



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

*A chi condivide con me le gioie e i
dolori di questa, che più che una
professione, è una passione.*

*“In ogni cosa ho voglia di
arrivare sino alla sostanza.
Nel lavoro, cercando la mia
strada, nel tumulto del cuore.
Sino all’essenza dei giorni
passati, sino alla loro ragione,
sino ai motivi, sino alle radici,
sino al midollo.
Eternamente aggrappandomi al
filo dei destini, degli avvenimenti,
sentire, amare, vivere, pensare,
effettuare scoperte.”*

Boris Pasternak

Introduzione

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.

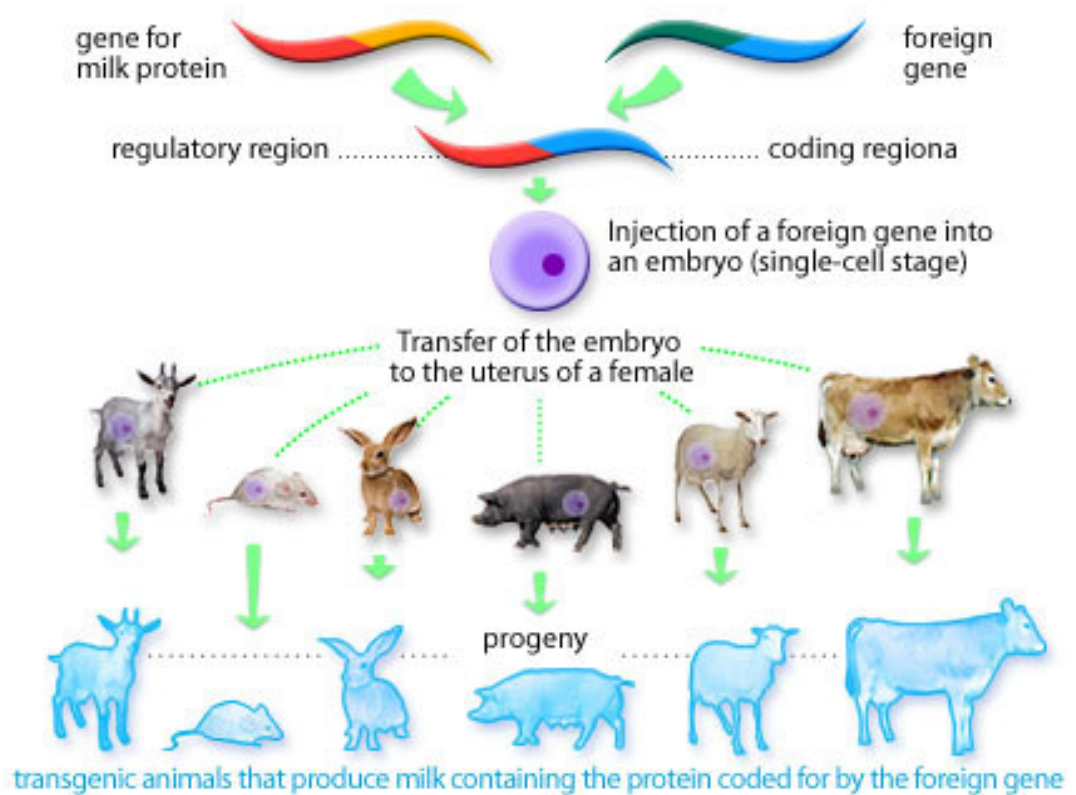


Fig. 1.1
Produzione di proteine ad uso farmaceutico in animali transgenici.

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.

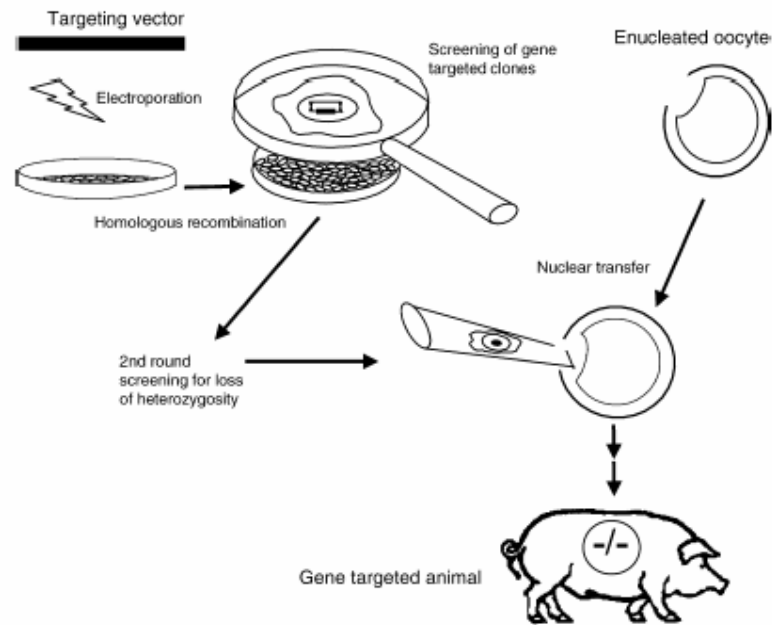


Fig. 1.2
Rappresentazione schematica del “gene-targeting” in animali domestici.

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.

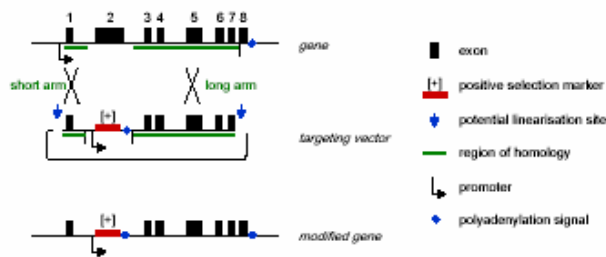


Fig. 1.3

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.

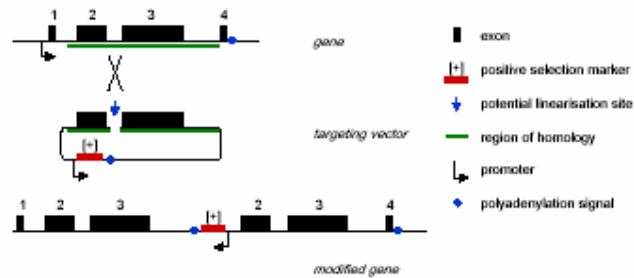


Fig. 1.4

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.

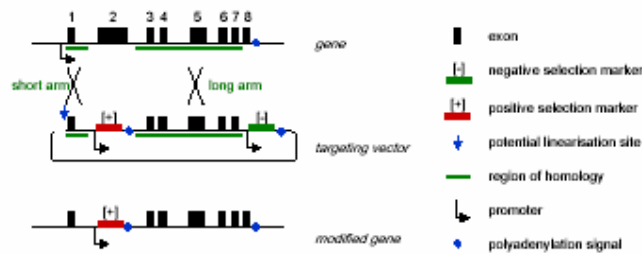


Fig. 1.5

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.

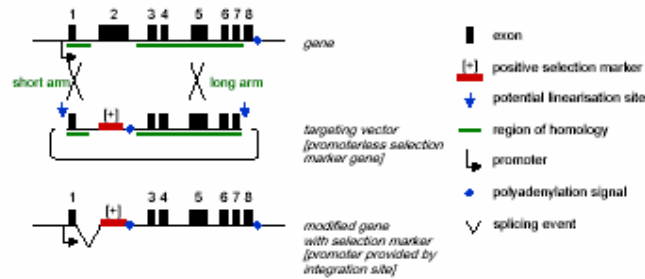


Fig. 1.6

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).

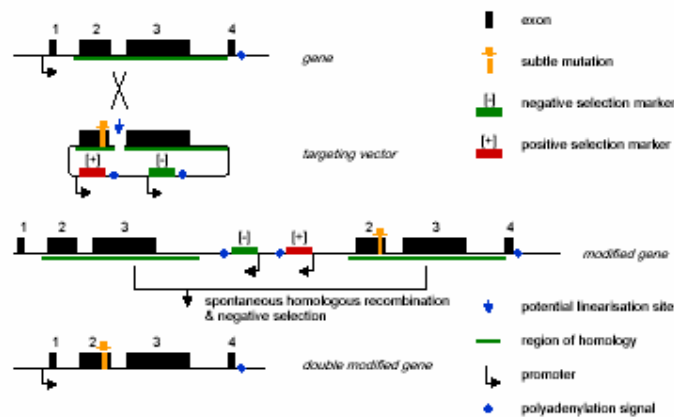


Fig. 1.7

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*.

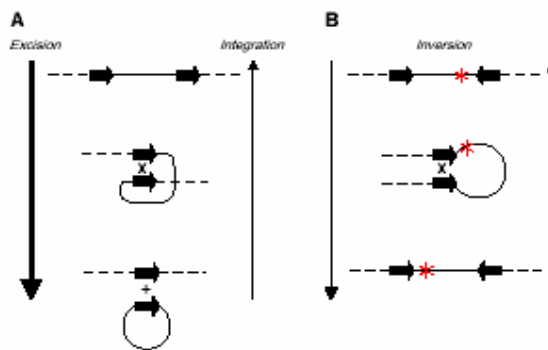


Fig. 1.8

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).

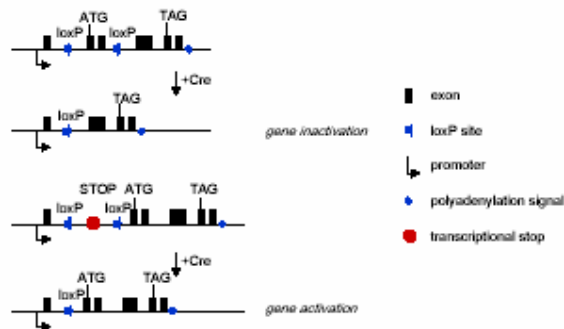


Fig. 1.9

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.

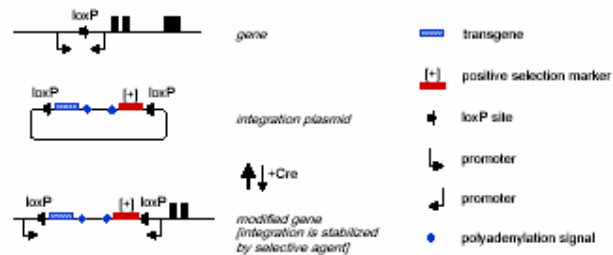


Fig. 1.10

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.

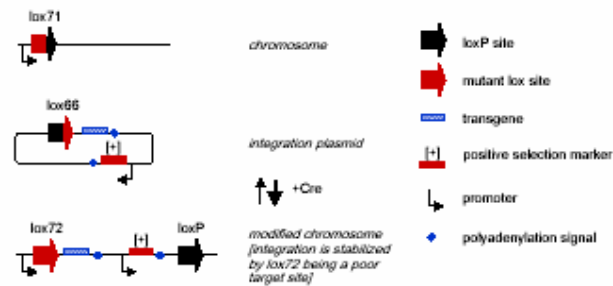


Fig. 1.11

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.

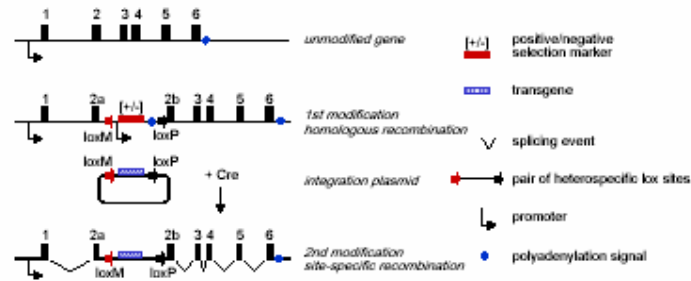


Fig. 1.12

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).

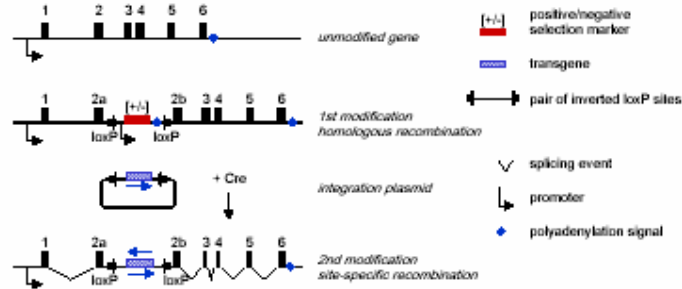


Fig. 1.13

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.

*Scopo e
strategie
adottate*

2. SCOPO E STRATEGIE ADOTTATE

Lo scopo del lavoro è la derivazione di fibroblasti bovini con modificazioni mirate, in modo da ottenere integrazioni di DNA esogeno in regioni specifiche del genoma. Questo è importante per ottenere livelli d'espressione più alti e prevedibili rispetto a quelli ottenuti con integrazioni casuali.

La scelta dei fibroblasti, e più in generale di cellule somatiche, è dettata dal fatto che non esistono ancora cellule embrionali staminali nel bovino, cellule necessarie cioè per realizzare la fusione in blastocisti allo scopo di ottenere animali transgenici chimere per la mutazione introdotta trasferendo le ES di partenza. Abbiamo scelto quindi di mettere a punto tali tecniche di modificazioni mirate ("gene-targeting") in cellule somatiche da utilizzare successivamente come donatrici per il trasferimento nucleare per ottenere eventualmente bovini transgenici.

L'approccio utilizzato per mutare i fibroblasti è quello della ricombinazione bifasica, suggerita da Kolb nel suo lavoro del 2001.

Il gene bersaglio della nostra ricerca è la β -lattoglobulina bovina (BLG).

La prima fase consiste essenzialmente in un passaggio di ricombinazione omologa per l'inserimento all'interno della BLG dei siti *loxP* e *lox2272*, siti di riconoscimento per la ricombinasi Cre del fago P1. A causa tuttavia della bassa frequenza dell'evento di HR nelle cellule somatiche, è necessaria una strategia di arricchimento. Abbiamo scelto la "positive-negative selection", in quanto la tecnica "promoterless", sebbene dia livelli maggiori di arricchimento, può essere utilizzata solo per geni attivamente trascritti nelle cellule usate. Come abbiamo già accennato sopra, il limite maggiore della strategia di selezione positivo-negativa è essenzialmente la bassa efficienza della cassetta di selezione negativa, di solito HSV-tk (herpes simplex virus-thymidine kinase): esso arricchisce gli eventi di HR in presenza di gancyclovir, che viene convertito da HSV-Tk in un nucleoside tossico che inibisce la crescita di cellule che hanno subito un evento d'integrazione casuale. Infatti questo schema di selezione con due agenti selettivi, per esempio G418 per la selezione positiva e gancyclovir per quella negativa, determina solo un parziale arricchimento dei ricombinanti omologhi e un effetto tossico generale sulla popolazione cellulare.

A questo proposito, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla ricerca di un marcatore ottimale come selettore negativo situato all'esterno della regione di omologia per la β -lattoglobulina. I costrutti allestiti presentano, come selettori negativi, una cassetta di espressione per la p53, proteina chiave nel processo apoptotico, una per siRNA, piccole molecole di RNA interferente, e due tipi differenti per la EGFP (enhanced green fluorescent protein). Tali selettori negativi vengono persi nel caso di avvenuta ricombinazione omologa.

Il nostro lavoro prevede inoltre, una volta inseriti nella β -lattoglobulina bovina i siti *lox* mediante HR, una seconda fase secondo il modello di Kolb. I fibroblasti bovini saranno cotrasfettati con un plasmide che contiene il transgene fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272* e con un altro che esprime la ricombinasi Cre. Ciò dovrebbe permetterci di inserire un gene esogeno esattamente nel locus della β -lattoglobulina (RMCE: Cre Recombinase-Mediated Cassette Exchange): in questo modo l'unica sequenza che viene inserita è il transgene, senza porzioni plasmidiche e ciò dovrebbe garantirci livelli di espressione prevedibili.

2.1 Proteina p53

La proteina p53 è considerata “il guardiano del genoma”, proteggendo il DNA: essa infatti è coinvolta nei processi di regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Il gene p53 è un gene soppressore di tumori e agisce come fattore trascrizionale. È localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 umano. La maggior parte delle attività di p53 sono state studiate mediante topi ottenuti da cellule embrionali staminali con il corrispondente gene inattivato mediante ricombinazione omologa (knock-out). Questi topi mostrano un'alta incidenza di tumori, sebbene lo sviluppo risulti normale. Timociti (linfociti che derivano dal timo, precursori dei linfociti T) prelevati da questi topi sono completamente resistenti a fenomeni di apoptosi indotti mediante radiazioni ionizzanti. Tra le funzioni di p53 vi è l'arresto del ciclo cellulare nel passaggio G1-G2 in risposta a danni del DNA, a seguito del quale inizia il processo di apoptosi qualora tale danno risulti irreparabile o dopo segnali proliferativi anomali. La p53 umana contiene 393 aminoacidi e funziona come un tetramero. Il polipeptide possiede tre domini strutturali e funzionali: dominio di transattivazione amino-terminale, quello di legame al DNA o “core” e quello di regolazione carbossi-terminale. La regione N-terminale è in grado di legare componenti del complesso trascrizionale come le proteine di legame ai TATA box (TBP), ma anche l'oncoproteina Mdm2; il core permette alla p53 di legarsi al DNA in maniera sequenza-specifica; la regione C-terminale aiuta la p53 a legarsi alle sequenze di DNA mediante il suo core. In condizioni normali, la p53 è espressa a basso livello all'interno della cellula, grazie alla presenza di un'altra proteina (mdm2) che si lega ad essa, inducendone la degradazione attraverso una proteolisi ubiquitina-dipendente o regolandone l'esportazione nucleare. In questo modo la p53 attiva direttamente l'espressione del suo regolatore, innescando un potente processo di “feedback” negativo. In caso di danno al DNA, le proteine attivate da processi stressori proteggono la p53 dalla degradazione (fosforilazione/defosforilazione) e attivano la sua funzione come fattore di trascrizione.

Abbiamo dunque ipotizzato che la sovraespressione di p53 potesse essere utile come selettore negativo per l'arricchimento cellulare per il “gene-targeting”, innescando processi apoptotici nelle cellule che avessero subito un evento di ricombinazione casuale e non omologa.

2.2 Short Interfering RNAs (siRNA)

In questi ultimi anni è stato dimostrato che piccole molecole di RNA a doppio filamento, chiamate siRNA (Short Interfering RNAs), possono interferire con l'espressione di geni altamente omologhi. Data l'efficacia e la specificità del meccanismo d'interferenza mediato da RNA, abbiamo realizzato vettori che portassero come selettore negativo una cassetta di espressione codificante siRNA in grado di catalizzare la degradazione del trascritto del gene di fusione selettore positivo HyTk (resistenza all'igromicina/HSV-thymidine kinase) o di interferire con il processo di traduzione dello stesso. In questo modo, cellule rese resistenti all'igromicina grazie all'integrazione nel genoma del gene HyTk, ritornano ad essere sensibili all'antibiotico a causa della presenza del siRNA, nel caso in cui non sia avvenuto l'evento di ricombinazione omologa. Da ciò ne dovrebbe conseguire un arricchimento in cloni ricombinanti omologhi.

In questi ultimi anni molti gruppi di ricerca si sono dedicati allo studio e allo sviluppo di metodiche di silenziamento genico basate sulla tecnica dell'RNA interferente (RNAi). Si tratta di un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale sequenza specifico mediato dall'introduzione di RNA a doppio filamento (dsRNA) con sequenza omologa a quella del gene da silenziare. L'RNA interferente in natura potrebbe essere un'arma contro le infezioni virali oppure essere coinvolto nella degradazione di dsRNA che derivano dalla trascrizione di trasposoni o di sequenze ripetute.

Il fenomeno dell'RNAi fu scoperto per la prima volta nelle piante (de Lange et al., 1995), ma il termine fu coniato durante gli studi successivi in *C. elegans*.

Nel 1998 Fire e colleghi scoprirono che l'iniezione di RNA a doppio filamento in *C. elegans* portava ad un efficiente silenziamento genico specifico per una sequenza bersaglio desiderata (Fire et al., 1998). Essi dimostrarono che l'introduzione in *C. elegans* di basse concentrazioni di RNA "senso" e "antisenso" che si appaiavano formando piccole molecole di RNA a doppio filamento causava l'attivazione di meccanismi cellulari di soppressione dell'espressione genica più efficiente rispetto a quella generata dall'RNA a singolo filamento ("senso" o "antisenso").

Questo meccanismo fu poi scoperto in diverse specie tra cui funghi, protozoi, insetti (*Drosophila melanogaster*) (Tuschl et al., 1999) e vertebrati. In *Drosophila* si osservò che molecole di dsRNA di circa 70 paia di basi venivano tagliate in piccole molecole di dsRNA di circa 22 nucleotidi, definiti successivamente siRNA (short interfering RNAs), e che l'introduzione di tali molecole sintetizzate chimicamente negli estratti di embrioni portava ad una degradazione parziale dell'RNA omologo. Il silenziamento mediato da RNA è dunque un meccanismo di regolazione genica che si è conservato durante l'evoluzione con molte varianti specie-specifiche. Inoltre il fatto che non sia stato trovato negli organismi procarioti indica che si tratti di un'innovazione da parte dei sistemi eucarioti.

Il dsRNA è riconosciuto dall'enzima Dicer, che fa parte della famiglia delle ribonucleasi Rnasi III. I Dicer si sono conservati durante l'evoluzione e sono stati trovati in *D. melanogaster*, in *C. elegans*, nella pianta del tabacco e nei mammiferi. L'uomo e *C. elegans* hanno un solo Dicer, *Drosophila* due e *Arabidopsis* quattro. Il Dicer contiene diversi domini: un dominio N-terminale con attività elicastica (il cosiddetto dominio PAZ coinvolto nel controllo dello sviluppo), un dominio catalitico con due regioni omologhe a quelle delle proteine della famiglia delle Rnasi III e un dominio di legame per il dsRNA a livello della porzione C-terminale. L'attività del

Dicer è ATP dipendente: da una parte si pensa che sia legata all'attività ATPasica dell'elicasi, dall'altra sembra che l'ATP possa controllare il legame tra Dicer e RNA a doppio filamento o regolare l'attività delle Rnasi.

Il Dicer processa l'RNA a doppio filamento in siRNA di 21-25 nucleotidi a seconda della specie. I siRNA possiedono un'estremità 3' idrossilica con 2 nucleotidi non appaiati e un'estremità 5' fosforilata. Tali caratteristiche sono importanti per il meccanismo dell'interferenza mediata da RNA. I siRNA prodotti dal Dicer vengono incorporati in un complesso di nucleasi, detto RISC (RNA-induced silencing complex) che deve essere convertito da una forma latente, contenente il siRNA a doppio filamento, ad una forma attiva svolgendo il siRNA tramite un'elicasi con un processo ATP-dipendente (RNA elicasi ATP-dipendente). Il RISC contiene anche un'endoribonucleasi che, utilizzando la sequenza codificata dal filamento di siRNA antisense, trova e rompe la sequenza complementare di mRNA: in particolare essa catalizza l'idrolisi del legame fosfodiesterico, lasciando un'estremità 5' fosfato e un'estremità 3' idrossilica. Il sito di taglio si trova nel mezzo della regione complementare, dieci nucleotidi a monte dell'estremità 5' del siRNA. La reazione richiede ioni magnesio e non è ATP dipendente, mentre l'assemblaggio del RISC con i siRNA necessita di ATP. Nei RISC sono inoltre stati identificati i DEAD-box tipici delle RNA-elicasi: sembra infatti che la presenza di un'elicasi in tale complesso favorisca il rilascio dell'mRNA e del filamento singolo di siRNA che può successivamente essere riciclato. Il RISC contiene anche una proteina della famiglia delle Argonate (Ago). Le proteine Ago presentano due domini conservati: il PAZ (piwi-argonate-zwille) e il PIWI, che probabilmente partecipano all'interazione col Dicer. Il dominio PAZ forse funziona come modulo di legame per Ago, riconoscendo e legando i due caratteristici nucleotidi non appaiati dell'estremità 3' dei siRNA. Questo riconoscimento del 3' terminale è importante per i Dicer e per le Ago per distinguere i siRNA dalle altre molecole di RNA.

L'mRNA bersaglio viene quindi tagliato in frammenti di circa 22 nucleotidi. Quando il taglio è completato, il RISC si allontana e il siRNA può essere utilizzato per un nuovo ciclo di taglio e riconoscimento dell'mRNA. Tale processo avviene nel citoplasma.

L'RNA a doppio filamento viene sintetizzato a livello intracellulare, ma può anche essere introdotto dall'esterno direttamente nelle cellule. Scoperto questo fenomeno, si è pensato di sfruttarlo per il silenziamento genico. La lunghezza minima dell'RNA a doppio filamento necessaria per indurre il meccanismo dell'RNAi è di 26 nucleotidi, ma molecole più lunghe risultano essere più efficienti. Tuttavia la trasfezione di lunghi RNA a doppio filamento in colture cellulari di mammifero induce un potente sistema antivirale, in grado di generare una risposta da parte dell'interferone: esso causa l'attivazione di enzimi che degradano in modo aspecifico l'mRNA intracellulare e inibiscono in modo globale la sua traduzione (Harborth et al., 2001). L'interferone in particolare induce un enzima, la 2'-5' Oligoadenilato Sintasi, il cui prodotto è un essenziale cofattore per una ribonucleasi sequenza-non-specifica, l'Rnasi L (enzima che presenta specificità per RNA di specie diverse incluso l'RNA ribosomale). Inoltre l'interferone induce la PKR, una protein-chinasi RNA dipendente, che se attivata da lunghe molecole di dsRNA, fosforila e inattiva la subunità α del fattore eIF-2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) implicato nell'inizio della traduzione dell'RNA messaggero, sopprimendo così la sintesi proteica e portando alla morte cellulare con meccanismi apoptotici e non.

È stato necessario quindi escogitare sistemi per superare i meccanismi di difesa tipici dei mammiferi per introdurre molecole esogene di RNA. La sintesi chimica di siRNA è quello più utilizzato per generare RNAi. Anche i siRNA trascritti *in vitro* dal promotore fagico T7 (siRNA-based hairpin RNA) (Donzé et al., 2002), così come i siRNA isolati da estratti proteici di embrioni di *D. melanogaster* sembrano essere efficaci. Tra le maggiori difficoltà vi è quella di introdurre le piccole molecole di RNA a doppio filamento direttamente nelle cellule. Un'altra possibilità è la produzione di siRNA a partire da lunghe molecole di RNA che vengono tagliate dall'Rnasi III di *E. coli* (esiRNA – endoribonuclease-prepared siRNA) (Yang et al., 2002) e che possono riconoscere più siti all'interno dello stesso mRNA. Clarke inoltre ha inattivato gli enzimi che mediano il sistema di difesa antivirale indotto dall'interferone (Clarke et al., 1995).

Tuttavia in questi casi non si ottengono organismi “knock-out” stabili: per risolvere questo problema si sono creati nuovi tipi di vettori di espressione. Questi vettori presentano inserti codificanti per la sequenza bersaglio del gene d'interesse posti sotto il controllo di promotori di RNA polimerasi III (il promotore murino U6 e l'umano H1 - che normalmente trascrivono gli small nuclear RNA - e quello per il tRNA) che permettono la trascrizione di siRNA funzionali o di loro precursori.

