhancer" dell'ospite presenti nelle vicinanze dei loro siti d'integrazione. Studi genici condotti essenzialmente in umana, ma anche in drosophila e in topi, hanno dimostrato che alcune sequenze distali sono indispensabili per l'espressione corretta dei geni. Queste regioni distali sono note come regioni di controllo del locus o isolatori (insulators). Vari studi hanno mostrato che questi "insulators" contengono diversi elementi: potenti "enhancers" che sono spesso cellula-specifici, "enhancers blockers" che prevengono che geni vicini sul genoma entrino in contatto tra loro, e strutture in grado di aprire la cromatina che inducono locali modificazioni post-traduzionali degli istoni, che permettono al complesso trascrizionale di raggiungere i geni che devono essere espressi. Diversi elementi di questi isolatori potrebbero essere localizzati in un'unica regione, formando una barriera e isolando così un locus da quelli vicini. Sembra comunque che in molti casi, se non in tutti, elementi piuttosto distanti partecipino agli effetti d'isolamento. Gli elementi regolatori di un gene dovrebbero essere separati dal proprio promotore da uno o più geni non correlati. Grazie ad un processo cosiddetto di "looping", elementi regolatori distali associati ai corrispondenti fattori di trascrizione si spostano verso la regione del promotore inducendo l'iperacetilazione dell'istone e l'apertura locale della cromatina. Ciò permette al complesso trascrizionale di far esprimere il gene. L'aggiunta di elementi isolatori chiamati regioni 5'HS4 del locus della β -globina di pollo per esempio, favoriscono enormemente l'espressione di geni esogeni nei vertebrati (Giraldo et al., 2003).

Questa breve introduzione alle tecniche di transgenesi serve a sottolineare come sia regolata in modo complesso l'espressione dei geni e di conseguenza quanto sia difficile esprimere i transgeni ad alti livelli, come riportato in letteratura.

1.3.1 Microiniezione pronucleare

Per generare linee di animali transgenici recanti il gene esogeno in tutte le cellule, il DNA deve essere presente nell'embrione allo stadio di una cellula. La microiniezione consiste nell'iniezione di diverse centinaia di copie di DNA nei pronuclei degli zigoti; gli zigoti vengono poi trasferiti in animali riceventi e la prole viene analizzata per l'integrazione ed espressione del DNA esogeno. Questa tecnica fu eseguita con successo per la prima volta nel 1980 (Gordon et al., 1980). Circa 1-3% dei topi derivati da embrioni microiniettati risulta transgenico. Per ragioni ancora sconosciute, questa percentuale è molto più bassa in conigli, ratti, maiali e ruminanti. In più le integrazioni che si ottengono con la microiniezione sono casuali all'interno del genoma dell'ospite e l'espressione variabile è dovuta agli effetti causati dalla posizione (Pursel e Rexroad, 1993; Wall, 1996). Inoltre si tratta di una tecnica che richiede tempi lunghi e molte risorse intellettuali, finanziarie e materiali (Seidel, 1993): per questo motivo i costi sono straordinariamente alti per la produzione di bestiame transgenico. Si è calcolato che un topo transgenico costa circa 121 US\$, un maiale transgenico circa 25000 US\$, una pecora 60000 US\$ e una vacca 546000 US\$ (Wall et al., 1992). La produzione di bestiame transgenico può essere praticata solo con la produzione in vitro di embrioni: in media su circa 36500 zigoti microiniettati, circa 2300 si sviluppano in blastocisti, dopo il trasferimento il 28% arriva alla gravidanza e di questi nati, 18 animali risultano transgenici. Per aumentare l'efficienza della procedura è possibile eseguire una biopsia dagli embrioni e analizzarli mediante PCR per la presenza del transgene (Eyestone, 1999). Questa rilevazione precoce della presenza del transgene è fattibile, ma l'efficienza è limitata a causa dell'incidenza di mosaicismi (Lemme et al., 1994). La propagazione del tratto transgenico in una data popolazione può essere facilitata dalle tecniche di produzione in vitro, utilizzando seme di tori transgenici e tramite la raccolta di oociti provenienti da una femmina transgenica "founder", mediante aspirazione follicolare guidata da ultrasuoni e loro successivo utilizzo nell'IVF (Eyestone, 1999).

La rivoluzione nella creazione di animali transgenici si è avuta con la messa a punto del trasferimento nucleare di cellule somatiche. L'utilizzo combinato del "nuclear transfer" e di tecniche molecolari, come modificazioni geniche mirate, rappresenta oggi nei ruminanti la tecnica per l'integrazione di geni esogeni per eccellenza (Niemanne e Kues, 2000).

1.3.2 Trasposoni

I trasposoni sono sequenze di DNA genomico in grado di autoreplicarsi e integrarsi casualmente nel genoma. Questa capacità è stata sfruttata per inserire geni esogeni nel genoma. Il trasposone P è largamente usato per generare drosophilae transgeniche. Sono sufficienti pochi trasposoni per trasferire in modo efficiente transgeni in specie in cui il DNA esogeno normalmente non riesce a integrarsi. Con questo sistema sono stati creati medaka (Dupuy et al., 2002), bachi da seta (Tamura et al., 2000) e vari invertebrati transgenici. I trasposoni sono efficienti anche nei mammiferi, ma non sono in grado di trasferire geni esogeni più lunghi di 2-3 kb.

1.3.3 Vettori retrovirali

È possibile creare animali transgenici anche tramite l'utilizzo di vettori retrovirali: questa tecnica sfrutta la capacità dei virus di integrare nel genoma dell'ospite il proprio materiale genetico retrotrascritto in molecole di DNA. Dal momento che è possibile inserire nei virus delle sequenze d'interesse, l'infezione tramite esposizione dell'embrione privo di membrana pellucida al virus permette di ottenere animali che contengono il transgene. Per evitare effetti indesiderati, sono stati ottenuti dei ceppi virali difettivi, che mantengono inalterata la loro capacità di trasformazione, senza però essere in grado di moltiplicarsi. A causa della specie-specificità dei retrovirus, essi sono stati utilizzati soprattutto nei topi e nei polli (solo pochi lavori si sono occupati dei bovini). Per ovviare il problema della specie-specificità, sono state inserite sull'envelope alcune proteine provenienti da altri agenti virali (Burns et al., 1993).

Purtroppo però, anche infettando gli zigoti o gli embrioni prima dell'impianto, si ottiene comunque un elevato grado di chimerismo, poiché l'integrazione del DNA virale avviene quando la cellula ospite entra in mitosi dopo la replicazione. Per questo motivo si è tentato di infettare oociti bovini arrestati in metafase II della seconda divisione mitotica, prima della fecondazione (Chan et al., 1998). In questo modo, tutti gli animali nati da embrioni infettati sono risultati transgenici.

I problemi legati all'utilizzo dei virus sono principalmente dovuti al loro basso titolo e all'impossibilità di inserire nel genoma virale sequenze di lunghezza superiore a 10 Kb.

Mentre il primo problema sembra essere stato risolto grazie ad esempio al lavoro di Burns e colleghi, il secondo risulta essere molto limitante: se infatti è possibile diminuire la lunghezza dei geni, evitando le sequenze non trascritte, è pur vero che introni e altre sequenze distali o prossimali hanno un ruolo cruciale nell'efficiente espressione dei geni (Palmiter et al., 1991).

I vettori retrovirali inoltre trovano applicazione nella preparazione di animali che producono farmaci, tramite trasferimento di geni in cellule somatiche (Archer et al., 1994): si sono ottenute per esempio capre che recano il transgene solo a livello mammario, senza quindi trasmetterlo alla prole.

Lois e colleghi nel 2002 hanno generato topi e ratti recanti il gene codificante la GFP mediante l'utilizzo di vettori lentivirali (Lois et al., 2002). Oltre all'alta efficienza di trasfezione, i vettori lentivirali hanno la capacità di attraversare la membrana nucleare e raggiungere il genoma dell'ospite in cellule in qualsiasi fase del loro ciclo, comprese cellule quiescenti ed embrionali. In più, si può aggiungere alle particelle lentivirali l'envelope del Vesicular Stomatitis Virus (VSV): questo permette di concentrare le particelle mediante ultracentrifugazione e garantisce un alto tasso d'infezione. Inoltre l'envelope VSV non riconosce particolari recettori, ma i fosfolipidi di membrana: questa caratteristica permette l'infezione di tutti i tipi cellulari (Lois et al., 2002).

Questo sistema facilita la generazione di topi transgenici in quanto le particelle virali recanti il DNA esogeno vengono iniettate tra la zona pellucida e la membrana dell'embrione piuttosto che nei pronuclei. L'utilizzo di lentivirus è stato esteso con successo ad altre specie come polli (McGrew et al., 2004), vacche (Hofmann et al., 2004) e maiali (Whitelaw et al., 2004). Per ragioni sconosciute, i vettori lentivirali devono essere iniettati nel maiale nell'embrione ai primi stadi, mentre nella vacca nell'oocita per creare un numero alto di animali transgenici. Sono stati eseguiti esperimenti anche in embrioni di scimmie, ma senza successo. Negli animali d'allevamento l'efficienza di transgenesi eseguita con vettori lentivirali sembra essere 50 volte superiore rispetto a quella ottenuta con la microiniezione pronucleare. Il

limite maggiore dei vettori lentivirali è che non possono contenere DNA esogeni di lunghezza superiore a 8-9 kb ed essi si integrano di preferenza nelle regioni codificanti del genoma dell'ospite. A volte inoltre risulta difficile utilizzare promotori specifici per guidare l'espressione del transgene, in quanto le LTR (Long Terminal Repeats) del vettore possono interferire con questi promotori.

Sempre per ottenere animali che contengano il gene esogeno solo a livello di determinati tessuti, sono state impiegate tecniche differenti, quali il bombardamento mediante microproiettili (Cheng et al., 1993) e l'iniezione diretta di DNA o RNA purificato nei tessuti muscolari (Wolff et al., 1990).

1.3.4 Vettori episomali

Un'alternativa alle tecniche d'integrazione consiste nell'utilizzo di vettori in grado di autoreplicarsi e di essere facilmente trasferibili nelle cellule sorelle. I plasmidi contenenti una sequenza MAR (matrix attached region) possono essere mantenuti stabilmente nelle linee cellulari (Lipps et al., 2003). È riconosciuto che anche con questi vettori si possono generare animali transgenici.

1.3.5 Utilizzo di gameti per la transgenesi

Il trasferimento genico nei gameti è una possibile alternativa all'utilizzo dei vettori lentivirali per l'inserimento genico negli embrioni in alcune specie, tra cui le vacche. Più di 10 anni fa, alcuni esperimenti dimostrarono che sperma di topo incubato con DNA, e successivamente utilizzato per fecondare, dava luogo ad animali transgenici. Nonostante l'apparente semplicità e il fatto che sia una tecnica non invasiva, in quanto consiste semplicemente nell'esposizione degli spermatozoi al DNA nudo, i risultati non sono ancora confortanti. L'efficienza con la quale si ottengono animali transgenici è molto bassa, vi è un elevato rischio di mosaicismo e spesso il transgene viene perso, non si integra nei cromosomi e si ritrova nella progenie in forma riarrangiata e/o parzialmente o completamente degradata (Gandolfi, 2000). Questo sembra essere dovuto alla produzione massiva di nucleasi, che viene stimolata dalla presenza proprio del DNA esogeno e da fenomeni di ricombinazione di questo col genoma degli spermatozoi.

