

ANIMALI TRANSGENICI : come si producono???

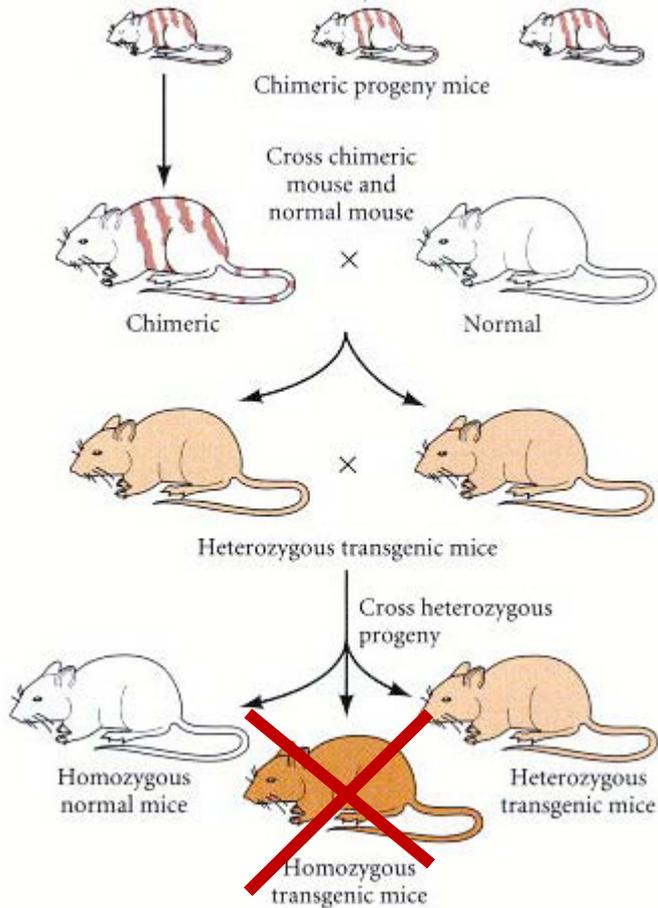
GFP



Vettori retrovirali
Microiniezione del DNA
Cellule staminali embrionali
Gene targeting/ gene trap
KO condizionali
Trasferimento del nucleo
YAC



KO costitutivi



Il limite principale dei topi transgenici KO per un gene e' la possibile mortalita' degli omozigoti durante lo sviluppo.
Soluzione : l'induzione della mutazione
tempo e tessuto specifica



Utilizzo di YAC per produrre TOPI TRANSGENICI

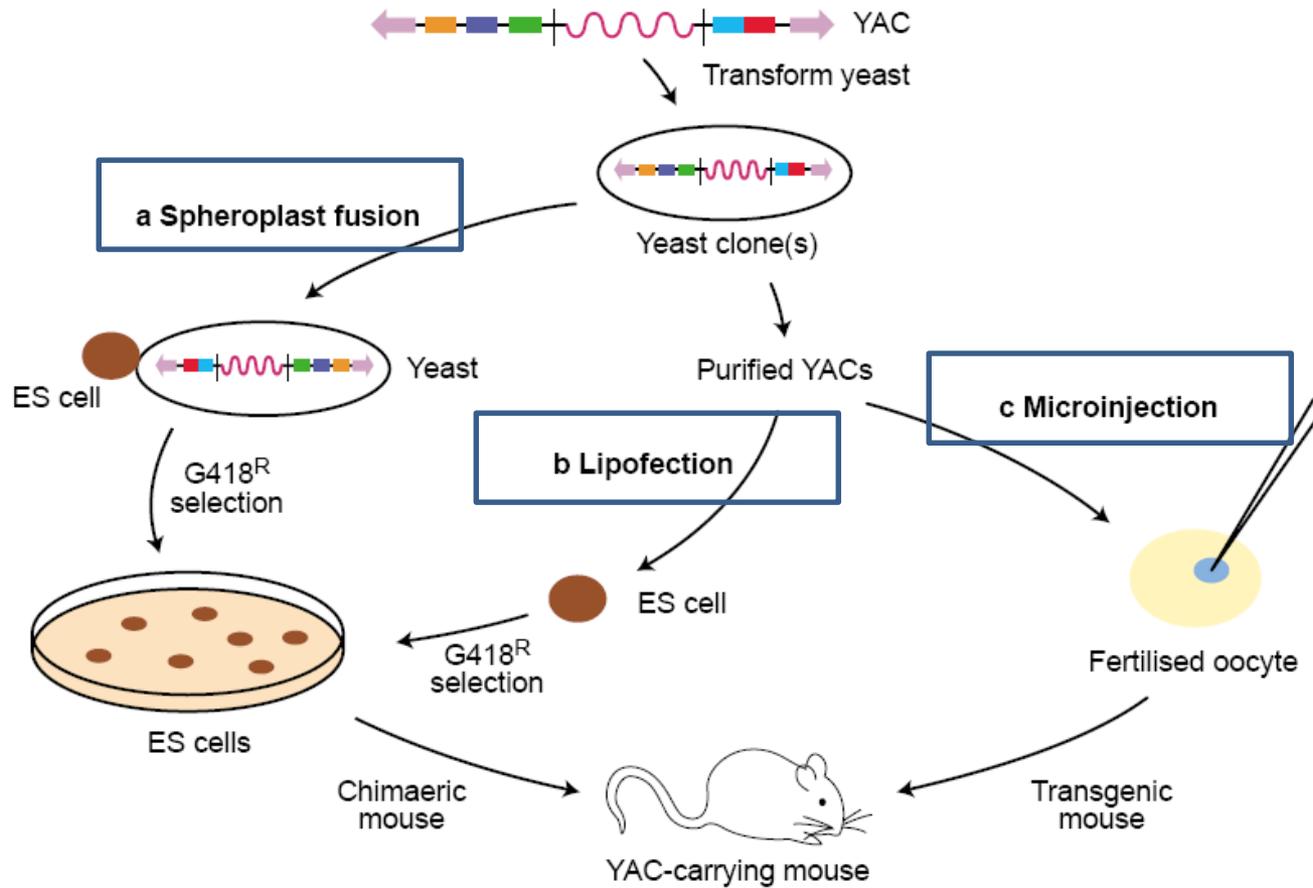
1995 Lamb e Gearhart

YAC (Yeast Artificial Chromosome) x produzione di topi transgenici

UTILIZZATI per TRASFERIRE GENI di grandi dimensioni
300-1000Kb

COME SI TRASFERISCE uno YAC nel TOPO?

- 1) Fusione di **SFEROPLASTI** (cellule Lievito senza parete) + cellule ES (rischio di contaminazione con genoma Lievito)
- 2) Purificazione di YAC (separato per elettroforesi) + **microiniezione** nel pronucleo (se YAC non ha dimensioni grandi, altrimenti si frammenta)
- 3) Trasferimento di YAC nelle ES tramite **LIPOSOMI** (vescicole lipidiche artificiali per fusione con membrana)



Generation of YAC-transgenic mice

KO condizionali

Il sistema cre-lox

1995 K Rajewsky published the [Science](#) article “Inducible gene targeting in mice”(Cre-loxP, conditional knockout).

Sistema che è alla base:

meccanismo di ricombinazione del fago P1 con i siti Lox e la ricombinasi Cre.