Zheng e colleghi hanno sviluppato un sistema di espressione per siRNA con doppio promotore (pDual) in cui il DNA sintetico codificante una sequenza di siRNA genespecifica è inserita tra i due diversi promotori di polimerasi III, U6 e H1. Dopo la trasfezione in cellule di mammifero, i filamenti senso e antisense vengono trascritti da questi due promotori a partire dal medesimo template: si crea così un RNA a doppio filamento con un'uridina non appaiata in ciascuna estremità 3', cioè con una struttura simile al siRNA generato dal Dicer (Zheng et al., 2004). Un altro sistema prevede invece l'utilizzo di un solo promotore davanti all'inserto oligonucleotidico costituito da due sequenze di circa 21 paia di basi, di cui una invertita, separate da una sequenza spaziatrice di 6-9 paia di basi: in questo caso il trascritto va a formare una struttura a forcina (short hairpin RNA – shRNA) che verrà convertita in siRNA vero e proprio dal Dicer (Hutvagner et al., 2002). Un'altra categoria di vettori di espressione è rappresentata dai vettori virali: i più utilizzati sono i retrovirus, i vettori retrovirali oncogeni basati sul virus della leucemia murina di Moloney (MoMuLV), il virus delle cellule staminali murine (MSCV) e i vettori lentivirali derivati dal virus dell'immunodeficienza umana tipo-1 (HIV-1).

Sono stati studiati anche vettori che contengono promotori di polimerasi II per esprimere lunghi dsRNA. Dato che sono disponibili diversi promotori della polimerasi II tessuto-specifici, questo metodo permette un silenziamento genico mirato a particolari tessuti.

Le possibili applicazioni dell'RNAi sono svariate: dalla lotta contro malattie, quali il cancro e le infezioni da virus e parassiti, all'analisi di problemi legati alla biologia cellulare e dello sviluppo. Esso inoltre può essere usato per lo studio di funzionalità e interazione tra geni. L'RNAi risulta importante anche per l'identificazione di nuovi bersagli per i farmaci. I siRNA potrebbero infine essere utili in varie forme di terapia genica.

In conclusione l'importanza dei siRNA è essenzialmente data dal fatto che si tratta di prodotti cellulari naturali, non producono metaboliti tossici, hanno una lunga durata nelle colture cellulari e sono efficaci anche a basse concentrazioni. In più, a differenza dell'effetto non specifico dei lunghi dsRNA, i siRNA generano un silenziamento genico selettivo nei mammiferi.

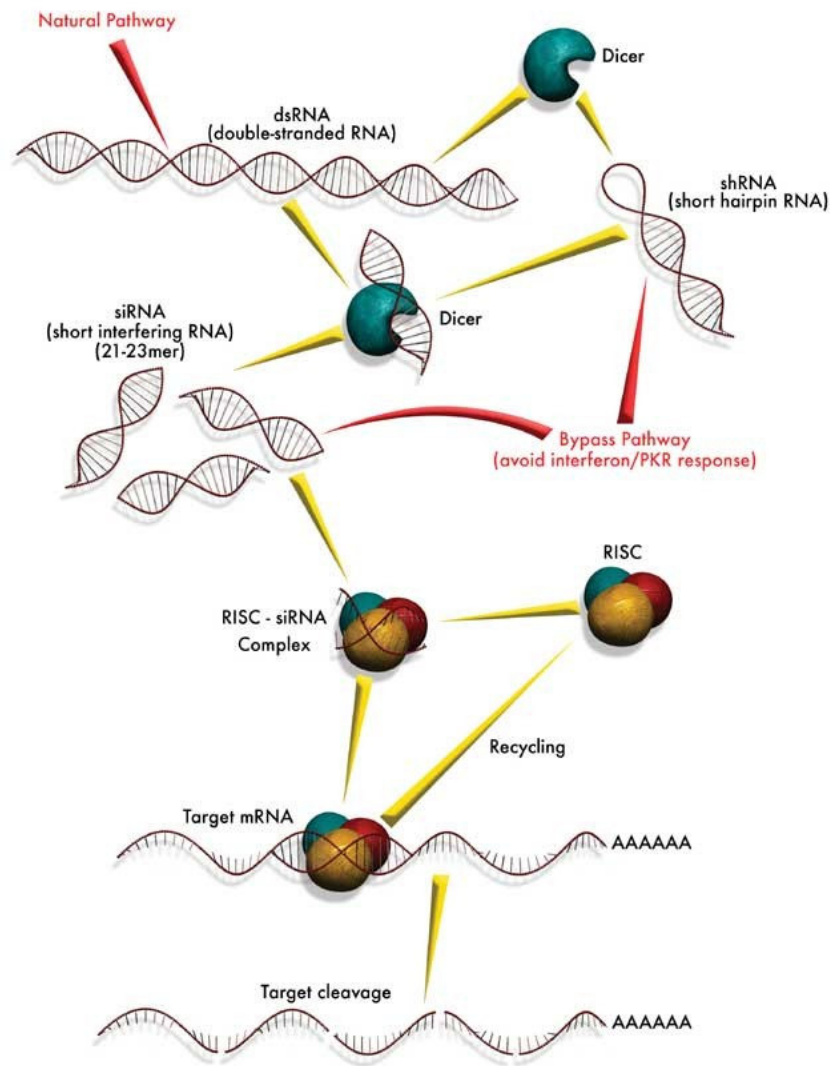


Fig. 2.1
Rappresentazione schematica del meccanismo d'interferenza mediato da RNA.

2.3 Green fluorescent protein (GFP)

Tra i numerosi esseri viventi bioluminescenti vi è la medusa *Aequorea victoria*. Questo organismo del nord Atlantico è in grado di emettere una luce verde fluorescente dai fotociti localizzati alle estremità del suo ombrello. La fluorescenza è generata dall'attivazione sequenziale di due fotoproteine, l'aequorina e la proteina verde fluorescente (GFP). La GFP è una proteina estremamente stabile di 238 amminoacidi. In seguito a legame con calcio, l'aequorina emette una luce blu che eccita la GFP, la quale a sua volta emette fluorescenza verde. Sebbene le caratteristiche di questa proteina fossero conosciute da anni, è stato solo con il clonaggio del cDNA della GFP nel 1992 (Prasher et al., 1992) e la sua successiva espressione eterologa in *E. coli* e *C. elegans* (Chalfie et al., 1994) che i ricercatori si sono resi conto delle reali potenzialità di questa molecola.

La GFP eccitata da luce blu o UV e in presenza di ossigeno, emette fluorescenza verde e non necessita di ulteriori substrati o cofattori esogeni, in quanto il cromoforo è intrinseco alla GFP stessa (Chalfie et al., 1994). L'immediata visualizzazione di questa proteina in colture cellulari è utilizzata come reporter per l'espressione genica, come marcatore per il differenziamento durante le varie fasi di sviluppo, come coda per la localizzazione di proteine (Wang e Hazelrigg, 1994) e potrebbe essere utile per l'arricchimento cellulare. In più la fluorescenza della GFP è specie-indipendente e può essere monitorata in modo non invasivo utilizzando tecniche di microscopia a fluorescenza, citofluorimetria e visualizzazione macroscopica. Essa rappresenta uno strumento importante per la misurazione diretta dell'efficienza di trasfezione. Tuttavia le GFP wild-type presentano varie caratteristiche indesiderate, compresa una bassa intensità di fluorescenza quando eccitata da luce blu, un ritardo nello sviluppo della fluorescenza in seguito alla sintesi proteica e una bassa espressione in vari tipi di cellule di mammifero. In questo modo, la sensibilità della GFP wild-type risulta inferiore a quella di altre proteine reporter, come β -gal, che utilizza un'amplificazione di tipo enzimatico. Per aumentare la rilevazione della GFP in cellule di mammifero trasfettate, sono state create diverse varianti, che contengono mutazioni nel cromoforo (EGFP – enhanced green fluorescent protein).

Nel nostro lavoro la prima cassetta d'espressione per la GFP utilizzata deriva dal plasmide pBSCGFPns, che presenta la sequenza codificante sotto il controllo del promotore del cytomegalovirus (CMV); la seconda invece proviene dal plasmide pCX-EGFP e ha il cDNA della EGFP sotto il controllo del promotore della β -actina di pollo, l'"enhancer" del CMV, l'introne della β -actina e il segnale di poliadenilazione della β -globina bovina (Okabe et al., 1997). Utilizzando la GFP come selettore negativo nei vettori di ricombinazione, ci aspettiamo che risultino verdi le cellule che non sono andate incontro ad HR, in modo così da ridurre il numero di cloni da analizzare per l'evento di ricombinazione omologa.

Materiali e metodi

3. MATERIALI E METODI

3.1 VETTORE DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO p53

3.1.1 Sintesi del costrutto

Abbiamo iniziato a testare il primo tipo di cassetta di selezione negativa in una linea di cellule epiteliali mammarie murine immortalizzate (HC11). Il costrutto di ricombinazione di partenza da noi utilizzato è il pBK- β cas-2272-hytk-P-tk fornito dal prof. Andreas Kolb, che presenta il gene di fusione HyTk (che conferisce resistenza all'igromicina e sensibilità al gancyclovir) all'interno della regione di omologia per la β -caseina murina e un ulteriore TK come selettore negativo all'esterno di tale cassetta.

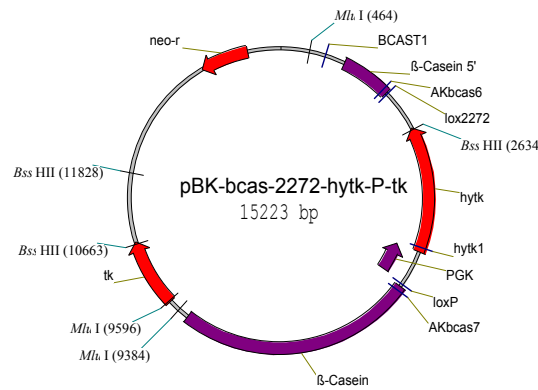


Fig. 3.1

Costrutto originale pBK- β cas-2272-hytk-P-tk del prof. Andreas Kolb

Dopo aver eliminato il TK esterno e alcuni siti di restrizione, si è inserito come selettore esterno una cassetta d'espressione per la p53, proteina chiave nel processo apoptotico (β -loxTK⁻rev/p53rev).

L'eliminazione del TK esterno (β -loxTK⁻ e β -loxTK⁻rev) è stata realizzata ligando tra loro i frammenti pBK- β cas-2272-hytk-P-tk // *Bss*HII+*Mlu*I e pBK- β cas-2272-hytk-P-tk // *Mlu*I.

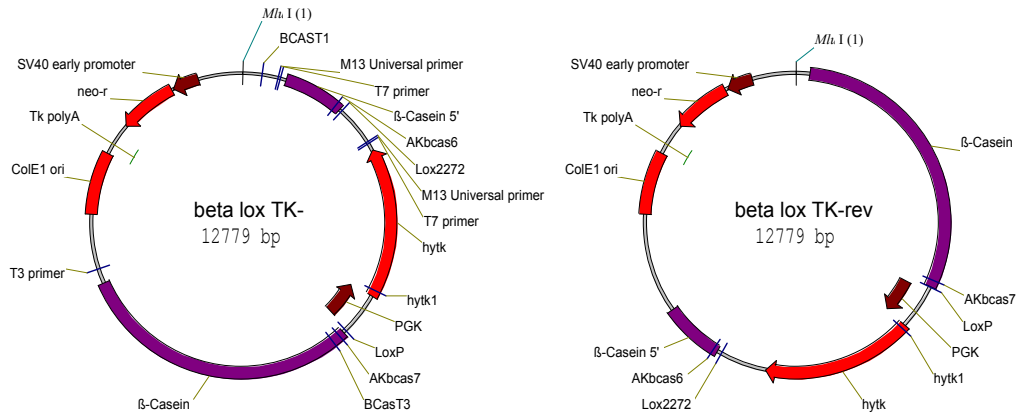


Fig. 3.2

Costrutti β -loxTK⁻ e β -loxTK^{-rev} derivanti dall'eliminazione del TK esterno alla regione di omologia per la β -caseina murina del costrutto originale pBK- β cas-2272-hytk-P-tk di Kolb

Il marcatore per la selezione negativa è stato ottenuto digerendo enzimaticamente il plasmide pCMVp53 con *Bss*HIII. Quest'ultimo poi è stato rilegato al vettore β -loxTK^{-rev} // *Mlu*I, ottenendo così il costrutto finale β -loxTK^{-rev}/p53rev.

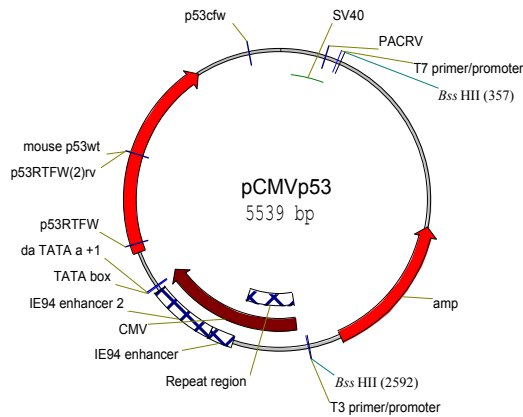


Fig. 3.3

Plasmide da cui è stata estratta la cassetta di selezione negativa p53.

3.1.2 Preparazione del DNA per le trasfezioni

Il costrutto β -loxTK⁻rev/p53rev precedentemente allestito nel nostro laboratorio è stato utilizzato per trasformare cellule di *Escherichia coli* competenti e conservato così in glicerolo a -80°C . Dato che il DNA per la trasfezione di colture cellulari deve essere molto pulito, abbiamo riestratto tali plasmidi con il Plasmid Mini Kit (Qiagen).

La sera precedente all'estrazione vengono inoculati da stock al glicerolo o da striscio su piastra le cellule competenti con i plasmidi d'interesse in 5 ml di terreno liquido LB (Luria-Bertani medium: 10 g/l triptone, 5 g/l estratto di lievito, 10 g/l NaCl) addizionato con 50 $\mu\text{g/ml}$ di kanamicina, dato che i nostri plasmidi contengono la resistenza alla neomicina. Gli inoculi vengono incubati a 37°C per 16 ore circa, e il giorno successivo si procede con l'estrazione dei plasmidi con Plasmid Mini Kit (Qiagen) secondo protocollo.

Il costrutto β -loxTK⁻rev/p53rev è stato linearizzato mediante l'enzima di restrizione *Sfi*I (Amersham) e incubato a 37°C per circa 1 ora: il frammento atteso è di 16089 pb. La digestione viene controllata mediante elettroforesi su gel d'agarosio allo 0,7%, utilizzando come marcatore di peso molecolare il λ DNA // *Hind*III (Fermentas).

Il successivo passaggio di purificazione è necessario in quanto il DNA per la trasfezione deve essere molto pulito. I residui normalmente presenti, a causa di purificazioni poco accurate o per processi di digestione, sono le proteine. La purificazione e successiva precipitazione sono indispensabili per allontanarle e, nel caso di enzimi di restrizione, evitare digestioni letali del genoma delle cellule trasfettate.

Il DNA digerito viene estratto con 1 vol. di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1), precipitato con etanolo e risospeso in tampone TE (1 mM EDTA; 10 mM Tris, pH 8) nella quantità desiderata.

Dopo aver digerito e purificato il DNA da utilizzare nelle trasfezioni, esso va quantificato su gel d'agarosio, utilizzando diluizioni dello stesso e del marcatore di peso molecolare di quantità nota. Anche in questo caso, abbiamo usato varie diluizioni di λ DNA // *Hind*III.

3.1.3 Colture cellulari di HC11 e trasfezioni

Le HC11 sono una linea di cellule epiteliali mammarie murine immortalizzate (Doppler et al., 1989). Esse sono coltivate in RPMI, con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino, 2 mM L-glutamina, 50 µg/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomina, 2,5 µg/ml anfotericina B (tutto Euroclone) e 10 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor) (Sigma).

➤ Scongelo e coltura

Le cellule, conservate in CryoVials (Nalgene) in azoto liquido, vengono scongelate a temperatura ambiente, diluite in terreno fresco, centrifugate, risospese in 5 ml di RPMI completo e trasferite in fiasca da 25 cm² (Corning) per colture cellulari. Le cellule vengono poi incubate a 37°C ad atmosfera modificata al 5% di CO₂.

Il cambio del terreno, che mediamente si effettua ogni 2-3 giorni, viene indicato dal viraggio al giallo del rosso fenolo, indicatore di pH presente nel terreno stesso: ciò avviene in seguito all'acidificazione del terreno dovuta alla crescita cellulare.

La procedura di cambio del terreno prevede l'aspirazione completa del terreno esaurito, il lavaggio con 3 ml di PBS (Phosphate Buffered Saline: 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na₂HPO₄; 0,24 g/l KH₂PO₄), la sua successiva aspirazione e l'aggiunta di terreno fresco.

Quando le cellule raggiungono la confluenza, dopo il lavaggio con PBS, si effettua la tripsinizzazione. La tripsina (EuroClone: 0,05% tripsina; 0,02% EDTA in PBS) infatti permette il distacco delle HC11 dalla fiasca per poterle riattivare o diluire, a seconda delle necessità.

Il processo di tripsinizzazione, svolto in maniera controllata, agisce a livello dei legami intercellulari e dei legami delle cellule stesse con il substrato sintetico delle fiasche, senza danneggiare le cellule. Questa fase di distacco è indispensabile in quanto cellule iper-confluenti vanno incontro a morte a causa dell'inibizione da contatto.

Per fiasche da 25 cm² è sufficiente aggiungere 1 ml di tripsina e incubare a 37°C per qualche minuto. Dopo aver controllato l'avvenuto distacco al microscopio rovesciato, la tripsina viene inattivata con 2 ml di terreno completo, si pipetta e si lavano le pareti della fiasca in modo da ottenere una sospensione di singole cellule. Infine si diluisce in RPMI completo a seconda delle necessità.

➤ Trasfezione

Per effettuare la trasfezione è necessario riattivare le cellule un paio di giorni prima: questa fase ci garantisce di avere una coltura vitale, non soggetta a inibizione da contatto. La riattivazione consiste nel tripsinizzare e diluire le cellule alla concentrazione desiderata.

Il giorno successivo alla riattivazione, le cellule vengono contate mediante camera emocitometrica e seminate in fiasche o piastre per colture cellulari delle dimensioni desiderate.

La procedura prevede l'aspirazione del terreno, il lavaggio con PBS, l'aggiunta di 1 ml di tripsina per fiasche da 25 cm² e l'inattivazione con 2 ml di RPMI completo. A questo punto, si risospese la coltura cellulare pipettando, si trasferisce una goccia su

ciascuna delle due camere emocitometriche e si contano le cellule presenti. Si calcola successivamente la media delle cellule contate nei due campi e si moltiplica tale valore per 10^4 in modo da ottenere la concentrazione (n° di cellule/ml). Ogni quadrato dell'emocitometro con vetrino coprioggetti infatti corrisponde ad un volume di 10^{-4} cm^3 . Dato che 1 cm^3 equivale circa a 1 ml, la concentrazione di cellule per ml sarà:

$$\text{media delle cellule contate} / 10^{-4} \text{ ml} = \text{media delle cellule contate} * 10^4 / \text{ml}$$

Dopo la conta, le cellule vengono diluite e seminate in modo da avere circa $1-3 * 10^5$ cellule in piastre Petri (Falcon) da 60 mm di diametro pronte per la trasfezione.

Il giorno successivo abbiamo eseguito la trasfezione tramite liposomi: si tratta di sostanze chimiche in grado di formare strutture vescicolari lipidiche monostrato, inglobando al loro interno il DNA. I liposomi possono così interagire con le membrane cellulari e veicolare il DNA fino al nucleo.

Per questi esperimenti abbiamo utilizzato in parallelo due diversi prodotti commerciali: il Metafectene della Biontex e il FuGENE6TM della Roche. Per ogni trasfezione allestita, abbiamo utilizzato come controllo positivo, cellule trasfettate con una cassetta d'espressione per la GFP e come controllo negativo cellule trasfettate senza DNA.

1. Metafectene

Qualche ora prima della trasfezione, le cellule da trasfettate vengono lavate con PBS e si aggiunge terreno fresco.

La soluzione A viene allestita miscelando, in una provetta da 1,5 ml, 0,5 μg di DNA con RPMI senza siero e antibiotici, precedentemente filtrato (filtri sterili di acetato di cellulosa ALBET-JACS, $\text{Ø} = 0,20 \mu\text{m}$), per arrivare ad un volume finale di 300 μl , pipettando delicatamente.

La soluzione B si prepara con 6 μl di Metafectene e RPMI senza siero e antibiotici per arrivare ad un volume finale di 300 μl , sempre pipettando gentilmente.

Si unisce infine la soluzione B alla soluzione A, pipettando piano, senza agitare o centrifugare, e si incuba a temperatura ambiente per 20 minuti. Alla fine si trasferisce la miscela nel terreno di coltura delle cellule e si incuba per 48 ore a 37°C e 5% CO_2 .

2. FuGENE6TM

Anche con questo secondo protocollo, è necessario cambiare il terreno alle cellule qualche ora prima della trasfezione.

In questo caso, in provetta da 1,5 ml si prepara una miscela con 297 μl di RPMI senza siero e antibiotici precedentemente filtrato, e 3 μl di FuGENE6TM, stando attenti a non fare entrare in contatto l'agente di trasfezione con le pareti della provetta stessa. Si agita la provetta e la si lascia a temperatura ambiente per 5 minuti. Si aggiunge poi 1 μg di DNA da trasfettare alla miscela, si inverte un paio di volte e la si lascia per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, la miscela di trasfezione viene aggiunta alle cellule goccia a goccia. Si distribuisce infine uniformemente il terreno e si incuba per 48 ore a 37°C e 5% CO_2 .

➤ Selezione delle cellule trasfettate

Dopo 48 ore d'incubazione, iniziano i 14 giorni di selezione. In questo esperimento l'agente di selezione è l'igromicina, in quanto il plasmide che abbiamo usato per le trasfezioni, se integrato, rende le cellule resistenti a tale antibiotico. Per le HC11 la concentrazione da usare di igromicina B è 300 µg/ml (Roche) in RPMI, in base alle prove di titolazione eseguite.

Prima del cambio di terreno, si valuta l'efficienza di trasfezione mediante conta delle cellule fluorescenti del controllo positivo al microscopio ottico rovesciato, dotato di appositi filtri per l'epifluorescenza. Si contano 10 campi visivi (10x) casuali e si calcola la media di cellule fluorescenti per campo.

Fatto ciò, si aspira il terreno, si effettua un lavaggio con PBS e si aggiunge il terreno di selezione. Nella prima settimana di selezione si effettua il cambio di terreno ogni due giorni, mentre nella seconda settimana si riduce la frequenza effettuando il cambio solo se necessario.

➤ Isolamento dei cloni

Tra il quinto e il settimo giorno di selezione si procede all'isolamento dei cloni cellulari. Questo passaggio ci permette di isolare i cloni derivati da singole cellule resistenti all'igromicina e di espanderli separatamente per le successive analisi.

Quando i cloni in selezione sono ben identificabili ed ancora ben separati tra loro, si posiziona una griglia numerata sul fondo della piastra e si procede alla localizzazione di tutti i cloni presenti. Si prepara una piastra da 96 pozzetti per colture cellulari (Corning) con 200 µl di terreno di selezione in ogni pozzetto.

La piastra da cui dobbiamo isolare i cloni viene lavata con PBS e si aggiungono 3 ml di tripsina diluita 1:20 in PBS. Individuato il clone al microscopio ottico rovesciato, con un puntale di una pipetta p10 si entra al centro del clone, si aspira (se le cellule non si staccano, si gratta delicatamente il fondo della piastra) e si trasferiscono i 10 µl aspirati in un pozzetto della piastra da 96.

Esauriti i cloni, si procede alla replica, trasferendo 100 µl del contenuto ben risospeso di ogni pozzetto in una piastra nuova da 96. La prima replica si utilizza per l'estrazione del DNA da usare per le successive analisi di PCR, mentre la seconda replica viene conservata a -80°C per eventuali espansioni in caso di cloni positivi. Si prosegue poi con la selezione. Dopo 14 giorni, se le cellule non sono ancora giunte a confluenza, si toglie la selezione e si continua con la coltura in terreno RPMI normale.

➤ Lisi dei cloni isolati

Quando le cellule giungono a confluenza nel pozzetto, esse vengono lisate con un sistema rapido che non prevede l'estrazione di DNA con fenolo/cloroformio/alcol isoamilico, ma permette comunque di effettuare un'analisi tramite PCR.

Il metodo consiste nell'utilizzo del tampone PBNB (PCR Buffer with Non-ionic Detergents: 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 2,5 mM MgCl₂-6H₂O; 0,1 mg/ml gelatina; 0,45% v/v NP40; 0,45% v/v Tween20).

Dopo aver tolto il terreno di crescita alle cellule, si aggiungono 50 µl di PBNB e 0,15 µl di proteinasi K (20 mg/ml) per pozzetto e la piastra viene incubata per 1 ora a 37°C. Successivamente il lisato viene trasferito in una provetta da 0,5 ml e si incuba 1 ora a 55°C. Infine si inattiva la proteinasi K a 95°C per 10 minuti in un termociclatore e il lisato così ottenuto può essere conservato in congelatore a -20°C per le successive analisi di PCR.

➤ Congelamento dei cloni isolati

La seconda replica di HC11 trasfettate e isolate nella piastra da 96 pozzetti, viene preparata per essere congelata a -80°C.

Dopo aver aspirato il terreno e lavato le cellule con PBS, si aggiungono 100 µl di RPMI completo addizionato con 10% DMSO (Sigma) e la piastra viene trasferita nel congelatore a -80°C.

3.1.3.1 *Analisi mediante PCR dei cloni isolati*

I lisati dei cloni di HC11 trasfettate con il vettore di ricombinazione β-loxTK^{rev}/p53^{rev} isolati sono stati analizzati mediante PCR (Polymerase Chain Reaction).

Per rendere piuttosto rapida l'analisi di un così alto numero di lisati cellulari, abbiamo utilizzato come miscela di reazione un prodotto commerciale completo di DNA polimerasi termostabile nel suo tampone di reazione, con nucleotidi e magnesio, chiamato MasterMix (Promega), che richiede solo l'aggiunta dei primer e di acqua per il raggiungimento del volume finale di reazione.

I primer disegnati mediante il programma VectorNTI e utilizzati per l'analisi sono:

βcasT1: GAGCCTTGGGACTGTGAATCTAA

βcasT2: CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

Il primo primer riconosce una sequenza all'interno del nostro vettore di "targeting", mentre il secondo si appaia ad una regione endogena della β-caseina murina (introne1) non compresa nel costrutto utilizzato per la trasfezione: in questo modo si ottiene un'amplificazione solo nel caso di avvenuta ricombinazione omologa.

Per avere un controllo positivo della reazione di PCR è stato realizzato un costrutto (BCas PCR targeting control-c), che comprende entrambe le regioni di appaiamento dei due primer e che dia un amplificato di dimensioni simili (1209 pb), ma non uguali a quelle che si ottengono in caso di avvenuto "gene-targeting" (1269 pb), in modo che sia possibile distinguere un'eventuale contaminazione plasmidica.

Come controllo negativo della reazione, oltre alla sola acqua, abbiamo utilizzato anche un lisato di HC11 wild-type ottenuto sempre con metodo PBND.