È stato dimostrato che il DNA aderisce alla superficie esterna dell'acrosoma in modo specifico e si lega soprattutto alla regione della testa più prossima alla coda degli spermatozoi (Camaioni et al., 1992) in maniera quasi identica nel topo, nel verro, nel bovino e nell'uomo. Il legame DNA-spermatozoo non è quindi casuale, ma richiede la presenza di particolari recettori presenti in questa area ed è inibito da un fattore del plasma seminale, che è stato identificato come IF-1 (Inhibitory Factor 1): quest'ultimo agisce come antagonista del DNA sul recettore. Sebbene il processo non sia stato ancora completamente chiarito, è ormai evidente che il DNA interagisce con alcune proteine che legano le molecole cariche negativamente. Questo è dimostrato dal fatto che l'eparina, il destrano solfato e altre proteine con punto isoelettrico inferiore a 7, tendono a legare la stessa regione dell'acrosoma con cui interagisce il DNA. Anche il Complesso Maggiore d'Istocompatibilità di classe II sembra essere coinvolto, poiché gli spermatozoi di topi "knock-out" per questi geni hanno una ridotta capacità di legare il DNA. Inoltre il CD4 permette l'internalizzazione dell'acido nucleico nella testa degli spermatozoi. Purtroppo col suo ingresso, il DNA viene degradato e attiva

un processo simile all'apoptosi, che porta uno spermatozoo prelevato direttamente dall'epididimo, alla morte. Al contrario, in caso di sperma eiaculato, questo evento non si verifica. Ciò potrebbe far pensare che si tratti di un meccanismo di difesa degli spermatozoi nell'epididimo, dove hanno più probabilità di venire a contatto con frammenti di DNA esogeno.

Non si conosce ancora chiaramente come i frammenti siano internalizzati dal complesso DNA-binding protein/ MHC II/ CD4 e quanto essi vengano a contatto col DNA genomico dopo la fusione dello spermatozoo con l'oocita. Per facilitare l'ingresso del DNA, si possono utilizzare la lipofezione (utilizzo di liposomi, es. vescicole fosfolipidiche) e l'elettroporazione (utilizzo di corrente elettrica), aumentando in modo considerevole l'efficienza con cui il DNA può essere visualizzato all'interno dello spermatozoo.

Recentemente è stato anche ottenuto un discreto successo utilizzando spermatozoi di topi sacrificati, con diverse tecniche, prima di una rapida incubazione in presenza di DNA plasmidico. Tramite IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI), le teste sono state iniettate nel citoplasma di oociti, permettendo la produzione di embrioni che si sono sviluppati in topi transgenici in grado di trasmettere il gene esogeno alla prole (8 su 11). I risultati di questo lavoro sono stati incoraggianti, grazie anche all'elevata percentuale di spermatozoi che hanno integrato il transgene (Perry et al., 1999).

Questa tecnologia è stata usata con successo da Lavitrano e colleghi nei maiali (Lavitrano et al., 2002). La degradazione della membrana spermatica seguita da incubazione con DNA e fecondazione usando l'ICSI si è dimostrata efficiente in topi (Kato et al., 2004). Frammenti di DNA di 200 kb incubati con sperma di topo e usati per l'ICSI possono generare animali transgenici a buoni livelli (Moreira et al., 2004). La spermatotransgenesi è stata migliorata grazie all'utilizzo di un anticorpo monoclonale che si lega in modo specifico alla superficie degli spermatozoi riconoscendo un antigene e il DNA tramite la sua estremità C-terminale. Questo complesso si è dimostrato efficiente nella creazione di diverse specie di animali transgenici. Il DNA esogeno può anche essere trasferito direttamente in precursori spermatici iniettando il complesso nei tubuli seminiferi. In alternativa i precursori spermatici possono essere raccolti, trasfettati *in vitro* e reimpiantati in testicoli riceventi.

1.3.6 Cellule pluripotenti

Gli strumenti fondamentali per la creazione di topi transgenici oggi sono la disponibilità di cellule embrionali staminali (ES), la ricombinazione omologa (Capecchi, 1989) e l'alta probabilità con cui le cellule ES danno origine ad un contributo a livello di linea germinale dopo l'iniezione in blastocisti. Tutto ciò costituisce un approccio efficace ad introdurre cambiamenti genetici specifici nel genoma murino (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Questa tecnica ha permesso finora di inattivare (knock-out) circa 5000 geni nel topo. Le cellule embrionali staminali modificate mediante trasfezioni sono successivamente incorporate nelle blastocisti per ottenere animali chimere. Un grosso limite di questa tecnologia nelle altre specie è l'assenza di cellule embrionali staminali.

Oltre alle ES, sono state utilizzate nel topo le Embryonic germ (EG) e le Embryonic Carcinoma cells (EC). Le cellule EG vengono isolate dalle PGC (primordial germ cells) (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992) e presentano alcune caratteristiche simili alle ES, inclusa la morfologia, la pluripotenza e la capacità di trasmissione nella linea germinale. Come le ES, le EG esprimono la fosfatasi alcalina e Oct-4 (marker

cellulari). Le EG inoltre possono aggregarsi a formare corpi embrionali e danno origine a teratocarcinomi (tumori delle gonadi) se trasferite in siti ectopici appropriati. Ad ogni modo, fino ad oggi, non si è ancora ottenuta in questo tipo cellulare la ricombinazione omologa. Le cellule EC murine vengono isolate da teratocarcinomi (Hogan et al., 1994). Tuttavia esse si differenziano solo raramente in gameti di chimere ricostituite e non sono quindi utilizzabili per la produzione di animali transgenici.

Le ES derivano dalla Inner Cell Mass (ICM) delle blastocisti, sono caratterizzate da proliferazione indefinita nello stato indifferenziato e dalla capacità di differenziarsi in tutti i tipi cellulari durante lo sviluppo in condizioni appropriate (pluripotenza). Vengono inoltre coltivate in gran numero e possono integrare dei frammenti di DNA esogeno. I vantaggi sono enormi perché, sfruttando la tecnica della ricombinazione omologa, è possibile indirizzare il gene in qualunque punto desiderato del genoma, distruggere un gene o sostituirlo con un altro o con il suo corrispondente modificato. Quindi, se inserite in una blastocisti, possono contribuire alla generazione di un embrione, che sarà una chimera: infatti solo una parte delle cellule dell'animale derivano dalle cellule ES modificate iniettate in blastocisti. Poiché i discendenti di tali cellule si distribuiranno casualmente nei tessuti e negli organi dell'animale adulto, non tutti gli animali transgenici di prima generazione esprimeranno il transgene nelle cellule germinali e saranno in grado di trasmetterlo alla progenie. Bisogna quindi identificare gli animali adatti a ottenere la seconda generazione di animali transgenici, una parte dei quali saranno veri eterozigoti per il transgene. Incrociando tra loro due eterozigoti si otterrà poi una terza generazione in cui si troveranno individui omozigoti per la modificazione introdotta.

Le ES sono state utilizzate anche come donatrici di nucleo per la tecnica del "nuclear transfer" (Wakayama et al., 1999). Ciò ha permesso di ottenere topi transgenici alla prima generazione col gene esogeno integrato in un sito prestabilito (Rideout III et al., 2000).

Sebbene la ricombinazione omologa di un frammento di DNA esogeno sia un evento molto raro, grazie alla proliferazione delle ES in coltura, è possibile che questo si verifichi in una popolazione numerosa. E anche se avvengono poche ricombinazioni utili, queste sono isolabili e coltivabili.

La ricombinazione omologa permette quindi di inattivare loci (knock-out) o inserire geni esogeni (knock-in).

Nonostante il crescente interesse nei confronti delle ES, sono stati ottenuti risultati solo nella specie murina, a causa della difficoltà nell'isolare queste cellule da altre specie. Per altri animali (pecora, criceto, suino, bovino, visone, coniglio, ratto, scimmia, capra) sono state utilizzate cellule morfologicamente simili (minor quantità di citoplasma e maggiore capacità di proliferazione rispetto alle altre cellule), ma queste non hanno evidenziato le stesse caratteristiche di differenziamento in vitro e in vivo o non sono state in grado di dare embrioni che si sviluppavano in chimere (Anderson, 1999).

Per questo motivo sono stati fatti diversi lavori di isolamento delle ES in ratti, suini e conigli, senza però essere ancora riusciti ad ottenere animali transgenici.

Lo stesso risultato si è avuto con le ES bovine (Strelchenko, 1996): in questa specie, il trasferimento nucleare effettuato con nuclei delle ES, ha permesso di ottenere alcuni feti vitali che si sono sviluppati normalmente per 45-55 giorni per poi essere abortiti. Dal momento che i feti non presentavano anomalie, Strelchenko e colleghi hanno addebitato ad un errato sviluppo placentario la causa dell'interruzione della gravidanza ed in particolare ad un numero insufficiente di cotiledoni sviluppati.

Inoltre c'è da tenere presente che le ES non si comportano allo stesso modo in tutte le specie: le ES bovine, per esempio, hanno un ciclo di replicazione più lento di quelle murine (pur rimanendo più veloci delle altre cellule somatiche bovine) e si differenziano dopo trattamento con tripsina a differenza di quelle di altre specie.

Un altro gruppo invece ha osservato nelle ICM di bovino la presenza di PECs (Pluripotential Embryonic Cell lines), constatando che esse hanno cicli cellulari più lunghi rispetto alle ES di topo, oltre ad alcuni differenti marcatori cellulari (Robl et al., 1999). Queste cellule sono quindi state trasfettate con un costrutto contenente il promotore CMV, i geni per la β -galattosidasi e per la resistenza alla neomicina. La trasfezione è stata effettuata tramite lipofezione prima e microiniezione poi. Da alcune analisi effettuate su embrioni e feti, è risultato che le PECs sono effettivamente in grado di differenziarsi in un gran numero di tessuti e permettono la sopravvivenza dell'embrione in vivo per almeno 40 giorni. Purtroppo, questo lavoro non è stato utile per il "gene-targeting", a causa della bassa efficienza con cui le PECs microiniettate hanno integrato il transgene (5 su 3753). In media ci si aspetta di trovare una o poche più colonie con la ricombinazione corretta ogni 100-1000 colonie col gene integrato, quindi sarebbero necessarie troppe microiniezioni per ottenere un risultato positivo.

Linee cellulari ES- e EG-like sono state isolate da pecore, capre, suini e bovini (Wheeler, 1994; Anderson, 1999). Linee cellulari di maiali e bovini erano in grado di contribuire alla formazione di chimere in seguito a iniezione in blastocisti ospite appropriate (Wheeler, 1994; Shim et al., 1997; Cibelli et al., 1998; Piedrahita et al., 1998). Tuttavia, non è ancora stata riportata alcuna trasmissione a livello di linea germinale. Linee cellulari staminali realmente totipotenti richiedono specifiche condizioni di coltura, fattori di crescita e probabilmente un "background" genetico specifico, dato che solo poche linee di topo sono adatte per l'isolamento di cellule ES (Hogan et al., 1994).

Recenti esperimenti nel topo hanno mostrato che cellule adulte della linea ematopoietica possiedono una grande plasticità (Jiang et al., 2002): oltre a tempi di proliferazione lunghi in vitro, queste cellule derivate da mesenchimali esprimono marcatori embrionali, come Oct-4, rex e telomerasi e possono essere differenziate in diversi tipi cellulari sia in vitro che in vivo. In seguito a iniezione in blastocisti, possono essere generati topi chimere, che mostrano alte percentuali di chimerismo in quasi tutti gli organi. Cellule simili sono state isolate dal sistema ematopoietico nei ratti e anche nell'uomo, suggerendo che anche le cellule staminali mesenchimali possono essere una risorsa utile per la ricerca e per le applicazioni nelle specie d'interesse zootecnico.

Oggi sono molti gli studi di perfezionamento di questa tecnica, dati i numerosi vantaggi che queste cellule totipotenti presentano.

1.4 TRASFERIMENTO NUCLEARE (NT)

1.4.1 Tecnologia del “nuclear transfer”

Un'altra tecnica interessante per la creazione di animali transgenici è il “nuclear transfer”, che consiste nella fusione del nucleo di una cellula donatrice diploide con un oocita non fecondato o un embrione precedentemente enucleato: ciò permette di ottenere animali clonati, cioè organismi geneticamente identici tra di loro.

Inizialmente si ottenevano organismi geneticamente identici solo utilizzando blastomeri di uno stesso embrione che venivano inseriti nel citoplasma ricevente.

Nel 1997 Wilmut e colleghi (Wilmut et al., 1997) pubblicarono la notizia di essere finalmente riusciti a clonare una pecora grazie al trasferimento nucleare, utilizzando una cellula somatica di un individuo adulto.