Si possono ottenere dei mutanti che perdono la regione voluta solo attivando la **ricombinasi Cre.**

Si devono costruire dei vettori con la regione genetica da eliminare con siti Lox all'esterno

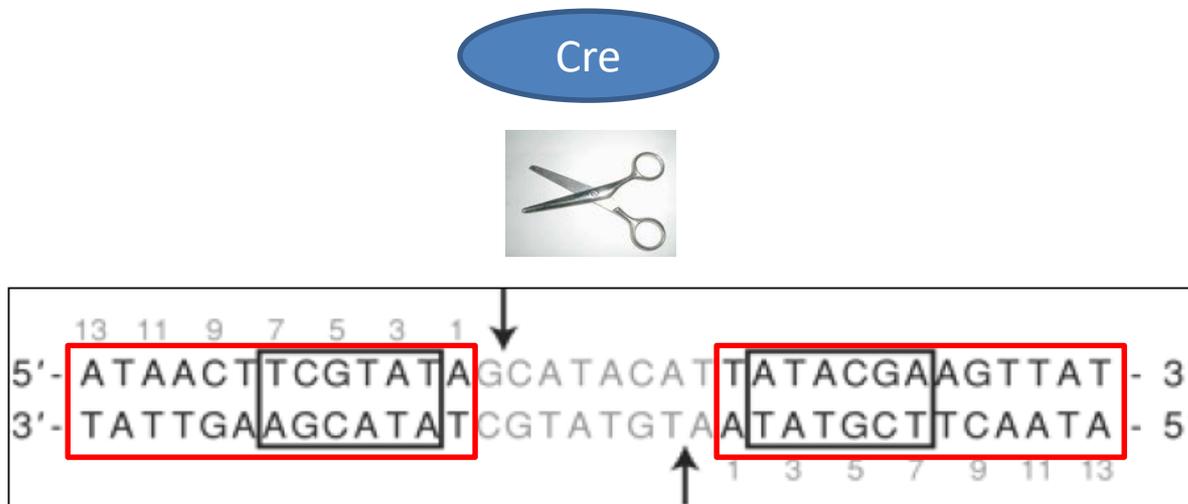
Con questa strategia si possono ottenere topi transgenici per geni che sono letali in fasi diverse e soprattutto con l'espressione della ricombinasi Cre tessuto specifica, si può far avvenire il knock-out del gene solo in particolari tessuti dove si esprime o dove si induce Cre.

SISTEMA CRE-LOX

Sistema di RICOMBINAZIONE del fago P1

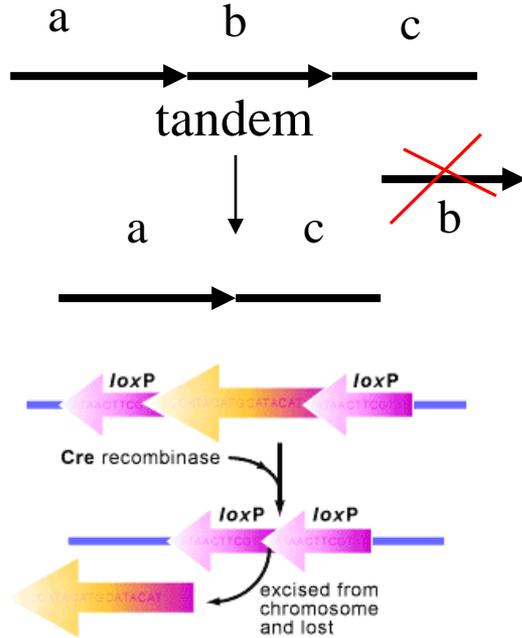
CRE: ricombinasi specifica (permette la ricombinazione tra siti Lox)
cyclization recombination

LoxP: locus di crossover (2 seq palindrome di 13bp + regione centrale di 8nt)
locus of X-over P1

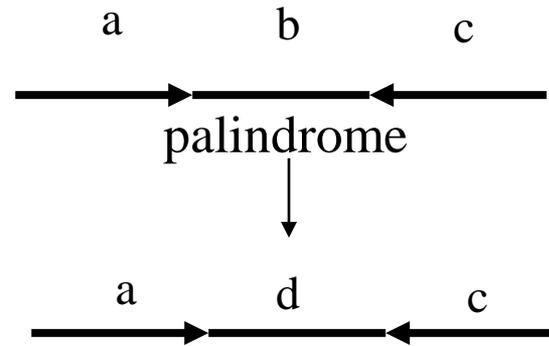


LoxP "attira" la ricombinasi CRE la quale ricombina le seq di DNA adiacenti

DELEZIONE

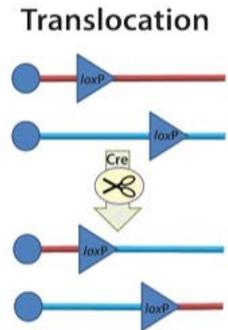
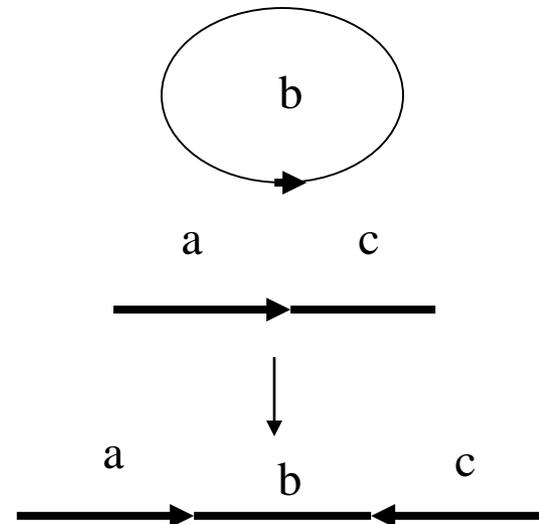


INVERSIONE



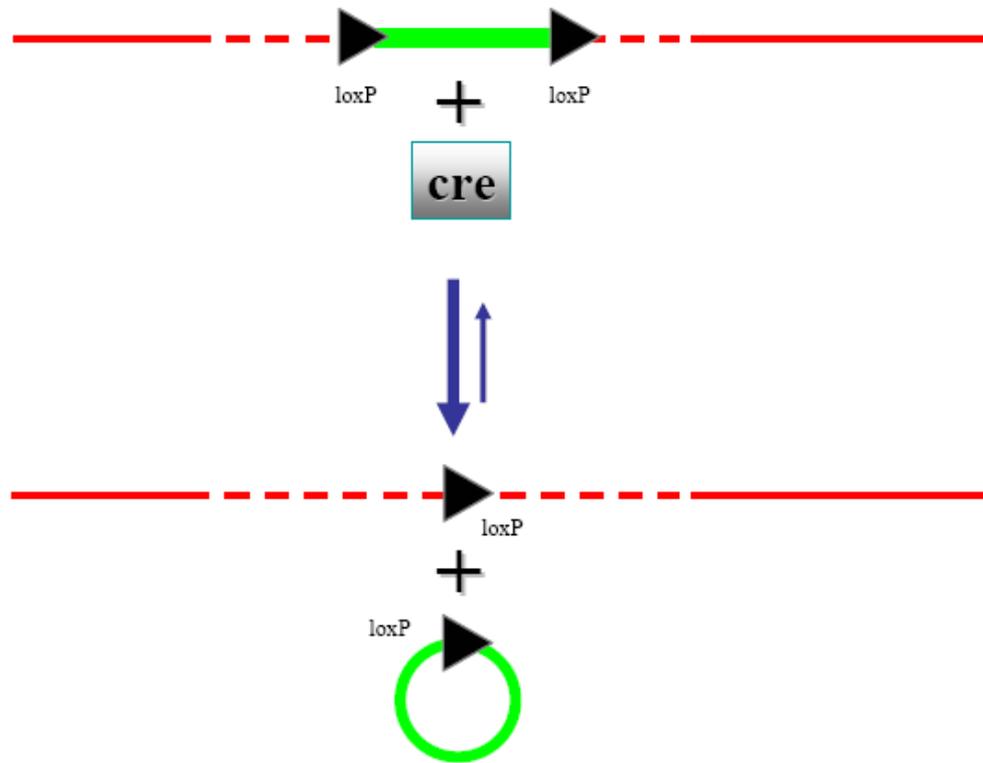
Ma puo' revertire!
Non utilizzato per topi transgenici

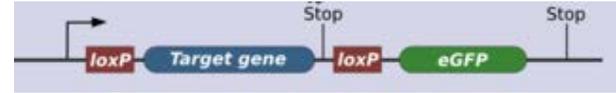
INTEGRAZIONE



- DELEZIONE** se sono in tandem
- INVERSIONE** se sono palindrome
- INTEGRAZIONE** se c'è un elemento in un plasmide, e l'altro nelle seq di integrazione