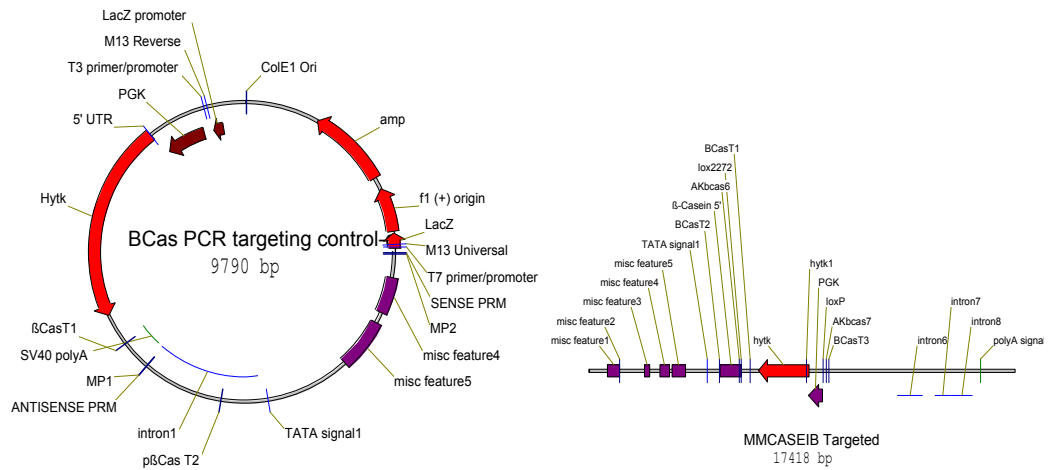


Fig. 3.4

A sinistra: plasmide controllo positivo per la reazione di PCR con primer β casT1 + β casT2
A destra: ipotetico locus della β -caseina murina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa

Esempio di miscela di reazione per PCR in piastra da 96 pozzetti (Eppendorf):

DNA lisato PBND	1 μ l		
MasterMix (2x)	10,5 μ l	mix x 100	1050 μ l
Primer β casT1+ β casT2 (25 μ M ciascuno)	0,8 μ l		80 μ l
H ₂ O	8,7 μ l		870 μ l
			<hr/>
V _f	21 μ l		2000 μ l:100 = 20 μ l + 1 μ l lisato

Il programma usato è il seguente, su termociclatore GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems):

95°C 2 minuti

95°C 30 secondi		x 35 cicli
56°C 30 secondi		
72°C 2 minuti		

72°C 5 minuti

Le reazioni vengono controllate su gel d'agarosio all'1%.

Come controllo endogeno dell'avvenuta amplificazione, i lisati sono stati analizzati anche con primer GDX1 e GDX2, che amplificano il gene GdX "housekeeping" murino che codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle ubiquitine, e danno un prodotto di circa 700 pb.

GDX1: TAAGCTGAATGTCCCTGTGCGC

GDX2: TTCAGGGTGTAGAAAGCGGCTG

Il programma usato è il seguente, su termociclatore GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems):

95°C 2 minuti

95°C 30 secondi		x 35 cicli
58°C 30 secondi		
72°C 1 minuto		

72°C 5 minuti

3.1.3.2 *Analisi mediante Western blot*

➤ Lisati cellulari

Alcuni cloni isolati di HC11 trasfettate col costrutto β -loxTK⁻rev/p53rev sono stati espansi e, una volta giunti a confluenza, tripsinizzati. Successivamente abbiamo centrifugato 10^6 cellule e le abbiamo lavate con PBS. Il pellet è stato risospeso in 100 μ l di soluzione di lisi (1% SDS; 10% glicerolo; 10% β -mercaptoetanolo; 40 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,001% blu di bromofenolo), vortexato e bollito per 5-10 minuti per rompere il DNA. Il lisato viene poi fatto raffreddare a temperatura ambiente, centrifugato per raccogliere le gocce e nuovamente vortexato brevemente per mischiare il tutto.

➤ SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Il metodo per l'elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodio-dodecilsolfato da noi usato è quello di Laemmli (1970), in cui tutte le componenti del sistema contengono 0,1% SDS. Abbiamo scelto una concentrazione di acrilammide del 10% per il gel di separazione, consigliato per proteine con un peso compreso tra i 16 e i 68 kDa: nel nostro caso infatti dovevamo visualizzare la proteina di controllo β -actina di 42 kDa e la proteina da analizzare p53 di 53 kDa. Il gel d'impaccamento è stato fatto ad una concentrazione del 5% di acrilammide.

La corsa viene effettuata con Mini-Protean II dual slab cell – BIO-RAD.

➤ Trasferimento (elettroblotting)

Le proteine, separate mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide, sono state successivamente trasferite su membrana PVDF (polivinildifluoruro) (BIO-RAD) con un processo elettroforetico, in quanto, in presenza di SDS, le proteine sono tutte cariche negativamente e corrono quindi verso l'anodo.

➤ Lavaggi e "immunodetection"

Il giorno successivo vengono eseguiti i lavaggi e l'"immunodetection" (BM Chemiluminescence Western Blotting kit (Mouse/Rabbit) - Roche). La rilevazione del segnale prevede due fasi: prima la membrana viene incubata con l'anticorpo primario murino specifico per la proteina d'interesse non marcato e successivamente con l'anticorpo secondario, in grado cioè di riconoscere la porzione costante dell'anticorpo di topo. Come anticorpi primari abbiamo usato un anticorpo anti- β -actina (1:5000) su uno dei due gel, come controllo endogeno dell'avvenuto trasferimento, e uno anti-p53 (1-2 μ g/ml) sull'altro gel per l'analisi di nostro interesse (entrambi Abcam). Per quanto riguarda l'anticorpo secondario, abbiamo usato la miscela anti-IgG di topo/anti-IgG di coniglio del kit Roche coniugato con la perossidasi, che, in presenza del substrato chemiluminescente, catalizza la scissione di H_2O_2 ed emette luce in grado di impressionare una lastra fotografica (Amersham).

3.1.4 Colture di cellule ES murine e trasfezioni

Successivamente abbiamo voluto cercare di valutare l'efficienza di "gene-targeting", trasfettando anche cellule ES murine col vettore β -loxTK^{rev}/p53rev, in quanto questo tipo cellulare presenta un'efficienza di ricombinazione omologa più alta rispetto alle cellule somatiche.

Queste cellule vengono coltivate su feeder di fibroblasti embrionali murini (MEF) inattivati con Mitomicina C (Sigma) in DMEM High Glucose con l'aggiunta di 15% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutamina, 50 μ g/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomina, 0,1 mM aminoacidi non essenziali (tutto Euroclone), 100 μ M β -mercaptoetanolo e 1 mM piruvato di sodio (entrambi Sigma). Durante la selezione dopo la trasfezione, le cellule staminali sono state coltivate in piastre con uno strato di 0,1% (w/v) gelatina (Bovine skin, type B; Sigma Chemical Co.) nel terreno descritto sopra con l'aggiunta di 1000 U/ml di LIF (Leukemia Inhibitory Factor – ESGRO).

La trasfezione è stata eseguita mediante FuGENE6TM (Roche) come descritto nei protocolli, utilizzando 1 μ g di DNA e 3 μ l di FuGENE6TM per cellule seminate in piastre con diametro di 60 mm.

Dopo 48 ore, le cellule staminali embrionali murine sono state selezionate in terreno completo con 100 μ g/ml di igromicina B (Roche) per 14 giorni.

I cloni sopravvissuti di cellule ES sono stati isolati come già descritto sopra, e riespansi. Giunte a confluenza, le cellule vengono lisate col sistema PBNB (vedi sopra).

➤ PCR

L'analisi degli isolati di cellule ES trasfettate con il costrutto β -loxTK^{rev}/p53rev sono state svolte mediante PCR con primer β casT1 e β casT2 esattamente come sopra e in parallelo abbiamo eseguito la PCR di controllo con i primer endogeni GDX1 e GDX2. In più per sicurezza, tali cellule sono state analizzate anche con primer β casT2 e β casT3, che si trovano entrambi su sequenze della β -caseina endogena, assenti nei vettori utilizzati per la trasfezione. In questo caso, si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1097 pb) e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4507 pb). In questo modo, a differenza della PCR con primer β casT1 e β casT2, si ha direttamente anche un controllo endogeno dell'amplificazione.

β casT2: CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

β casT3: TTGTTCCAGCTTGGAGACCC

Le analisi sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti su termociclatore GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) con il seguente ciclo:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x2 cicli
61°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x2 cicli
60°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x2 cicli
59°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x4 cicli
58°C	30 sec	
72°C	5 min	
95°C	30 sec	x25 cicli
57°C	30 sec	
72°C	5 min	
72°C	5 min	

➤ Western blot

Per quanto riguarda le cellule ES β -loxTK^{-rev}/p53^{rev}, esse sono state analizzate anche per l'espressione della proteina p53 mediante Western blot, come sopra.

Le cellule vengono bollite nella soluzione di lisi (1% SDS; 10% glicerolo; 10% β -mercaptoetanolo; 40 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,001% blu di bromofenolo) e tali lisati proteici vengono poi caricati su due gel di acrilammide al 10% (SDS-PAGE) in parallelo. Le proteine sono successivamente trasferite dal gel mediante "elettroblotting" su membrana PVDF. I filtri infine sono incubati uno con l'anticorpo anti- β actina, come controllo endogeno dell'avvenuto trasferimento delle proteine, mentre per l'altro abbiamo usato l'anticorpo anti-p53, specifico per la nostra analisi. La rilevazione del segnale viene eseguita mediante BM Chemiluminescence Western Blotting kit (Mouse/Rabbit) – Roche -.

3.2 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO siRNA

Il secondo tipo di selettore negativo che abbiamo pensato di utilizzare per la “positive-negative selection” è il siRNA (Short Interfering RNAs). A questo proposito, abbiamo allestito, come sopra, un vettore di ricombinazione per la β -caseina murina, comprendente, come selettore positivo fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272*, il gene di fusione HyTk, e all'esterno delle regioni di omologia per la β -caseina, una cassetta di espressione codificante siRNA in grado di catalizzare la degradazione del trascritto del gene HyTk o di interferire con il processo di traduzione dello stesso (β cas-HyTk/siRNA).

In parallelo, dopo aver allestito lo scheletro per i vettori di ricombinazione aventi come bersaglio la β -lattoglobulina bovina, abbiamo completato anche questo plasmide con il medesimo schema PNS, Hytk-selettore positivo e siRNA-selettore negativo (BLG-HyTk/siRNA).

3.2.1 Disegno degli oligonucleotidi

Le sequenze bersaglio S95 e S1050 all'interno del gene HyTk sono state scelte tramite i programmi “siRNA Target Finder” (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) e EMBOSS siRNA.

Tali sequenze sono state poi inserite nel programma “Insert Design Tool for the *pSilencer*TM Vectors” (http://www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html) e abbiamo così ottenuto la mappa del vettore *pSilencer* 1.0 – U6 per il clonaggio dei nostri siRNA.

Il filamento “forward” del siRNA è costituito dalla sequenza senso della regione bersaglio, da uno spaziatore di 9 nucleotidi (TTCAAGAGA), dalla sequenza antisense e da una coda di 5 o 6 timine. La lunghezza finale è di 55 nucleotidi. Al filamento “reverse” vengono aggiunti 4 nucleotidi non appaiati ad entrambe le estremità (AATT)/(GGCC) per ottenere i siti di restrizione *EcoRI* e *ApaI* per facilitare il clonaggio all'interno del vettore. La trascrizione di questa sequenza genera così una struttura a forcina in cui la regione senso e antisense della sequenza bersaglio si appaiano.

3.2.2 Allestimento del vettore di ricombinazione β cas-HyTk/siRNA

I due filamenti del siRNA “forward” e “reverse” sintetizzati (Sigma-Genosys) sono stati appaiati in Annealing Buffer (100 mM acetato di potassio; 30 mM HEPES-KOH, pH 7,4; 2 mM acetato di magnesio) a 90°C per 3 minuti e successivamente incubati a 37°C per 1 ora. I due inserti sono stati poi fosforilati tramite T4 PNK (T4 polinucleotide chinasi - USB) e legati al vettore *pSilencer* 1.0 – U6 digerito con enzimi *ApaI/EcoRI* (*pSilencer* 1.0 – U6 S95, *pSilencer* 1.0 – U6 S1050_18 e *pSilencer* 1.0 – U6 S1050_20, che presentava una delezione di un nucleotide a livello della sequenza antisense).

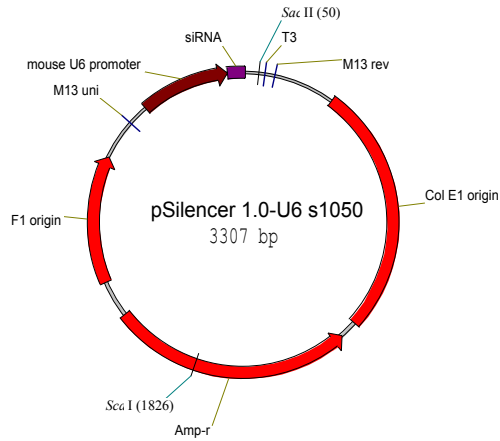


Fig. 3.5
siRNA clonati nel vettore *pSilencer* 1.0 – U6

Le prime prove sono state eseguite partendo dal costrutto β -loxTK^{rev} (vedi sopra), che presenta il gene di fusione HyTk all'interno della regione di omologia per la β -caseina murina e si è inserito come selettore negativo esterno la cassetta di espressione del *pSilencer* 1.0-U6 s1050_18 codificante siRNA in grado di silenziare l'HyTk, che da esperimenti preliminari eseguiti nel nostro laboratorio sembrava essere quello con attività di silenziamento più marcata (β cas-HyTk/siRNA).

3.2.3 Allestimento del vettore di ricombinazione BLG-HyTk/siRNA

Abbiamo successivamente allestito lo scheletro del vettore destinato alla ricombinazione omologa del gene della β -lattoglobulina (BLG) bovina, bersaglio di questa ricerca.

Le sequenze di omologia della BLG sono state ottenute tramite amplificazione del gene a partire dal DNA genomico bovino.

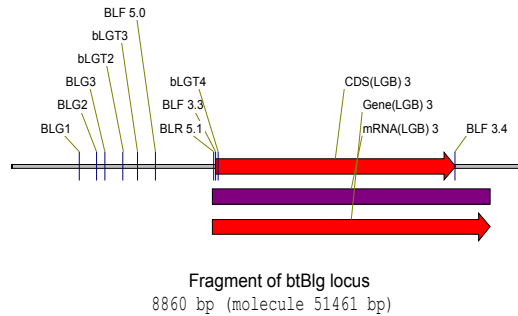


Fig. 3.6
Frammento del locus della β -lattoglobulina bovina

3.2.3.1 Regione 3'BLG

➤ PCR

Per quanto riguarda la porzione 3'BLG (4129 pb), abbiamo disegnato, sempre mediante programma VectorNTI, i primer

BLF 3.3: ATGAAGTGCCTCCTGCTTGCC

BLF 3.4: GGCTCACCTAGATGTGGCACTG

Per eseguire la reazione abbiamo preparato due miscele, di cui la seconda con la DNA polimerasi viene aggiunta a caldo (HotStart), per ridurre gli eventuali amplificati aspecifici. Come DNA polimerasi abbiamo utilizzato Expand Long Template PCR system (Roche), che serve per amplificare lunghi frammenti di DNA che devono essere clonati in vettori con alta fedeltà di sequenza.

Il ciclo utilizzato è il seguente, su termociclatore Hybaid PCR-Sprint:

95°C	2 min	
95°C	15 sec	x 35 cicli
57°C	30 sec	
68°C	5 min	
68°C	7 min	

La reazione di PCR viene controllata su gel d'agarosio allo 0,7%.

➤ Purificazione di DNA da gel (gene-clean)

La reazione di PCR, oltre a generare la banda attesa, dava una serie di amplificati aspecifici: per questo motivo, abbiamo isolato da gel d'agarosio solo la banda di nostro interesse.

L'intero volume di reazione di PCR viene caricato in un pozzetto di un gel d'agarosio allo 0,7%. In seguito a corsa elettroforetica, si procede all'individuazione della banda d'interesse su transilluminatore. Si ritaglia con il bisturi il frammento di gel contenente la nostra banda, trasferendolo poi in una provetta da 2 ml.

Fatto ciò, si pesa il frammento di gel sulla bilancia di precisione e si procede usando il kit Nucleospin Extract (Macherey-Nagel) secondo protocollo.

➤ Ligazione

L'amplificato 3'BLG (BLF 3.3+BLF 3.4) è stato clonato poi nel vettore pGEM-T Easy (Promega) secondo protocollo e abbiamo ottenuto il plasmide pGEM-T Easy/BLG3'rev.

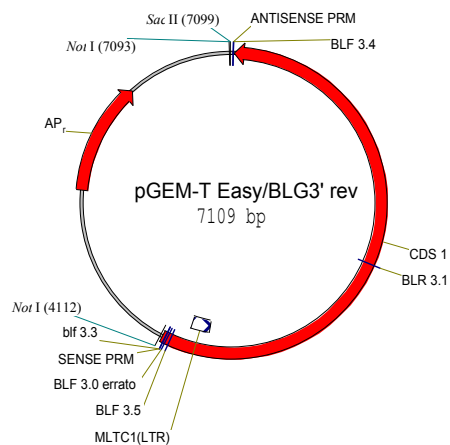


Fig. 3.7
Regione di omologia 3'BLG clonata nel vettore pGEM-T Easy

3.2.3.2 Regione 5'BLG

➤ PCR

Per quanto riguarda invece la regione 5'BLG (1023 pb), abbiamo usato i primer

BLF 5.0: TGTTCCCCTACCCAGTACGCC

BLR 5.1: CAGCTGGGGTCACGCTTCTGAG

Per eseguire la reazione abbiamo preparato nuovamente due miscele, di cui la seconda viene aggiunta a caldo (HotStart) con Taq DNA polimerasi (Promega).
 Il ciclo utilizzato è il seguente, su termociclatore Hybaid PCR-Sprint:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 35 cicli
58°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	

La reazione di PCR viene controllata su gel d'agarosio allo 0,7% e precipitata.

➤ Trattamento della reazione di PCR con Pfu

Il trattamento con Pfu DNA polimerasi (Promega) è necessario per sequenze genomiche che devono essere clonate in vettori con alta fedeltà di sequenza: si tratta infatti di una DNA polimerasi con attività di correzione (proofreading). In questo caso, non abbiamo potuto usare direttamente la miscela Expand High Fidelity della Roche per amplificare la regione 5'BLG, perché mostrava bassa efficienza di polimerizzazione. Quindi abbiamo trattato la reazione di PCR, eseguita con Taq DNA polimerasi Promega e precipitata, con la Pfu DNA polimerasi secondo protocollo, incubandola a 37°C per 30 minuti.

➤ Ligazione

Il frammento di PCR della regione 5'BLG, trattato con Pfu DNA polimerasi, è stato clonato nel vettore pBlueScript (pBS), che contiene la resistenza all'ampicillina e il gene lacZ che permette lo "screening" colorimetrico bianco/blu, mediante l'enzima T4 DNA ligasi (USB).

Il pBS è stato digerito con l'enzima *HincII*, che genera estremità piatte, e successivamente abbiamo eseguito una restrizione-ligazione, cercando di tenere aperto con *HincII* il vettore, al fine di ottenere il costrutto pBS*HincII*/BLG5'rev:

PBS <i>HincII</i>	1 µl
PCR	4,4 µl
Buffer OnePhorAll 10x	1 µl
DTT 1 mM	1 µl
ATP 1 mM	1 µl
BSA 20x	0,5 µl
<i>HincII</i> (50U/µl)	0,1 µl
T4 DNA ligasi (5U/µl)	1 µl
<hr/>	
V _f	10 µl

La reazione è stata eseguita su termociclatore con il seguente ciclo:

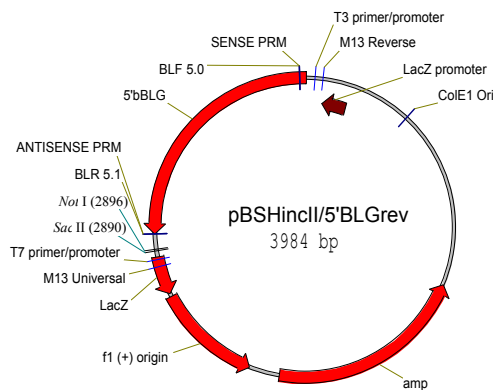
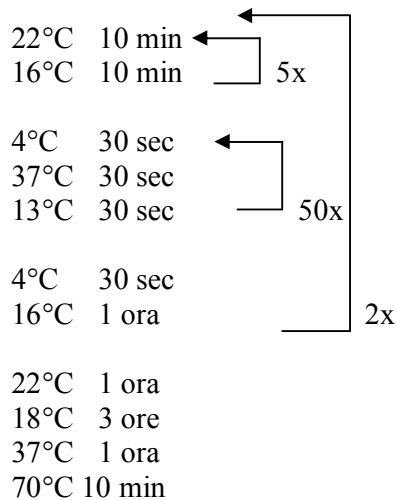


Fig. 3.8
Regione di omologia 5'BLG clonata nel vettore pBS

➤ Trasformazione di cellule di *E. coli* competenti (DH5 α) e identificazione di colonie positive

Entrambe le reazioni di ligazione (3'BLG + pGEM-T Easy e 5'BLG + pBS) vengono poi utilizzate per trasformare cellule di *E. coli* chemiocompetenti, cioè che permettono l'incorporazione di plasmidi, mediante shock termico. Le cellule trasformate vengono piastrate a varie diluizioni su LB-agar (terreno LB con 15 g/l di polvere di agar) addizionato con 50 μ g/ml ampicillina. Le piastre vengono incubate per circa 16 ore a 37°C.

Il giorno successivo le colonie batteriche cresciute vengono inoculate in 3 ml di terreno LB addizionato con ampicillina e incubate per circa 16 ore a 37°C in incubatore a secco in agitazione. Si effettua poi un'estrazione di DNA plasmidico (miniprep).

Una volta estratto il plasmide da ogni inoculo allestito, si procede all'analisi mediante enzimi di restrizione. Gli enzimi da utilizzare vengono scelti studiando le mappe di restrizione dei nostri costrutti mediante programma Vector NTI.

Le restrizioni vengono poi controllate mediante elettroforesi su gel d'agarosio.

Identificati i cloni positivi, si allestiscono stock al glicerolo in Cryo-vial (Nalgene) conservati a -80°C .

3.2.3.3 Plasmide pBS βLG 5'-3'

Successivamente abbiamo legato con enzima T4 DNA ligasi il plasmide pBS*HincII*/5' βLG rev digerito *SacII* / *NotI* e purificato con il vettore pGEM-T Easy/ βLG 3'rev digerito anch'esso *SacII* / *NotI* ed estratto da gel d'agarosio. Abbiamo così ottenuto il costrutto pBS βLG 5'-3'.

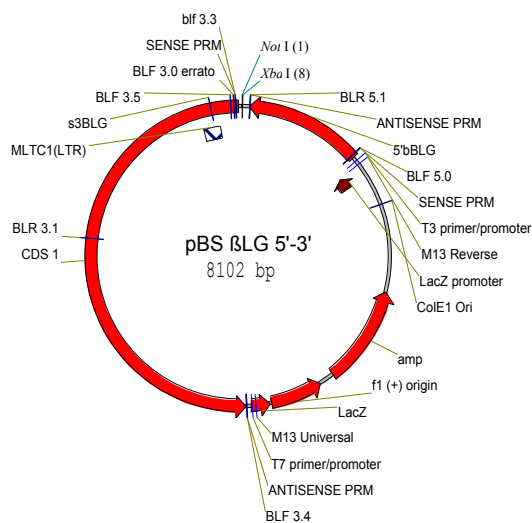


Fig. 3.9
Plasmide derivante dalla ligazione delle regioni di omologia 3' βLG e 5' βLG

3.2.3.4 Plasmide pBSXba2272

Per l'allestimento di questo costrutto, siamo partiti dal plasmide pB2272 fornitoci dal prof. Kolb, che contiene un sito di policlonaggio fiancheggiato da un sito *loxP* e da un segnale *lox* mutato (*lox2272*).

Su questo plasmide abbiamo disegnato due primer che amplificassero tale sito di policlonaggio, compresi i segnali *lox*, e in modo da creare alle estremità del frammento amplificato due siti di riconoscimento per l'enzima di restrizione *XbaI*.

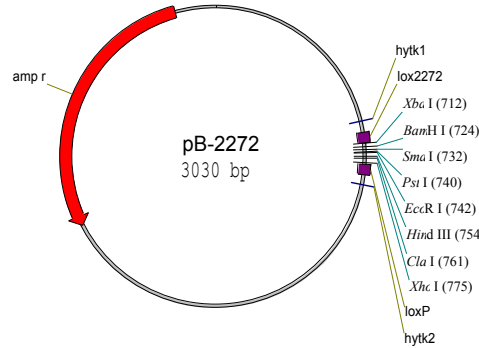


Fig. 3.10
Plasmide pB-2272 fornitoci dal prof. Kolb

Prima di eseguire la PCR, abbiamo eliminato il sito *XbaI* dal vettore pB2272.

Per questo motivo, abbiamo digerito il plasmide con *XbaI* e l'abbiamo trattato con il frammento Klenow (USB), prodotto proteolitico della DNA polimerasi I di *E. coli* che mantiene attività polimerasica 3' → 5', presenta bassa attività esonucleasica 3' → 5' e ha perso l'attività esonucleasica 5' → 3'.

Il plasmide così trattato è stato purificato mediante fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitato.

A questo punto abbiamo ligato nuovamente il plasmide e trasformato con esso cellule competenti di *E. coli* per ottenere il nuovo costrutto pB2272 delecto *XbaI* (pB2272del*XbaI*).

I primer utilizzati per la reazione di PCR sul plasmide pB2272del*XbaI* sono:

hytk1: TATCTAGAATAGGGCGAATTGGAGCTC

hytk2: ATTCTAGAAGCTCGGAATTAACCCTC

La reazione è stata eseguita usando come DNA polimerasi termostabile Expand High Fidelity (Roche) con il seguente ciclo:

94°C	2 min	
94°C	15 sec	x2 cicli
64°C	30 sec	
68°C	1 min	
94°C	15 sec	x2 cicli
63°C	30 sec	
68°C	1 min	
94°C	15 sec	x2 cicli
62°C	30 sec	
68°C	1 min	
94°C	15 sec	x4 cicli
61°C	30 sec	
68°C	1 min	
94°C	15 sec	x25 cicli
60°C	30 sec	
68°C	1 min+5 sec/ciclo	
72°C	5 min	

La reazione di PCR (pB2272-PCR di 225 pb) è stata poi purificata mediante kit Wizard DNA Clean-up (Promega), digerita con enzima di restrizione *Xba*I, nuovamente purificata con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitata.

In parallelo abbiamo digerito con *Xba*I il vettore pBlueScript, purificato mediante fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitato.

A questo punto vettore (pBS // *Xba*I) e inserto (pB2272-PCR // *Xba*I) sono stati legati grazie all'enzima T4 DNA ligasi, per ottenere il costrutto pBS*Xba*2272.

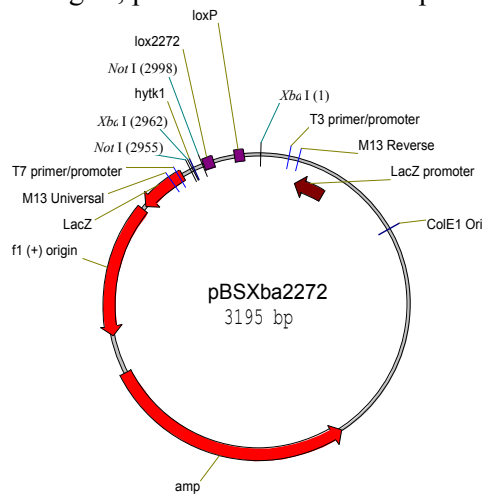


Fig. 3.11

Costrutto derivato dal clonaggio della PCR, eseguita con primer hytk1+hytk2 sul plasmide pB2272 di Kolb, nel vettore pBS

3.2.3.5 Plasmide pBS β LG 5'-3'/2272

Abbiamo infine legato il vettore pBS β LG 5'-3' digerito *Xba*I // *Not*I purificato con il plasmide pBS*Xba*2272 digerito anch'esso *Xba*I // *Not*I ed estratto da gel d'agarosio, con l'enzima T4 DNA ligasi.

