

5. CONCLUSIONI

La produzione di animali transgenici è limitata spesso dalla bassa e non prevedibile espressione dei geni esogeni prescelti, a causa soprattutto delle integrazioni casuali ottenute con le classiche tecniche di transgenesi.

Per ovviare a questo problema, l'alternativa oggi è rappresentata dalle tecniche di "gene-targeting", che garantiscono inserzioni/delezioni geniche mirate in un locus predeterminato. Sebbene ciò non garantisca alti livelli di espressione, assicura comunque che il livello di proteina codificata dal gene esogeno sia sempre la medesima, non essendo influenzata dal "positional effect".

Il gene bersaglio della nostra ricerca è stato quello della β -lattoglobulina bovina, che consentirebbe l'espressione di transgeni d'interesse direttamente nel latte di bovini.

Il "gene-targeting" sfrutta l'evento di ricombinazione omologa (HR) tra un vettore allestito *ad hoc* (vettore di ricombinazione) e il corrispondente locus localizzato sul genoma ospite. Rispetto alle classiche tecniche di transgenesi, questo sistema è vantaggioso, in quanto le analisi vengono effettuate su cloni cellulari e non si deve aspettare la nascita degli animali. Il problema in questo caso è dato dal fatto che il sistema di HR è poco efficiente soprattutto in cellule somatiche, che purtroppo risultano essere ancora oggi le uniche disponibili in animali d'interesse zootecnico: ciò determina l'analisi di un gran numero di cloni al fine di trovare quelli andati incontro ad HR, utilizzabili per il successivo passaggio di trasferimento nucleare per ottenere animali transgenici *in toto*.

Quindi tra i progetti più ambiziosi oggi vi è quello di messa a punto di sistemi di "gene-targeting", in modo d'arricchire la popolazione di cloni di cellule somatiche per l'evento di HR e ridurre così il numero di analisi per ottimizzare tempi, manodopera e costi.

L'oggetto di studio di questi tre anni di lavoro è stato l'identificazione di un'efficiente cassetta di selezione negativa esterna da utilizzare nei vettori di ricombinazione di tipo PNS (positive-negative selection) come soluzione alternativa alle classiche cassette di antibiotico-resistenza. Con questo sistema innovativo si ovvierebbe alla necessità altrimenti di utilizzare due antibiotici per la selezione positiva e per quella negativa, e, mantenendo solamente quello per il marcatore positivo interno, si determinerebbero condizioni di coltura meno tossiche per le cellule.

- Il primo selettore preso in considerazione è il gene codificante la p53, proteina chiave nel processo apoptotico: con questo tipo di selezione abbiamo ipotizzato che le cellule trasfettate e andate incontro a ricombinazione casuale, mantenendo e quindi sovraesprimendo tale proteina, andassero incontro ad apoptosi. Il vettore di ricombinazione è stato inizialmente trasfettato in HC11, cellule epiteliali immortalizzate di ghiandola mammaria di topo: in questo caso non abbiamo notato un aumento nella mortalità cellulare a fine selezione. Indagando questo aspetto, abbiamo rilevato che le HC11 wild-type esprimono già alti livelli di proteina p53: infatti come riportato in letteratura, si tratta di un tipo cellulare che presenta tre mutazioni nel gene p53 e ciò sicuramente gioca un ruolo importante nella loro immortalizzazione. Per questo motivo, abbiamo successivamente valutato l'efficacia della cassetta di espressione per la p53 come selettore negativo in cellule ES murine: anche in questo caso tuttavia, non abbiamo rilevato un aumento della mortalità cellulare. Infatti dalle analisi di Western blot abbiamo visualizzato un livello di espressione di p53 piuttosto basso e all'incirca uguale nelle cellule wild-type e negli isolati trasfettati col vettore di ricombinazione: da ciò possiamo

dedurre che la cassetta di espressione per la proteina p53 da noi utilizzata non sia sufficientemente efficace. Per aumentare i livelli di proteina p53 prodotta, sarebbe interessante cambiare la cassetta di espressione.