In questo caso il nucleo, per potersi sviluppare, dal momento che proveniva da una cellula già differenziata, aveva bisogno di essere «riprogrammato». In questo processo, sono critiche soprattutto le fasi in cui sono presenti contemporaneamente sia la cellula donatrice che la ricevente. È importante che le cellule in coltura siano sincronizzate e rese quiescenti, prima che il nucleo sia asportato e iniettato nell'oocita. Per impedire la loro replicazione, è sufficiente privare il terreno di coltura dei fattori di crescita, diminuendo ad esempio la quantità di siero (vedi sotto). Sembra che il DNA delle cellule quiescenti si liberi dalle proteine ad esso legate, perdendo quindi anche i fattori di trascrizione. A questo punto, altri fattori presenti nel citoplasma dell'oocita possono interagire col genoma e riprogrammarlo. Fondamentale sembra essere soprattutto il Mitosis Promoting Factor (MPF), la cui concentrazione aumenta molto nell'oocita fino al momento della fecondazione e dell'attivazione partenogenica. Il MPF permette quindi la rottura delle membrane nucleari e la condensazione dei cromosomi, consentendo ad altri fattori di accedere al DNA, inducendone la replicazione, seguita infine dalla diminuzione della concentrazione di MPF, con conseguente ricomposizione della membrana nucleare e decondensazione dei cromosomi (Wilmut et al., 1999).

Questa tecnica permette di avere animali geneticamente identici tra loro, rendendo possibile distinguere tra caratteri fenotipici dovuti al genotipo e quelli imputabili all'ambiente, propagare gli animali con caratteristiche favorevoli e salvaguardare animali in via d'estinzione (Lanza et al., 2000).

La clonazione ha inoltre molte applicazioni anche nell'ambito della transgenesi. Le cellule che vengono utilizzate per donare il nucleo possono infatti essere trasfettate e controllate facilmente in vitro. In questo modo, tutti gli embrioni contengono il transgene. Il numero delle gravidanze necessarie per ottenere un animale transgenico è così drasticamente ridotto. Utilizzando le colture cellulari è anche possibile verificare che l'inserzione del gene avvenga in un determinato locus. Questo è utile in quanto permette di ottenere delle espressioni molto elevate sito-indipendenti (McCreath et al., 2000), di sostituire o interrompere geni per studiarne le funzioni, di creare modelli per studi di malattie, di suscettibilità e fisiologici. La transgenesi mediante trasferimento nucleare consente anche di produrre animali per xenotrapianti e di stabilire a priori il sesso dell'animale transgenico, che è importante per esempio per controllare in tempi brevi la produzione di sostanze a livello di ghiandola mammaria.

Subito dopo la nascita di Dolly è risultato chiaro che il trasferimento di DNA in cellule, successivamente utilizzate come donatrici di nuclei per il trasferimento nucleare, sebbene laborioso, fosse una metodica più efficiente della classica microiniezione per la creazione di ruminanti transgenici (Schnieke et al., 1997; Cibelli

et al., 1998). Schnieke e collaboratori nel 1997 hanno prodotto pecore transgeniche per il gene umano del fattore IX, proteina che interviene nella coagulazione sanguigna e che è utilizzata per curare l'emofilia di tipo B. In questo caso però il gene non è stato inserito in un locus specifico. L'esperimento prevedeva il contemporaneo trasferimento del gene della resistenza all'antibiotico neomicina in modo che, aggiungendo una dose tossica di questo antibiotico alla coltura, fosse possibile eliminare tutte le cellule che non avevano incorporato il DNA estraneo.

La prima pecora transgenica ottenuta con questa tecnica, Polly, è nata nell'estate del 1997 e ha poi dimostrato di produrre, così come fanno altri cloni transgenici, un latte contenente il fattore IX umano.

Successivamente diversi ricercatori hanno iniziato ad utilizzare questo sistema per creare pecore (McCreath et al., 2000) e maiali transgenici (Dai et al., 2002; Lai et al., 2002).

Kuroiwa e collaboratori nel 2002 sono riusciti ad eseguire il "knock-out" dei due alleli del gene PrP coinvolto nella malattia del prione e dei due alleli del gene per l'immunoglobulina μ nella stessa vacca (Kuroiwa et al., 2004). In questo caso, dal feto ottenuto in seguito all'inattivazione del primo allele sono state derivate le cellule per il "knock-out" del secondo allele, mediante una seconda clonazione. Questo "ringiovanimento" è indispensabile in quanto le cellule somatiche hanno un numero di duplicazioni (doublings) piuttosto ridotto e potrebbero facilmente andare incontro a senescenza durante la seconda fase d'inattivazione. Questo protocollo è stato ripetuto per i due alleli del secondo gene.

Il trasferimento nucleare tuttavia presenta ancora numerose limitazioni: l'efficienza con cui si ottengono animali transgenici è molto bassa, a causa dello scarso numero di zigoti che si sviluppano in feti, e presenta un'elevata incidenza di neonati morti nell'immediato periodo post-parto, dovuta spesso a malformazioni congenite a carico soprattutto dell'apparato cardiovascolare o urogenitale (reni soprattutto), ma anche del cervello e del fegato (McCreath et al., 2000). In altre circostanze non è stato possibile identificare la causa del decesso, che è stata imputata a motivi ambientali (Kato et al., 1998). È comunque universalmente accettato che la manipolazione degli embrioni, compresa la maturazione, la fecondazione e la coltura in vitro, l'asincronia nel trasferimento embrionale e il trattamento con progesterone della madre aumentino la mortalità e la morbilità del feto, a prescindere dalla presenza di un transgene. In più, i feti risultano significativamente più grandi della media, a causa forse del contatto degli zigoti con il siero, dell'assetto ormonale della femmina ricevente e della dieta ricca di azoto non proteico. Alcuni parti inoltre sono molto ritardati, rendendo quindi necessario un intervento cesareo.

Alla luce delle recenti scoperte, il "somatic cell nuclear transfer" (SCNT) rappresenta la tecnica più promettente per aumentare in modo significativo la generazione di bestiame transgenico.

Il prerequisito principale in questo caso è la disponibilità di cellule primarie adatte o di linee cellulari compatibili con le tecniche di modificazioni geniche mirate, come il "knock-in" e il "knock-out". Un altro prerequisito importante è lo studio delle sequenze geniche e dell'organizzazione del genoma degli animali d'interesse zootecnico, che attualmente risulta ancora piuttosto indietro rispetto a quello umano e murino.

In questa tecnica i fibroblasti fetali vengono trasfettati in vitro, analizzati per l'integrazione del transgene e successivamente trasferiti in oociti enucleati. Dopo la fusione di entrambi i componenti e l'attivazione di questi complessi ricostituiti in seguito al trasferimento nucleare, le blastocisti vengono trasferite in riceventi

sincronizzate ed esse danno origine a prole transgenica. La tecnologia della clonazione mediante trasferimento nucleare, se comparata alla procedura di microiniezione in cui l'analisi di transgenesi e di espressione ottimale del gene esogeno ha luogo a livello di prole, è in grado di accelerare i tempi di produzione, grazie ad un'analisi rapida dei fibroblasti in vitro e al 100% di prole transgenica. Il primo dato commerciale dell'utilizzo del "nuclear transfer" per generare bestiame transgenico ha mostrato la realizzabilità di questo approccio (Forsberg et al., 2001). Sono state utilizzate con successo diverse linee cellulari di origine embrionale, fetale e somatica come donatrici di nuclei nel "nuclear transfer". Tuttavia l'efficienza complessiva di questa metodica risulta bassa (Colman, 2000). I fattori che determinano il successo del trasferimento nucleare sono poco definiti e la percentuale media di prole vivente non supera l'1-3% degli embrioni ricostituiti trasferiti (Wakayama et al., 1998; Wilmut et al., 2002). È necessaria quindi una migliore comprensione dei processi molecolari e cellulari fondamentali, come le compatibilità di ciclo cellulare tra il citoplasma ricevente e il nucleo donatore (Campbell et al., 1996), la sincronizzazione del ciclo cellulare delle cellule donatrici (Boquest et al., 1999; Kues et al., 2000), la riprogrammazione e il meccanismo di differenziamento e di totipotenza. Per esempio in alcuni esperimenti, in seguito a deprivazione di siero o trattamento con inibitori chimici del ciclo cellulare, la maggior parte delle cellule donatrici di maiale risultava sincronizzata nel presunto ottimale stadio del ciclo cellulare G₀/G₁ senza compromettere la vitalità (Kues et al., 2000, 2002). Questo sistema ha contribuito sostanzialmente a standardizzare le procedure di "nuclear transfer". In più, devono essere stabiliti dei metodi che permettano di determinare in modo reale le capacità di un dato embrione nel trasferimento nucleare di svilupparsi in prole normale. In prole di animali, soprattutto ruminanti, derivati da embrioni ottenuti con il "nuclear transfer" si è riscontrata la LOS (large offspring syndrome), insieme ad un incremento della mortalità peri- e post-natale (Wilmut et al., 1997; Young et al., 1998; Kato et al., 1998): sembrano implicate in questa alta incidenza di LOS aberrazioni del complesso pattern di espressione genica. Una prima spiegazione potrebbe essere la presenza di alterazioni nella metilazione di geni, compresi quelli soggetti ad "imprinting" (Young et al., 1998).

1.4.2 Ricombinazione omologa e linee cellulari per il "nuclear transfer"

La ricombinazione omologa in cellule staminali murine è l'approccio per eccellenza oggi per ottenere topi transgenici. Con questa tecnologia sono state create più di 1000 linee di topi "knock-out". Le potenzialità della tecnica "knock-out" negli animali domestici sono aumentate con la scoperta di vari incroci bovini, come Belgian Blue e Piemontese, accidentalmente omozigoti per il gene mutato della miostatina, che è funzionalmente inattivo e può essere considerato un "knock-out" naturale (McPherron e Lee, 1997; Kambadur et al., 1997; Grobet et al., 1997). La somiglianza in fenotipo tra bovini con miostatina mutata e topi con miostatina inattivata (McPherron et al., 1997) è forte, e ciò suggerisce che la miostatina può essere un bersaglio utile per modificazioni genetiche in specie d'interesse zootecnico.

La tecnologia del trasferimento nucleare permette di superare la necessità di cellule realmente totipotenti per la creazione di animali transgenici. La futura sfida è rappresentata dall'isolamento e dalla messa a punto di tecniche di coltura di cellule primarie, di origine somatica o embrionale (Schnieke et al., 1997; Cibelli et al., 1998b; Kues et al., 1998), per le successive modificazioni genetiche complesse, selezione clonale e successivo "nuclear transfer".

Il “gene-targeting” in cellule somatiche di animali domestici ha importanti applicazioni in combinazione con il trasferimento nucleare.

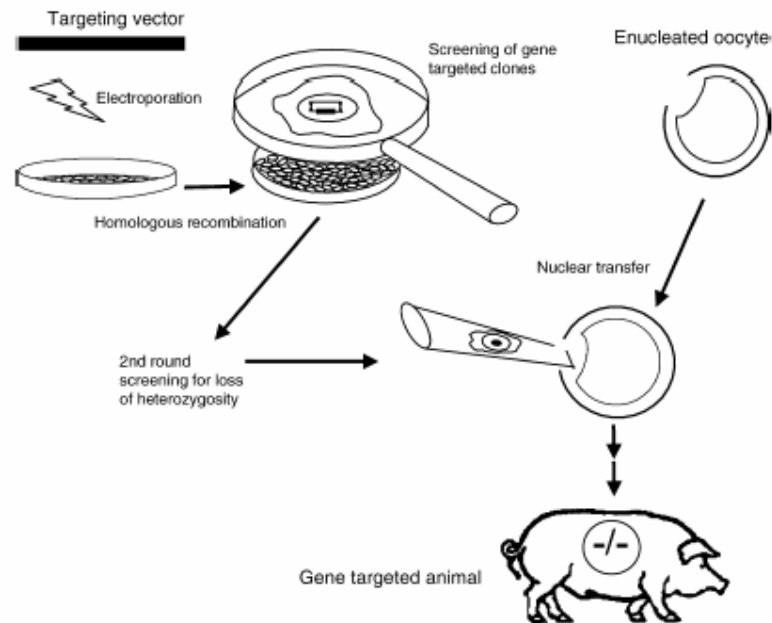


Fig. 1.2
Rappresentazione schematica del “gene-targeting” in animali domestici.