Abbiamo così ottenuto lo scheletro del nostro vettore di ricombinazione finale pBS β LG 5'-3'/2272, con un sito di policonnessione fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272*, posizionato tra le due regioni di omologia della β -lattoglobulina bovina (BLG5' e BLG3').

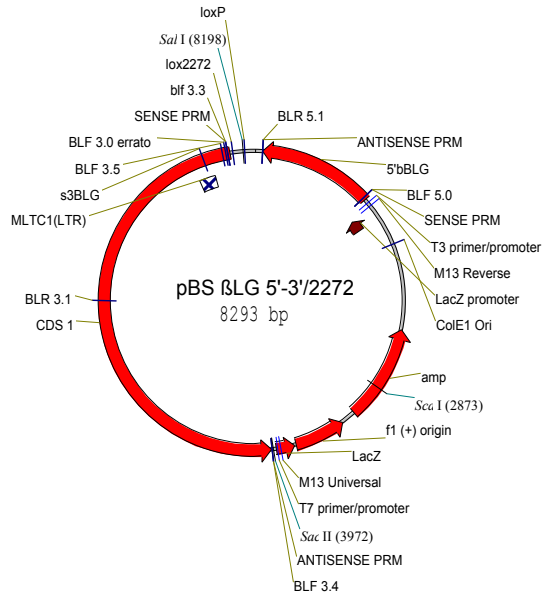


Fig. 3.12

Scheletro plasmidico dei vettori di ricombinazione aventi come bersaglio il locus della β -lattoglobulina bovina

3.2.3.6 Inserimento del selettore negativo siRNA e del selettore positivo HyTk

Il selettore esterno *pSilencer* 1.0-U6 s1050_18 è stato clonato *ScaI* // *SacII* in pBS β LG 5'-3'/2272 (pBS β LG 5'-3'/2272/siRNA).

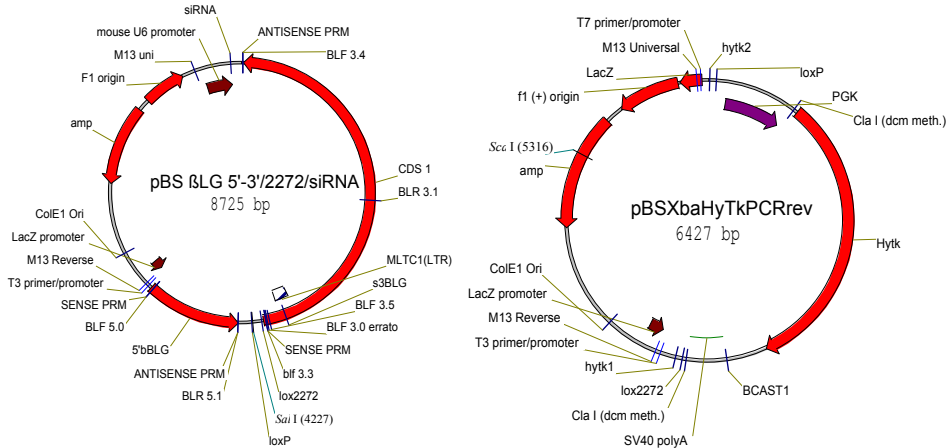


Fig. 3.13

Plasmidi utilizzati nella reazione di scambio mediante Cre ricombinasi in vitro, per inserire il gene di fusione HyTk all'interno dei *lox* del vettore di sinistra

Infine il gene di fusione HyTk (selettore positivo) è stato inserito tra i due *lox* mediante una reazione di scambio mediata dalla ricombinasi Cre in vitro (BioLabs): a questo proposito, abbiamo digerito pBS β LG 5'-3'/2272/siRNA con *SaI* (enzima che linearizza nel sito di policlonaggio tra i *lox*) e pBSXbaHyTkPCRrev (pBS con HyTk fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272*, sintetizzato come pBSXba2272 sopra, solo amplificando un plasmide che all'interno dei *lox*, al posto del sito di policlonaggio, presentava il gene HyTk) con *ScaI* (che linearizza all'esterno dei siti *lox*). Con questi due plasmidi abbiamo eseguito lo scambio Cre-mediato:

pBS β LG 5'-3'/2272/siRNA // <i>SaI</i>	200 ng
pBSXbaHyTkPCRrev // <i>ScaI</i>	200 ng
buffer 10x	2,5 μ l
Cre recombinase (1U/ μ l)	5 μ l
H ₂ O	a vol.
<hr/>	
V _f	25 μ l

Abbiamo successivamente defosforilato il tutto con fosfatasi SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase – USB), purificato la reazione e con essa trasformato cellule competenti di *E. coli*.

Abbiamo così ottenuto il vettore di ricombinazione BLG-HyTk/siRNA, avente come bersaglio la β -lattoglobulina bovina.

3.2.4 Colture cellulari e trasfezioni

Per quanto riguarda il costrutto β cas-HyTk/siRNA con regioni di omologia per la β -caseina murina, è stato sperimentato in cellule embrionali staminali murine (cellule ES). Queste cellule vengono coltivate su feeder di fibroblasti embrionali murini (MEF) inattivati con Mitomicina C (Sigma) in DMEM High Glucose con l'aggiunta di 15% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutammina, 50 μ g/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomicina, 0,1 mM aminoacidi non essenziali (tutto Euroclone), 100 μ M β -mercaptoetanolo e 1 mM piruvato di sodio (entrambi Sigma). Durante la selezione dopo la trasfezione, le cellule staminali sono state coltivate in piastre con uno strato di 0,1% (w/v) gelatina (Bovine skin, type B; Sigma Chemical Co.) nel terreno descritto sopra con l'aggiunta di 1000 U/ml di LIF (Leukemia Inhibitory Factor – ESGRO).

I plasmidi β cas-HyTk/siRNA e β cas-HyTk (identico a β cas-HyTk/siRNA, ma privo di selettore negativo) sono stati purificati mediante un kit commerciale (Plasmid Minikit; Qiagen), linearizzati rispettivamente con l'enzima di restrizione *ScaI* e *MluI*, lavati con un volume di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitati.

La trasfezione è stata eseguita mediante FuGENE6TM (Roche) come descritto nei protocolli, utilizzando 1 μ g di DNA e 3 μ l di FuGENE6TM per cellule seminate in piastre con diametro di 60 mm.

Dopo 48 ore, le cellule staminali embrionali murine sono state selezionate in terreno completo con 100 μ g/ml di igromicina B (Roche) e in parallelo con 300 μ g/ml di G418 (Calbiochem) per 14 giorni.

I cloni sopravvissuti di cellule ES sono stati isolati come già descritto sopra, e riespansi.

Il costrutto BLG-HyTk/siRNA invece è stato trasfettato in fibroblasti bovini (sia adulti che fetali): essi vengono coltivati in terreno DMEM/199 1:1 con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutammina, 50 μ g/ml gentamicina, 0,1 U/ml penicillina/streptomicina e 2,5 μ g/ml anfotericina B (tutto Euroclone).

Il vettore di ricombinazione BLG-HyTk/siRNA è stato purificato con Plasmid Minikit (Qiagen) come descritto nei protocolli, linearizzato con l'enzima di restrizione *ScaI*, lavato con un volume di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico e precipitato.

I fibroblasti bovini sono stati trasfettati con Effectene (Qiagen), che dava una resa più alta con questo tipo di cellule rispetto al FuGENE6TM. Abbiamo utilizzato 3 μ g di DNA e 30 μ l di Effectene per cellule seminate in piastre da 100 mm di diametro.

Dopo 48 ore, i fibroblasti bovini sono stati selezionati in terreno completo con 300 μ g/ml di igromicina B per 14 giorni.

Per isolare i cloni sopravvissuti di fibroblasti, essendo molto più delicati rispetto ai cloni di cellule ES, abbiamo usato dischi di carta sterili di 5 mm di diametro (Cloning Discs, Sigma-Aldrich). Dopo aver individuato e segnato i cloni al microscopio, si lava la piastra con PBS e si posizionano i dischetti imbevuti di tripsina. Dopo circa 5-6 minuti, si recuperano i dischetti con una pinza sterile, controllando l'avvenuto distacco delle cellule, e si trasferiscono in piastre da 24 pozzetti con terreno privo di selezione. Se le colonie sono molto grandi, si cerca di recuperare le cellule rimanenti con un altro dischetto, osservandole al microscopio. Il giorno successivo, si tolgono i dischetti e si ricomincia con la selezione delle cellule fino al 14° giorno.

In entrambi i casi per le analisi di PCR, si è effettuata una lisi cellulare seguendo un protocollo denominato HotSHOT (Hot Sodium Hydroxide and Tris), che, a differenza del sistema con PBNB, risulta più rapido e non utilizza proteinasi K. Esso consiste in una lisi alcalina (25 mM NaOH; 0,2 mM EDTA) per 30 minuti a 95°C. Le cellule vengono poi raffreddate a 4°C per 10 minuti e infine si aggiunge la soluzione di neutralizzazione (40 mM Tris-HCl).

3.2.5 Analisi

3.2.5.1 Cellule ES trasfettate col costrutto β cas-HyTk/siRNA

➤ PCR

I lisati dei cloni cellulari isolati sono stati analizzati mediante PCR.

Nel caso delle cellule staminali embrionali murine, i primer utilizzati sono β -casT1 e β -casT2, come per le HC11 sopra e con lo stesso ciclo

β casT1: GAGCCTTGGGACTGTGAATCTAA

β casT2: CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

I cloni sono stati analizzati anche tramite i primer β -casT2 e β -casT3, che si trovano entrambi su sequenze della β -caseina endogena assenti nel vettore utilizzato per la trasfezione. In questo caso si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1097 pb) e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4507 pb).

β casT2: CCATAAACTTCTCCAGGGACTTG

β casT3: TTGTTCCAGCTTGGAGACCC

Le analisi sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti su termociclatore GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) con il ciclo già riportato sopra.

➤ Colorazione con Giemsa e conta del numero di cloni

Per quanto riguarda le prove per la valutazione dell'efficacia del siRNA, i cloni di cellule ES murine che dovevano essere contati, sono stati fissati in metanolo per 15 minuti e poi colorati con Giemsa. I cloni sono stati successivamente contati con il programma Kodak 1D.

3.2.5.2 Fibroblasti bovini trasfettati col costrutto BLG-HyTk/siRNA

➤ PCR

Per analizzare i lisati di fibroblasti bovini abbiamo cercato inizialmente di mettere a punto una PCR con primer β casT1 e bLGT2 su un plasmide controllo BLG targeting control

β casT1: GAGCCTTGGGACTGTGAATCTAA

bLGT2: AAGGACACCGGACATAAGATTAGC

Il primo primer si appaia ad una regione del selettore positivo HyTk (vedi sopra), mentre il secondo lega una regione della β -lattoglobulina bovina non compresa nel vettore di ricombinazione.

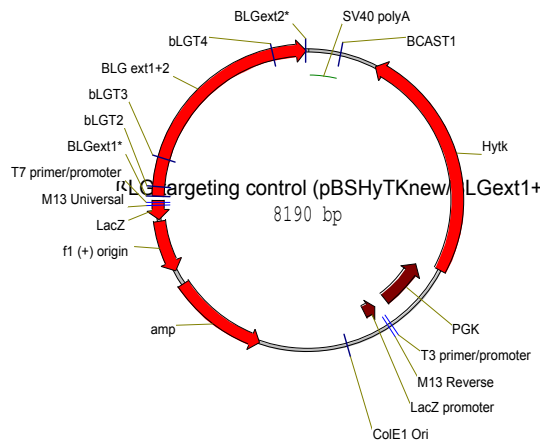


Fig. 3.14

Plasmide controllo per la reazione di PCR con primer β casT1 + bLGT2

Tuttavia, essendo una PCR piuttosto difficoltosa a causa probabilmente dei primer, abbiamo deciso di analizzare i lisati di fibroblasti bovini mediante primer BLGT3 e BLGT4, entrambi disegnati su sequenze della β -lattoglobulina bovina, di cui il primo si appaia ad una regione compresa nel vettore di ricombinazione, mentre il secondo si trova all'esterno. In questo caso si ottengono due prodotti di lunghezza diversa su allele/i di cloni wild-type (1395 pb), fornendo così automaticamente anche un controllo endogeno dell'amplificazione, e allele di cloni che hanno subito l'evento di ricombinazione omologa (4897 pb).

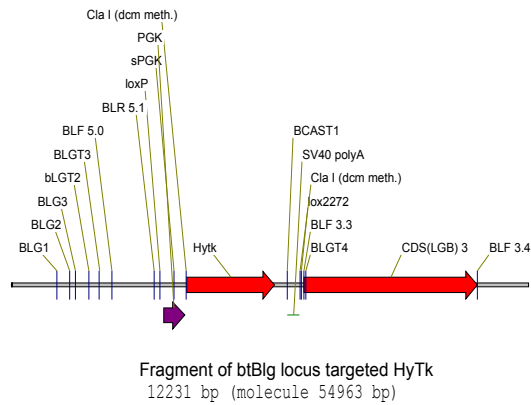


Fig. 3.15

Ipotetico locus della β -lattoglobulina bovina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa con il costrutto BLG-HyTk/siRNA

BLGT3 CAGATCAGGGCAAGGACCGAAG

BLGT4 TCTGGGTGACAATGAGGGCCTG

Per avere un controllo positivo della reazione di PCR è stato realizzato un costrutto (BLGext control) che comprende entrambe le regioni di appaiamento dei due primer e che dia un amplificato di dimensioni simili (5216 pb), ma non uguali a quelle che si ottengono in caso di avvenuto “gene-targeting”, in modo che sia possibile distinguere un'eventuale contaminazione plasmidica.

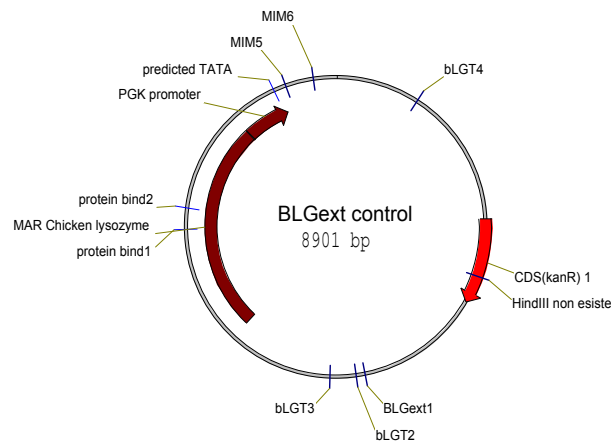


Fig. 3.16

Plasmide controllo per la reazione di PCR con primer BLGT3 e BLGT4

L'amplificazione si è ottenuta con una miscela di Taq DNA polimerasi e GoTaq Green MasterMix (entrambe Promega), che contiene già nucleotidi e magnesio e un colorante/addensante, che permette il caricamento diretto della reazione su gel d'agarosio per l'elettroforesi di controllo.

Le analisi sono state eseguite in piastre da 96 pozzetti su termociclatore GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) con il seguente ciclo:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 35 cicli
66°C	30 sec	
72°C	6 min	
59°C	5 min	
95°C	30 sec	x 10 cicli
66°C	30 sec	
72°C	6 min	
72°C	7 min	

Esempio di reazione per PCR BLGT3+BLGT4:

DNA lisato	1 µl
GoTaq Green MasterMix 2x	10,5 µl
Taq DNA polimerasi (5 U/µl)	0,2 µl
Primer BLGT3+BLGT4 (25 µM ciascuno)	0,8 µl
H ₂ O	8,5 µl
	<hr/>
V _f	21 µl

3.3 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO GFP

3.3.1 CMV-GFP

3.3.1.1 Sintesi del costrutto e trasfezione in HC11

Come sopra, il costrutto di partenza da noi utilizzato è il pBK- β cas-2272-hytk-P-tk fornitoci dal prof. Andreas Kolb, che presenta il gene di fusione HyTk (che conferisce resistenza all'igromicina e sensibilità al gancyclovir) all'interno della regione di omologia per la β -caseina murina e un ulteriore TK come selettore negativo all'esterno di tale cassetta. Dopo aver eliminato il TK esterno e alcuni siti di restrizione, si è inserito come selettore esterno una cassetta d'espressione per la GFP (Green Fluorescent Protein) (β -loxTK⁻rev/GFP^{rev}).

L'eliminazione del TK esterno (β -loxTK⁻ e β -loxTK⁻rev) è stata realizzata ligando tra loro i frammenti pBK- β cas-2272-hytk-P-tk // *Bss*HIII+*Mlu*I e pBK- β cas-2272-hytk-P-tk // *Mlu*I. Il marcatore per la selezione negativa è stato ottenuto digerendo enzimaticamente il plasmide pBSCGFPns con *Bss*HIII. Quest'ultimo poi è stato rilegato al vettore β -loxTK⁻rev // *Mlu*I, ottenendo così il costrutto finale β -loxTK⁻rev/GFP^{rev}.

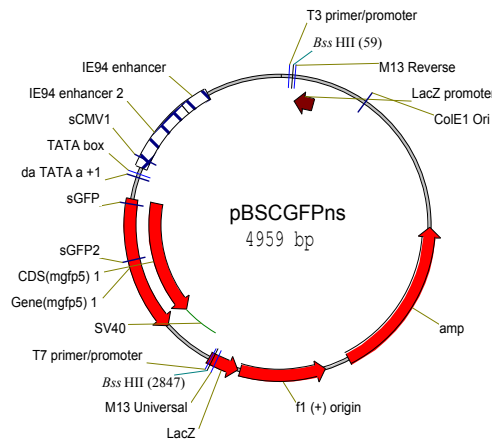


Fig. 3.17

Plasmide da cui è stata estratta la cassetta di selezione negativa GFP.

Il vettore di ricombinazione β -loxTK⁻rev/GFP^{rev} è stato poi estratto con Plasmid Mini Kit (Qiagen) secondo protocollo, linearizzato mediante l'enzima *Sfi*I, purificato con fenolo/cloroformio e precipitato con etanolo.

Il DNA così preparato è stato utilizzato per l'allestimento delle trasfezioni in HC11 come nel paragrafo 3.1.3. In seguito a trasfezione, quando i cloni in selezione sono ben identificabili ed ancora ben separati tra loro, si posiziona una griglia numerata sul fondo della piastra e si procede alla localizzazione di tutti i cloni presenti. Successivamente si identificano i cloni che si presentano fluorescenti al microscopio con filtri per l'epifluorescenza, per escluderli dalla procedura d'isolamento: infatti in questo caso le cellule fluorescenti, non avendo perso il selettore negativo GFP, sono andate sicuramente incontro ad un processo di ricombinazione casuale e non hanno subito l'evento di "gene-targeting". I cloni non fluorescenti isolati sono stati lisati col metodo PBNB, controllati mediante PCR con primer GDX1 e GDX2 e analizzati con primer β casT1 e β casT2 esattamente come sopra.

3.3.1.2 *Analisi mediante FACS*

Per eseguire questa analisi abbiamo scongelato un isolato di HC11 β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} fluorescente, uno non fluorescente e uno con fluorescenza dubbia. Li abbiamo coltivati in RPMI completo fino al raggiungimento della confluenza in fiasche da 25 cm². A questo punto le tre fiasche assieme ad un controllo negativo di HC11 wild-type e ad un controllo positivo di HC11 “verdi”, trasfettate in precedenza con il plasmide pBSGFP3, sono state spedite per l’analisi citofluorimetrica presso

Istituto di Medicina Molecolare A. Nocivelli
Clinica Pediatrica
Dipartimento Materno Infantile
Spedali Civili di Brescia

Per eseguire l’analisi tramite FACS, le cellule sono state tripsinizzate, centrifugate a 1200 rpm per 5 minuti e lavate con 10 ml di PBS. Il lavaggio è stato eseguito 2 volte. Il pellet di cellule infine viene risospeso in 300 μ l di PBS e le cellule sono analizzate mediante il citofluorimetro FACScan -3 colori- (Necton Dickinson) supportato dal programma CellQuest, per valutare la fluorescenza.

3.3.1.3 *Analisi mediante Southern blot*

Per assicurarci che l’integrazione della GFP fosse avvenuta, a causa della bassa rilevazione del segnale, abbiamo eseguito un Southern blot. Per l’analisi abbiamo espanso due cloni isolati di HC11 trasfettate β -loxTK^{rev}/GFP^{rev} identificati come “fluorescenti” (H9 e F8) e due identificati come “non fluorescenti” (G3 e E5).

La tecnica del Southern blot serve per localizzare sequenze specifiche all’interno del DNA genomico mediante sonde marcate.

Il DNA genomico è stato digerito con enzimi di restrizione, scelti in base alla sonda utilizzata, e i frammenti risultanti sono stati separati tramite elettroforesi su gel d’agarosio. Abbiamo utilizzato un trasferimento di tipo alcalino su una membrana di nylon (HybondTM-N, Amersham LIFE SCIENCE), usando NaOH 0,4 M: la soda modifica il pH e allenta i legami idrogeno presenti nella molecola di DNA. Le posizioni relative dei frammenti di DNA sono conservate durante il trasferimento sulla membrana. Il DNA legato irreversibilmente alla membrana carica positivamente, viene poi ibridato con una sonda marcata con digossigenina che localizza la posizione della banda complementare alla sonda stessa. Dopo l’ibridazione, le sonde marcate sono riconosciute da un anticorpo anti-digossigenina legato alla fosfatasi alcalina (AP), la quale defosforila il substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche), che emette luce e impressiona così la lastra fotografica.

I vantaggi dell’utilizzo di sonde non radioattive sono diversi: sono più sicure, possono essere conservate più a lungo e riutilizzate più volte.

➤ Estrazione di DNA genomico da cellule

Le HC11 giunte a confluenza nelle fiasche da 25 cm² vengono lavate e tripsinizzate. Successivamente si aggiunge RPMI completo per neutralizzare la tripsina e si centrifugano a 1000 rpm per 5 minuti.

Al pellet di cellule si aggiungono poi 500 µl di soluzione di lisi – Laird Parker buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 5 mM EDTA; 0,2% SDS; 200 mM NaCl) con 150 µg/ml di proteinasi K. Le cellule vengono incubate per una notte in questa soluzione a 55°C. Il giorno successivo, se la lisi è avvenuta in modo completo, si procede alla purificazione con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (25:24:1) e precipitazione con isopropanolo. Il DNA viene poi risospeso in 100 µl di TE.

➤ Digestione del DNA genomico con *SalI*

La scelta dell'enzima dipende dalla sonda utilizzata: serve infatti un enzima che dia un frammento di dimensione nota.

Nel nostro caso abbiamo scelto *SalI* che genera un frammento di 3153 pb.

La sonda GFP, che si ibrida alla sequenza codificante, era stata precedentemente allestita nel nostro laboratorio mediante PCR e nucleotidi marcati con digossigenina, precipitata, risospesa in TE e diluita nella soluzione di preibridazione nella misura di 10-20 ng/ml.

I DNA digeriti *SalI* sono poi caricati su gel d'agarosio allo 0,7%, utilizzando come marcatore di peso molecolare 1 µl di DNA del fago λ digerito *HindIII* con 2 µl dello stesso marcato con digossigenina.

Il DNA separato tramite elettroforesi su gel d'agarosio, viene fotografato e successivamente si esegue il "blotting" sulla membrana di nylon mediante trasferimento alcalino, che richiede circa sei ore.

➤ Preibridazione e ibridazione

Al termine del trasferimento alcalino, la membrana viene incubata a 42°C in agitazione per circa 1 ora nella soluzione di preibridazione (High SDS concentration hybridization buffer: 7% SDS; 50% formamide; 5x SSC; 2% Blocking Reagent; 50 mM sodio-fosfato, pH 7; 0,1% N-lauroylsarcosine) precedentemente sciolta a 58°C: questo passaggio serve per ridurre i legami aspecifici della sonda alla membrana.

Successivamente, tolta la soluzione di preibridazione, si aggiunge la sonda, precedentemente denaturata per 10 minuti a 68°C, e si incuba così la membrana a 42°C in agitazione per una notte.

Lavaggi e rilevazione del segnale (detection)

Terminata la fase d'ibridazione, si recupera la sonda e si procede con i lavaggi e con la rilevazione del segnale secondo il manuale "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" (Roche).

Si prosegue poi con l'esposizione della membrana alla lastra fotografica in una cassetta di sviluppo (tutto Amersham).

Infine si sviluppa la lastra per 5 minuti in "developer buffer", la si sciacqua in acqua e la si fissa per 10 minuti in "fixer buffer" (tutto Kodak).

3.3.2 pCX-EGFP

In questo secondo vettore di ricombinazione, partendo sempre dallo scheletro pBS β LG 5'-3'/2272, abbiamo scelto di inserire tra i siti *lox* come selettore positivo in parallelo la resistenza alla neomicina su un plasmide e il gene HyTk su un altro, e all'esterno delle regioni di omologia per la β -lattoglobulina come selettore negativo una nuova cassetta di espressione codificante la GFP (pCX-EGFP) con cDNA della EGFP sotto il controllo del promotore della β -actina di pollo, l'"enhancer" del CMV, l'introne della β -actina e il segnale di poliadenilazione della β -globina bovina.

3.3.2.1 Sintesi dei costrutti

Il selettore esterno per la GFP è stato clonato *ScaI* // *HindIII* trattato con il frammento Klenow in pBS β LG 5'-3'/2272 digerito *ScaI* // *SacII* trattato con la T4 DNA polimerasi, enzima che presenta attività polimerasica e potente attività esonucleasica 3' \rightarrow 5' (pBS β LG 5'-3'/2272/pCXEGFP).

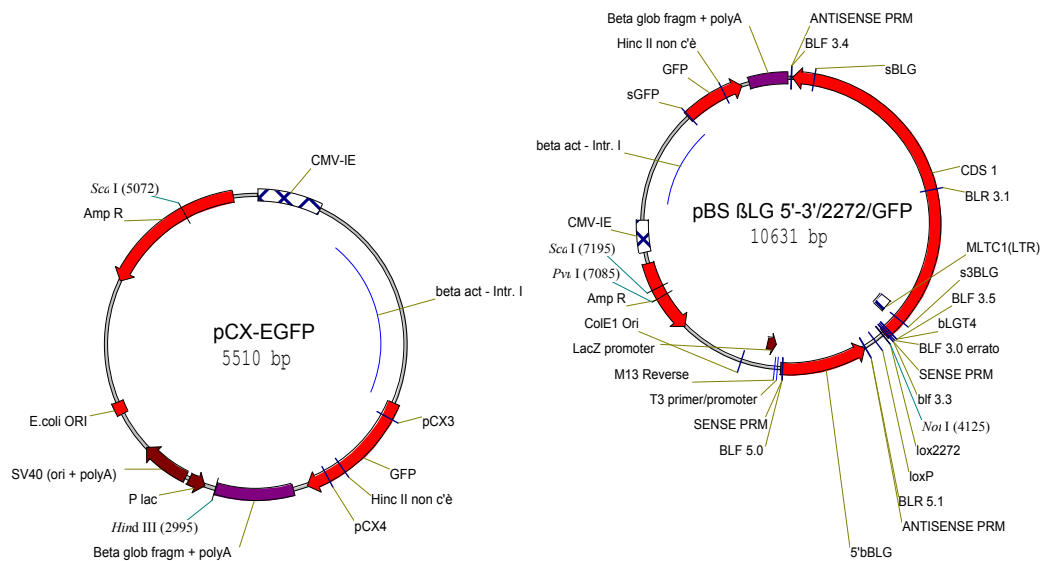


Fig. 3.18

A sinistra: plasmide contenente la nuova cassetta di espressione per la GFP

A destra: cassetta di espressione codificante la GFP inserita come selettore negativo nel vettore di ricombinazione per la BLG.