Cre-LoxP DNA recombination

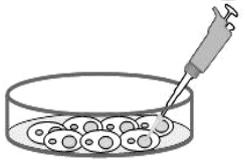




Creation of a Cre-expressing Transgenic Mouse by Microinjection



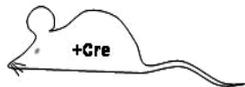
Super ovulate female donor and harvest single-cell embryos



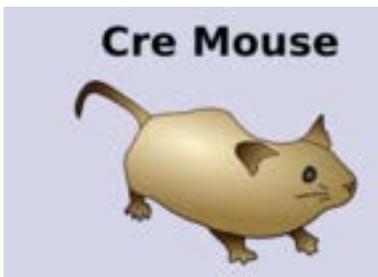
Microinject pronucleus of each single-cell mouse embryo with Cre expressing transgenic DNA construct



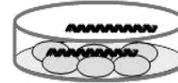
Implant single-cell mouse embryos with DNA construct into pseudopregnant female



Birth of a transgenic founder offspring that will be bred to obtain a line of transgenic mice that express Cre



Creation of a Floxed Mouse by Homologous Recombination



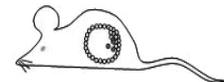
Introduction of DNA targeting construct into embryonic stem (ES) cells by electroporation



Selection of ES cells containing the DNA targeting construct



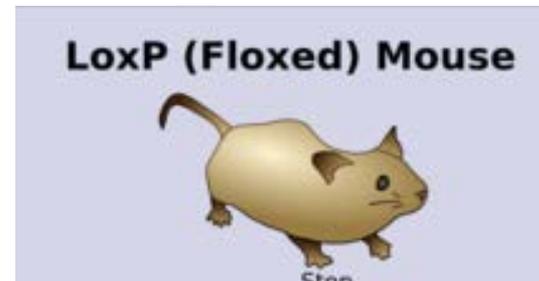
Implantation of selected ES cells into normal blastocyst (usually the ES cells are of a different genetic background than the blastocyst e.g., 129 ES cells in a C57B6 blastocyst)



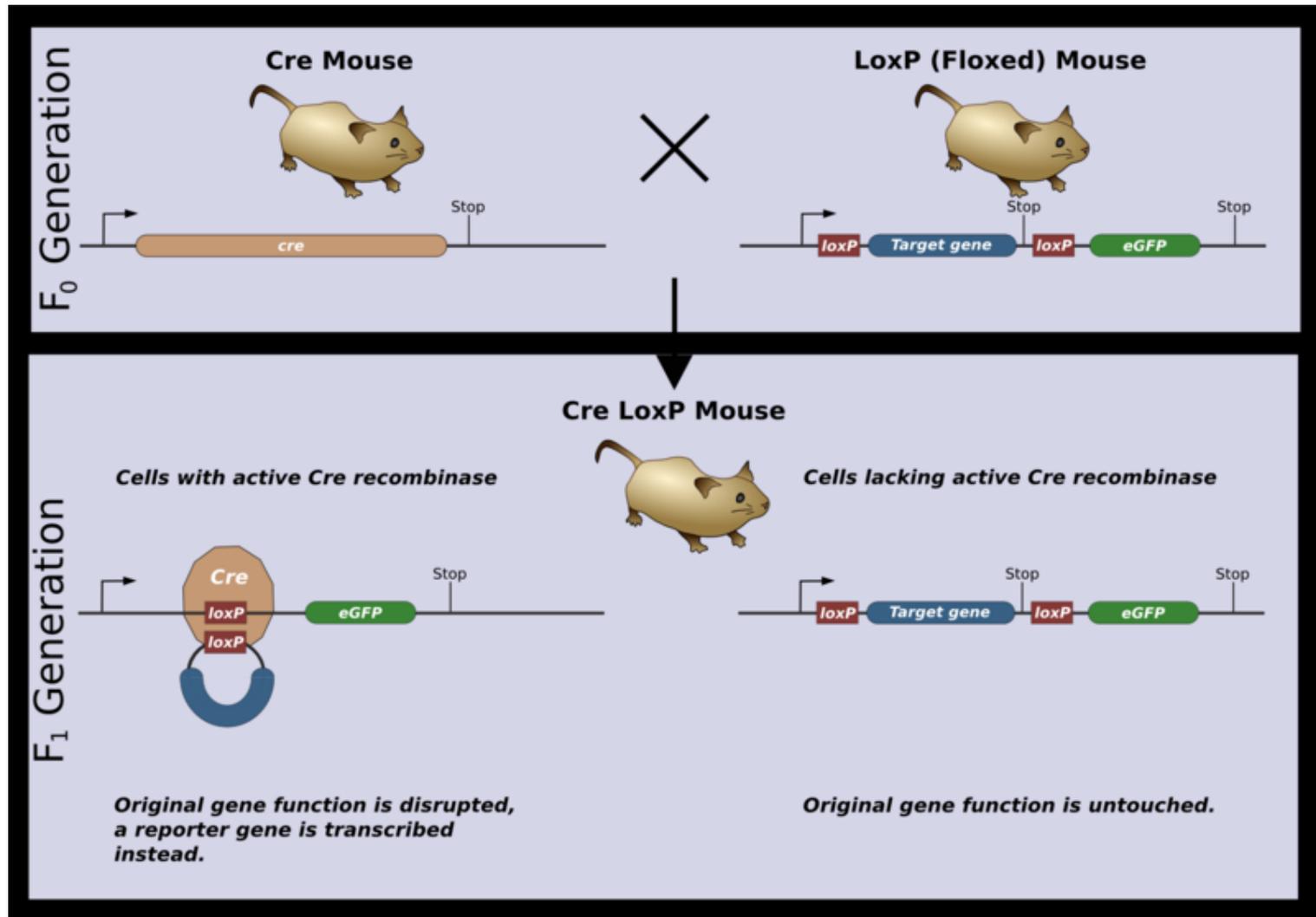
Implantation of chimeric blastocyst into pseudopregnant female



Birth of a chimeric offspring which will be bred to verify germ-line transmission and to obtain a line of mice with the targeted floxed gene



UTILIZZO SISTEMA CRE-LOX



siti LoxP derivano da fago P1 (non esistono nel genoma animale/vegetale)
quindi non possibilità di ricombinazione in altri siti del genoma

Il SISTEMA Cre-LoxP permette il controllo dell'espressione genica
nello SPAZIO e nel TEMPO



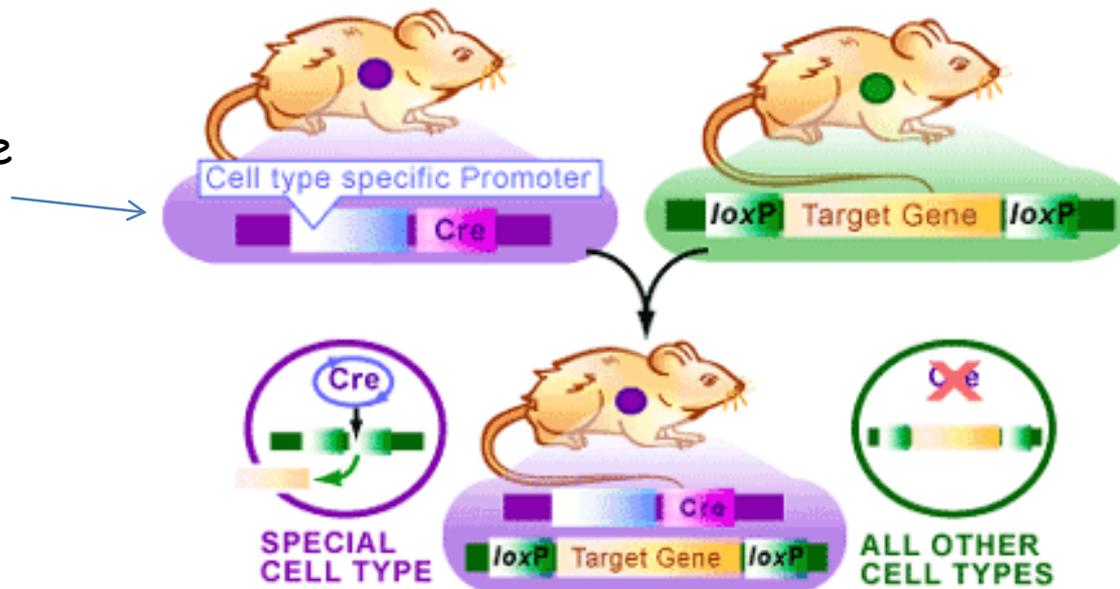
Utilizzo di un PROMOTORE
TESSUTO SPECIFICO