Le linee di cellule somatiche selezionate per il “gene-targeting” tuttavia devono avere un’alta potenzialità di espansione ed un’alta stabilità citogenetica: infatti un importante criterio di scelta della linea cellulare è l’alta capacità di produrre cloni a partire da singola cellula durante la selezione. Ad ogni modo, l’efficienza di formare cloni a partire da una singola cellula per la maggior parte delle cellule primarie è molto bassa. Per esempio, fibroblasti del derma umano, quando seminati come cellule singole, non sono in grado di proliferare in condizioni normali di coltura (Falanga e Kirsner., 1993). Quindi l’ottimizzazione delle condizioni di coltura per l’isolamento di cloni derivati da singole cellule è critica per il successo del “gene-targeting” in cellule somatiche.

In teoria, sono necessarie circa 45 duplicazioni (“doublings”) per generare cellule con mutazioni geniche mirate per il trasferimento nucleare considerando l’elettroporazione, la selezione e le analisi (Clark et al., 2000). Come cellule somatiche vengono usati soprattutto fibroblasti. La durata dei fibroblasti fetali è di circa 30-50 duplicazioni in suini e bovini (Polejaeva e Campbell, 2000) e di 40-120 in pecore (Denning et al., 2001). Ad ogni modo è possibile eseguire le procedure di “gene-targeting” con queste cellule. In più è possibile introdurre mutazioni mirate negli

animali attraverso il “nuclear transfer”, dato che le popolazioni di fibroblasti bovini, anche dopo le 45 duplicazioni (Kubota et al., 2000) e persino in senescenza (Lanza et al., 2000) mantengono la loro totipotenza a supporto dello sviluppo completo degli embrioni clonati. Un altro passo limitante nella produzione di animali domestici transgenici è il tempo necessario a isolare i cloni di cellule somatiche, passo fondamentale per garantire un singolo evento d’integrazione genica. La senescenza delle cellule somatiche e la possibilità di contaminazione delle colonie implica che sia fondamentale un efficiente protocollo d’isolamento delle cellule per ottenere con successo la produzione di animali transgenici (Melo et al., 2005).

Utilizzando la ricombinazione omologa associata al trasferimento nucleare, sono stati eseguiti diversi esperimenti. È stato messo a punto per esempio un protocollo di “targeting” efficiente e riproducibile in fibroblasti fetali, in cui il gene per l’ α -protocollagene ovino è stato sostituito con quello per l’ α 1 antitripsina umana sotto il controllo del promotore della β -lattoglobulina e si sono ottenute pecore vive in seguito a “nuclear transfer” (McCreath et al., 2000). La α -AT era espressa ad alti livelli nella ghiandola mammaria. Tuttavia, la proporzione tra perdite embrionali e fetali risultava aumentata in modo significativo in gravidanza con embrioni di pecora o maiale NT-derivati. I primi suinetti recanti un “knock-out” per un allele del gene dell’ α -galattosiltransferasi non mostravano grosse anomalie (Lai et al., 2002; Dai et al., 2002). Tramite la messa a punto di due fasi di “targeting” successive in colture cellulari, entrambi gli alleli possono essere inattivati e potrebbero essere evitati i tempi lunghi dovuti agli incroci. La messa a punto di queste tecnologie di “targeting” potrebbe garantire anche la produzione di grandi quantità di albumina sierica umana (HSA) se inserita nel locus della BSA (albumina sierica bovina) in bovini transgenici. E ancora, l’inattivazione del locus del gene PrP (gene coinvolto nella malattia del prione) potrebbe generare bovini resistenti alla BSE (encefalopatia spongiforme bovina). Queste sono solo alcune delle possibili applicazioni derivanti dalla combinazione del “gene-targeting” con la tecnica del trasferimento nucleare.

1.5 GENE-TARGETING

La ricombinazione omologa tra sequenze genomiche e un frammento di DNA esogeno permette la sostituzione in teoria di qualsiasi regione genomica. Il “knock-out” è l’applicazione più frequente di questa tecnica: esso consiste nella sostituzione di un gene attivo con lo stesso gene ma inattivato. Un gene attivo inoltre può anche essere sostituito con un altro gene attivo correlato o meno al gene bersaglio: questa tecnica viene definita “knock-in” e permette ad esempio lo studio dell’attività biologica di diversi alleli. Con questo sistema è possibile anche inserire geni esogeni in un preciso locus genomico. Questo sito d’inserzione deve essere studiato in modo che contenga sequenze di regolazione che permettano l’espressione attesa del gene esogeno integrato. Il grosso problema di questa tecnologia è essenzialmente la bassa frequenza con cui si manifesta l’evento di ricombinazione omologa nei vertebrati: la frequenza assoluta di HR in cellule ES di topo, definita come la frequenza di HR per cellule elettroporate, varia all’incirca tra 1×10^{-5} e 1×10^{-6} (Templeton N.S., 1997). Il “gene targeting” in cellule somatiche risulta più difficile, in quanto la frequenza di HR è di circa due ordini di grandezza inferiore rispetto a quella di cellule staminali (Sedivy J.M. et al., 1999), per esempio tra $2,8 \times 10^{-7}$ e $27,5 \times 10^{-7}$ in cellule di pecora (Denning C., 2001). Il grande vantaggio del “gene-targeting” è la possibilità di introdurre geni differenti in loci specifici evitando così i due limiti principali legati alle integrazioni casuali delle tecniche classiche di transgenesi:

1. l’espressione del transgene può essere bassa a causa dell’inibizione delle regioni genomiche fiancheggianti il sito d’integrazione (Clark et al., 1994)
2. il transgene può avere effetti mutageni inibendo o attivando geni dell’ospite a livello del sito d’integrazione (Baum et al., 2004).

Gli effetti dovuti alla posizione d’inserzione del transgene esistono comunque anche nel caso del “gene-targeting”, ma sono sempre gli stessi: questo è importante perché permette di semplificare le interpretazioni dei dati ottenuti con gli animali transgenici per studiare per esempio funzioni geniche o malattie umane.

1.5.1 Strategie di “targeting” classiche basate sulla ricombinazione omologa (HR)

Le strategie per le modificazioni geniche mirate (“gene-targeting”) basate sulla ricombinazione omologa (HR) sono state il primo approccio sviluppato per introdurre mutazioni sito-specifiche nel genoma di mammiferi (Smithies et al., 1985): tali metodiche sfruttano la capacità dei frammenti di DNA genomico, quando introdotti in cellule di mammifero, di ricombinare con sequenze omologhe presenti nel cromosoma. Questo processo è mediato da enzimi di riparo cellulare del DNA. La semplice ricombinazione omologa è stata molto utilizzata e rimane ancora la tecnica d’elezione per il “gene-targeting” nel topo (van der Weyden et al., 2002). I topi con queste modificazioni vengono generati effettuando mutazioni d’interesse mirate in cellule embrionali staminali (ES) e successivamente incorporando queste cellule in blastocisti, da cui possono derivare animali col gene mutato (Doetschman et al., 1987; Thomas e Capecchi, 1987; Koller et al., 1989; Schwartzberg et al., 1989; Thompson et al., 1989). L’approccio dell’HR è ampiamente utilizzato anche per modificare le cellule somatiche per varie applicazioni, come la creazione di sistemi di colture cellulari con modificazioni precise per la ricerca di base, per il “gene-targeting” di cellule staminali adulte per gli utilizzi terapeutici nell’uomo e per creare mutazioni mirate in cellule somatiche in coltura per costituire poi un nuovo animale mediante

trasferimento nucleare (Yanez e Porter, 1998; Sedivy e Dutriaux, 1999; McCreath et al., 2000). Esistono essenzialmente due tipi di strategie per ottenere modificazioni geniche mirate: le cosiddette “one-step” usate per creare semplicemente alleli con inserimento (“knock-in”) o inattivazione genica (“knock-out”) e le “two-step” per la generazione di mutazioni mirate più complesse.

a. Vettori di sostituzione

Il vettore di ricombinazione consiste in un plasmide recante sequenze di DNA genomico omologhe al sito d'integrazione desiderato, e uno o più marcatori di selezione. I più utilizzati sono i “vettori di sostituzione” (Thomas e Capecchi, 1987; Hasty e Bradley, 1993; Cheah e Behringer, 2001), che comprendono un marcatore di selezione positivo fiancheggiato dalle due regioni di omologia; in più in esperimenti che utilizzano come strategia di arricchimento la “positive-negative selection”, un marcatore di selezione negativa è posizionato all'esterno delle sequenze omologhe (Mansour et al., 1988). La frequenza di ricombinazione tra il vettore e il cromosoma sembra aumentare con la lunghezza totale delle sequenze di DNA omologo utilizzate e la lunghezza ideale da usare nel vettore è tra 5 e 8 kb (Hasty e Bradley, 1993). Il selettore positivo di solito è in posizione asimmetrica all'interno della regione di omologia: in questo modo quest'ultima risulta divisa in un braccio lungo e uno corto. Questo facilita l'identificazione dei ricombinanti omologhi tramite PCR, utilizzando un primer che si appaia al selettore e un secondo primer che si appaia alla regione di DNA genomico immediatamente adiacente al braccio corto di omologia. Il braccio corto di solito è lungo tra 0,5 e 2 kb in modo da risultare sufficientemente lungo a sostenere la HR senza compromettere l'efficienza della PCR (Hasty e Bradley, 1993). I vettori vengono linearizzati all'esterno della regione di omologia e trasfettati nelle cellule. A questo punto avviene una doppia ricombinazione reciproca nelle regioni di omologia situate sul cromosoma, che vengono rimpiazzate dalle sequenze omologhe del vettore, compreso il selettore positivo e qualsiasi sequenza situata tra esse. Le sequenze esterne alle regioni di omologia invece vengono perse. Questi vettori sono utilizzati per creare alleli “knock-out”, perché oltre ad inserire un selettore, possono facilitare la delezione dell'intero gene bersaglio o parti essenziali di esso, se situato tra le regioni di omologia (Hasty e Bradley, 1993; Cheah e Behringer, 2001). Questi vettori sono utili anche per creare alleli “knock-in”, che hanno cioè inserito un transgene sotto il controllo trascrizionale del gene endogeno (Le Mouellic et al., 1990; Mansour et al., 1990; van der Weyden et al., 2002). In questo caso il gene che deve essere inserito è incorporato nel vettore tra le regioni di omologia a monte del selettore. Come discuteremo nel dettaglio dopo, il marcatore di selezione di solito è fiancheggiato da siti bersaglio di ricombinasi sito-specifiche per la successiva rimozione, una volta che ha svolto la sua funzione.

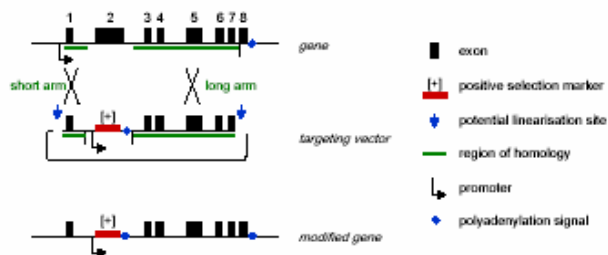


Fig. 1.3

Ricombinazione omologa tramite vettori di sostituzione. Il vettore di ricombinazione contiene una cassetta di espressione per il selettore positivo (per esempio una sequenza codificante la neomicina-

fosfotransferasi con un promotore ubiquitario e un segnale di poliadenilazione), fiancheggiata da due segmenti di DNA omologhi al gene bersaglio.

b. Vettori d'inserzione

Esistono poi i “vettori d'inserzione” che contengono essenzialmente gli stessi componenti dei vettori di sostituzione (Thomas e Capecchi, 1987; Hasty e Bradley, 1993), tuttavia, a differenza di essi, il marcatore per la selezione positiva può essere posizionato sia all'interno della regione di omologia, sia nel vettore. Inoltre i vettori d'inserzione prima dell'elettroporazione vengono linearizzati in un sito di restrizione posizionato all'interno delle regioni di omologia. Questi vettori vanno incontro ad una ricombinazione reciproca singola con le sequenze cromosomali omologhe, che risulta nell'inserzione di tutto il vettore nel sito bersaglio. Ad ogni modo l'allele modificato contiene una duplicazione delle sequenze omologhe, separate dalle regioni del vettore. Nella maggior parte dei casi, questa modificazione è sufficiente a rompere completamente la funzionalità genica e crea il cosiddetto “null allele”. Comunque, poiché con questo approccio nessuno degli esoni viene realmente distrutto, potrebbe venir ancora prodotta una proteina funzionale (Hasty e Bradley, 1993). In conclusione questo sistema dei vettori d'inserzione è considerato meno affidabile rispetto ai vettori di sostituzione per inattivare geni. Dall'altra parte i vettori d'inserzione presentano due vantaggi rispetto ai vettori di sostituzione: possono dare una frequenza di ricombinazione 5-20 volte superiore (Hasty et al., 1991b) e possono creare le basi per l'introduzione di mutazioni più complesse.