In parallelo abbiamo allestito due plasmidi inserendo la resistenza alla neomicina (PGKneo) e il gene di fusione HyTk nel pBS β LG 5'-3'/2272 tra i due *lox* mediante uno scambio Cre-mediato (BLGlox-neo e BLGlox-HyTk): in particolare modo abbiamo eseguito uno scambio tra β LG 5'-3'/2272 linearizzato *Sal*I e il plasmide pB2272/PGKneo digerito *Sac*I nel primo caso e tra β LG 5'-3'/2272 // *Sal*I e pBS*Xba*HyTkPCRrev // *Sca*I nel secondo caso (i vettori pB2272/PGKneo e pBS*Xba*HyTkPCRrev erano stati precedentemente allestiti nel nostro laboratorio).

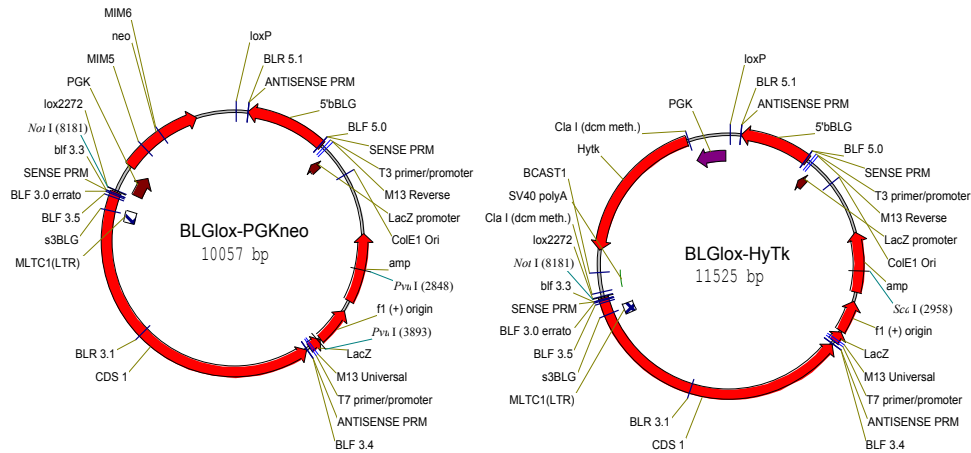


Fig. 3.19

Plasmidi utilizzati per l'inserimento dei selettori positivi PGKneo e HyTk all'interno del vettore di ricombinazione pBS β LG 5'-3'/2272/pCXEGFP

Infine abbiamo legato pBS β LG 5'-3'/2272/pCXEGFP con BLGlox-HyTk *Sca*I/*Not*I (BLG-HyTk/pCXEGFP) e con BLGlox-neo *Pvu*I/*Not*I (BLG-neo/pCXEGFP).

3.3.2.2 *Colture cellulari e trasfezioni*

I fibroblasti bovini sono stati coltivati come già detto sopra in terreno DMEM/199 1:1 con l'aggiunta di 10% siero fetale bovino inattivato, 2 mM L-glutamina, 50 µg/ml gentamicina e 0,1 U/ml penicillina/streptomina. Abbiamo ommesso in questi esperimenti l'antimicotico, in quanto ci siamo accorti che la crescita clonale di questo tipo cellulare veniva inibita in presenza di anfotericina.

I costrutti BLG-neo/pCXEGFP e BLG-HyTk/pCXEGFP sono stati purificati mediante un kit commerciale (NucleoBond AX 500, Macherey-Nagel), linearizzati rispettivamente con *XhoI* e *ScaI*, lavati con un volume di fenolo/cloroformio/alcol isoamilico, precipitati e trasfettati nei fibroblasti bovini in parallelo con Effectene (Qiagen) o con il sistema Nucleofector™ (Amaxa biosystems).

Nel caso di trasfezione con Effectene, il giorno precedente la trasfezione, circa $8 \cdot 10^5$ fibroblasti vengono seminati in una piastra da 100 mm di diametro. La trasfezione si esegue secondo protocollo con 2 µg di DNA e 100 µl di Effectene. Il giorno successivo alla trasfezione, i fibroblasti vengono suddivisi in 10 piastre da 150 mm di diametro per garantire cloni ben isolati tra loro.

Per quanto riguarda la trasfezione con il sistema Nucleofector™, abbiamo trasfettato circa 10^6 cellule con 3 µg di DNA. Le cellule sono state risospese in 100 µl di Basic Nucleofector™ Solution e ad esse abbiamo aggiunto il DNA. La miscela è stata posta in una cuvette Amaxa e la trasfezione è stata eseguita mediante il programma V-24 (messo a punto con una trasfezione transiente con il costrutto GFP fornito nel kit, che dava una resa dell'80% di cellule verdi e una mortalità del 40% dopo 6 ore dalla trasfezione). Le cellule poi sono state diluite nel loro terreno di coltura completo e seminate in una piastra da 150 mm di diametro. Il giorno successivo, esse sono state divise in 15 piastre da 150 mm di diametro.

Dopo 48 ore dalla trasfezione, i fibroblasti sono stati selezionati per 10 giorni rispettivamente in terreno completo con 300 µg/ml di igromicina B nel caso di cellule trasfettate con il costrutto BLG-HyTk/pCXEGFP e con 500 µg/ml di G418 per quelle trasfettate col plasmide BLG-neo/pCXEGFP. Dopo circa 10 giorni, i cloni sopravvissuti vengono identificati e controllati al microscopio con filtri per l'epifluorescenza per escludere dalla procedura d'isolamento quelli che risultano fluorescenti: infatti, come abbiamo già spiegato sopra, le cellule fluorescenti, non avendo perso il selettore negativo GFP, sono andate sicuramente incontro ad un processo di ricombinazione casuale e non hanno subito l'evento di "gene-targeting".

I cloni di fibroblasti vengono isolati mediante l'utilizzo di dischetti di carta imbevuti di tripsina e successivamente trasferiti in piastre da 24 pozzetti per colture cellulari (Corning) ed espansi. Al raggiungimento della confluenza, abbiamo diviso a metà il contenuto dei vari pozzetti in 2 piastre da 24. Abbiamo fatto espandere nuovamente le cellule e alla fine una piastra è stata utilizzata per l'estrazione del DNA, mentre l'altra è stata congelata a -80°C .

3.3.2.3 *Analisi dei cloni isolati*

➤ PCR

Il DNA è stato estratto incubando i pellet dei vari fibroblasti bovini isolati nel tampone Laird-Parker (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,2% SDS; 200 mM NaCl) con l'aggiunta di 300 µg/ml di Proteinasi K a 55°C per 16 ore. I lisati cellulari sono stati poi lavati con 1 vol. di fenolo-cloroformio-alcol isoamilico. I DNA sono stati successivamente precipitati mediante 1 vol. di isopropanolo ed infine lavati con 70% etanolo, asciugati e risospesi in 20 µl del tampone TE.

I DNA delle cellule trasfettate con il vettore BLG-HyTk/pCXEGFP sono stati analizzati mediante PCR eseguita con i primer BLGT3 e BLGT4: il primo si appaia a una sequenza della β-lattoglobulina endogena situata sul genoma bovino più all'esterno delle regioni di omologia contenute nei costrutti da noi allestiti, e quindi assente nei vettori utilizzati per la trasfezione, e il secondo si appaia invece ad una sequenza contenuta nella regione 3' della β-lattoglobulina compresa nei costrutti. In questo caso si ottengono due prodotti di lunghezza diversa sull'allele che ha subito l'evento di ricombinazione omologa col vettore di ricombinazione (4897 pb) e l'allele/gli alleli wild-type (1395 pb).

BLGT3 CAGATCAGGGCAAGGACCGAAG

BLGT4 TCTGGGTGACAATGAGGGCCTG

Il ciclo utilizzato su termociclatore GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) è lo stesso già descritto sopra.

Per quanto riguarda invece fibroblasti trasfettati con il vettore di ricombinazione BLG-neo/pCXEGFP, oltre ai primer BLGT3 e BLGT4 che generano sull'allele wild-type una banda di 1395 pb e sull'allele HR una banda di 3429 pb, abbiamo disegnato altri 2 primer “annidati” che si appaiano alla sequenza neo^R e che generano un'ulteriore banda solo nel caso di avvenuto evento di ricombinazione omologa (1838 pb per BLGT3+BLGT4+NEO1 o 2100 pb per BLGT3+BLGT4+NEO2).

NEO1 ATGGAAGGATTGGAGCTACGGG

NEO2 AGGACATAGCGTTGGCTACCCG

Il ciclo utilizzato è lo stesso descritto sopra per i primer BLGT3 e BLGT4.

➤ Southern blot

I DNA dei vari cloni di fibroblasti bovini trasfettati coi costrutti BLG-HyTk/pCXEGFP e BLG-neo/pCXEGFP sono stati digeriti mediante l'enzima di restrizione *EcoRI*, sottoposti a corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,7% e trasferiti su membrana di nylon. Tale membrana è stata successivamente ibridata con la sonda BLG 1+3 new (470 pb) marcata con digossigenina. Il segnale è stato rilevato mediante anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina e substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche).

La sonda è stata preparata mediante PCR su DNA bovino con primer BLG1 e BLG3, situati sulla β -lattoglobulina bovina più all'esterno della regione 5' compresa nel nostro vettore di ricombinazione, e desossinucleotidi marcati con digossigenina.

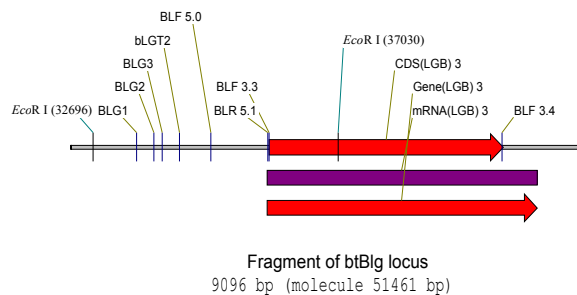


Fig. 3.20

Locus parziale della β -lattoglobulina bovina

La reazione di PCR è stata poi precipitata e diluita nella soluzione di preibridazione.

BLG1: TTGCTTCTGCACTTACAGGCC

BLG3: TGTCAGATGCGAGAGGCTGTGC

La PCR è stata realizzata su termociclatore Hybaid PCR-Sprint col seguente ciclo:

95°C 5 min

95°C 40 sec		x 35 cicli
60°C 30 sec		
72°C 45 sec		

72°C 5 min

Nel caso di allele wild-type, la digestione con *EcoRI* dei DNA dei fibroblasti trasfettati e la successiva ibridazione con sonda BLG1+BLG3 determina la visualizzazione di una banda di 4334 pb.

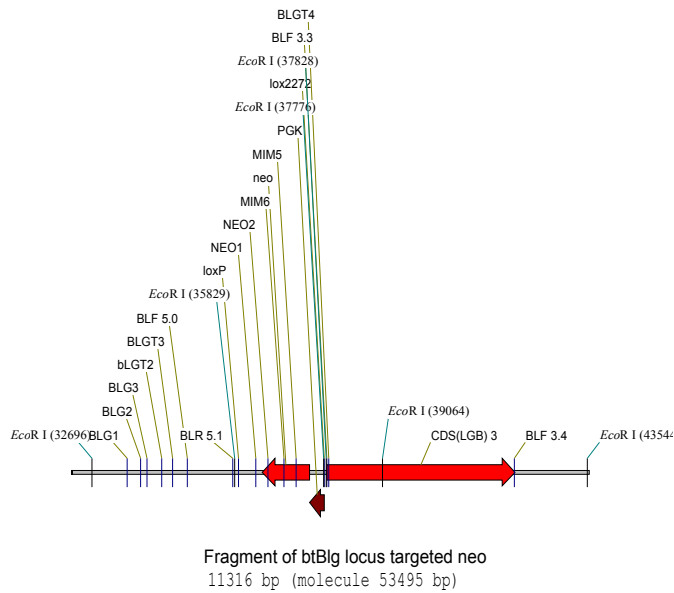


Fig. 3.21

Ipotetico locus della β lattoglobulina bovina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa con il costrutto BLG-neo/pCXEGFP

Nel caso invece di ricombinazione omologa con il plasmide BLG-HyTk/pCXEGFP o BLG-neo/pCXEGFP, l'allele digerito *EcoRI* e ibridato con sonda BLG1+BLG3 genera una banda di 3133 pb.

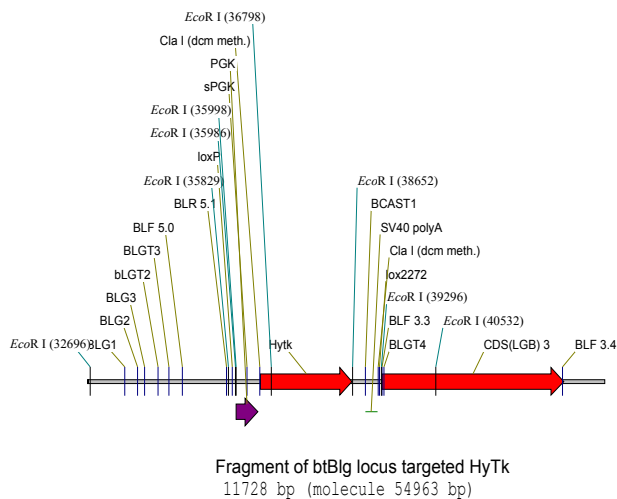


Fig. 3.22

Ipotetico locus della β lattoglobulina bovina andato incontro all'evento di ricombinazione omologa con il costrutto BLG-HyTk /pCXEGFP

3.4 ANALISI RMCE (RECOMBINASE-MEDIATED CASSETTE EXCHANGE)

Come ultimo lavoro, abbiamo voluto valutare l'efficienza di RMCE da parte della ricombinasi Cre, che, riconoscendo i siti *lox* eterospecifici (*loxP* e *lox2272*), determina lo scambio della cassetta di DNA posizionata sul cromosoma con una cassetta presente su un plasmide (entrambe fiancheggiate dai medesimi siti di riconoscimento).

3.4.1 RMCE in HC11

Per valutare l'efficienza di scambio di cassette mediato dalla ricombinasi Cre (RMCE), un isolato espanso di HC11 precedentemente trasfettate col costrutto β -*loxTK*^{rev}/*GFP*^{prev} e risultante fluorescente (F8) è stato sottoposto a cotrasfezione dei plasmidi pPGKCre e pB-2272-luc-PGKneo (precedentemente fornitoci da Kolb) (1 μ g ciascuno) con 3 μ l di FuGENE (Roche), secondo il protocollo. In questo modo ci aspettiamo che, sebbene il plasmide β -*loxTK*^{rev}/*GFP*^{prev} si sia integrato casualmente nelle HC11 precedentemente trasfettate, sia possibile comunque effettuare uno scambio di cassette di selezione comprese tra i *lox* (HyTk scambiato con luc-PGKneo) ad opera della ricombinasi Cre.

Il pool di HC11 è stato successivamente espanso, si è estratto il DNA con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico, precipitato con isopropanolo e digerito con l'enzima di restrizione *Pst*I. Su tale DNA tagliato abbiamo eseguito il Southern blot mediante la sonda LUC1+2 (468 pb) marcata con digossigenina, preparata con PCR sul plasmide pB-2272-luc-PGKneo con primer LUC1 e LUC2. La rilevazione del segnale è stata eseguita con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina e substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche).

LUC1 CGCGGAATACTTCGAAATGTCC

LUC2 GCCACACCCTTAGGTAACCCAG

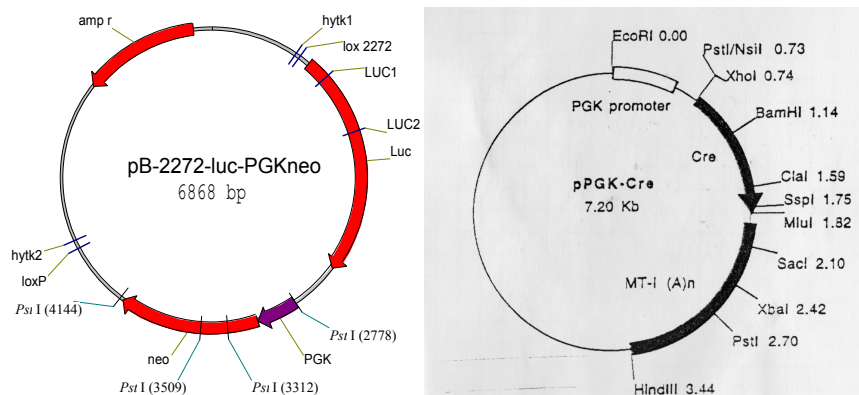


Fig. 3.23

Plasmidi cotrasfettati per RMCE su clone di HC11 trasfettate β -*loxTK*^{rev}/*GFP*^{prev}
Il plasmide di sinistra è stato usato anche per la messa a punto della sonda LUC1+2

La PCR per l'allestimento della sonda è stata realizzata su termociclatore Hybaid PCR-Sprint col seguente ciclo:

95°C	2 min	
95°C	30 sec	x 35 cicli
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	

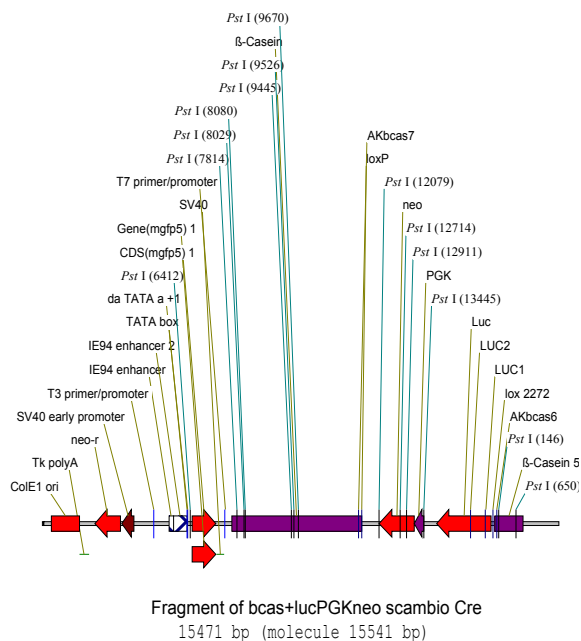


Fig. 3.24
Ricostruzione dell'avvenuto scambio di cassette (RMCE)

In caso di realizzazione dello scambio di cassette, la digestione del DNA con l'enzima *PstI* e successiva ibridazione con la sonda LUC1+2 genera una banda di 2242 pb; mentre nel caso d'integrazione casuale del plasmide pB-2272-luc-PGKneo nel genoma murino, si ha una banda di 5502 pb.

3.4.2 RMCE in fibroblasti bovini

Abbiamo cercato di valutare l'efficienza di RMCE anche in fibroblasti bovini. Per questo motivo, un isolato espanso di cellule precedentemente trasfettate col costrutto BLG-HyTk/siRNA è stato sottoposto a cotrasfezione dei plasmidi pTurboCre e pB2272/pCXEGFP-PGKneo (precedentemente allestito nel nostro laboratorio) (1 µg ciascuno) con 10 µl di Effectene (Qiagen), secondo il protocollo. In questo modo ci aspettiamo che, sebbene il plasmide BLG-HyTk/siRNA si sia integrato casualmente nei fibroblasti precedentemente trasfettati, sia possibile comunque effettuare uno scambio di cassette di selezione comprese tra i *lox* (HyTk scambiato con pCXEGFP-PGKneo) ad opera della ricombinasi Cre.

Il pool di fibroblasti è stato successivamente espanso, si è estratto il DNA con fenolo-cloroformio-alcol isoamilico, precipitato con isopropanolo e digerito con l'enzima di restrizione *Xba*I. Su tale DNA tagliato abbiamo eseguito il Southern blot mediante la sonda pCX 3+4 (522 pb) marcata con digossigenina, preparata con PCR sul plasmide pB2272/pCXEGFP-PGKneo con primer pCX3 e pCX4. La rilevazione del segnale è stata eseguita con anticorpo anti-digossigenina coniugato con fosfatasi alcalina e substrato chemiluminescente CDP-Star (Roche).

pCX3: TGGAGAGGGTGAAGGTGATGC

pCX4: TGTGTGGACAGGTAATGGTTG

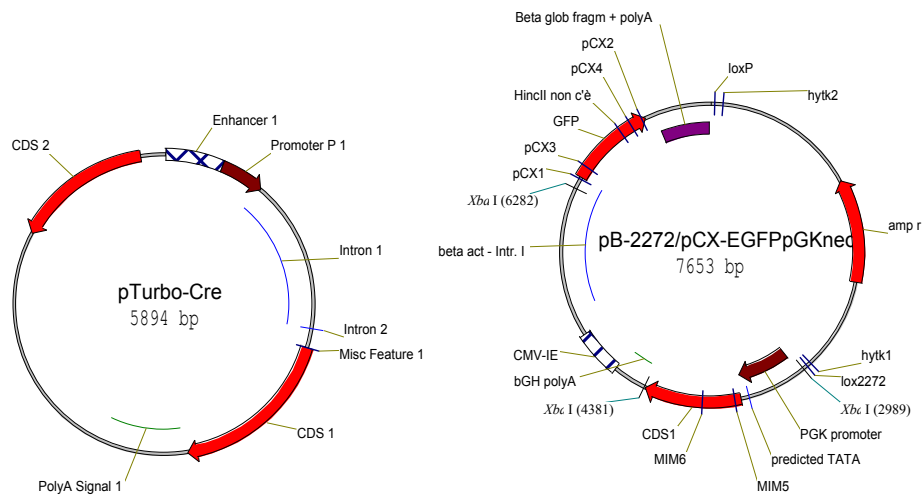


Fig. 3.25

Plasmidi cotrasfettati per RMCE su clone di fibroblasti trasfettati BLG-HyTk/siRNA
Il plasmide di destra è stato usato anche per la messa a punto della sonda pCX3+pCX4

La PCR è stata realizzata su termociclatore Hybaid PCR-Sprint col seguente ciclo:

94°C	2 min	
94°C	30 sec	x 40 cicli
60°C	30 sec	
72°C	40 sec	
72°C	5 min	

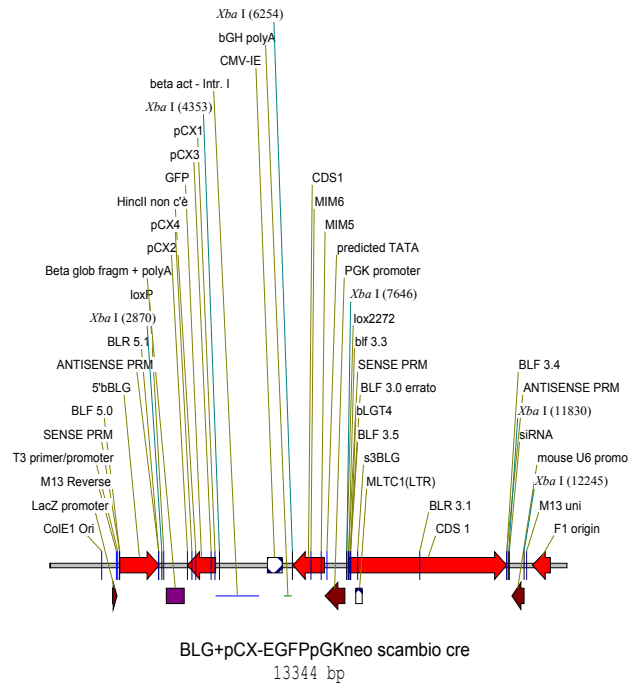


Fig. 3.26
Ricostruzione dell'avvenuto scambio di cassette (RMCE)

In caso di realizzazione dello scambio di cassette, la digestione del DNA con l'enzima *XbaI* e successiva ibridazione con la sonda pCX3+4 genera una banda di 1483 pb; mentre nel caso d'integrazione casuale del plasmide pB2272/pCXEGFP-PGKneo nel genoma bovino, si ha una banda di 4360 pb.

Risultati e discussione

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 VETTORE DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO p53

4.1.1 Sintesi del costrutto

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

Il plasmide allestito per le prove di “gene-targeting” (β -loxTK⁻rev/p53rev) presenta come selettore positivo il gene di fusione HyTk compreso tra un sito *loxP* e un sito *lox* mutato (*lox2272*), e come bersaglio la β -caseina murina da testare in HC11, cellule epiteliali immortalizzate di ghiandola mammaria di topo, e in cellule embrionali staminali murine.

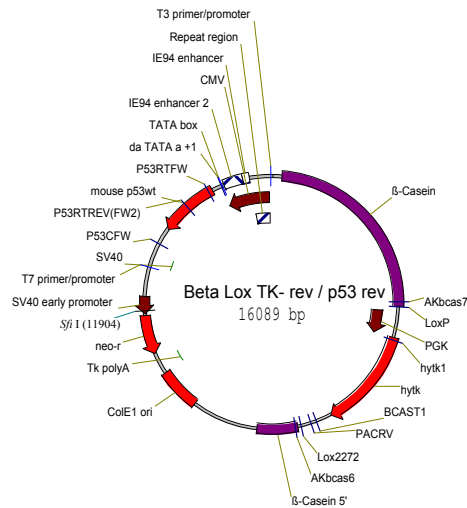


Fig. 4.1

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

4.1.2 Trasfezione in HC11

➤ Valutazione dell'efficienza di HR in HC11 mediante PCR

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

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

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

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

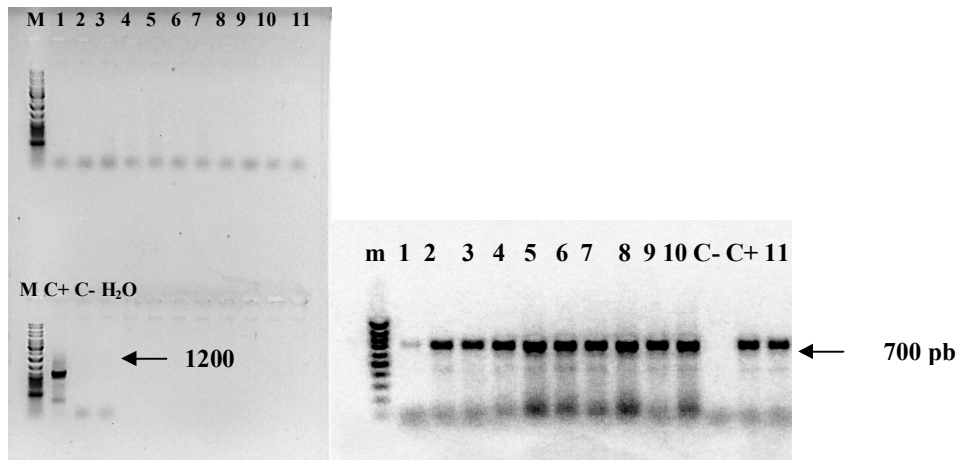


Fig. 4.2

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

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

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

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

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

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

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

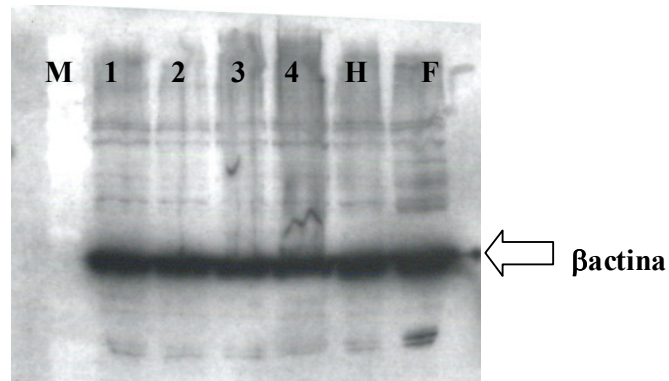


Fig. 4.3

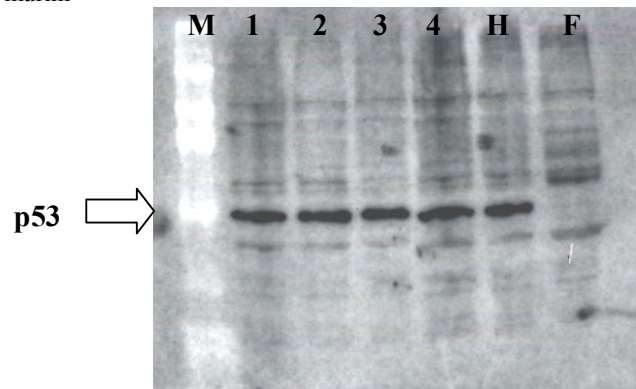
Western blot eseguito con anticorpo anti- β -actina come controllo endogeno sopra, e con anticorpo anti-p53 sotto.