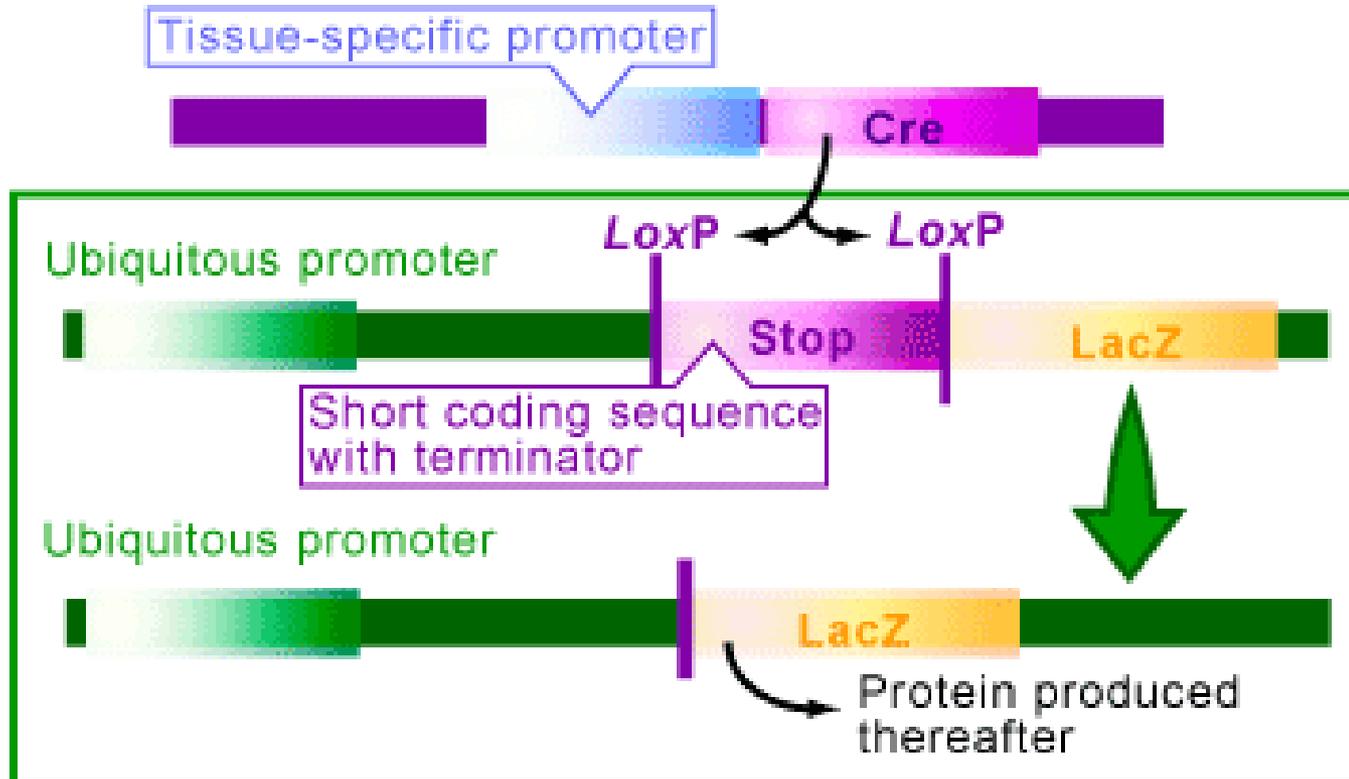
Utilizzo di un PROMOTORE
-dipendente dallo STADIO di SVILUPPO
-INDUCIBILE

DELEZIONE di un GENE **TESSUTO SPECIFICA** (spazio)

Promotore
attivo in cellule
nervose

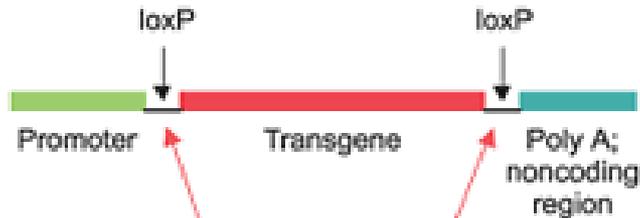


ESPRESSIONE di un GENE TESSUTO SPECIFICA (spazio)



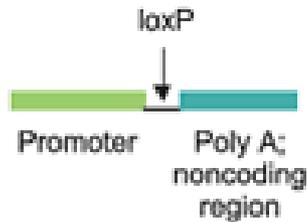
DELEZIONE/KO programmabile

A) Cre/loxP recombination system: Loss of function



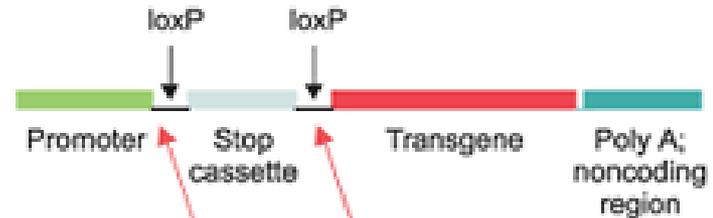
Espressione di Cre regolata nel TEMPO/SPAZIO