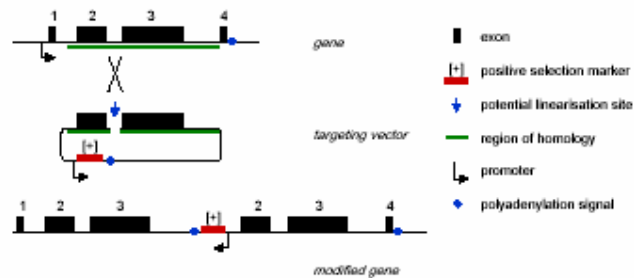


Fig. 1.4

Ricombinazione omologa mediante vettori d'inserzione. Rappresentazione schematica di un ipotetico gene di 4 esoni: un vettore d'inserzione che porta le regioni di omologia degli esoni 2 e 3 e degli introni 2 e 3 è linearizzato all'interno della regione di omologia. L'inserimento del vettore di ricombinazione nel genoma porta ad una parziale duplicazione del gene e all'inattivazione funzionale della proteina codificante.

1.5.1.1 Strategie di selezione

La ricombinazione omologa avviene con una bassa frequenza nelle cellule di mammifero, in particolar modo nelle cellule somatiche, e l'integrazione mirata del vettore si ha solo in un numero di cellule piuttosto basso, perciò sono necessarie strategie di selezione (Sedivy e Dutriaux, 1999; Vasquez et al., 2001):

1. Semplice selezione positiva. Viene eseguita in cellule ES, utilizzando un vettore con una cassetta di selezione positiva (es. neo^R), con tutti gli elementi necessari per l'espressione, cioè promotore e sequenza di poliadenilazione. Questa strategia permette la selezione di tutti i cloni che hanno integrato stabilmente il transgene, ricombinanti omologhi e non omologhi; questi possono poi essere analizzati mediante PCR o Southern blot per identificare quelli con l'integrazione corretta (Hasty e Bradley, 1993; Cheah e Behringer, 2001). Ad ogni modo, poiché l'integrazione casuale avviene con una frequenza più elevata rispetto l'HR, la maggior parte dei cloni che sopravvivono alla selezione presenteranno il transgene integrato casualmente e ciò determina l'analisi di un gran numero di cloni (di solito circa 50-300) per poter identificare almeno 2 o 3 cloni con l'integrazione corretta. Secondo alcuni ricercatori per alcuni loci con la semplice selezione positiva è possibile ottenere in cellule embrionali staminali murine l'1-5% di ricombinanti omologhi (percentuale di cloni selezionati positivamente e che hanno subito la corretta modificazione genica).
2. "Positive-negative selection" (PNS). Nel caso in cui la frequenza di HR sia inferiore all'1%, una semplice selezione non è sufficiente a causa del gran numero di cloni da analizzare per identificarne 2 o 3 con integrazione corretta. In questi casi viene di solito usata la PNS in cellule embrionali staminali (Mansour et al., 1988). Questa tecnica seleziona contro i ricombinanti non omologhi e comporta l'uso di marcatori di selezione sia positiva che negativa. In questo caso il selettore negativo è posizionato nel plasmide all'esterno di uno dei due bracci di omologia. Dopo la trasfezione, le cellule vengono sottoposte ad entrambi gli agenti selettivi sia positivo che negativo. Dato che il marcatore negativo è all'esterno della regione di omologia, in caso di ricombinazione omologa, esso viene perso e il clone risulta così resistente sia al selettore positivo che negativo. In caso di cloni con integrazione casuale invece, essi risultano resistenti all'agente di selezione positivo, ma sensibili all'agente di selezione negativo e muoiono. Di solito questa strategia dà un arricchimento di 2-10 volte rispetto la semplice selezione positiva (Sedivy e Dutriaux, 1999; Doetschman, 2002). Nella maggior parte dei casi questo arricchimento viene utilizzato per cellule ES.

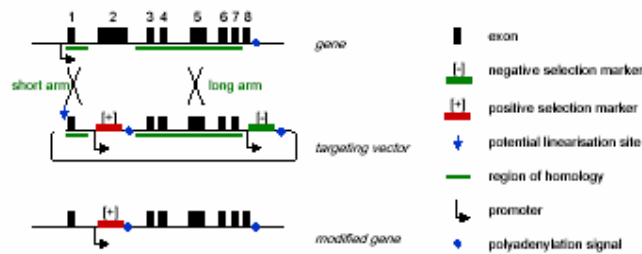


Fig. 1.5

Strategie di arricchimento di cellule recanti la corretta modificazione genica mirata. Selezione positiva-negativa: il costrutto di ricombinazione contiene un selettore positivo, che permette la sopravvivenza delle cellule in presenza di agente selettivo. In più, il vettore di “targeting” comprende anche un selettore negativo (ad es. la timidina chinasi), che induce la morte cellulare in presenza del corrispondente farmaco (Gancyclovir). L’integrazione del vettore di ricombinazione assicura la presenza del selettore positivo e la perdita di quello negativo.

Il limite principale di questo protocollo è la bassa efficienza del selettore negativo. Di solito come cassetta di espressione negativa viene utilizzato il gene della timidina chinasi dell’Herpes simplex virus (HSV-tk): le cellule che lo integrano diventano sensibili agli analoghi nucleotidi tossici, quali il gancyclovir, e sono quindi destinate a morire (Wang, 2003). Solo nel caso di avvenuto evento di ricombinazione omologa, le cellule perdono questo gene e riescono a sopravvivere in presenza di gancyclovir. Tuttavia questo schema di selezione che impiega due agenti selettivi (per esempio, G418, analogo della neomicina, per la selezione positiva e gancyclovir) determina solo un arricchimento parziale di ricombinanti omologhi, con l’aggiunta di un effetto tossico generale sulla popolazione cellulare.

3. Selezione “promoter-trap” o “promoterless”. Mentre la semplice selezione positiva o la PNS vengono normalmente utilizzate per il “gene-targeting” in cellule ES, queste strategie sono poco applicate alle modificazioni geniche mirate nelle cellule somatiche: questo perché le cellule somatiche hanno una frequenza assoluta di ricombinazione omologa che è di vari ordini di grandezza inferiore rispetto quella delle cellule embrionali staminali (Sedivy e Dutriaux, 1999; Vasquez et al., 2001). In questi casi, viene comunemente utilizzata un’altra strategia detta “promoterless” (Jasin e Berg, 1988; Sedivy e Sharp, 1989; Sedivy e Dutriaux, 1999). Questo tipo di selezione viene applicata anche alle cellule ES quando la semplice selezione positiva o la PNS non risultino adeguate (Doetschman et al., 1988; Dorin et al., 1989). La tecnica del “promoterless” utilizza il promotore del gene bersaglio per guidare l’espressione di un marcatore di selezione positiva privo di promotore contenuto nel vettore di “targeting”. In seguito all’evento di ricombinazione omologa, il promotore endogeno viene a trovarsi legato al selettore privo di promotore, rendendo le cellule con l’integrazione corretta resistenti all’agente selettivo. Viceversa il marcatore rimane privo di promotore nelle cellule con integrazione casuale, risultando così sensibili all’agente selettivo. Questa strategia di solito dà un arricchimento di 100-500 volte (Sedivy e Dutriaux, 1999). Il limite di questo tipo di approccio è che il promotore del gene bersaglio deve essere attivo nel tipo cellulare utilizzato per l’esperimento.

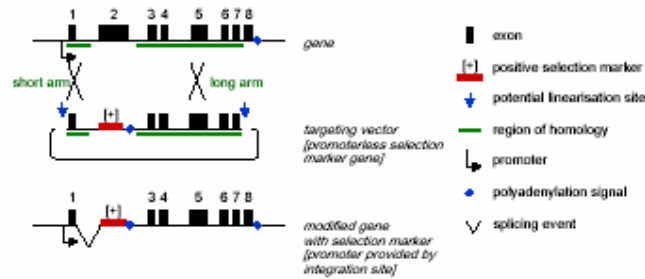


Fig. 1.6

Strategie di arricchimento di cellule recanti la corretta modificazione genica mirata. “Promoter-trap”: il vettore di ricombinazione contiene un selettore privo di promotore, che si attiva solo nel caso d’integrazione in una regione genomica adiacente ad un promotore attivo. L’integrazione sito-specifica del selettore tramite ricombinazione omologa lega la sua regione codificante al promotore del gene bersaglio.

4. Selezione “polyadenylation-trap”. Questa strategia di arricchimento usa i segnali di terminazione/poliadenilazione del gene endogeno per regolare il marcatore di selezione introdotto (Thomas e Capecchi, 1987; Donehower et al., 1992; Hasty e Bradley, 1993). In questo scenario, la cassetta di selezione positiva nel vettore di ricombinazione contiene il proprio promotore, ma manca del segnale di poliadenilazione necessario per la sintesi di un trascritto stabile terminato correttamente. Così, in seguito a ricombinazione omologa, il selettore introdotto risulta legato al segnale di terminazione/poliadenilazione endogeno, che conferisce resistenza all’agente di selezione. Al contrario, cellule con integrazione casuale del transgene sintetizzano un trascritto instabile, che viene rapidamente degradato e rimangono così sensibili all’agente selettivo. Questa strategia dà un arricchimento di 5-50 volte (Hasty e Bradley, 1993). Il vantaggio di questa metodica rispetto a quella del “promoterless” è che il gene bersaglio non deve essere trascrizionalmente attivo nel tipo cellulare utilizzato. Comunque, a causa dei livelli di arricchimento più bassi rispetto la strategia del “promoterless”, questa tecnica è meno utilizzata per il “gene-targeting” in cellule somatiche.

1.5.1.2 Strategie a due fasi

Sebbene un’inattivazione genica sia un buon punto di partenza, spesso è necessario introdurre modificazioni più sottili in regioni codificanti o di regolazione, per esempio per lo studio della funzionalità genica. Uno dei requisiti importanti in questo tipo di modificazioni più sottili è la rimozione di cassette di marcatori di selezione o di sequenze del vettore batterico dal locus bersaglio in seguito all’introduzione della mutazione nel genoma. Questo è importante perché tali sequenze possono interferire con l’espressione dei geni bersaglio o dei geni endogeni vicini (Hug et al., 1996; Pham et al.). Per fare ciò vengono utilizzate due tipi di strategie dette “two-step”, perché sono necessari due eventi successivi di ricombinazione omologa:

1. strategia “hit-and-run” (o “in-and-out). I vettori usati in questo caso sono vettori d’inserzione che contengono i marcatori di selezione sia positivo che negativo nello scheletro plasmidico e la mutazione desiderata nelle sequenze di omologia

(Hasty et al., 1991a; Valancius e Smithies, 1991; Hasty e Bradley, 1993). Nel primo passaggio di questo metodo, il vettore di ricombinazione viene introdotto nel gene bersaglio, creando una duplicazione parziale dello stesso, e le cellule con l'integrazione vengono selezionate positivamente. Un secondo passaggio di HR spontaneo tra le sequenze omologhe duplicate rimuove le regioni del vettore, i selettori e la copia non modificata delle sequenze omologhe duplicate. L'allele risultante contiene solo la modificazione e nessuna porzione del vettore o dei marcatori. Dato che il selettore negativo viene perso, i cloni modificati correttamente possono essere identificati grazie alla loro resistenza all'agente di selezione negativo. Alcuni esempi delle applicazioni di questa strategia sono l'introduzione di modificazioni nei loci dell'HPRT (Valancius e Smithies, 1991), di *Hox-2.6* (Hasty et al., 1991a) e del precursore della proteina β -amiloide (Gschwind e Huber, 1998).