M = marcatore di peso molecolare

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

H = lisati di HC11 wild-type

F = lisati di fibroblasti embrionali murini



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

4.1.3 Trasfezione in cellule ES murine

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

➤ PCR

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

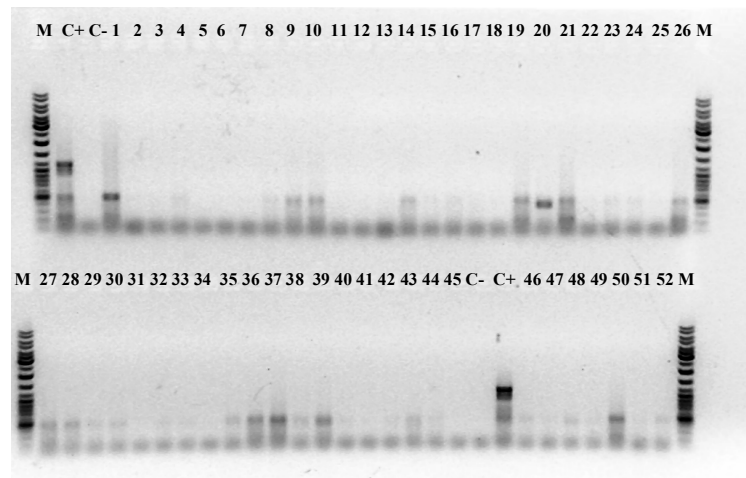


Fig. 4.4

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

C+ = plasmide controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

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

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

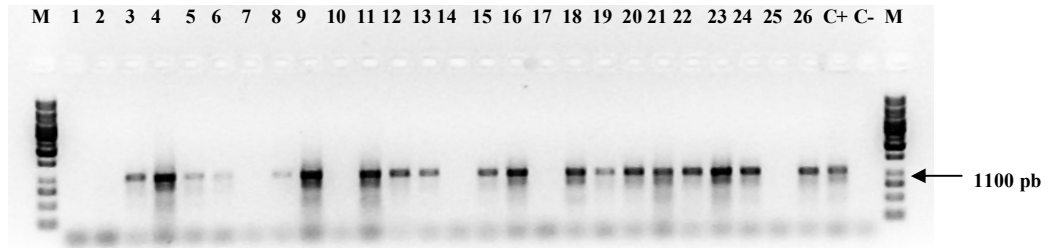


Fig. 4.5

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

C+ = DNA bovino controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

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

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

Fig. 4.6

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

➤ Western blot

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

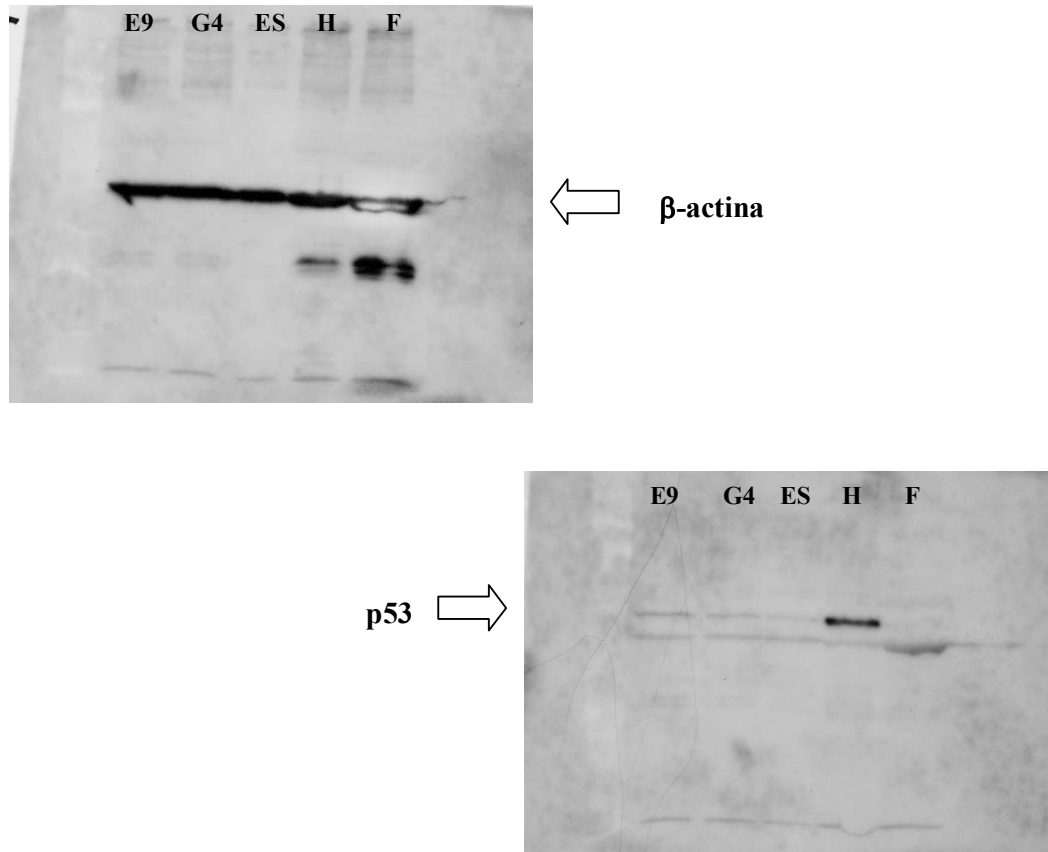


Fig. 4.7

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

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

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

ES = cellule ES wild-type

H = HC11 wild-type

F = fibroblasti embrionali murini

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

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

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

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

4.2 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO siRNA

4.2.1 Sintesi dei costrutti

➤ Disegno degli oligonucleotidi

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

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

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

Inserto S95 forward (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENSO

GAATCTCGTGCTTTCAGCTTTC AAGAGAAAGCTGAAAGCACGAGATTCTTTTTT

Inserto S95 reverse (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENSO

AATTA AAAA AAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCTCTTGAAAGCTGAAAGCACGAGATTCTGGCC

Inserto S1050 forward (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENSO

AAGCCACGGAAGTCCGCCTTTC AAGAGAAAGGCGGACTTCCGTGGCTTTTTTTT

Inserto S1050 reverse (5'→3')

SEQ. SENSO LOOP SEQ. ANTISENSO

AATTA AAAA AAAAGCCACGGAAGTCCGCCTTCTCTTGAAAGGCGGACTTCCGTGGCTTGGCC

➤ Vettori β cas-HyTk/siRNA e BLG-HyTk/siRNA

Per testare i siRNA come selettori negativi, abbiamo trasfettato in parallelo cellule ES e fibroblasti bovini, date le iniziali difficoltà nella coltura di questi ultimi.

I vettori finali di ricombinazione utilizzati per le trasfezioni, rispettivamente di cellule staminali embrionali murine e di fibroblasti bovini, sono β cas-HyTk/siRNA e BLG-HyTk/siRNA linearizzati *ScaI*: il primo presenta la regione di omologia per la β -caseina murina e il secondo quella per la β -lattoglobulina bovina. Entrambi i plasmidi hanno come selettore positivo il gene di fusione HyTk, fiancheggiato dai siti *loxP* e *lox2272*, e come selettore negativo la cassetta di espressione del *pSilencer 1.0-U6 s1050_18* codificante siRNA in grado di silenziare l'HyTk, che da esperimenti preliminari eseguiti nel nostro laboratorio sembrava essere quello con attività di silenziamento più marcata.

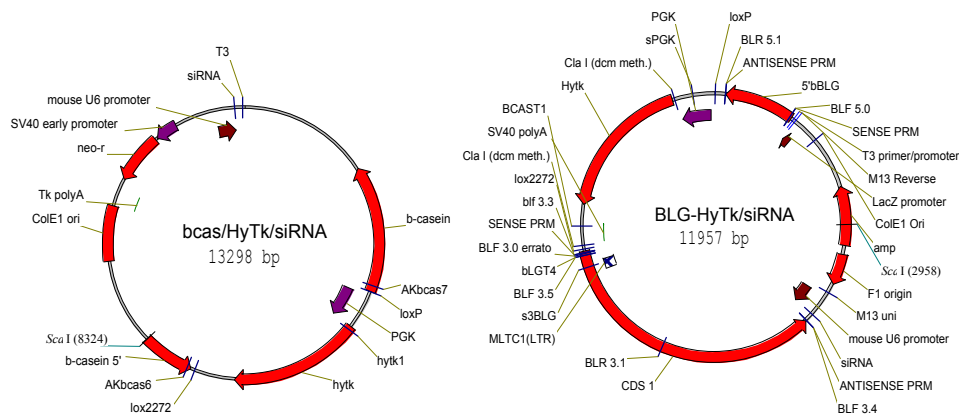


Fig. 4.8

Vettori di ricombinazione aventi come bersaglio la β -caseina murina a sinistra e la β -lattoglobulina bovina a destra, come selettore negativo una cassetta di espressione per “short interfering RNA” e come selettore positivo tra i siti *lox* il gene di fusione HyTk.

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

➤ Valutazione dell'evento di ricombinazione omologa mediante PCR

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

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

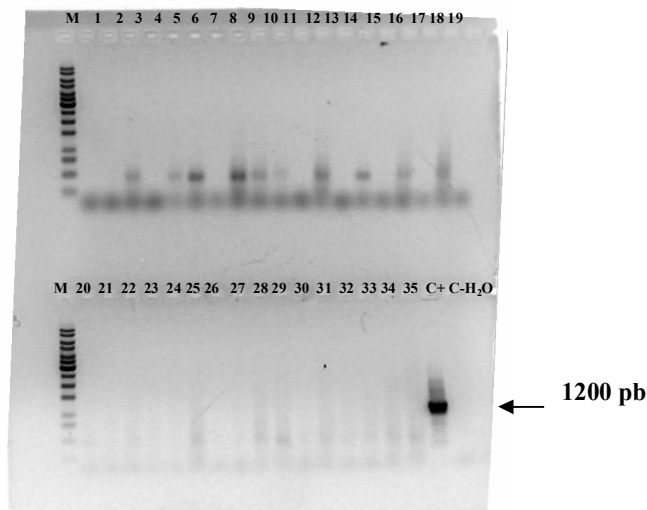


Fig. 4.9

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

M = marcatore di peso molecolare 1 Kb

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

C+ = plasmide controllo positivo

C- e H₂O = controlli negativi

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

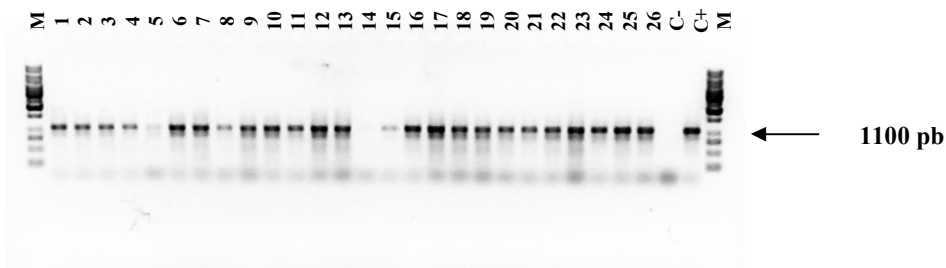


Fig. 4.10

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

M = marcatore di peso molecolare 1 Kb

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

C+ = controllo positivo DNA murino

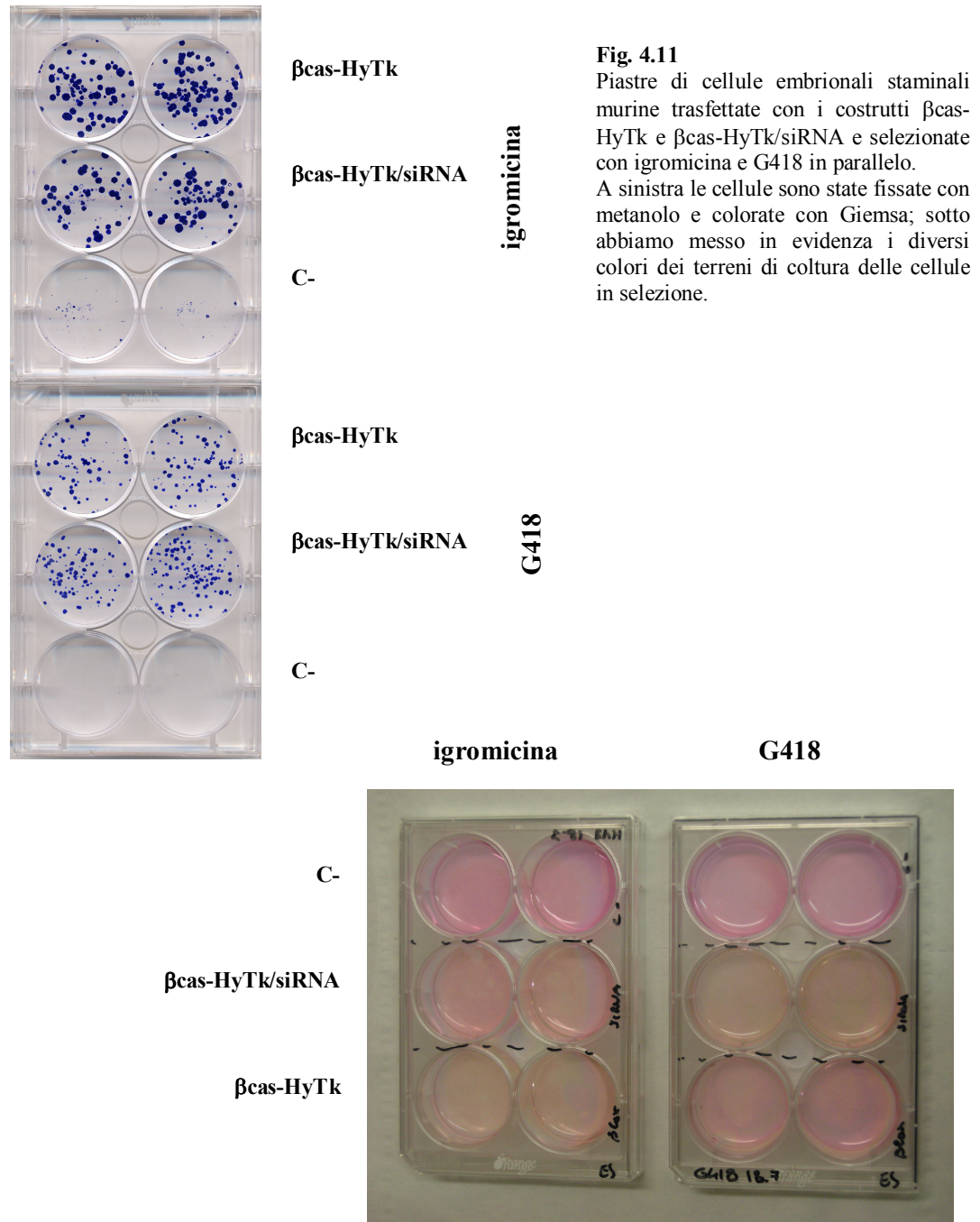
C- = controllo negativo H₂O

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

➤ Valutazione del selettore negativo esterno siRNA

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

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



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

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

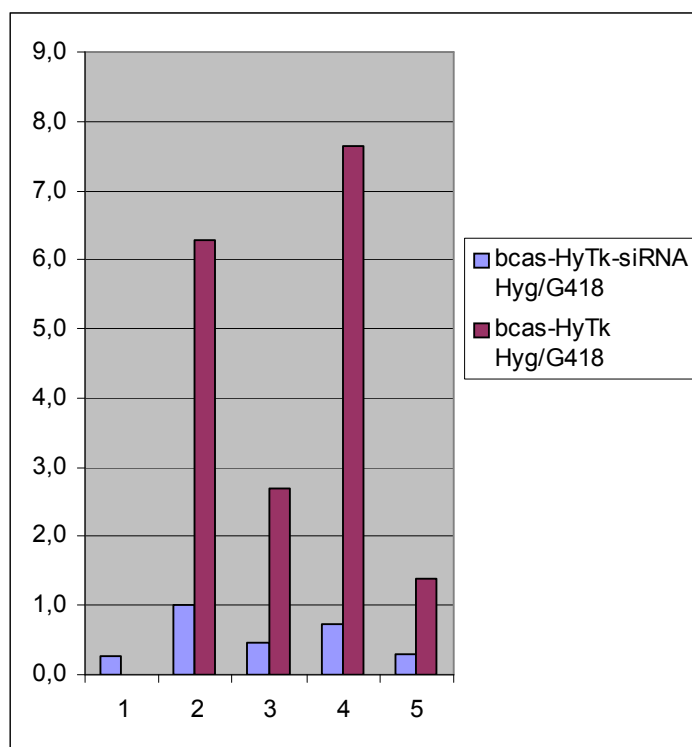


Fig. 4.12

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

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

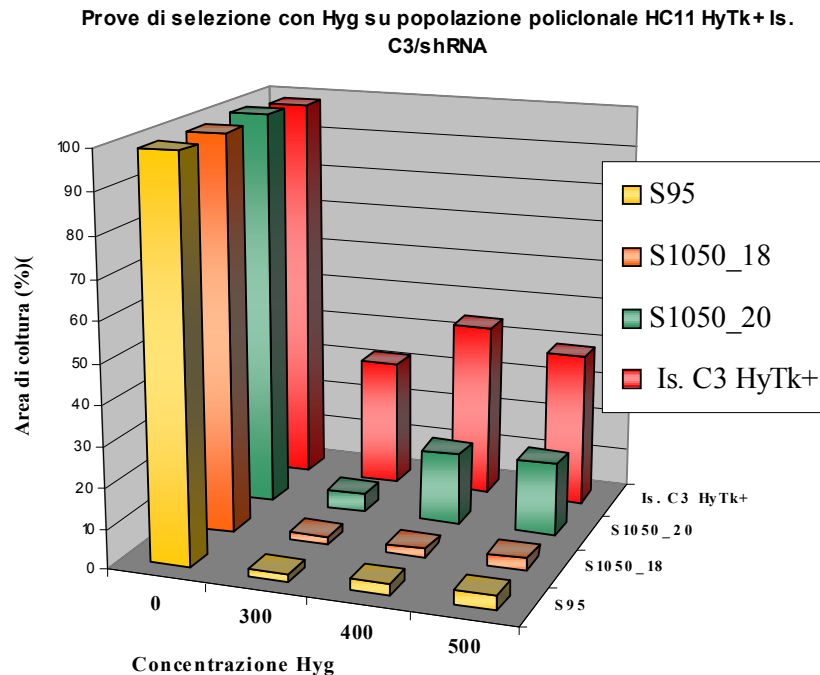


Fig. 4.13

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

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

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

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

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

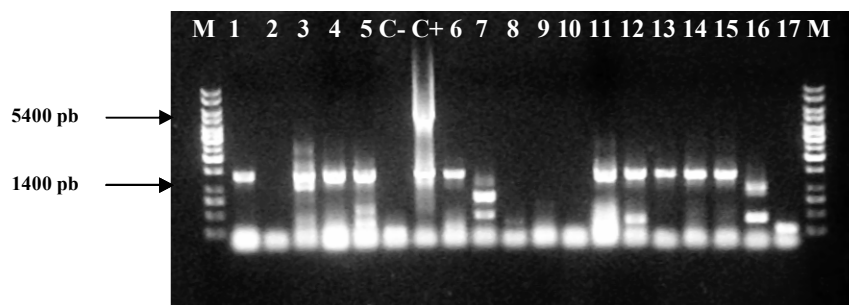


Fig. 4.14

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

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

C- = controllo negativo H₂O

Abbiamo analizzato 56 cloni, di cui nessun ricombinante omologo.

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

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

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

Fig. 4.15

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

4.3 VETTORI DI RICOMBINAZIONE CON SELETTORE NEGATIVO GFP

4.3.1 CMV-GFP

4.3.1.1 Sintesi del costrutto

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

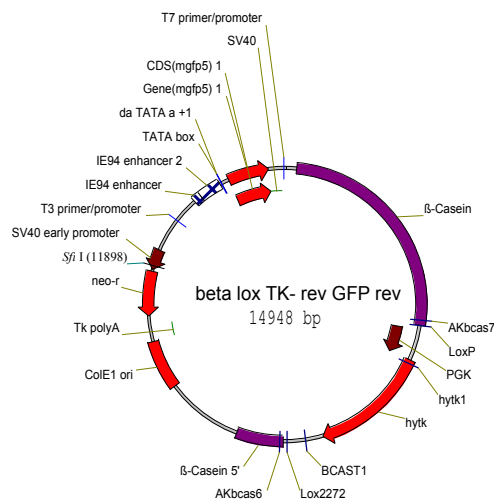


Fig. 4.16

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

4.3.1.2 Trasfezione in HC11

➤ Valutazione dell'efficienza di HR in HC11 mediante PCR

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

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

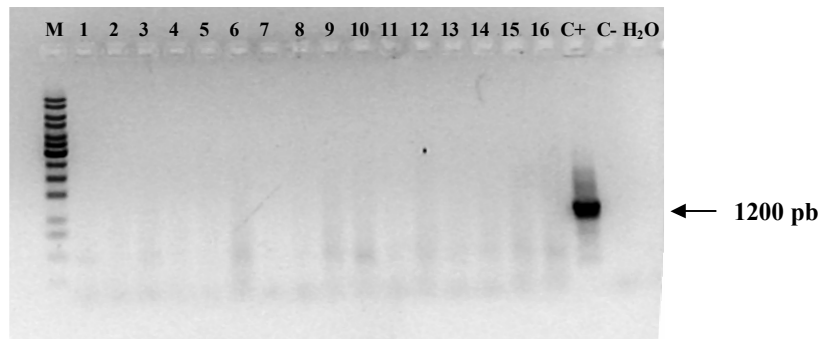


Fig. 4.17

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

C+ = plasmide controllo positivo

C- e H₂O = controlli negativi

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

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

Fig. 4.18

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

➤ Valutazione dell'espressione della GFP mediante FACS

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

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

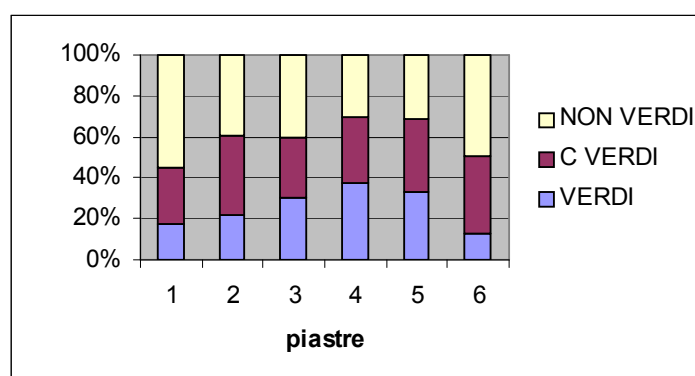


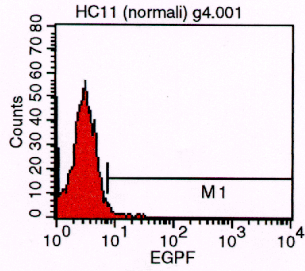
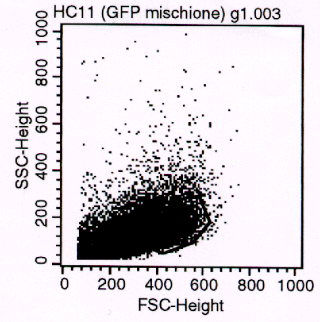
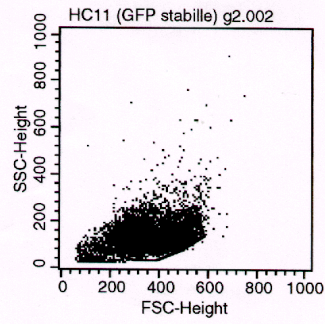
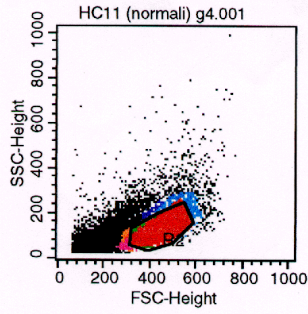
Fig. 4.19

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

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

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

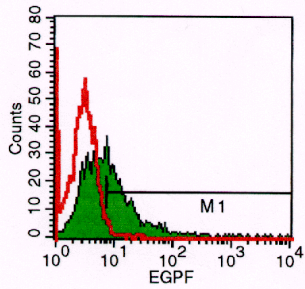
Nelle pagine seguenti vengono riportati i tracciati e l'analisi statistica che ci sono stati forniti in seguito all'analisi effettuata mediante citofluorimetro FACScan-3 colori (Becton Dickinson).