Cre recombinase



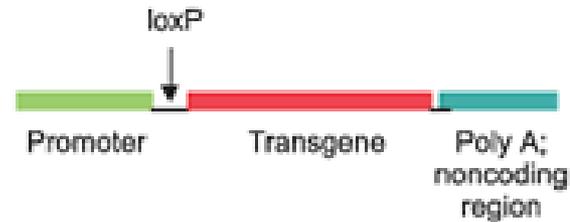
ESPRESSIONE/K-IN programmabile

B) Cre/loxP recombination system: Gain of function



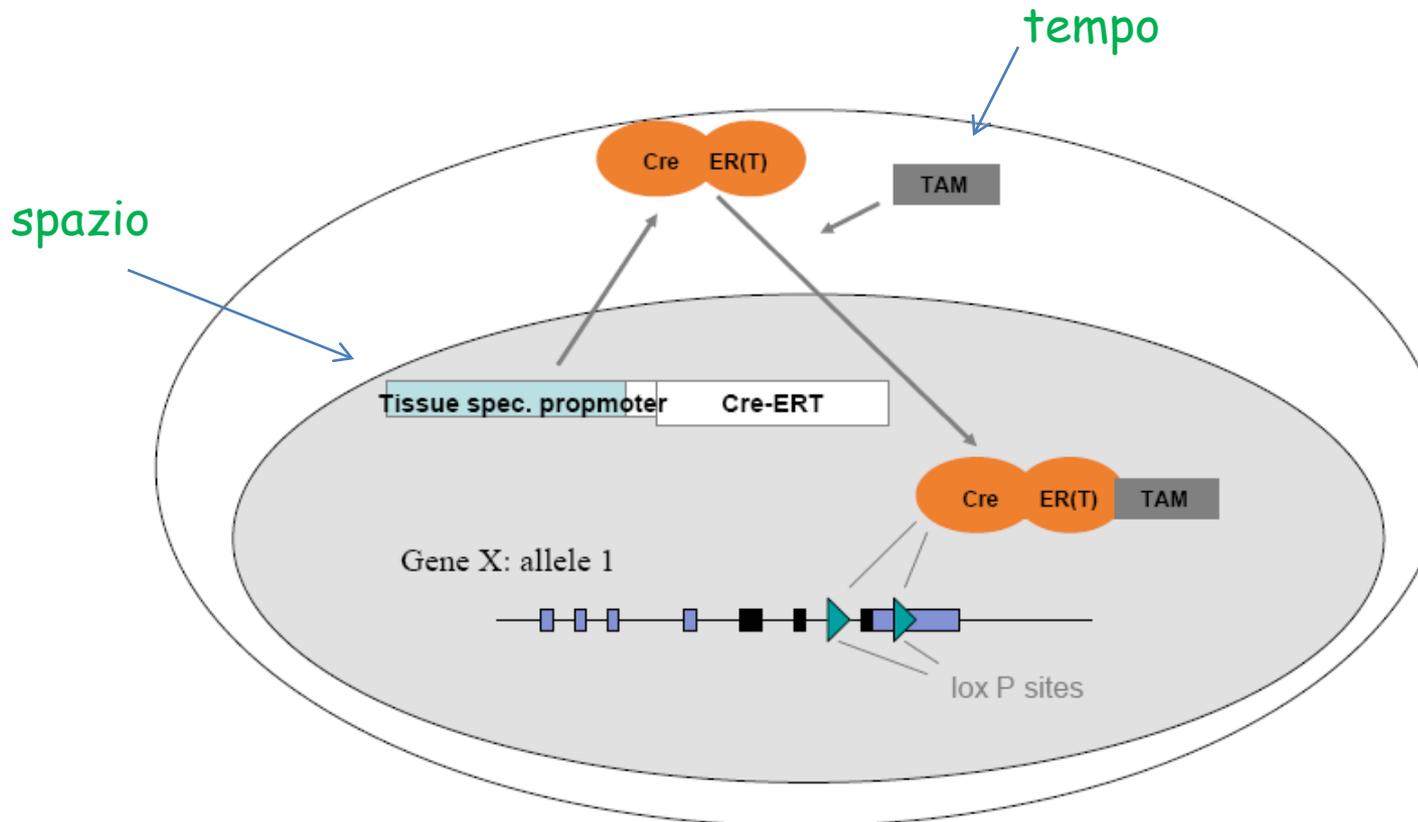
Espressione di Cre regolata nel TEMPO/SPAZIO

Cre recombinase

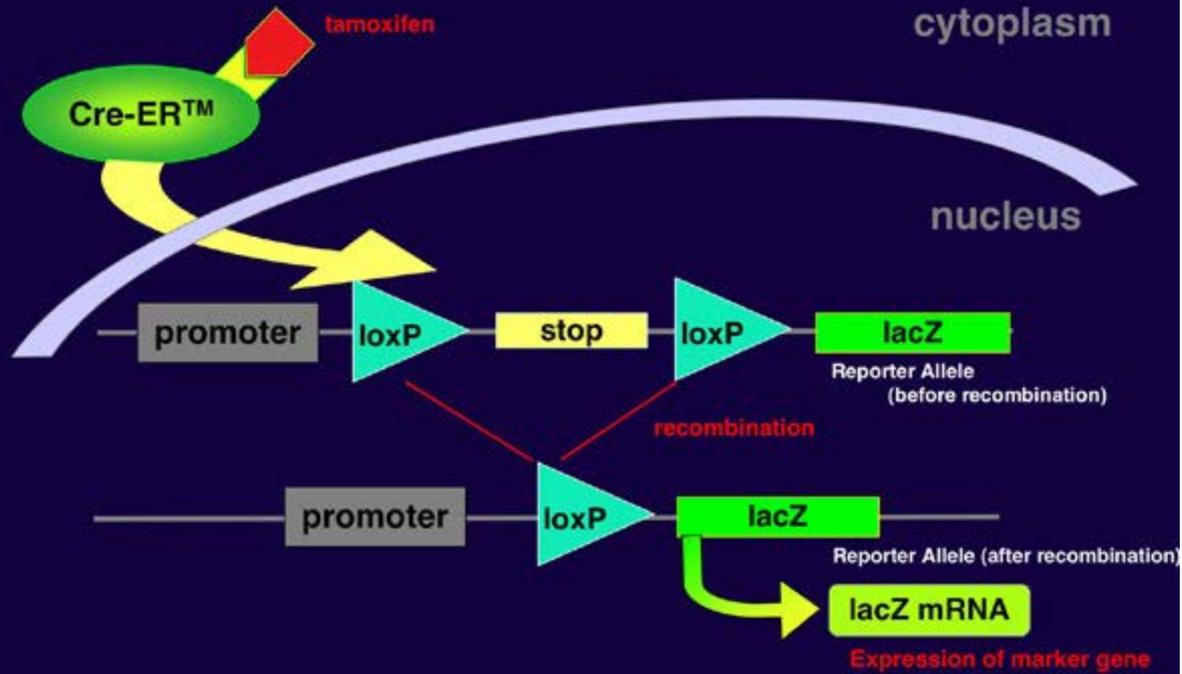


ESPRESSIONE/DELEZIONE di un GENE INDUCIBILE (tempo/spazio)

Sono state prodotte proteine di fusione tra Cre e ER(T) (recettore estrogeni)
La ricombinasi è confinata nel citoplasma finché non viene somministrato l'ormone sintetico (TAMoxifene) che riconosce il recettore e fa traslocare la proteina di fusione con la ricombinasi nel nucleo dove induce la delezione del frammento incluso tra i due siti LoxP



The CreER/ loxP System



SISTEMA TET-ON/TET-OFF

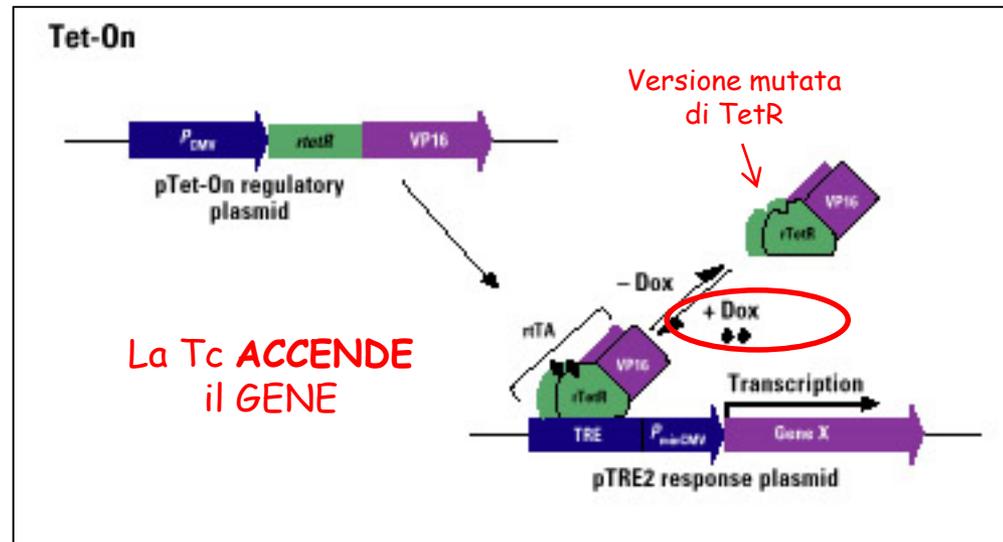
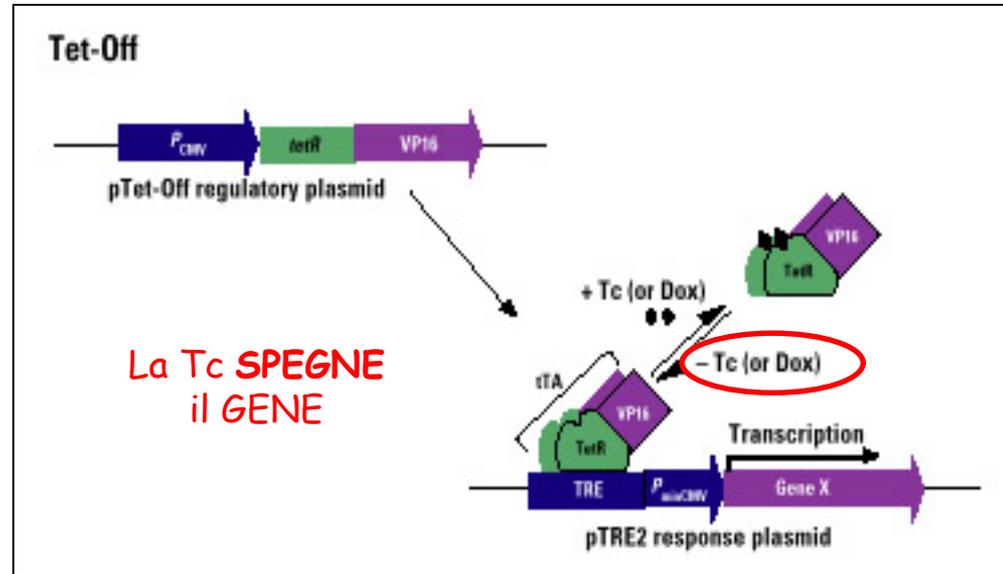
Sistema che deriva da
Operone Tet E.Coli
(se c'è tetraciclina, si attivano
geni per la resistenza alla Tc)