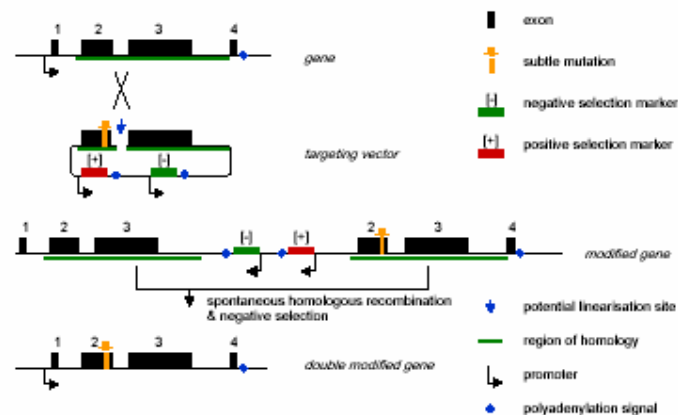


Fig. 1.7

Introduzione di mutazioni complesse. “Hit and run”: il vettore di ricombinazione è basato sullo schema di un costrutto d’inserzione e contiene il selettore positivo e negativo. In più, il vettore di “targeting” contiene una sottile mutazione nel secondo esone dell’ipotetico gene. Tramite selezione positiva, possono essere identificate le cellule che hanno subito l’evento di ricombinazione omologa (tra i numerosi cloni in cui l’integrazione è avvenuta in modo casuale). Grazie poi alla giustapposizione di sequenze omologhe nel sito bersaglio, le sequenze inserite possono essere rimosse tramite un evento spontaneo di ricombinazione omologa. Le cellule in cui è avvenuto questo evento possono essere isolate tramite selezione per l’assenza del selettore negativo.

2. strategia “tag-and-exchange” (o sostituzione doppia). Questa tecnica utilizza vettori di sostituzione che contengono selettori sia positivi che negativi posizionati tra le due regioni di omologia (Askew et al., 1993; Stacey et al., 1994; Muller, 1999). Il primo passaggio di questa strategia (il “tagging step”) consiste nella sostituzione di una porzione dell’intero gene bersaglio con marcatori di selezione mediante HR, e relativa identificazione delle cellule con l’integrazione mediante selezione positiva. Nel secondo passaggio di HR (“exchange step”), il locus genomico è ribersagliato con un secondo vettore di sostituzione che contiene la versione modificata del gene endogeno. Il risultato è la ricostruzione del locus originale con la modificazione e la perdita contemporaneamente delle cassette di selezione. Le cellule con queste caratteristiche finali sono identificate con selezione negativa dato che il marcatore negativo è stato perso. Il vantaggio di questa strategia rispetto la “hit-and-run” è che nel secondo passaggio può essere

introdotta qualsiasi tipo di modificazione e quindi è possibile creare una serie di cloni di cellule ES o di topi transgenici ciascuno contenente mutazioni diverse nello stesso locus genomico. Esempi dell'utilizzo di questa strategia sono l'introduzione di mutazioni nel gene *Hdh* coinvolto nella malattia di Huntingdon (Cearley e Detloff, 2001) e in quello della proteina prionica (Moore et al., 1995).

Tuttavia esistono diverse limitazioni per queste strategie:

- a. Questi metodi classici di HR hanno una bassa efficienza di “targeting” (Vasquez et al., 2001). Questo non rappresenta uno dei maggiori ostacoli per le modificazioni mirate in cellule in coltura in quanto le pochissime cellule modificate possono essere isolate ed espanse, ma si tratta di lavori che richiedono tempi molto lunghi, dato il gran numero di cellule da analizzare.
- b. Molte linee cellulari sono resistenti o danno una bassa efficienza di trasfezione con le tecniche classiche di trasformazione per l'inserimento del vettore di ricombinazione, quali l'ellettroporazione.
- c. Mentre il “gene-targeting” in cellule staminali embrionali di topo ha avuto un grande impatto sullo studio della funzionalità genica e ha reso possibile generare topi con mutazioni geniche mirate, gli sforzi per isolare e coltivare cellule ES in altri mammiferi non hanno avuto grandi successi: ciò è stato un grosso ostacolo nella creazione di animali transgenici con mutazioni mirate importanti nel settore sia medico che zootecnico. Nonostante queste limitazioni, sono stati generati animali mediante “gene-targeting”, come maiali, pecore e bovini: questo è stato possibile realizzando l'evento di ricombinazione omologa in cellule somatiche, utilizzate successivamente come donatrici di nuclei per creare animali transgenici mediante trasferimento nucleare (McCreath et al., 2000; Denning et al., 2001; Dai et al., 2002; Lai et al., 2002; Clark e Whitelaw, 2003; Phelps et al., 2003; Ramsoondar et al., 2003; Kuroiwa et al., 2004).
- d. Infine possono essere introdotti solo frammenti di DNA di dimensioni limitate in vettori plasmidici. L'introduzione di alterazioni specifiche in grossi geni può risultare piuttosto complicata. In più, ci possono essere limiti anche per quanto riguarda le dimensioni del segmento di DNA che può essere inserito tramite HR.

1.5.2 DSB – double strand breaks -

Un approccio utilizzato per superare il problema della bassa frequenza di “gene-targeting” ottenuto con la classica tecnica HR descritta sopra è l'introduzione di una rottura dei due filamenti di DNA (DSB, double-strand break) nel locus bersaglio. Questo metodo è basato sull'osservazione che il DSB cromosomale sia in grado di stimolare le frequenze di HR fino a 1000 volte o più nelle cellule di mammifero (Rouet et al., 1994; Choulika et al., 1995; Smith et al., 1995; Jasin, 1996). La ricombinazione omologa è il maggior sistema di riparo del DSB nelle cellule di mammifero. Quindi l'introduzione di rotture nella doppia elica stimolerebbe il complesso di HR, che successivamente sarebbe in grado di riparare la rottura mediante uno scambio genico con un template omologo disponibile, come per esempio un vettore di ricombinazione (Johnson e Jasin, 2001). La rottura del DNA può essere eseguita utilizzando l'endonucleasi *I-SceI* di *Saccharomyces cerevisiae*, che non taglia il genoma di mammiferi, se non posizionando appositamente i siti di riconoscimento mediante un passaggio di HR. L'alternativa per evitare questa fase essenziale di ricombinazione omologa è il disegnare ad hoc delle endonucleasi che riconoscano e taglino in modo sito-specifico regioni precise del genoma: questa potrebbe essere una

strategia promettente, ma gli studi sono ancora all'inizio e al momento le metodologie necessarie per ingegnerizzare un enzima in grado di riconoscere in maniera affidabile e specifica e tagliare una data sequenza nel genoma richiedono tempi lunghi ed è ancora lontana la reale messa a punto.

1.5.3 TFOs – triplex forming oligonucleotides –

Un'alternativa per stimolare il riparo cellulare del DNA e incrementare così la frequenza di HR implica l'uso di sequenze di oligonucleotidi che vanno a formare DNA a tripla elica (triplex forming oligonucleotides – TFO -). I TFO sono lunghi circa 10-30 nucleotidi e si legano con alta affinità e in maniera sequenza-specifica al DNA a doppio filamento a livello di sequenze bersaglio ricche di purine (Seidman e Glazer, 2003). La formazione della tripla elica TFO-mediata induce il riparo del DNA e stimola la HR intramolecolare tra due copie adiacenti in tandem di un gene sia a livello di episoma che di cromosoma in cellule di mammifero. Tuttavia un grosso problema di questa tecnica è che il legame dei TFO è limitato alle sequenze ricche di purine e ciò riduce notevolmente il numero di possibili siti bersaglio.

1.5.4 AAV – adeno-associated virus vectors –

Un'altra possibilità è l'utilizzo di vettori AAV (adeno-associated virus) per assistere le modificazioni mirate di sequenze cromosomali omologhe (Russell e Hirata, 1998). Un grande vantaggio di questi vettori è dato dal fatto che essi sono in grado di trasdurre in modo efficiente molti tipi cellulari e organi, a differenza delle basse efficienze di trasfezione ottenute con vettori di ricombinazione basate su plasmidi. In questo senso, strategie di “gene-targeting” AAV-mediate possono aumentare le basse frequenze di modificazioni mirate raggiunte dalle classiche tecniche di HR. Con i vettori AAV sono state eseguite sostituzioni di singole paia di basi, delezioni e inserzioni fino a 1,5 kb (Hirata e Russell, 2000; Inoue et al., 2001; Hirata et al., 2002). In alcune pubblicazioni sono state riportate frequenze di “gene-targeting” fino all' 1% di cellule somatiche umane infettate, cioè 3-4 ordini di grandezza in più rispetto a quelle ottenute con le classiche tecniche di HR (Hirata et al., 2002). In un recente lavoro, vettori AAV sono stati utilizzati con successo per modificare il gene PRNP (che codifica la proteina prionica PrP) in fibroblasti bovini, che possono successivamente essere usati come donatori per il trasferimento nucleare (Hirata et al., 2004). Il grosso limite di questa strategia è che questi vettori virali sono in grado di integrarsi casualmente nel genoma e ciò può causare mutazioni pericolose.

1.5.5 Strategie di “targeting” basate su ricombinasi sito-specifiche

Un altro tipo di approccio per superare gli ostacoli di alcune delle classiche strategie di “gene-targeting” basate sulla ricombinazione omologa, è l’utilizzo di ricombinasi sito-specifiche (Kolb, 2002; Sorrell e Kolb, 2003; Branda e Dymecki, 2004). Le ricombinasi sito-specifiche riconoscono e mediano la ricombinazione tra brevi sequenze di DNA (30-40 pb o più) ben caratterizzate, determinando integrazioni, excisioni o inversioni di frammenti di DNA (Kolb, 2002). Tra le famiglie di ricombinasi sito-specifiche vi è quella delle integrasi, così nominate per l’omologia con l’integrasi λ : esse utilizzano un residuo catalitico di tirosina conservato per formare un legame covalente tra la ricombinasi e il DNA bersaglio. Tra i membri di questa famiglia vi è la ricombinasi Cre del fago P1 e la ricombinasi Flp di *S. cerevisiae*.

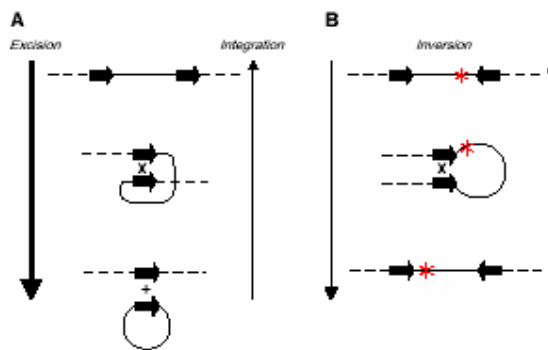


Fig. 1.8

Reazioni catalizzate dalle ricombinasi sito-specifiche, come Cre o Flp. I siti bersaglio della ricombinazione sono identici prima e dopo la reazione. La ricombinazione mediata da queste ricombinasi è reversibile.

Le ricombinasi sono costituite da una singola proteina che riconosce e media la ricombinazione tra sequenze di riconoscimento bersaglio identiche. Il sistema della Cre è il più comunemente utilizzato per le modificazioni del genoma di mammiferi, soprattutto nel topo (Kolb, 2002; Nagy, 2000). Cre riconosce e ricombina siti bersaglio detti *loxP*, lunghi 34 pb e costituiti di una sequenza spaziatrice centrale di 8 pb fiancheggiata da due sequenze ripetute invertite di 13 pb (Hoess et al., 1982; Abremski et al., 1983; Hamilton e Abremski, 1984). Lo spaziatore centrale è asimmetrico e questo determina l’orientamento del sito e la riuscita della reazione di ricombinazione. Due molecole di Cre, ciascuna legata ad una delle sequenze ripetute invertite, tagliano il DNA e catalizzano la ricombinazione nello spaziatore centrale (Nagy, 2000). La ricombinasi Flp riconosce siti bersaglio chiamati FRT (Kilby et al., 1993; Bode et al., 2000). Un sito FRT completo è lungo 48 pb e, come i siti *loxP*, consiste di una sequenza spaziatrice centrale asimmetrica di 8 pb, fiancheggiata da sequenze ripetute invertite di 13 pb. In più, a differenza dei siti *loxP*, contiene anche un terzo motivo ripetuto di 13 pb diretto (Andrews et al., 1985). Tre molecole Flp, ciascuna legata ad una delle ripetizioni, tagliano il DNA e mediano la ricombinazione nello spaziatore centrale (Bode et al., 2000). Siti FRT corti, lunghi 28-34 pb e che non presentano la terza sequenza ripetuta diretta, mediano la reazione di excisione, ma non

quella d'integrazione (Senecoff et al., 1985; Bode et al., 2000). La ricombinasi Flp è meno attiva rispetto la Cre in cellule di mammifero, a causa probabilmente della sua più bassa termostabilità (Buchholz et al., 1996). Questo spiega in parte il motivo per cui Flp è meno utilizzata per le modificazioni in ingegneria genetica. Per superare questo limite sono state create Flp mutate (Flpe) tramite cicli di mutagenesi, che hanno aumentato la loro termostabilità e attività (Buchholz et al., 1998) e funzionano in modo efficiente in cellule di mammifero (Rodriguez et al., 2000). Comunque, in saggi con siti FRT localizzati sul cromosoma, Flpe mostra ancora solo il 10% di attività rispetto alla Cre (Andreas et al., 2002).