Histogram Statistics

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

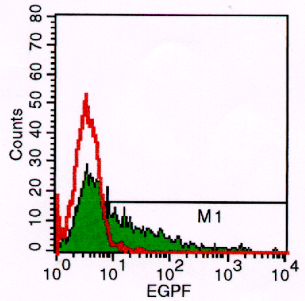
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	4539	100.00	48.50	3.19
M1	46	1.01	0.49	11.35



Histogram Statistics

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

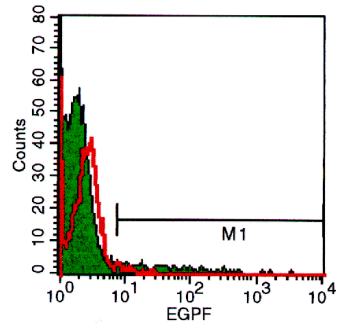
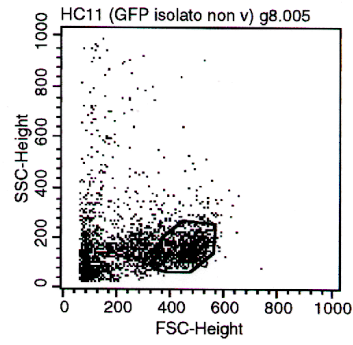
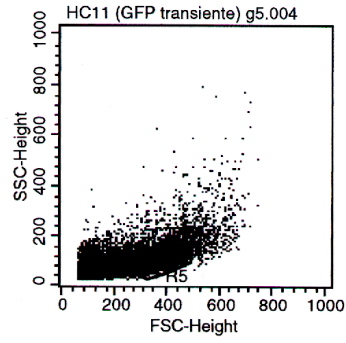
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	4896	100.00	61.31	20.03
M1	1937	39.56	24.26	43.88



Histogram Statistics

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

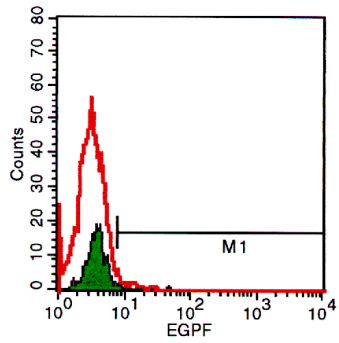
Marker	Events	% Gated	% Total	Mean
All	3743	100.00	25.34	24.53
M1	1418	37.88	9.60	57.97



Histogram Statistics

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

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



Histogram Statistics

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

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

Ogni campione è stato analizzato in citofluorimetria nel seguente modo:

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

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

Fig. 4.20

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

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

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

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

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

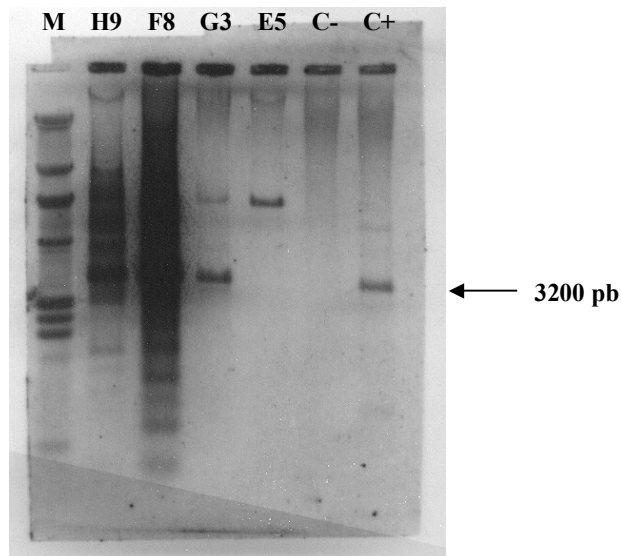


Fig. 4.21

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

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

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

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

C- = HC11 wild-type controllo negativo

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

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

4.3.1.3 Trasfezioni in cellule ES murine

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

➤ PCR

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

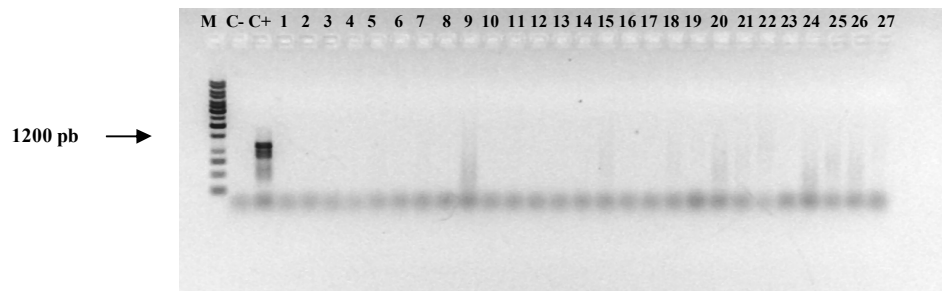


Fig. 4.22

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

C+ = plasmide controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

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

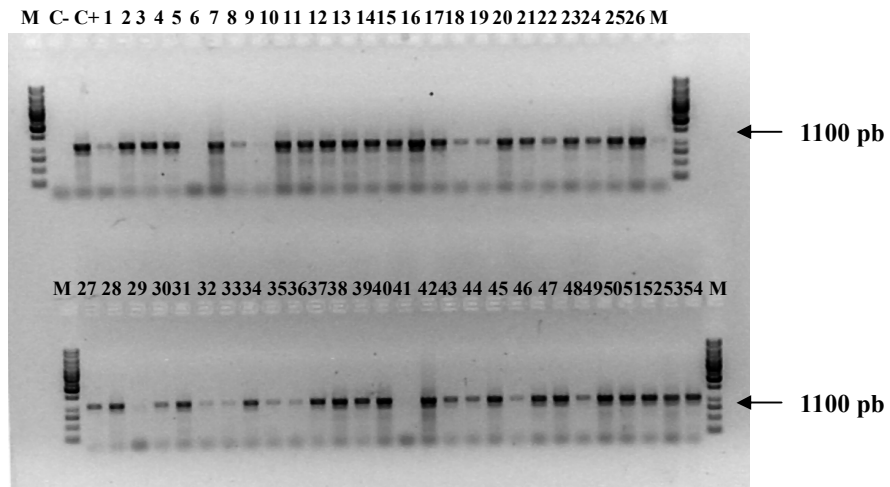


Fig. 4.23

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

C+ = DNA bovino controllo positivo

C- = controllo negativo H₂O

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

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

Fig. 4.24

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

4.3.2 pCX-EGFP

4.3.2.1 Sintesi dei costrutti

Questi ultimi tipi di vettori di ricombinazione hanno come bersaglio la β -lattoglobulina bovina e presentano come selettore negativo esterno alla regione di omologia, una nuova cassetta di espressione codificante la GFP (pCX-EGFP) con cDNA della EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) sotto il controllo del promotore della β -actina di pollo, l'”enhancer” del CMV, l'introne della β -actina e il segnale di poliadenilazione della β -globina bovina.

All'interno delle regioni di omologia, fiancheggiato dai segnali *loxP* e *lox2272*, abbiamo posizionato in un caso il selettore PGKneo (BLG-neo/pCXEGFP), e nell'altro il gene di fusione HyTk (BLG-HyTk/pCXEGFP). Essi sono stati linearizzati rispettivamente *XhoI* e *ScaI* ed utilizzati per le trasfezioni di fibroblasti bovini.

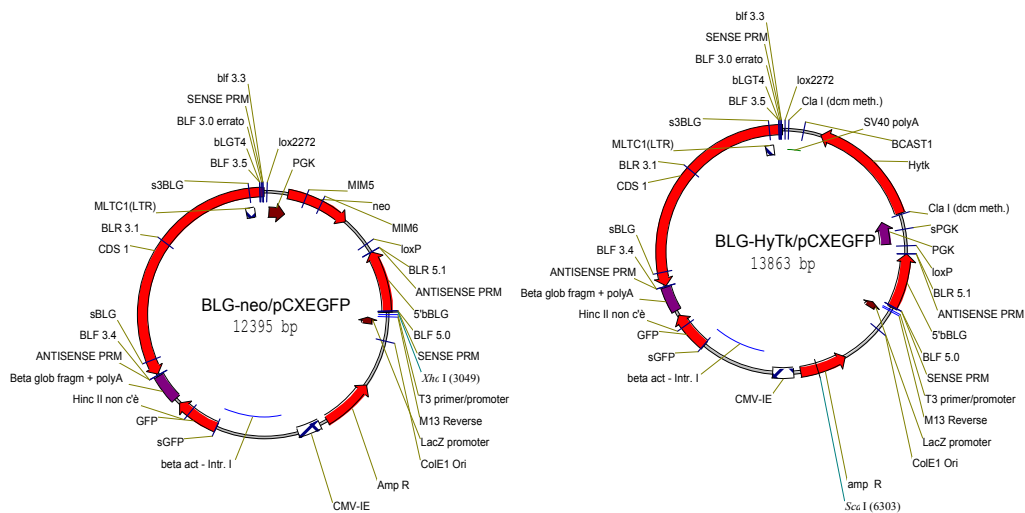


Fig. 4.25

Vettori di ricombinazione aventi come bersaglio la β -lattoglobulina bovina, come selettore negativo una cassetta di espressione nuova per la GFP e come selettore positivo a sinistra PGKneo e a destra il gene di fusione HyTk.

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

➤ Estrazione del DNA

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

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

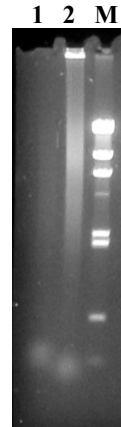
Tuttavia, il DNA che si ottiene con questa tecnica risulta notevolmente frammentato e la sua concentrazione è spesso troppo bassa: tutto ciò ovviamente va a inficiare la realizzazione di amplificazioni di frammenti di grosse dimensioni, come possono essere ad esempio quelli per l'individuazione degli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

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

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

Fig. 4.26

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



M 1 2 3

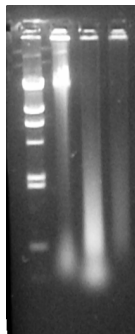


Fig. 4.27

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

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

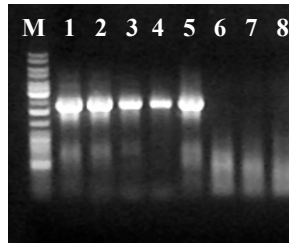


Fig. 4.28

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

1 = 2 pg di plasmide controllo

2 = 200 fg di plasmide controllo

3 = 20 fg di plasmide controllo

4 = 2 fg di plasmide controllo

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

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

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

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

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

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

➤ PCR

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

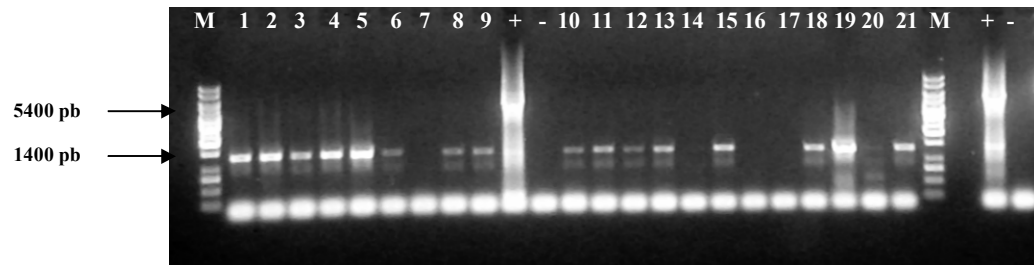


Fig. 4.29
Analisi dei prodotti di PCR con primer BLGT3 e BLGT4 mediante elettroforesi su gel d’agarosio all’1%.

M = marcatore di peso molecolare 1 Kb
1 → 21 = DNA di cloni di fibroblasti bovini trasfettati BLG-HyTk/pCXEGFP
 += controllo positivo: plasmide di controllo per l’evento di HR + DNA bovino
 -= controllo negativo: H₂O

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

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

Fig. 4.30
La tabella riassume i dati dei 2 esperimenti eseguiti trasfettando il vettore BLG-HyTk/pCXEGFP in fibroblasti bovini: in particolar modo abbiamo visualizzato il numero di cloni ottenuti, la percentuale di quelli fluorescenti, il numero di quelli isolati, di quelli che sono stati in grado di espandersi per poter essere analizzati e di quelli andati incontro a ricombinazione omologa (HR).

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

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

➤ Southern blot

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

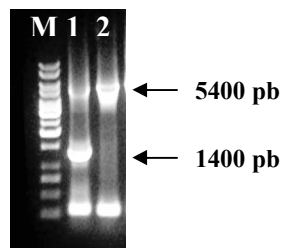


Fig. 4.31

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

2 = plasmide di controllo per l'evento di HR

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

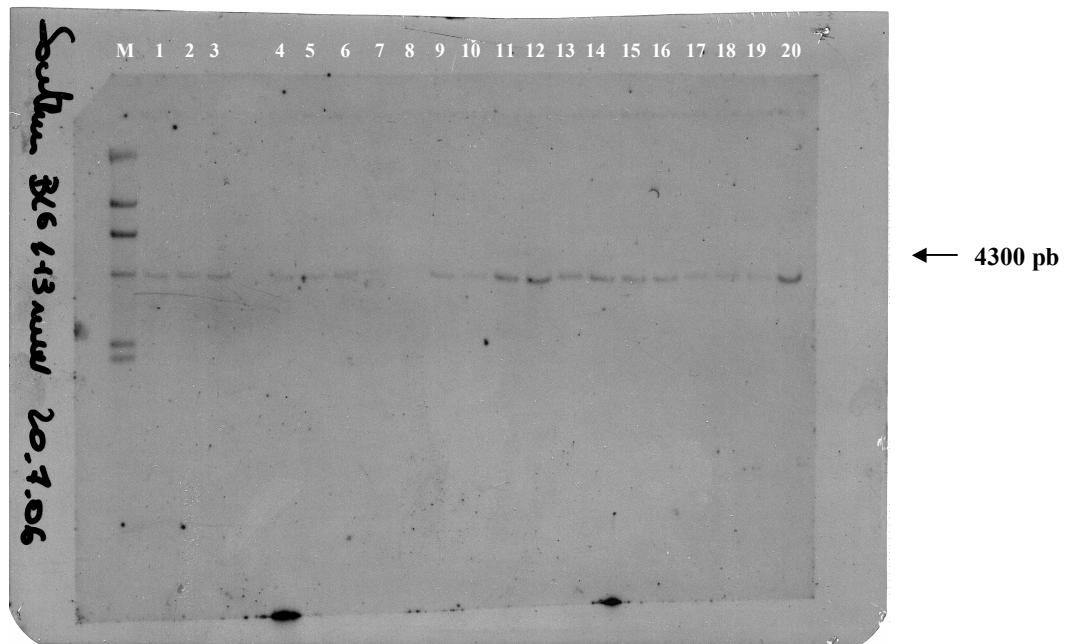


Fig. 4.32

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

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

1 → 19 = DNA di cloni di fibroblasti bovini trasfettati BLG-HyTk/pCXEGFP

20 = DNA di fibroblasti bovini wild-type

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

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

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

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

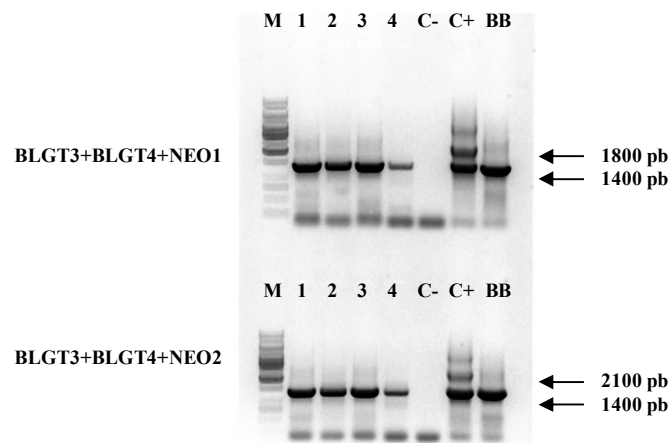


Fig. 4.33

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

M = marcatore di peso molecolare 1Kb

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

C- = controllo negativo H₂O

C+ = plasmide controllo positivo

BB = DNA bovino

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

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

Fig. 4.34

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

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

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

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

4.4 ANALISI RMCE

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

4.4.1 RMCE in HC11

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

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

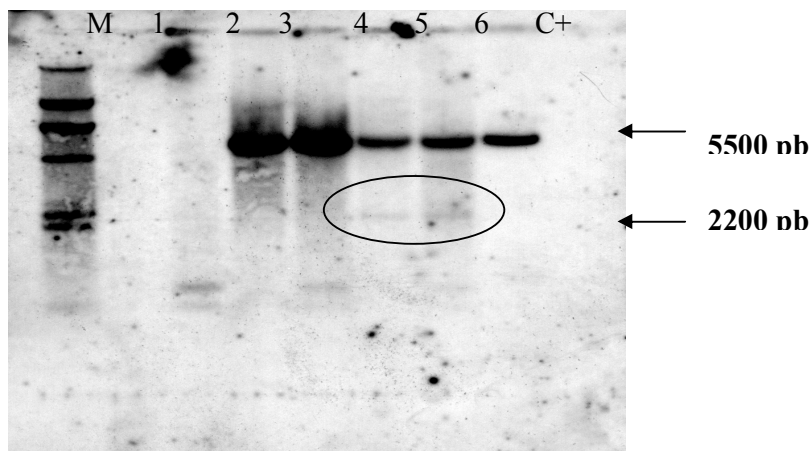


Fig. 4.35
Southern blot su DNA di HC11 sottoposte a RMCE.

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

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

4.4.2 RMCE in fibroblasti bovini

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

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

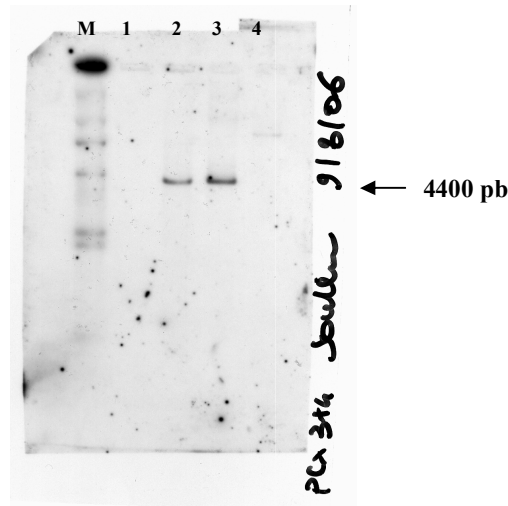


Fig. 4.36

Lastra da Southern blot eseguito con sonda pCX 3+4

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

1 = isolato di fibroblasti bovini BLG-HyTk/siRNA

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

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

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

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

Conclusioni

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).

bibliografia

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbott A. (2004)
Geneticists prepare for deluge of mutant mice
Nature **432**: 541
- Abremski K., Hoess R., Sternberg N. (1983)
Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination
Cell **32**: 1301-1311
- Albert H., Dale E.C., Lee E., Ow D.W. (1995)
Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome
Plant J. **7**: 649-659
- Anderson G.B. (1999)
Embryonic stem cells in agriculture species
In: Murray J.D., Anderson G.B., Oberbauer A.M., McGloughlin M.M. (Eds.), *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI Publishing, New York, USA, pp. 57-66
- Andreas S., Schwenk F., Kuter-Luks B., Faust N., Kuhn R. (2002)
Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage phi C31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells
Nucleic Acids Res. **30**: 2299-2306
- Andrews B.J., Proteau G.A., Beatty L.G., Sadowski P.D. (1985)
The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences
Cell **40**: 795-803
- Araki K., Araki M., Yamamura K. (1997)
Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells
Nucleic Acids Res. **25**: 868-872
- Archer J.S., Kennan W.S., Gould M.N., Bremel R.D. (1994)
Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** (15): 6840-6844
- Askew K., Doetschman T., Lingrel J.B. (1993)
Site-directed point mutations in embryonic stem cells: a gene-targeting tag-and-exchange strategy
Mol. Cell. Biol. **13**: 4115-4124
- Bach F.H. (1998)
Xenotransplantation: problems and prospects
Ann. Rev. Mol. **49**: 301-310
- Baer A., Bode J. (2001)
Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes
Curr. Opin. Biotechnol. **12**: 473-480
- Baum C., von Kalle C., Staal F.J.T., Li Z., Fehse B., Schmidt M., et al. (2004)
Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences
Mol. Ther. **9**: 5-13
- Bethke B., Sauer B. (1997)
Segmental genomic replacement by Cre-mediated recombination: genotoxic stress activation of the p53 promoter in single-copy transformants
Nucleic Acids Res. **25**: 2828-2834

- Bleck G.T., White B.R., Miller D.J., Wheeler M.B. (1998)
Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs
J. Anim. Sci. **76**: 3072-3078
- Bode J., Schlake T., Iber M., Schubeler D., Seibler J., Snezhkov E., et al. (2000)
The transgeneticist's toolbox: novel methods for the targeted modification of eucaryotic genomes
Biol. Chem. **381**: 801-813
- Boquest A.C., Day B.N., Prather R.S. (1999)
Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblasts cells
Biol. Reprod. **60**: 1013-1019
- Bouhassira E.E., Westerman K., Leboulch P. (1997)
Transcriptional behavior of LCR enhancer elements integrated at the same chromosomal locus by recombinase-mediated cassette exchange
Blood **90**: 3332-3344
- Branda C.S., Dymecki S.M. (2004)
Talking about a revolution: the impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice
Dev. Cell **6**: 7-28
- Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P., Laible G. (2003)
Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein
Nat. Biotechnol. **21**: 157-162
- Buchholz F., Angrand P.O., Stewart A.F. (1998)
Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis
Nat. Biotechnol. **16**: 657-662
- Buchholz F., Ringrose L., Angrand P.O., Rossi F., Stewart A.F. (1996)
Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination
Nucleic Acids Res. **24**: 4256-4262
- Burns J.C., Friedmann T., Driever W., Burrascano M., Yee J.K. (1993)
Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (17): 8033-8037
- Camaioni A., Russo M.A., Odorisio T., Gandolfi F., Fazio V.M., Siracusa G. (1992)
Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads
J. Reprod. Fertil. **96** (1): 203-212
- Campbell K. H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. (1996)
Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line
Nature **380**: 64-66
- Capecchi M.R. (1989)
The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting
Trends Genet. **5**: 70-76
- Castilla J., Pintado B., Sola I., Sanchez-Morgado J.M., Enjuanes L. (1998)
Engineering passive immunity in transgenic mice secreting virus-neutralizing antibodies in milk
Nat. Biotechnol. **16**: 349-354
- Cearley J.A., Detloff P.J. (2001)
Efficient repetitive alteration of the mouse Huntington's disease gene by management of background in the tag and exchange gene targeting strategy
Transgenic Res. **10**: 479-488

- Cesari F., Rennekampff V., Vintersten K., Vuong L.G., Seibler J., Bode J., et al. (2004)
Elk-1 knock-out mice engineered by Flp recombinase-mediated cassette exchange
Genesis **38**: 87-92
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. (1994)
Green fluorescent protein as a marker for gene expression
Science **263**: 802-805
- Chan A.W., Homan E.J., Ballou L.U., Burns J.C., Bremel R.D. (1998)
Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95** (24): 14028-14033
- Chang B.H., Liao W., Li L., Nakamuta M., Mack D., Chan L. (1999)
Liver-specific inactivation of the abetalipoproteinemia gene completely abrogates very low density lipoprotein/low density lipoprotein production in a viable conditional knockout mouse
J. Biol. Chem. **274**: 6051-6055
- Cheah S.S., Behringer R.R. (2001)
Contemporary gene targeting strategies for the novice
Mol. Biotechnol. **19**: 297-304
- Cheng L., Ziegelhoffer R., Yang N.S. (1993)
In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 4455-4459
- Choulika A., Perrin A., Dujon B., Nicolas J.F. (1995)
Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-*SceI* system of *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell. Biol. **15**: 1968-1973
- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M. (1998a)
Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells
Nat. Biotechnol. **16**: 642-646
- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J., Blackwell C., Ponce de Leon F.A., Robl J.M. (1998b)
Cloned calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts
Science **280**: 1256-1258
- Clark A.J., Bissinger P., Bullock D.W., Damak S., Wallace R., Whitelaw C.B., et al. (1994)
Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression
Reprod. Fertil. Dev. **6**: 589-598
- Clark A.J., Burl S., Denning C., Dickinson P. (2000)
Gene targeting in livestock: a preview
Transgenic Res. **9**: 263-275
- Clark A.J., Harold G., Yull F.E. (1997)
Mammalian cDNA and prokaryotic reporter sequences silence adjacent transgenes in transgenic mice
Nucleic Acids Res. **25**: 1009-1014
- Clark A.J., Whitelaw B. (2003)
A future for transgenic livestock
Nat. Rev. Genet. **4**: 825-833
- Clarke P. A., Mathews M. B. (1995)
Interactions between the double-stranded RNA binding motif and RNA: definition of the binding site for the interferon-induced protein kinase DAI (PKR) on adenovirus VA RNA
RNA **1**: 7-10

- Colman A. (2000)
Somatic cell nuclear transfer in mammals: progress and applications
Cloning **1**: 185-200
- Cozzi E., Bhatti F., Schmoeckel M., Chavez G., Smith K.G.C., Zaidi A., Bradley J.R., Thiru S., Goddard M., Vial C., Ostlie D., Wallwork J., White D.J.G., Friend P.J. (2000)
Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts
Transplantation **70**: 15-21
- Cozzi E., White D.J.G. (1995)
The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans
Nat. Med. **1**: 964-966
- Dai Y., Vaught T.D., Boone J., Chen S.H., Phelps C.J., Ball S., Monahan J.A., Jobst P.M., McCreath K.J., Lamborn A.E., Cowell-Lucero J.L., Wells K.D., Colman A., Polejaeva I.A., Ayares D.L. (2002)
Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs
Nat. Biotechnol. **20**: 251-255
- Damak S., Jay N.P., Barrell G.K., Bullock D.W. (1996a)
Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep
Biotechnology **14**: 181-184
- Damak S., Su H., Jay N.P., Bullock D.W. (1996b)
Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1
Biotechnology **14**: 185-188
- De Lange P., van Blokland R., Kooter J. M., Mol J. N. (1995)
Suppression of flavonoid flower pigmentation genes in *Petunia hybrida* by the introduction of antisense and sense genes
Curr. Top Microbiol. Immunol. **197**: 57-75
- Denning C., Burl S., Ainslie A., Bracken J., Dinnyes A., Fletcher J., King T., Ritchie M., Ritchie W.A., Rollo M. et al. (2001)
Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTAI) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep
Nat. Biotechnol. **19**: 559-562
- Denning C., Dickinson P., Burl S., Wylie D., Fletcher J., Clark A.J. (2001)
Gene targeting in primary fetal fibroblasts from sheep and pig
Cloning Stem Cells **3** (4): 221-231
- Doetschman T. (2002)
Gene targeting in embryonic stem cells: I History and methodology.
In: Pinkert C.A., editor. Transgenic animal technology a laboratory handbook. San Diego: Academic Press; p. 113-141
- Doetschman T., Gregg R.G., Maeda N., Hooper M.L., Melton D.W., Thompson S., et al. (1987)
Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells
Nature **330**: 576-578
- Doetschman T., Maeda N., Smithies O. (1988)
Targeted mutation of the Hprt gene in mouse embryonic stem cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85**: 8583-8587
- Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery Jr. C.A., Butel J.S. (1992)
Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors
Nature **356**: 215-221
- Donzé O., Picard D. (2002)
RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase
Nucleic Acid. Res. **30** (10): e46

- Doppler W., Groner B., Ball R.K. (1989)
Prolactin and glucocorticoid hormones synergistically induce expression of transfected rat β -casein gene promoter constructs in a mammary epithelial cell line
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 104-108
- Dorin J.R., Inglis J.D., Porteous D.J. (1989)
Selection for precise chromosomal targeting of a dominant marker by homologous recombination
Science **243**: 1357-1360
- Dupuy A.J., Clark K., Carlson C.M., Fritz S., Davidson A.E., Markley K.M., Finley K., Fletcher C.F., Ekker S.C., Hackett P.B., Horn S., Largaespada D.A. (2002)
Mammalian germ-line transgenesis by transposition
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 4495-4499
- Espanion G., Halter R., Wrenzycki C., Carnwath J.W., Herrmann D., Lemme E., Niemann H., Paul D. (1997)
mRNA expression of human blood coagulation factor VIII (FVIII) gene constructs in transgenic mice
Transgenics **2**: 175-182
- Evans M.J., Kaufman M.H. (1981)
Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos
Nature **292**: 154-156
- Eyestone W.H. (1999)
Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology
Theriogenology **51**: 509-517
- Falanga V., Kirsner R.S. (1993)
Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells
J. Cell. Physiol. **154**: 506-510
- Fan J., Watanabe T. (2003)
Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models
Pharmacol. Ther. **99**: 261-282
- Feil R., Brocard J., Mascrez B., LeMeur M., Metzger D., Chambon P. (1996)
Ligand-activated site-specific recombination in mice
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 10887-10890
- Feil R., Wagner J., Metzger D., Chambon P. (1997)
Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains
Biochem. Biophys. Res. Commun. **237**: 752-757
- Feng Y.Q., Lorincz M.C., Fiering S., Grealley J.M., Bouhassira E.E. (2001)
Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin
Mol. Cell. Biol. **21**: 298-309
- Feng Y.Q., Seibler J., Alami R., Eisen A., Westerman K.A., Le Boulch P., et al. (1999)
Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange
J. Mol. Biol. **292**: 779-785
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998)
Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*
Nature **391**: 806-811
- Forsberg E.J., Betthausen J., Strelchenko N., Golueke P., Childs L., Jurgella R., Koppang G., Mell G., Pace M.M., Bishop M. (2001)
Cloning non-transgenic and transgenic cattle
Theriogenology **55**: 269 (abstract)