Sistema a 3 elementi:

Tet-Repressor: repressore
della trascrizione

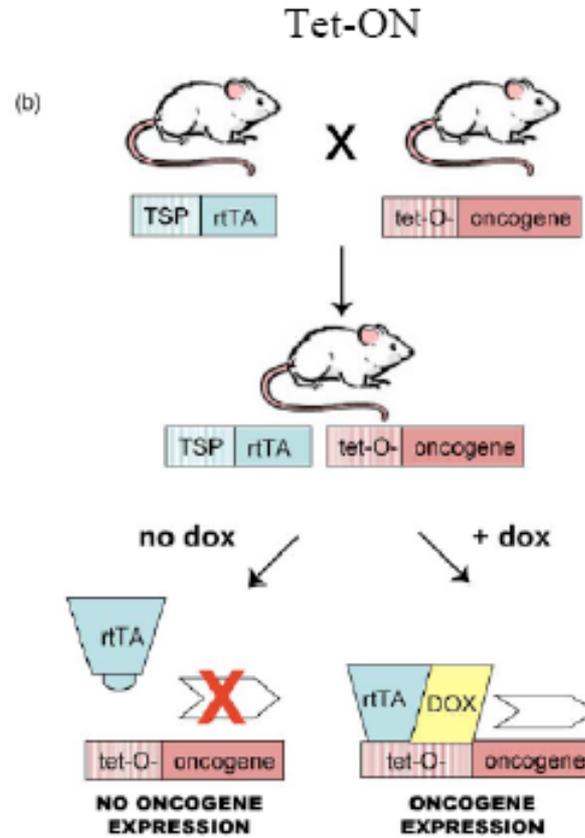
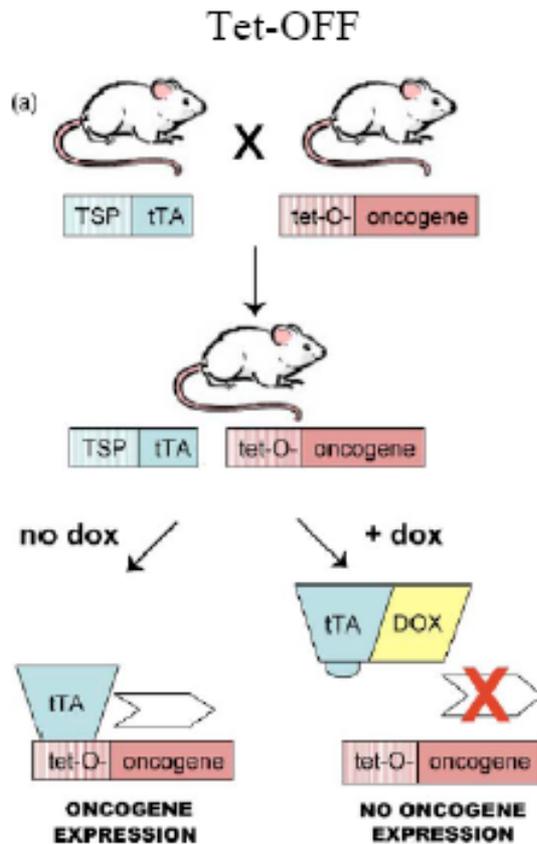
Tc/Dox: tetraciclina

TRE: tetracycline response element



La Tc **SPEGNE**
il GENE

La Tc **ACCENDE**
il GENE



TRASFERIMENTO DEL NUCLEO → clonazione

Il trasferimento nucleare è una tecnica che permette di sostituire il genoma di una cellula con quello derivante da un'altra.

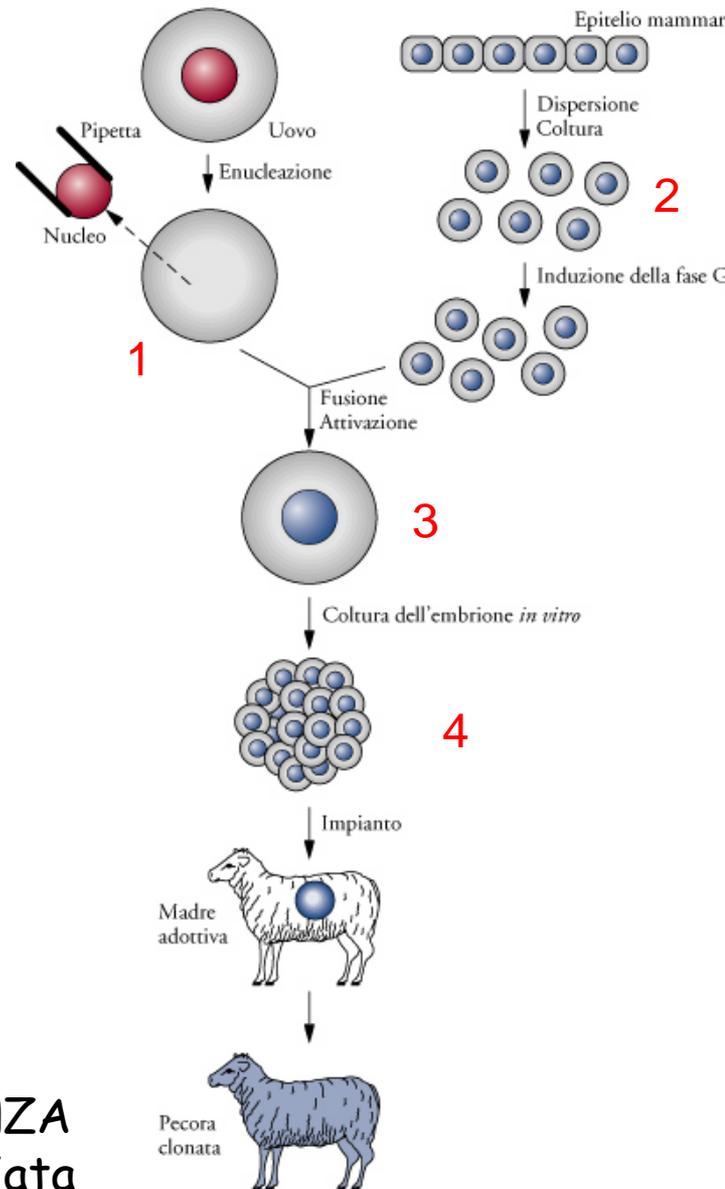
Viene utilizzata per generare animali clonati partendo da cellule di un individuo adulto.

Wilmot e collaboratori 1997

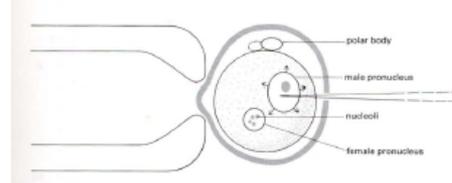
Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line.