Un'importante considerazione da fare per l'utilizzo dei sistemi di ricombinasi per l'integrazione di DNA esogeno nei genomi, è che i siti bersaglio per Cre e Flp sono identici prima e dopo la reazione di ricombinazione. Questo è un problema perché l'integrazione mediata dalla ricombinasi di un plasmide in un singolo sito nel genoma crea 2 siti molto vicini, che diventano immediatamente bersaglio di una reazione di excisione. Dato che la locale concentrazione di siti bersaglio è più alta nello stato integrato che nello stato exciso, la reazione di excisione è termodinamicamente favorita rispetto l'integrazione (Baer e Bode, 2001). Ad ogni modo il DNA integrato è altamente instabile e viene immediatamente exciso in presenza di ricombinasi.

a. Inattivazione genica

La delezione di sequenze di DNA è la modificazione più comunemente eseguita utilizzando le ricombinasi sito-specifiche. Questo è particolarmente importante per l'inattivazione condizionale o attivazione di un gene in un certo stadio dello sviluppo o in maniera tessuto-specifica, oppure per la rimozione di marcatori dalla cassetta integrata del transgene (Nagy, 2000; Kolb, 2002). Siccome la maggior parte di queste strategie richiedono l'utilizzo di cellule ES, esse sono state messe a punto esclusivamente nel topo.

L'inattivazione condizionale di un gene è particolarmente importante per lo studio di geni letali a livello embrionale, se inattivati nell'intero organismo durante lo sviluppo. In più, anche se un gene non risulta indispensabile per lo sviluppo embrionale, la sua inattivazione condizionale potrebbe determinare un'analisi più precisa della sua funzione in particolari tessuti o stadi di sviluppo. Il primo passo per ottenere un "knock-out" condizionale utilizzando la ricombinasi Cre è la generazione di una linea di topi transgenici in cui tutto il gene o parti essenziali di esso che devono essere inattivate, vengono fiancheggiate da ripetizioni in tandem di siti *loxP* (floxed). Questo passaggio è eseguito con la classica HR e i siti *loxP* vengono posizionati in regioni non codificanti del gene, in modo che rimanga intatta la sua funzionalità (Nagy, 2000; Kolb, 2002). Il secondo passaggio consiste nell'attività della ricombinasi Cre in uno stadio di sviluppo preciso o in un tessuto specifico. Questa fase può essere eseguita in diversi modi: un approccio consiste nella generazione di una seconda linea di topi transgenici, detta "inducer line", che porta un transgene codificante la Cre sotto il controllo di un promotore tessuto-specifico o inducibile. La linea "inducer" viene poi incrociata con la linea di topi contenente l'allele "floxed", che determina l'excisione del frammento di DNA "floxed" dal genoma, inattivando così il gene in tutte le cellule che esprimono la ricombinasi (Kulkarni et al., 1999). Un secondo approccio implica incroci tra topi con l'allele "floxed" e topi transgenici contenenti l'ORF (open reading frame) della ricombinasi Cre fusa ad un dominio di legame di un recettore steroideo (Feil et al., 1996, 1997). In assenza di induzione da parte dell'ormone steroideo, la proteina di fusione della Cre rimane nel citoplasma. In seguito all'aggiunta di ormone,

che può essere reso disponibile sia localmente che in modo sistemico, la Cre viene trasferita nel nucleo dove è in grado di mediare la reazione di excisione. Un terzo approccio per ottenere l'espressione della ricombinasi Cre in un preciso stadio di sviluppo o in maniera tessuto-specifica è utilizzare vettori virali contenenti il transgene codificante la Cre (Chang et al., 1999; Rinaldi et al., 1999).

b. Attivazione genica

L'attivazione condizionale di un gene può essere ottenuta usando le stesse strategie descritte per l'inattivazione genica condizionale (Lasko et al., 1992; Grieshammer et al., 1998; Nagy, 2000; Kolb, 2002). Ad eccezione di cellule non-indotte, il gene che deve essere attivato è separato dal suo promotore da un frammento di DNA "floxed" che contiene un segnale di stop trascrizionale. L'induzione dell'attività della Cre risulta dall'excisione del segnale di stop "floxed" e permette l'espressione del gene.

c. Rimozione di marcatori di selezione

Un altro utilizzo molto importante delle delezioni di DNA ricombinasi-mediate è la rimozione di cassette di selezione da costrutti transgenici integrati (Nagy, 2000). Una delle possibili applicazioni già menzionate è l'eliminazione del selettore in seguito ad inserimento genico basato sulla ricombinazione omologa. Il marcatore di selezione è fiancheggiato da siti *lox* e, identificate le cellule con l'integrazione mediante l'appropriato agente selettivo, esse sono poi esposte alla ricombinasi Cre e il selettore viene rimosso dal genoma. Questo è importante perché le cassette di selezione potrebbero interferire con l'espressione del transgene co-integrato e con i geni bersaglio o i geni endogeni vicini (Jaenisch, 1988; Hug et al., 1996; Pham et al., 1996; Clark et al., 1997; Kolb, 2002).

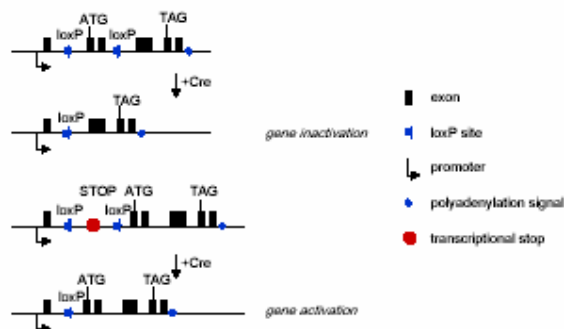


Fig. 1.9

Excisioni Cre-mediate di frammenti di DNA. La ricombinazione mediata da Cre può essere usata per attivare o inattivare l'espressione genica. L'inattivazione di geni può essere effettuata mediante delezione di sequenze geniche essenziali, che sono fiancheggiate da ripetizioni identiche dirette di siti *loxP*. L'attivazione si ottiene mediante delezione di un segnale di stop trascrizionale fiancheggiato da siti *loxP*, che impedisce la trascrizione del gene d'interesse.

1.5.5.1 Strategie di base – integrazione in un sito bersaglio singolo

a. Selezione positiva “promoter-trap”

La strategia più semplice per integrare un transgene in un sito bersaglio pre-esistente nel genoma ospite mediante ricombinazione sito-specifica è l'utilizzo di un plasmide contenente il transgene e i siti bersaglio della ricombinasi insieme ad un vettore di espressione per la ricombinasi Cre o Flp. Tuttavia, come abbiamo già discusso, il problema di questo approccio è che il transgene integrato viene exciso immediatamente in presenza di ricombinasi. Così l'integrazione stabile è un evento raro. Questo problema può essere superato utilizzando una strategia di selezione stringente. Una di queste tecniche consiste nell'inserzione di un promotore fiancheggiato da un sito *loxP* nel genoma, usando la classica HR (Kolb et al., 1999). Le cellule vengono successivamente cotrasfettate con un plasmide contenente una cassetta di selezione priva di promotore fiancheggiata da due siti *loxP* orientati nello stesso verso e con un plasmide d'espressione per la Cre. La ricombinasi Cre media l'excisione del selettore fiancheggiato dai *loxP* dal plasmide e la sua integrazione nel sito bersaglio *loxP* situato sul cromosoma. In questo modo il promotore pre-integrato viene a trovarsi legato al selettore privo di promotore, e ciò rende i cloni resistenti all'agente selettivo, mentre le cellule che hanno integrato il plasmide casualmente rimangono sensibili.

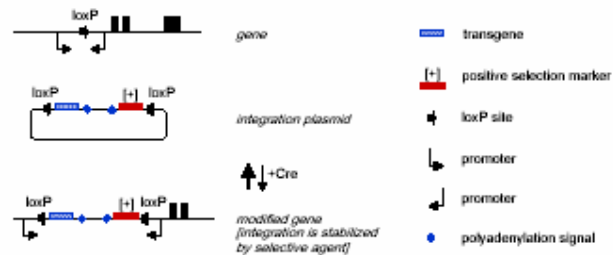


Fig. 1.10

Integrazione Cre-mediata di frammenti di DNA. Integrazione sito-specifica di un transgene in un sito *loxP* pre-esistente nel genoma: il sito *loxP* è fiancheggiato da un promotore, che è in grado di attivare un selettore positivo privo di promotore presente sul plasmide d'integrazione. Le cellule che portano l'integrazione desiderata possono essere isolate dopo l'incubazione con l'appropriato agente selettivo. In presenza continua di Cre e senza l'agente di selezione la reazione d'integrazione viene invertita facilmente.

b. Siti *lox* mutati a metà

Come alternativa alle strategie che impiegano selezioni stringenti, esistono approcci che favoriscono l'integrazione di un transgene piuttosto che la sua excisione. Uno di questi sistemi consiste nell'utilizzo di siti *loxP* mutati per metà (Albert et al., 1995; Araki et al., 1997). Questi siti a metà presentano mutazioni in una delle regioni ripetute invertite, che riducono in modo significativo l'affinità di legame tra la Cre e le regioni ripetute. Comunque il sito mutato per metà rimane un substrato per la ricombinasi, poiché il legame delle due molecole di Cre al sito *loxP* è cooperativo. Così la molecola di Cre legata alla regione ripetuta non modificata facilita il legame della seconda molecola di Cre alla sequenza ripetuta invertita mutata. Il primo passaggio di questa strategia consiste nell'integrazione all'interno del genoma di un sito mutato a metà (*lox71*), che contiene alterazioni nella ripetizione di sinistra (Araki et al., 1997). Il secondo passaggio consiste nella cotrasfezione di un plasmide contenente un selettore fiancheggiato da un sito diverso per metà (*lox66*) che porta la ripetizione di destra mutata, e di un plasmide d'espressione per la Cre. La ricombinazione sito-specifica tra i due siti a metà determina l'integrazione dell'intero plasmide. Questo plasmide integrato nel genoma è fiancheggiato da un *loxP* normale e da un sito (*lox72*) che presenta mutazioni in entrambe le sequenze ripetute invertite. Il *lox72* è poco efficiente come substrato per la ricombinasi Cre e ciò previene l'excisione del plasmide integrato, incrementando la frequenza d'integrazione stabile. Questa strategia può essere usata come semplice selezione positiva, che genera fino al 16% di cloni resistenti contenenti la modifica desiderata.

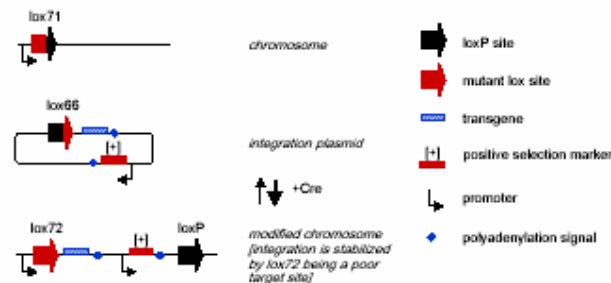


Fig. 1.11

Integrazione Cre-mediata di frammenti di DNA utilizzando siti *lox* mutati. Il bersaglio sul cromosoma viene stabilito integrando un sito *lox* mutato (*lox71*). Il transgene viene integrato nel sito pre-definito mediante ricombinazione sito-specifica usando un secondo sito *lox* mutato (*lox66*). La ricombinazione del *lox71* con il *lox66* determina la formazione di un sito *lox72* e di un sito *loxP*. Dato che il *lox72* è un bersaglio debole per la ricombinasi Cre, la reazione d'integrazione non viene facilmente invertita.