- Gandolfi F. (2000)
Sperm-mediated transgenesis
Theriogenology **53**: 127-137
- Giraldo P., Rival-Gervier S., Houdebine L.M., Montoliu L. (2003)
The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals
Transgenic Res. **12**: 751-755
- Golovan S.P., Meidinger R.G., Ajakaiye A., Cottrill M., Wiederkehr M.Z., Barney D.J., Plante C., Pollard J.W., Fan M.Z., Hayes M.A., Laursen J., Hjorth J.P., Hacker R.R., Phillips J.P., Forsberg C.W. (2001)
Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure
Nat. Biotechnol. **19**: 741-745
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. (1980)
Genetic transformation of mouse embryos by microinjected of purified DNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** (12): 7380-7384
- Grieshammer U., Lewandoski M., Prevette D., Oppenheim R.W., Martin G.R. (1998)
Muscle-specific cell ablation conditional upon Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice leads to massive spinal and cranial motoneuron loss
Dev. Biol. **197**: 234-247
- Gschwind M., Huber G. (1998)
Introduction of hereditary disease-associated mutations into the beta-amyloid precursor protein gene of mouse embryonic stem cells: a comparison of homologous recombination methods
Mol. Cell. Biol. **18**: 4651-4658
- Halter R., Carnwath J., Espanion G., Herrmann D., Lemme E., Niemann H., Paul D. (1993)
Strategies to express factor VIII gene constructs in the ovine mammary gland
Theriogenology **39**: 137-149
- Hamilton D.L., Abremski K. (1984)
Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system Cre-mediated synapsis of two lox sites
J. Mol. Biol. **178**: 481-486
- Harborth J., Elbashir S. M., Bechert K., Tuschl T., Weber K (2001)
Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs
J. Cell Sci. **114**: 4557-4565
- Hasty P., Bradley A. (1993??)
Gene targeting vectors for mammalian cells
In: Joiner A.L., editor. Gene targeting: a practical approach. Oxford: IRL Press. p. 1-31
- Hasty P., Ramirez-Solis R., Krumlauf R., Bradley A. (1991a)
Introduction of a subtle mutation into the Hox-26 locus in embryonic stem cells
Nature **350**: 243-246
- Hasty P., Rivera-Perez J., Chang C., Bradley A. (1991b)
Target frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells
Mol. Cell Biol. **11**: 4509-4517
- Hirata R.K., Chamberlain J., Dong R., Russell D.W. (2002)
Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors
Nat. Biotechnol. **20**: 735-738
- Hirata R.K., Xu C., Dong R., Miller D.G., Ferguson S., Russell D.W. (2004)
Efficient PRNP gene targeting in bovine fibroblasts by adeno-associated virus vectors
Cloning Stem Cells **6**: 31-36

- Hirata R.K., Russell D.W. (2000)
Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors
J. Virol. **74**: 4612-4620
- Hiripi L., Makovics F., Baranyi M., Paul D., Carnwath J.W., Bösze Z., Niemann H. (2003)
Expression of active human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic rabbits
DNA Cell. Biol. **22**: 41-45
- Hoess R.H., Ziese M., Sternberg N. (1982)
P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**: 3398-3402
- Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E., Pfeifer A. (2004)
Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes
Biol. Reprod. **71**: 405-409
- Hogan B., Constantini F., Lacy E. (1994)
Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cols Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour Press, Plainview, NY
- Houdebine L.M. (2000)
Transgenic animal bioreactors
Transgenic Res. **9**: 305-320
- Houdebine L.M. (2002)
Antibody manufacture in transgenic animals and comparisons with other systems
Curr. Opin. Biotechnol. **13**: 625-629
- Houdebine L-M (2005)
Use of transgenic animals to improve human health and animal production
Reprod. Dom. Anim. **40**: 269-281
- Hug B.A., Wesselschmidt R.L., Fiering S., Bender M.A., Epner E., Groudine M., et al. (1996)
Analysis of mice containing a targeted deletion of beta-globin locus control region 5' hypersensitive site 3
Mol. Cell Biol. **16**: 2906-2912
- Hutvagner G., Zamore P. D. (2002)
A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex
Science **297**: 2056-2060
- Hyttinen J.M., Peura T., Tolvanen M., Aalto J., Alhonen L., Sinervirta R., Halmekytö M., Myöhänen S., Jänne J. (1994)
Generation of transgenic dairy cattle from transgene-analyzed and sexed embryos produced in vitro
Biotechnology **12**: 606-608
- Inoue N., Dong R., Hirata R.K., Russell D.W. (2001)
Introduction of single base substitutions at homologous chromosomal sequences by adeno-associated virus vectors
Mol. Ther. **3**: 526-530
- Jackson A. L., Bartz S. R., Schelter J., Kobayashi S. V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsey P. S. (2003)
Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi
Nat. Biotechnol. **21**: 635-637
- Jaenisch R. (1988)
Transgenic animals
Science **240**: 1468-1474

- Jasin M. (1996)
Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases
Trends Genet. **12**: 224-228
- Jasin M., Berg P. (1988)
Homologous integration in mammalian cells without target gene selection
Genes Dev. **2**: 1353-1363
- Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. (2002)
Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow
Nature **418**: 41-49
- Johnson R.D., Jasin M. (2001)
Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells
Biochem. Soc. Trans. **29**: 196-201
- Jost B., Vilotte J.L., Duluc I., Rodeau J.L., Freund J.N. (1999)
Production of low-lactose milk by ectopic expression of intestinal lactase in the mouse mammary gland
Nat. Biotechnol. **17**: 160-164
- Kambadur R., Sharma M., Smith T.P., Bass J.J. (1997)
Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscléd Belgian Blue and Piedmontese cattle
Genome Res. **7**: 910-916
- Kato M., Ishikawa A., Kaneko R., Yagi T., Hochi S., Hirabayashi M. (2004)
Production of transgenic rats by ooplasmic injection of spermatogenic cells exposed to exogenous DNA: a preliminary study
Mol. Reprod. Dev. **69**: 153-158
- Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y. (1998)
Eight calves cloned from somatic cells of a single adult
Science **282**: 2095-2098
- Kilby N.J., Snaith M.R., Murray J.A. (1993)
Site-specific recombinases: tools for genome engineering
Trends Genet. **9**: 413-421
- Kolb A.F. (2001)
Selection-marker-free modification of the murine beta-casein gene using a lox2272 site
Anal. Biochem. **290**: 260-271
- Kolb A.F. (2002)
Genome engineering using site-specific recombinases
Cloning stem cells **4**: 65-80
- Kolb A.F., Ansell R., McWhir J., Siddell S.G. (1999)
Insertion of a foreign gene into the beta-casein locus by Cre-mediated site-specific recombination
Gene **227**: 21-31
- Koles K., van Berkel P.H., Pieper F.R., Nuijens J.H., Mannesse M.L., Vliegthart J.F., Kamerling J.P. (2004)
N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits
Glycobiology **14**: 51-64
- Koller B.H., Hagemann L.J., Doetschman T., Hageman J.R., Huang S., Williams P.J., et al. (1989)
Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**: 8927-8931

- Kubota C., Yamakuchi H., Todoroki J., Mizoshita K., Tabara N., Barber M., Yang X. (2000)
Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**: 990-995
- Kues W.A., Anger M., Carnwath J.W., Paul D., Motlik J., Niemann H. (2000)
Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors
Biol. Reprod. **62**: 412-419
- Kues W.A., Carnwath J.W., Paul D., Niemann H. (1998)
A DNA-vector-based selection strategy for totipotent porcine cell lines
Theriogenology **49**: 223 (abstract)
- Kues W.A., Carnwath J.W., Paul D., Niemann H. (2002)
Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts by serum deprivation initiates a nonconventional form of apoptosis
Cloning stem cells **4**: 231-243
- Kues W.A., Niemann H. (2004)
The contribution of farm animals to human health
Trends Biotechnol. **22**: 286-294
- Kulkarni R.N., Bruning J.C., Winnay J.N., Postic C., Magnuson M.A., Khan C.R. (1999)
Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes
Cell **96**: 329-339
- Kuroiwa Y., Kasinathan P., Matsushita H., Sathiyaselan J., Sullivan E.J., Kakitani M., Tomizuka K., Ishida I., Robl J.M. (2004)
Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-micro and prion protein in cattle
Nat. Genet. **36**: 671-672
- Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., Cheong H.T., Greenstein J.L., Im G.S., Samuel M., Bonk A., Rieke A., Day B.N., Murphy C.N., Carter D.B., Hawley R.J., Prather R.S. (2002)
Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning
Science **295**: 1089-1092
- Lanza R.B., Cibelli J.B., Diaz F., Moraes C.T., Farin P.W., Farin C.E., Hammer C.J., West M.D., Damiani P. (2000)
Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer
Cloning **2** (1): 79-90
- Lasko M., Sauer B., Mosinger Jr. B., Lee E.J., Manning R.W., Yu S.H., et al. (1992)
Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 6232-6236
- Lauth M., Moerl K., Barski J.J., Meyer M. (2000)
Characterization of Cre-mediated cassette exchange after plasmid microinjection in fertilized mouse oocytes
Genesis **27**: 153-158
- Lauth M., Spreafico F., Dethleffsen K., Meyer M. (2002)
Stable and efficient cassette exchange under non-selectable conditions by combined use of two site-specific recombinases
Nucleic Acids Res. **30**: e115
- Lavitrano M., Bacci M.L., Forni M., Lazzereschi D., Di Stefano C., Fioretti D., Giacotti P., Marfè G., Pucci L., Renzi L., Wang H., Stoppacciaro A., Stassi G., Sargiacomo M., Sinibaldi P., Turchi V., Giovannoni R., Della Casa G., Seren E., Rossi G. (2002)
Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 14230-14235

- Lee G., Saito I. (1998)
Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination
Gene **216**: 55-65
- Lemme E., Eckert J., Carnwath J.W., Niemann H. (1994)
Expression of 6WTK-LacZ gene construct in in vitro produced bovine embryos following microinjection into pronuclei or cytoplasm
Theriogenology **41**: 236 (abstract)
- Le Mouellic H., Lallemand Y., Brulet P. (1990)
Targeted replacement of the homeobox gene Hox-31 by the Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**: 4712-4716
- Lipps H.J., Jenke A.C., Nehlsen K., Scinteie M.F., Stehle I.M., Bode J. (2003)
Chromosome-based vectors for gene therapy
Gene **304**: 23-33
- Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J., Baltimore D. (2002)
Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors
Science **295**: 868-872
- Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R. (1988)
Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes
Nature **336**: 348-352
- Mansour S.L., Thomas K.R., Deng C.X., Capecchi M.R. (1990)
Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **87**: 7688-7692
- Martin G.R. (1981)
Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells
Proc. Natl., Acad. Sci. USA **78**: 7634-7638
- Matsui Y., Zsebo K., Hogan B.L. (1992)
Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture
Cell **70**: 841-847
- McCreath K.J., Howcroft J., Campbell K.H., Colman A., Schnieke A.E., Kind A.J. (2000)
Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells
Nature **405**: 1066-1069
- McGrew M.J., Sherman A., Ellard F.M., Lillico S.G., Gilhooley H.J., Kingsman A.J., Mitrophanous K.A., Sang H. (2004)
Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors
EMBO Rep. **5**: 728-733
- McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. (1997)
Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member
Nature **38**: 83-90
- McPherron A.C., Lee S.J. (1997)
Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**: 12457-12461
- Meade H. (1999)
ATIII from goats through clinical trials
Transgenic animal research conference IV, Tahoe City, CA, USA, p.33

- Melo E.O., Sousa R.V., Iguma L.T., Franco M.M., Rech E.L., Rumpf R. (2005)
Isolation of transfected fibroblast clones for use in nuclear transfer and transgene detection in cattle embryos
Genet. Mol. Res. **4**: 812-821
- Merlo G.R., Venesio T., Taverna D., Callahan R., Hynes N.E. (1993)
Growth suppression of normal mammary epithelial cells by wild-type p53
Ann. N.Y. Acad. Sci. **698**: 108-113
- Merlo G.R., Venesio T., Taverna D., Marte B.M., Callahan R., Hynes N.E. (1994)
Growth suppression of normal mammary epithelial cells by wild-type p53
Oncogene **9**: 443-453
- Mitra A., Hruska K.S., Wellnitz O., Kerr D.E., Capuco A.V., Wall R.J. (2003)
Expression of lysostaphin in milk of transgenic mice affects the growth of neonates
Transgenic Res. **12**: 597-605
- Moore R.C., Redhead N.J., Selfridge J., Hope J., Manson J.C., Melton D.W. (1995)
Double replacement gene targeting for the production of a series of mouse strains with different prion protein gene alterations
Biotechnology **13**: 999-1004
- Moreira P.N., Giraldo P., Cozar P., Pozueta J., Jimenez A., Montoliu L., Gutierrez-Adan A. (2004)
Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection
Biol. Reprod. **71**: 1943-1947
- Muller U. (1999)
Ten years of gene-targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis
Mech. Dev. **82**: 3-21
- Müller M., Brem G. (1991)
Disease resistance in farm animals
Experientia **47**: 923-934
- Murray J., Reh W., Anderson G., Maga E. (2003)
Changing the composition of milk to improve human health
Transgenic Animal Research Conference IV, Tahoe City, CA, USA, p. 32
- Nagy A. (2000)
Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring
Genesis **26**: 99-109
- Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder J. C. (1993)
Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 8424-8428
- Nebert D.W., Dalton T.P., Stuart G.W., Carvan III M.J. (2000)
“Gene-swap knock-in” cassette in mice to study allelic differences in human genes
Ann. N.Y. Acad. Sci. **919**: 148-170
- Niemann H., Halter R., Carnwath J.W., Herrmann D., Lemme E., Paul D. (1999)
Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep
Transgenic Res. **8**: 237-247
- Niemann H., Kues W.A. (2000)
Transgenic livestock: premises and promises
Anim. Reprod. Sci. **60-61**: 277-293
- Niemann H., Kues W.A. (2003)
Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine
Anim. Reprod. Sci. **79** : 291-317

- Nottle M.B., Nagashima H., Verma P.J., Du Z.T., Grupen C.G., Ashman R.J., McIlpatrick S. M.(1997)
Developments in transgenic techniques in pigs
J. Reprod. Fertil. Suppl. **52**: 237-244
- Nottle M.B., Nagashima H., Verma P.J., Du Z.T., Grupen C.G., McIlpatrick S.M., Ashman R.J., Harding M.P., Giannakis C., Wigley P.L., Lyons I.G., Harrison D.T., Luxford B.G., Campbell R.G., Crawford R.J., Robins A.J. (1999)
Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct
In: Murray J.D., Anderson G.B., Oberbauer A.M., McGloughlin M.M. (Eds.), *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI Publishing, New York, USA, pp. 145-156
- Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T., Nishimune Y. (1997)
„Green mice“ as a source of ubiquitous green cells
FEBS Letters **407**: 313-319
- Oldmixon B.A., Wood J.C., Ericsson T.A., Wilson C.A., White-Scharf M.E., Andersson G., Greenstein J.L., Schuurman H.J., Patience C. (2002)
Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine
J. Virol. **76**: 3045-3048
- Ono E., Amagai K., Taharaguchi S., Tomioka Y., Yoshino S., Watanabe Y., Cherel P., Houdebine L.M., Adam M., Eloit M., Inobe M., Uede T. (2004)
Transgenic mice expressing a soluble form of porcine nectin-1/herpesvirus entry mediator C as a model for pseudorabies-resistant livestock
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 16150-16155
- Pailhoux E., Vigier B., Chaffaux S., Servel N., Taourit S., Furet J.P., Fellous M., Grosclaude F., Cribiu E.P., Cotinot C., Vaiman D. (2001)
A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats
Nat. Genet. **29**: 453-458
- Paleyanda R.K., Velandar W.H., Lee T.K., Scandella D.H., Gwazdauskas F.C., Knight J.W., Hoyer L.W., Drohan W.H., Lubon H. (1997)
Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk
Nat. Biotechnol. **15**: 971-975
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Bimberg N.C., Evans R.M. (1982)
Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes
Nature **300** (5893): 611-615
- Palmiter R.D., Sandgren E.P., Avarbock M.R., Allen D.D., Brinster R.L.(1991)
Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** (2): 478-482
- Patience C., Takeuchi Y., Weiss R.A. (1997)
Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs
Nat. Med. **3**: 282-286
- Perry A.C.F., Wakayama T., Kishikawa H., Kasai T., Okabe M., Toyoda Y., Yanagimachi R. (1999)
Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection
Science **284**: 1180-1183
- Pham C.T., MacIvor D.M., Hug B.A., Heusel J.W., Ley T.J. (1996)
Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 13090-13095
- Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D., Boone J., Wells K.D., Chen S.H., et al. (2003)
Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs
Science **299**: 411-414

- Piedrahita J.A., Moore K., Oetama B., Lee C.K., Scales N., Ramsoondar J., Bazer F.W., Ott T. (1998)
Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies
Biol. Reprod. **58**: 1321-1329
- Platt J.L., Lin S.S. (1998)
The future promises of xenotransplantation
In: Fishman J., Sachs D., Shaikh R. (Eds.), *Xenotransplantation-Scientific Frontiers and Public Policy.*
Ann. New York Acad. Sci. **862**, 5-18
- Polejaeva I.A., Campbell K.H. (2000)
New advances in somatic cell nuclear transfer: applications in transgenesis
Theriogenology **53**: 117-126
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J. (1992)
Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein
Gene **111**: 229-233
- Pursel V.G., Rexroad Jr. C.E. (1993)
Status of research with transgenic farm animals
J. Anim. Sci. **71**: 10-19
- Ramsoondar J.J., Machaty Z., Costa C., Williams B.L., Fodor W.L., Bondioli K.R. (2003)
Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-knockout cloned pigs expressing human alpha 1,2-fucosyltransferase
Biol. Reprod. **69**: 437-445
- Resnick J.L., Bixler L.S., Cheng L., Donovan P.J. (1992)
Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture
Nature **359**: 550-551
- Rideout III W.M., Wakayama T., Wutz A., Eggan K., Jackson-Grusby L., Dausman J., Yanagimachi R., Jaenisch R. (2000)
Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning
Nat. Genet. **24**: 109-110
- Rinaldi A., Marshall K.R., Preston C.M. (1999)
A non-cytotoxic herpes simplex virus vector which expresses Cre recombinase directs efficient site specific recombination
Virus Res. **65**: 11-20
- Robl J.M., Cibelli J.B., Golueke P.G., Kane J.J., Blackwell C., Jerry J., Dickenson E.S., Ponce de Leon F.A., Stice S.L.
Embryonic stem cell chimeras and somatic cell nuclear transplantation for production of transgenic cattle
In: *Transgenic Animals in Agriculture.* CABI Publishing, NY, USA, 1999
- Rodriguez C.I., Buchholz F., Galloway J., Sequerra R., Kasper J., Ayala R., et al. (2000)
High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP
Nat. Genet. **25**: 139-140
- Rouet P., Smith F., Jasin M. (1994)
Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease
Mol. Cell. Biol. **14**: 8096-8106
- Rudolph N.S. (1999)
Biopharmaceutical production in transgenic livestock
TIBTECH **17**: 367-374
- Russell D.W., Hirata R.K. (1998)
Human gene targeting by viral vectors
Nat. Genet. **18**: 325-330

- Sabapathy K., Klemm M., Jaenisch R., Wagner E.F. (1997)
Regulation of ES cell differentiation by functional and conformational modulation of p53
The EMBO Journal **16**: 6217-6229
- Schlake T., Bode J. (1994)
Use of mutated FLP recognition target (FRT) sites for the exchange of expression cassettes at defined chromosomal loci
Biochemistry **33**: 12746-12751
- Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmot I., Colman A., Campbell K.H. (1997)
Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts
Science **278**: 2130-2133
- Schwartzberg P.L., Goff S.P., Robertson E.J. (1989)
Germ-line transmission of a c-abl mutation produced by targeted gene disruption in ES cells
Science **246**: 799-803
- Sedivy J.M., Dutriaux A. (1999)
Gene targeting and somatic cell genetics – a rebirth or a coming of age?
Trends Genet. **15**: 88-90
- Sedivy J.M., Sharp P.A. (1989)
Positive genetic selection for gene disruption in mammalian cells by homologous recombination
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**: 227-231
- Seibler J., Bode J. (1997)
Double-reciprocal crossover mediated by FLP-recombinase: a concept and an assay
Biochemistry **36**: 1740-1747
- Seibler J., Schubeler D., Fiering S., Groudine M., Bode J. (1998)
DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs
Biochemistry **37**: 6229-6234
- Seidel Jr., G.E. (1993)
Resource requirements for transgenic livestock research
J. Anim. Sci. **71**: 26-33
- Seidman M.M., Glazer P.M. (2003)
The potential for gene repair via triple helix formation
J. Clin. Invest. **112**: 487-494
- Senecoff J.F., Bruckner R.C., Cox M.M. (1985)
The Flp recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 7270-7274
- Shim H., Gutierrez-Adan A., Chen L.R., BonDurant R.H., Behboodi E., Anderson G.B. (1997)
Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells
Biol. Reprod. **57**: 1089-1095
- Smith F., Rouet P., Romanienko P.J., Jasin M. (1995)
Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells
Nucleic Acids Res. **23**: 5012-5019
- Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A., Kucherlapati R.S. (1985)
Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination
Nature **317**: 230-234

- Soler E., Le Saux A., Cohen R., Merle C., Guinet F., Passet B., Sorel V., Martin K., Perrin A., Piriou A., Charpilienne A., Fourgoux C., Schartz-Cornil I., Cohen J., Houdebine L.M. (2004)
Production of two vaccinating recombinant rotavirus proteins in milk of transgenic rabbits
In: Vaccination against enteric diseases, Congress book, Montego Bay, Jamaica
- Sorrell D.A., Kolb A.F. (2003)
Targeted integration of transgenes into the mammalian genome using site-specific recombinases: tools and strategies
In: Pandalai S.G., editor. Recent research developments in analytical biochemistry. Trivandrum: Tranworld Research Networkvol. 3; p. 133-153
- Soukharev S., Miller J.L., Sauer B. (1999)
Segmental genomic replacement in embryonic stem cells by double lox targeting
Nucleic Acids Res. **27**: e21
- Stacey A., Schnieke A., McWhir J., Cooper J., Colman A., Melton D.W. (1994)
Use of double-replacement gene targeting to replace the murine alpha-lactalbumin gene with its human counterpart in embryonic stem cells and mice
Mol. Cell. Biol. **14**: 1009-1016
- Stowers A.W., Chen L.H., Zhang Y., Kennedy M.C., Zou L., Lambert L., Rice T.J., Kaslow D.C., Saul A., Long C.A., Meade H., Miller L.H. (2002)
A recombinant vaccine expressed in the milk of transgenic mice protects Aotus monkeys from a lethal challenge with *Plasmodium falciparum*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 339-344
- Strelchenko N. (1996)
Bovine pluripotent stem cells
Theriogenology **45**: 131-140
- Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Thomas J.L., Mauchamp B., Chavancy G., Shirp P., Fraser M., Prudhomme J.C., Couble P. (2000)
Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori*L. using a piggyBac transposon derived vector
Nat. Biotechnol. **18**: 81-84
- Templeton N.S., Roberts D.D., Safer B. (1997)
Efficient gene targeting in mouse embryonic stem cells
Gene Ther. **4** (7): 700-709
- Thomas K.R., Capecchi M.R. (1987)
Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells
Cell **51**: 503-512
- Thompson S., Clarke A.R., Pow A.M., Hooper M.L., Melton D.W. (1989)
Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells
Cell **56**: 313-321
- Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R., Bartel D. P., Sharp P. A. (1999)
Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro
Genes Dev. **13**: 3191-3197
- Valancius V., Smithies O. (1991)
Testing an "in-out" targeting procedure for making subtle genomic modifications in mouse embryonic stem cells
Mol. Cell Biol. **11**: 1402-1408
- van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H. (2002)
Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows
Nat. Biotechnol. **20**: 484-487

- van der Weyden L., Adams D.J., Bradley A. (2002)
Tools for targeted manipulation of the mouse genome
Physiol. Genomics **11**: 133-164
- Vasquez K.M., Marburger K., Intody Z., Wilson J.H. (2001)
Manipulating the mammalian genome by homologous recombination
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**: 8403-8410
- Wakayama T., Perry A.C.F., Zuccotti M., Johnson K.R., Yanagimachi R. (1998)
Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei
Nature **394**: 369-374
- Wakayama T., Rodriguez I., Perry A.C.F., Yanagimachi R., Mombaerts P. (1999)
Mice cloned from embryonic stem cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96** (26): 14984-14989
- Wall R.J. (1996)
Transgenic livestock: progress and prospects for the future
Theriogenology **45**: 57-68
- Wall R.J., Hawk H.W., Nel N. (1992)
Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale
J. Cell. Biochem. **49**: 113-120
- Wang B., Zhou J. (2003)
Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning
Reproductive Biology and Endocrinology **1**: 103-110
- Wang S., Hazelrigg T. (1994)
Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis
Nature **369**: 400-403
- Wheeler M.B. (1994)
Development and validation of swine embryonic stem cells: a review
Reprod. Fertil. Dev. **6**: 563-568
- Wheeler M.B., Bleck G.T., Donovan S.M. (2001)
Transgenic alteration of sow milk to improve piglet growth and health
Reprod. Suppl. **58**: 313-324
- White D. (1996b)
hDAF transgenic pig organs: are they concordant for human transplantation
Xeno **4**: 50-54
- Whitelaw C.B., Radcliffe P.A., Ritchie W.A., Carlisle A., Ellard F.M., Pena R.N., Rowe J., Clark A.J., King T.J., Mitrophanous K.A. (2004)
Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector
FEBS Lett. **571**: 233-236
- Wilmot I., Beaujean N., De Sousa P.A., Dinnyes A., King T.J., Paterson L.A., Wells D.N., Young L.E. (2002)
Somatic cell nuclear transfer
Nature **419**: 583-586
- Wilmot I., Schnieke E., McWhir J., Kind A.J., Colman A., Campbell K.H.S.
Nuclear transfer in the production of transgenic farm animals
In: *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI Publishing, NY, USA, 1999
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997)
Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells
Nature **385**: 803-810

- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. (1990)
Direct gene transfer into mouse muscle in vivo
Science **247** (4949 Pt 1): 1465-1468
- Yanez R.J., Porter A.C. (1998)
Therapeutic gene targeting
Gene Ther. **5**: 149-159
- Yang D., Buchholz F., Huang Z., Goga A., Chen C., Brodsky F. M. , Bishop J. M. (2002)
Short RNA duplexes produced by hydrolysis with Escherichia coli RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells
Proc. Natl. Acad. Sci. **99**: 9942-9947
- Young L.E., Sinclair K.D., Wilmut I. (1998)
Large offspring syndrome in cattle and sheep
Rev. Reprod. **3**: 155-163
- Zbikowska H.M. (2003)
Fish can be first – advances in fish transgenesis for commercial applications
Transgenic Res. **12**: 379-389
- Zheng L., Liu J., Batalov S., Zhou D., Orth A., Ding S., Schultz P. G. (2004)
An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 135-140
- Zhou Q., Renard J.P., Le Fric G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi J. (2003)
Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation
Science **302**: 1179
- Zuelke K.A. (1998)
Transgenic modification of cows milk for value-added processing
Reprod. Fertil. Dev. **10**: 671-676