- 1) Si allontana il NUCLEO di un ovulo
- 2) Si coltivano le cellule epiteliali adulte (GO)
- 3) Si fondono nucleo GO + ovulo enucleato
- 4) Uovo rinucleato in crescita in coltura/ovidotto
- 5) Embrione si impianta nella madre adottiva

Pecora Dolly: prima dimostrazione della TOTIPOTENZA del nucleo di una cellula di individuo adulto differenziata



Pronuclear injection to make transgenic mouse



Foreign DNA injected is a construct/vector containing:

- full coding sequence of the gene of interest
- promoter determining tissue specificity & strength of expression

* Site of integration of injected DNA into genome is **random!**

* Number of copies of injected DNA into genome is **random!**
single insertion - tandem (>100) array

range of foreign gene expression
range of phenotypes

Cloning
(Ultimate transgenesis)

VIDEO



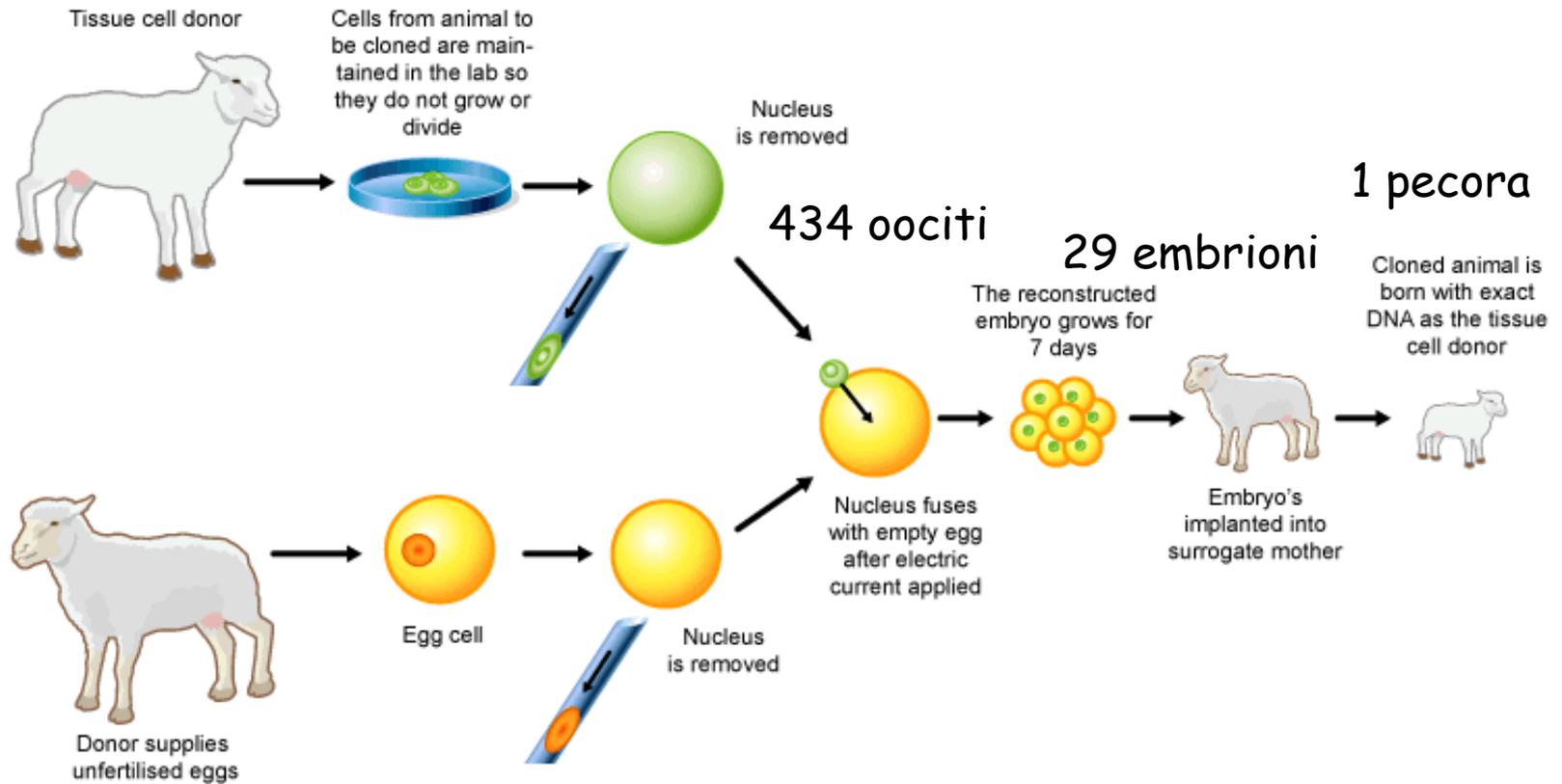
transfer of a complete "somatic cell nucleus"

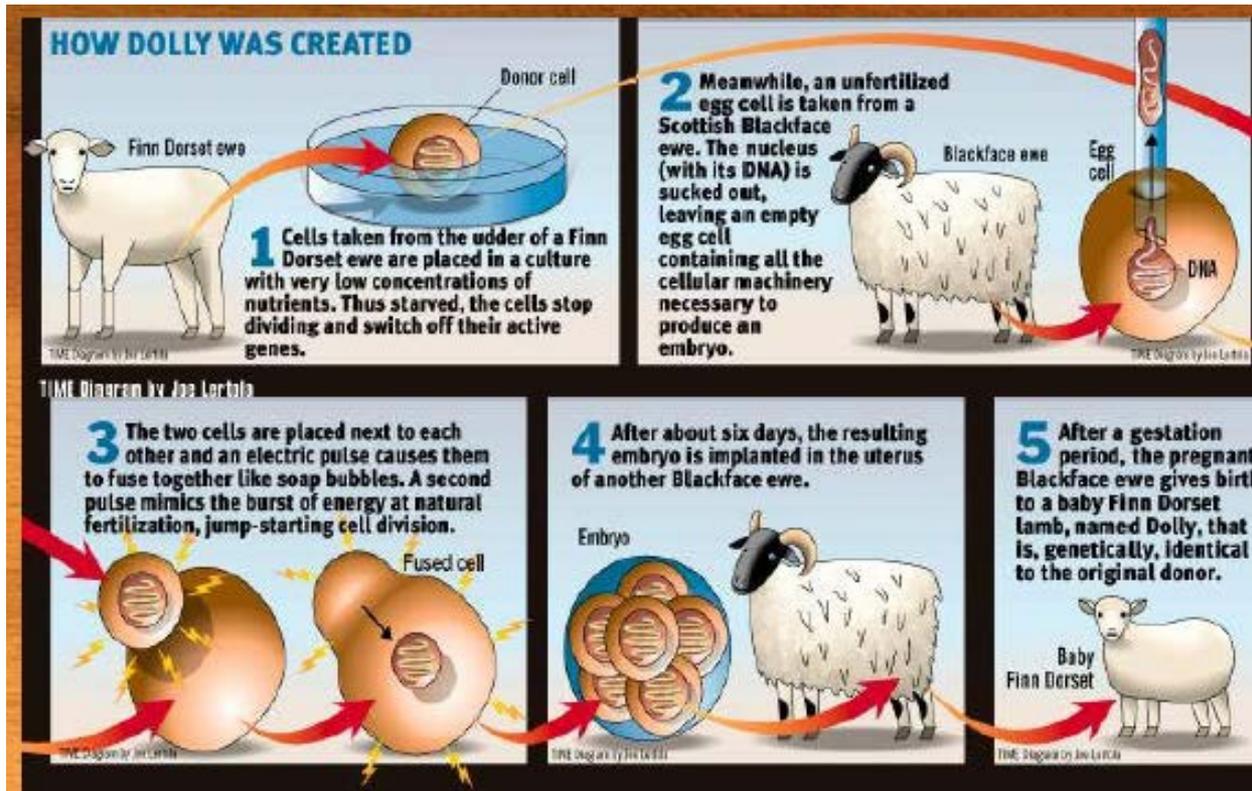
Con la tecnica del TRASFERIMENTO del NUCLEO
di CELLULE SOMATICHE
(SCNT)
si creano dei CLONI

In Natura: CLONE → GEMELLI identici
in seguito a riproduzione sessuale
stesso DNA mitocondriale

In Laboratorio: CLONE → chi dona il nucleo/chi riceve il nucleo
utilizzo tecnica SCNT
DNA mitocondriale differente

CLONAZIONE per TRASFERIMENTO NUCLEARE: efficienza bassissima!