1.5.5.2 *Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE)*

Sebbene utili per l'integrazione di transgeni, queste tecniche sono limitate dal fatto che determinano l'inserimento di almeno un selettore e in molti casi di sequenze batteriche del plasmide. Queste regioni sembrano avere effetti negativi sull'espressione dei geni esogeni integrati (Jaenisch, 1988; Clark et al., 1997). Una strategia utile per superare questi limiti è di integrare i transgeni in modo sito-specifico usando la tecnica RMCE (recombinase-mediated cassette exchange), che comporta lo scambio di una cassetta di DNA posizionata sul cromosoma con una cassetta presente su un plasmide (Bode et al., 2000; Baer e Bode, 2001). A questo proposito sono state sviluppate tre strategie diverse che utilizzano le ricombinasi Cre e Flp.

a. Siti bersaglio incompatibili

Tra le varie strategie di RMCE vi è quella che sfrutta siti di riconoscimento della Cre o di Flp incompatibili (eterospecifici) (Schlake e Bode, 1994; Bethke e Sauer, 1997; Bouhassira et al., 1997; Seibler e Bode, 1997; Seibler et al., 1998; Feng et al., 1999; Soukharev et al., 1999; Lauth et al., 2000; Nebert et al., 2000; Kolb, 2001; Cesari et al., 2004). La prima fase implica l'integrazione nel genoma ospite di una cassetta di DNA fiancheggiata da due sequenze di riconoscimento incompatibili nello stesso orientamento o opposte, una "wild-type" e una con mutazioni nello spaziatore. Questi siti *lox* possono essere legati e tagliati dalla Cre, ma la mutazione nella sequenza spaziatrice impedisce l'appaiamento dei siti incompatibili tramite le estremità sporgenti di 6 pb generate nello spaziatore. Nella seconda fase, le cellule sono cotrasfettate con un plasmide che contiene il transgene fiancheggiato dalla stessa coppia di siti di riconoscimento per la Cre incompatibili e un plasmide che esprime la ricombinasi. Poiché i siti su ciascuna cassetta sono incompatibili, essi possono ricombinare solo con l'identico sito presente sull'altra cassetta. Ciò determina lo scambio della cassetta genomica con la cassetta del plasmide mediante un doppio incrocio reciproco. La cassetta integrata è stabile poiché l'incompatibilità dei due siti previene la sua excisione (nel caso di siti nello stesso orientamento) o inversione (nel caso di orientamento opposto), e la trasfezione di un largo eccesso di plasmide impedisce che la cassetta riposizionata sia nuovamente scambiata con la sequenza genomica: l'unica sequenza che viene inserita in questo modo è il gene esogeno senza porzioni plasmidiche. In più, se viene incorporato un selettore positivo/negativo nella cassetta che è stata pre-inserita nel genoma, i cloni che sono andati incontro allo scambio di cassette possono essere identificati con una selezione negativa e nessun marcatore rimane nel genoma.

Ad oggi, tra le applicazioni più efficaci di questa strategia vi è l'uso della ricombinasi Cre e cassette di DNA fiancheggiate dai siti *loxP* e *lox2272* orientati nello stesso modo (Kolb, 2001). Il *lox2272* contiene due mutazioni puntiformi nello spaziatore centrale di 8 pb, che lo rendono incompatibile coi siti *loxP* (Lee e Saito, 1998; Kolb, 2001). Gli esperimenti di RMCE in cellule embrionali staminali, utilizzando la semplice selezione negativa, generano più del 90% di cloni selezionati con la modificazione mirata desiderata (Kolb, 2001). Una delle applicazioni più interessanti per la transgenesi in mammiferi è la produzione di proteine ricombinanti nel latte (Houdebine, 2000). Con questa strategia RMCE *loxP/lox2272*, Kolb nel 2001 è riuscito a mediare l'inserimento di un gene esogeno all'interno del gene della β -caseina murina (gene altamente espresso a livello di ghiandola mammaria) in cellule

ES di topo (Kolb, 2001). Ciò dimostra le potenzialità di questa e di altre strategie simili per l'espressione di proteine esogene nel latte di animali transgenici.

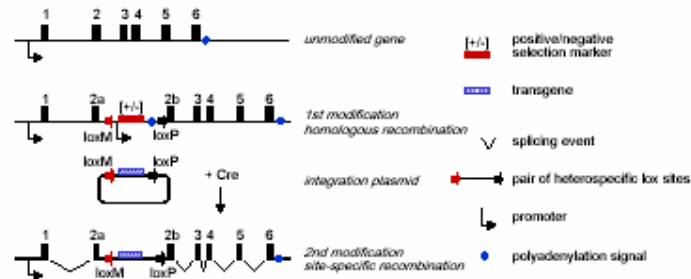


Fig. 1.12

RMCE utilizzando la ricombinasi Cre (Kolb, 2001). L'ipotetico gene viene inizialmente fiancheggiato da due *lox* eterospecifici (incompatibili) diretti tramite HR. In questo processo, un selettore positivo/negativo (per esempio HPRT, hypoxanthine-phospho-ribosyl-transferase) viene inserito nel genoma (e le cellule che recano la modificazione vengono identificate dopo la selezione). Usando la ricombinazione Cre-mediata, il selettore viene scambiato col transgene, che è fiancheggiato da una coppia identica di siti *lox* eterospecifici. Le cellule, andate incontro con successo alla ricombinazione sito-specifica possono essere isolate in seguito a selezione negativa contro il selettore positivo/negativo. Lo scambio di cassette è termodinamicamente favorito in quanto il plasmide d'inserzione è in eccesso rispetto alla cassetta di selezione presente nel genoma ospite.

b. Siti bersaglio *loxP* wild-type invertiti

In questa seconda strategia di RMCE, le cassette di DNA che devono essere scambiate sono fiancheggiate da una coppia di siti *loxP* wild-type invertiti (Feng et al., 1999). In questa situazione, la ricombinazione che avviene tra i siti *loxP* fiancheggianti la cassetta integrata determina un'inversione e non una delezione. Lo svantaggio in questo caso è dato dal fatto che è necessaria un'analisi ulteriore per identificare i cloni che contengono la cassetta integrata nel giusto orientamento, ma può essere vantaggioso nel caso in cui si debba valutare l'espressione del transgene in entrambi gli orientamenti (Feng et al., 2001). L'utilizzo di questa strategia in cellule eritroleucemiche murine mediante una selezione negativa determina circa il 100% di cloni selezionati con la modificazione desiderata (Feng et al., 1999). Ad ogni modo, la stessa strategia utilizzata in cellule ES ha generato solo il 10-50% di cloni selezionati mutati in modo corretto (Feng et al., 1999). In entrambi gli esperimenti, ciascun orientamento è stato trovato in circa la metà dei cloni modificati. Questo approccio è stato utilizzato anche in cellule eritroleucemiche in assenza di selezione diretta per l'evento di RMCE, ma usando una strategia basata sulla GFP (green fluorescent protein) per arricchire le cellule trasfettate in modo transiente. In questo caso il 4-16% dei cloni trasfettati è andato incontro ad uno scambio di cassette stabile (Feng et al., 1999).

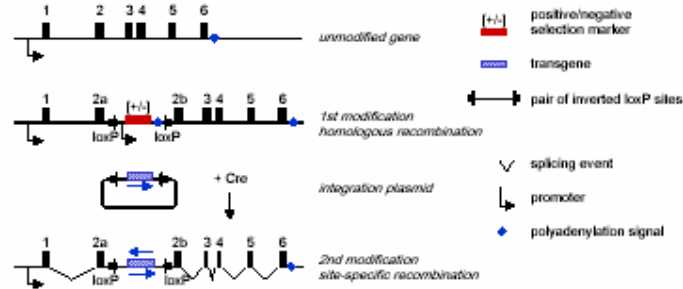


Fig. 1.13

RMCE utilizzando la ricombinasi Cre e un paio di siti *loxP* wild-type invertiti. L'ipotetico gene innanzitutto viene fiancheggiato da siti *loxP* invertiti tramite HR. In questo processo, viene inserito un selettore positivo/negativo (per esempio, HPRT) nel genoma. Cre catalizza l'inversione di segmenti di DNA fiancheggiati da siti *lox* invertiti. Dato che il vettore d'integrazione è in largo eccesso rispetto al selettore presente nel genoma, l'inserzione del transgene è termodinamicamente favorita. Il gene esogeno può essere inserito in entrambi gli orientamenti. Tuttavia solo un orientamento porterà all'espressione del transgene. In questo modo solo il 50% delle cellule modificate esprimerà il gene.

c. Combinazione di ricombinasi

Una terza strategia di tipo RMCE utilizza entrambe le ricombinasi Cre e Flp (Lauth et al., 2002). Per questo approccio, una cassetta di DNA fiancheggiata da entrambi i siti *loxP* e FRT (froxing) viene integrata nel genoma casualmente o in un sito predeterminato mediante HR. Nel secondo passaggio, le cellule sono cotrasfettate con un plasmide che reca una cassetta "froxed" e un plasmide d'espressione Cre/Flpe. Queste cassette sono integrate stabilmente in quanto i siti *loxP* e FRT non presentano omologia di sequenza, quindi incompatibili, e non sono in grado di promuovere una reazione di excisione. Questa strategia in cellule ES con una selezione positiva "promoter-trap" ha determinato il 61-78% di cloni resistenti con l'integrazione desiderata (Lauth et al., 2002). Tuttavia, questo approccio non è stato testato con una sola selezione negativa, e questa selezione potrebbe essere meno efficiente della selezione positiva "promoter-trap". Alcuni cloni identificati nell'esperimento sopra inoltre erano andati incontro a ricombinazione solo tra i siti *loxP* (Lauth et al., 2002): ciò è dovuto alla ridotta attività di Flpe rispetto alla Cre in cellule di mammifero e potrebbe in parte spiegare la scarsa efficienza di questo metodo (Andreas et al., 2002).

Il limite di questa tecnica è il fatto che i siti di riconoscimento delle ricombinasi devono essere inseriti in una posizione precisa del genoma mediante la classica ricombinazione omologa. Oggi si sta cercando d'ingegnerizzare le ricombinasi per renderle in grado di riconoscere siti unici già naturalmente presenti sui cromosomi.

Queste strategie di modificazioni sito-specifiche sono oggi lo strumento chiave per ottenere alterazioni precise nel genoma di mammiferi e hanno diverse applicazioni nella ricerca di base, nella biomedicina e nelle biotecnologie. Esse infatti permettono l'inserimento di transgeni in singola copia in un locus cromosomale predefinito, studiato per ottenere un livello di espressione stabile per un lungo periodo di tempo. In questo modo, è possibile superare i limiti delle tecniche di transgenesi tradizionali, che determinavano un'integrazione casuale del gene esogeno. In più, mentre gli approcci classici permettevano solo l'integrazione, le tecniche sito-specifiche estendono il numero di modificazioni possibili comprese delezioni, sostituzioni e inversioni.

Le tecniche di HR sono al momento il metodo più utilizzato per ottenere modificazioni del genoma di mammiferi: esse sono diventate ormai lo strumento standard per la manipolazione di cellule ES per generare topi transgenici. Tuttavia a causa della mancanza di cellule embrionali staminali in altre specie di mammiferi e per la bassa efficienza del processo di HR in cellule somatiche, sono necessari schemi di selezione molto complessi e la creazione di animali transgenici diversi dal topo risulta laboriosa e necessita tempi lunghi.

Anche le strategie di ricombinazione sito-specifica possono essere utili per modificare il genoma di mammiferi, in particolar modo le ricombinasi Cre e Flp vengono utilizzate con alta efficienza. Il limite anche in questo caso è rappresentato dalla presenza di almeno un passaggio di HR, che è poco efficiente.