- Il secondo tipo di selettore negativo testato è costituito dai siRNA (Short Interfering RNAs), data l'efficacia e la specificità del meccanismo d'interferenza mediata da queste piccole molecole dimostrata in questi ultimi anni. In questo caso, prima di valutare la sua efficacia direttamente nel vettore di ricombinazione, abbiamo eseguito delle prove preliminari proprio sull'attività di silenziamento dei siRNA da noi disegnati, in quanto esistono varie problematiche legate alle caratteristiche intrinseche della sequenza dei siRNA che possono influenzare negativamente la degradazione del messaggero nel meccanismo dell'RNA interferente. In generale i siRNA possono presentare problemi d'incorporazione nel RISC o di stabilità all'interno di questo complesso. Altre difficoltà sono legate alla fase di appaiamento con l'mRNA, alla degradazione di questo e al rilascio dopo il taglio. La struttura stessa del siRNA può influenzare l'efficienza del silenziamento. Per quanto riguarda il messaggero, i problemi maggiori sembrano essere dovuti alle strutture secondarie o terziarie dello stesso, alla presenza di proteine legate all'mRNA che generano impedimento sterico o al numero di polisomi associati. Inoltre la quantità di mRNA, la sua vita media e l'efficienza di traduzione, oltre che la sua localizzazione a livello subcellulare, sono spesso un ostacolo, così come la posizione della regione bersaglio. Inoltre sebbene numerosi studi suggeriscano che il meccanismo mediato dall'RNA interferente richieda una perfetta omologia per una determinata sequenza, analisi più recenti sul silenziamento genico indotto dai siRNA hanno dimostrato che la specificità del silenziamento non è assoluta e che spesso si possono verificare degli effetti che coinvolgono geni diversi da quelli bersaglio. Ad avvalorare questa tesi ci sono studi basati sull'utilizzo di microarray: essi mostrano che i siRNA possono causare sia un silenziamento genico specifico che aspecifico e che questi effetti possono essere determinati dall'appaiamento di sole 11 pb tra il filamento del siRNA e l'mRNA (Jackson A. L. et al., 2003).

Tutti questi studi sottolineano la difficoltà nella scelta di siRNA appropriati.

Nelle prove preliminari dunque abbiamo testato 3 diversi siRNA aventi come bersaglio di silenziamento il gene di fusione Hytk (resistenza all'igromicina/HSV-thymidine kinase), compreso nei vettori di ricombinazione come selettore positivo: in questo modo, cellule rese resistenti all'igromicina, in presenza dei nostri siRNA, tornano ad essere sensibili all'antibiotico. In questo caso abbiamo trasfettato i vettori codificanti siRNA in cellule HC11 HyTk+ e con due di essi abbiamo notato una forte riduzione a livello di crescita cellulare, indicando interferenza da parte degli RNA sulla resistenza all'igromicina. Dopo queste prove preliminari, abbiamo inserito il siRNA che dava l'effetto di silenziamento più evidente nei vettori di ricombinazione, come selettore negativo: in questi esperimenti abbiamo chiaramente evidenziato un effetto dovuto all'interferenza da parte degli RNA a livello di riduzione del metabolismo cellulare. Tuttavia non era distintamente visualizzabile una riduzione nel numero di cellule: ciò indica che il vettore di "targeting" stesso e la posizione della cassetta codificante il siRNA potrebbero avere una certa importanza nell'espressione del siRNA stesso.

Date le numerose difficoltà anche nella scelta di siRNA appropriati, nel nostro lavoro, l'effetto di silenziamento potrebbe essere incrementato cercando molecole di RNA interferente diverse dirette contro il gene bersaglio HyTk, oltre che

migliorando la cassetta di espressione, per esempio inserendo sequenze isolatrici (vedi sotto).

Da questo lavoro comunque è emersa l'efficacia dei siRNA e la loro possibile applicazione come selettori negativi per silenziare marcatori positivi in vettori di ricombinazione del tipo PNS.

- Il terzo tipo infine di selettore negativo testato è la GFP (Green Fluorescent Protein): la fluorescenza di questa proteina sembra essere stabile, specie-indipendente e può essere monitorata con metodiche non invasive utilizzando tecniche di microscopia a fluorescenza. In questo caso, l'incorporazione della GFP nei vettori di ricombinazione come marcatore per la selezione negativa determina che le cellule recanti un'integrazione casuale risultino fluorescenti, mentre gli eventuali ricombinanti omologhi non esprimano la GFP, perdendo tale cassetta: in questo modo, i cloni fluorescenti vengono scartati dalla procedura d'isolamento e analisi.

La prima cassetta di espressione per la GFP (CMV-GFP) presentava come promotore il CMV e non ci è sembrata essere il candidato ideale, in quanto in media solo il 20% dei cloni resistenti all'antibiotico (selettore positivo) a fine selezione risultava verde, in generale le cellule la esprimevano a bassi livelli e la fluorescenza era molto variabile anche all'interno dello stesso clone.

La seconda cassetta di espressione per la GFP testata in vettori di ricombinazione invece presentava la sequenza codificante sotto il controllo del promotore della β -actina di pollo, l'"enhancer" del cytomegalovirus (CMV), l'introne della β -actina e il segnale di poliadenilazione della β -globina bovina. In questo caso i risultati sono stati decisamente incoraggianti in quanto in media circa l'80% dei cloni resistenti all'antibiotico usato per la selezione positiva, era fluorescente. Inoltre dobbiamo sottolineare che i cloni fluorescenti risultavano completamente verdi e l'intensità di fluorescenza più forte rispetto a quella di CMV-GFP: ciò denota in modo evidente il più alto livello di espressione ottenuto con questa seconda cassetta pCX-EGFP e la sua efficacia come selettore negativo in vettori di ricombinazione PNS.

- Le osservazioni sopra riportate per il marcatore pCX-EGFP si riferiscono a vettori di ricombinazione aventi come selettore positivo la resistenza alla neomicina, ma in parallelo abbiamo provato anche lo stesso vettore di ricombinazione con il gene di fusione HyTk e abbiamo notato che con esso il numero di cloni fluorescenti era notevolmente ridotto (circa 6%) e l'intensità di fluorescenza molto bassa, oltre ad una morfologia dei cloni che indicava una certa sofferenza cellulare, forse per la maggiore tossicità da parte dell'igromicina rispetto al G418.

Nonostante si siano ottenuti cloni d'analizzare utilizzando come selettore positivo la resistenza all'igromicina, abbiamo notato che tale selezione comporta una ridotta vitalità da parte dei cloni cellulari, che riescono ad espandersi solo nel caso in cui si tolga l'antibiotico almeno 24 ore prima della fase d'isolamento.

È dunque ipotizzabile che l'interferenza negativa, rilevata a carico dell'espressione della GFP, dovuta probabilmente al meccanismo d'azione dell'igromicina, abbia influenzato anche i due selettori negativi precedentemente testati, avendo noi allestito tutti gli altri vettori di ricombinazione utilizzando come marcatore per la selezione positiva il gene di fusione HyTk.

- Dal nostro lavoro emerge sicuramente l'importanza di realizzare ottime cassette di espressione per i geni utilizzati come selettori, al fine di ottenere alti livelli di

proteine codificate. A questo proposito è fondamentale studiare promotori, “enhancer”, isolatori, ecc. al fine di aumentare i livelli di espressione. Tra gli isolatori per esempio vi sono le regioni MAR (Matrix Associated Regions): diversi studi infatti hanno dimostrato che le MAR, segmenti di DNA con alto contenuto in A-T che presentano grande affinità per la matrice nucleare, giocano un ruolo nella regolazione trascrizionale dei geni eucarioti. Si tratta di regioni di 200-300 pb presenti circa ogni 30 Kb sul genoma degli eucarioti, spesso in prossimità di regioni enhancer o promotori.

- La fase che ha richiesto più tempo in questo lavoro è stata la messa a punto delle condizioni di coltura e trasfezione dei fibroblasti bovini, in quanto una grossa problematica delle cellule primarie è la scarsa capacità di produrre cloni a partire da singola cellula durante la selezione, come riportato in letteratura. Siamo riusciti comunque a trovare le condizioni di coltura ottimali, ma dobbiamo sottolineare che sono necessari un elevato numero di esperimenti, perché il numero di isolati che riescono ad espandersi per le successive analisi è piuttosto ridotto, tenendo presente la bassa frequenza di ricombinazione omologa in cellule somatiche.
- Bisogna sottolineare inoltre che non tutti i loci scelti come bersaglio per il “gene-targeting” presentano la stessa frequenza di HR: esistono sicuramente regioni cromatiniche chiuse, come possono essere per esempio quelle di geni tessuto-specifici inducibili come la β -lattoglobulina utilizzata nel nostro lavoro, che interferiscono con i meccanismi di ricombinazione omologa.
- Anche negli esperimenti in cui abbiamo utilizzato cellule ES murine, non abbiamo visualizzato alcun evento di ricombinazione omologa, sebbene siano riportate frequenze di HR piuttosto elevate in letteratura in questo tipo di cellule. A questo proposito, effettuando gli esperimenti di espressione del primo tipo di selettore negativo p53 mediante Northern blot, abbiamo notato che le cellule ES da noi utilizzate presentavano livelli molto bassi di questa proteina. In letteratura tuttavia è riportato che esse siano l'unico tipo cellulare che, nello stato indifferenziato, presenti alti livelli di espressione della proteina p53 nella conformazione wild-type, mentre durante il processo di differenziamento si osserverebbe una riduzione del livello di tale proteina e un cambiamento del suo stato conformazionale. Essendo basso il livello di espressione di p53 nelle cellule ES in nostro possesso, ne possiamo dedurre che esse siano in via di differenziamento e questo potrebbe essere uno dei motivi per cui non abbiamo riscontrato, nemmeno in questo caso, un evento di “gene-targeting”.
- Per quanto riguarda invece la seconda fase di RMCE (Recombinase-mediated Cassette Exchange), le nostre prove di efficacia del sistema hanno messo in evidenza la semplice realizzazione di questo passaggio in HC11. Il passaggio limitante dunque rimane il primo di ricombinazione omologa: a questo proposito sarebbe interessante valutare l'efficacia di arricchimento data dalla cassetta di espressione pCX-EGFP in cellule embrionali staminali R1 (Nagy et al., 1993), che presentano una frequenza di HR più elevata. Un'altra possibilità potrebbe essere rappresentata dalla sovraespressione in cellule primarie di Rad51, proteina inducibile da danno al DNA, omologa a RecA nei batteri, che gioca un ruolo essenziale a livello di ricombinazione omologa e che catalizza lo scambio di filamenti di DNA: essa stimola infatti HR spontanea, HR intracromosomale indotta da rotture e il “gene-targeting” di 2-5 volte (Vasquez et al., 2001).