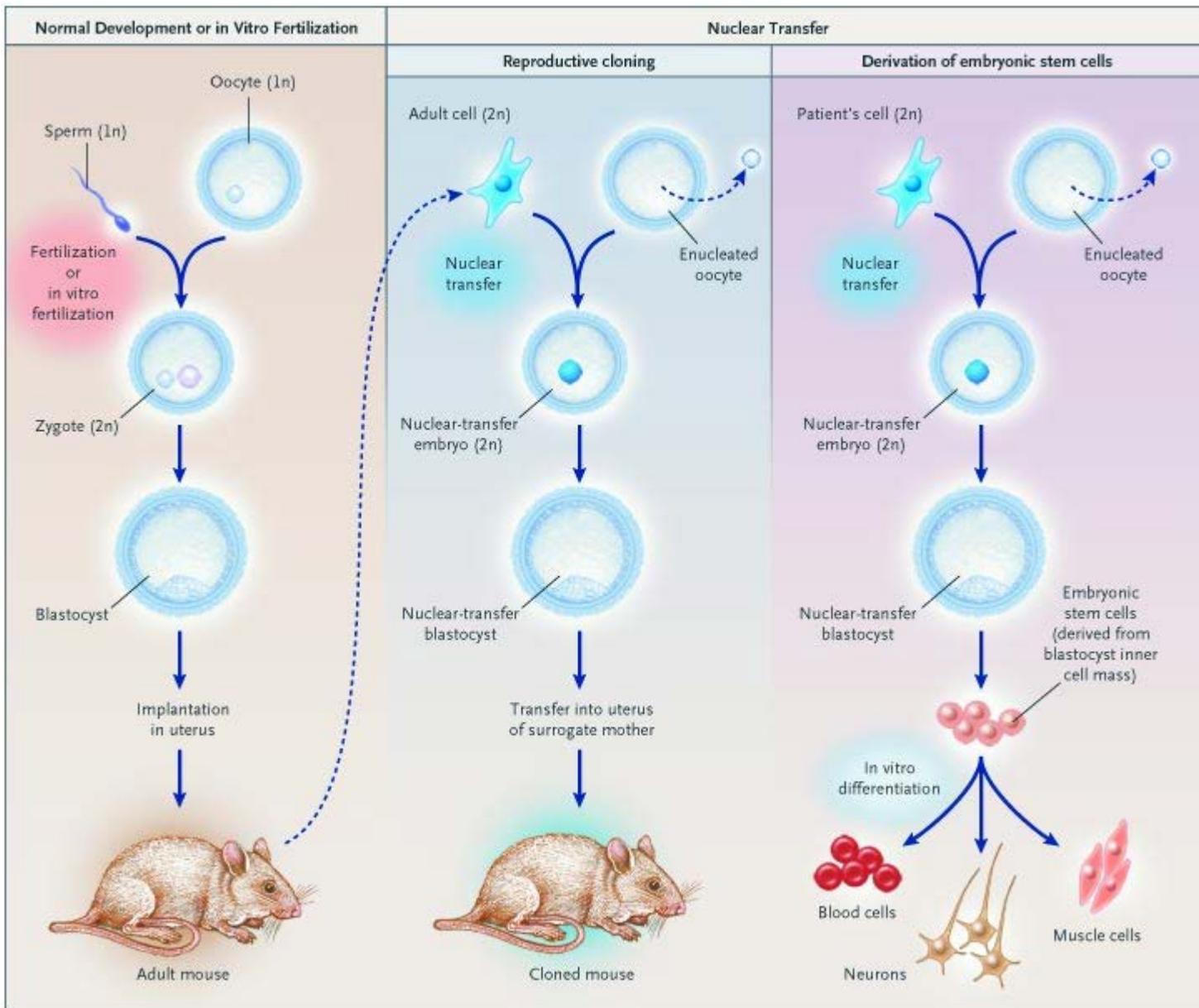


IL NUCLEO DI UNA CELLULA SOMATICA ADULTA E' STATO RIPROGRAMMATO ORIGINANDO UN INDIVIDUO ADULTO.

GLI ANIMALI CLONATI...SONO SANI???

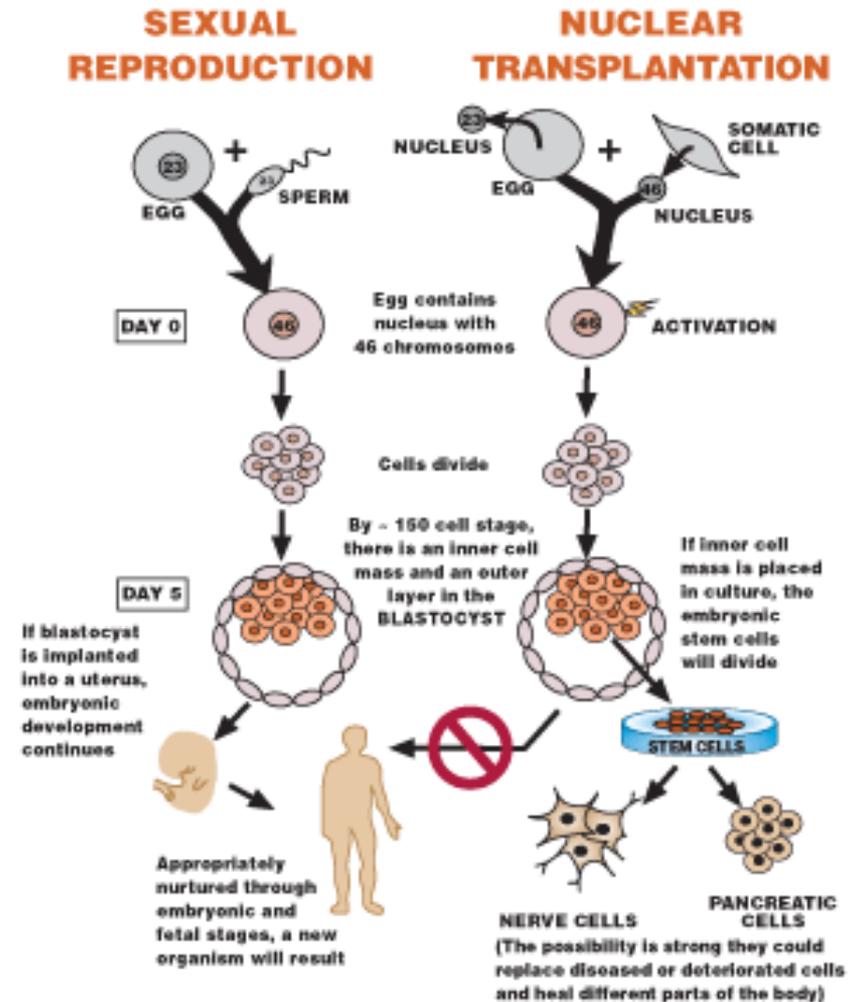
Table 1 Summary of the pathologies described in cloned fetuses and offspring

Species	Type of embryo manipulation	Embryo loss	Gestation length	Placental abnormalities	Fetal size	Respiratory/cardiovascular dysfunction	Organ dysplasia	Perinatal mortality	Post-natal development
Cow	Nuclear transfer	High	Prolonged	Common	Increases	Common	Common	Raised	Altered
	Other	High	Prolonged	Common	Increases	Occasional	Occasional	Raised	Altered
Sheep	Nuclear transfer	High	Prolonged	Common	Increases	Common	Common	Raised	Altered
	Other	High	Prolonged	Common	Increases	-	Occasional	Raised	Altered
Goat	Nuclear transfer	High	Prolonged	None observed	Normal	No	No	Normal	Normal
	Other	High	Normal	None observed	Normal	No	No	Normal	Normal
Pig	Nuclear transfer	High	Prolonged	None observed	Reductions	Occasional	Occasional	Raised	Altered
	Other	High	Normal	None observed	Reductions	No	No	Raised	Normal
Mouse	Nuclear transfer	High	Caesareans	Common	Altered	Common	-	Raised	Altered
	Other	High	-	-	Reduced	-	-	-	Altered

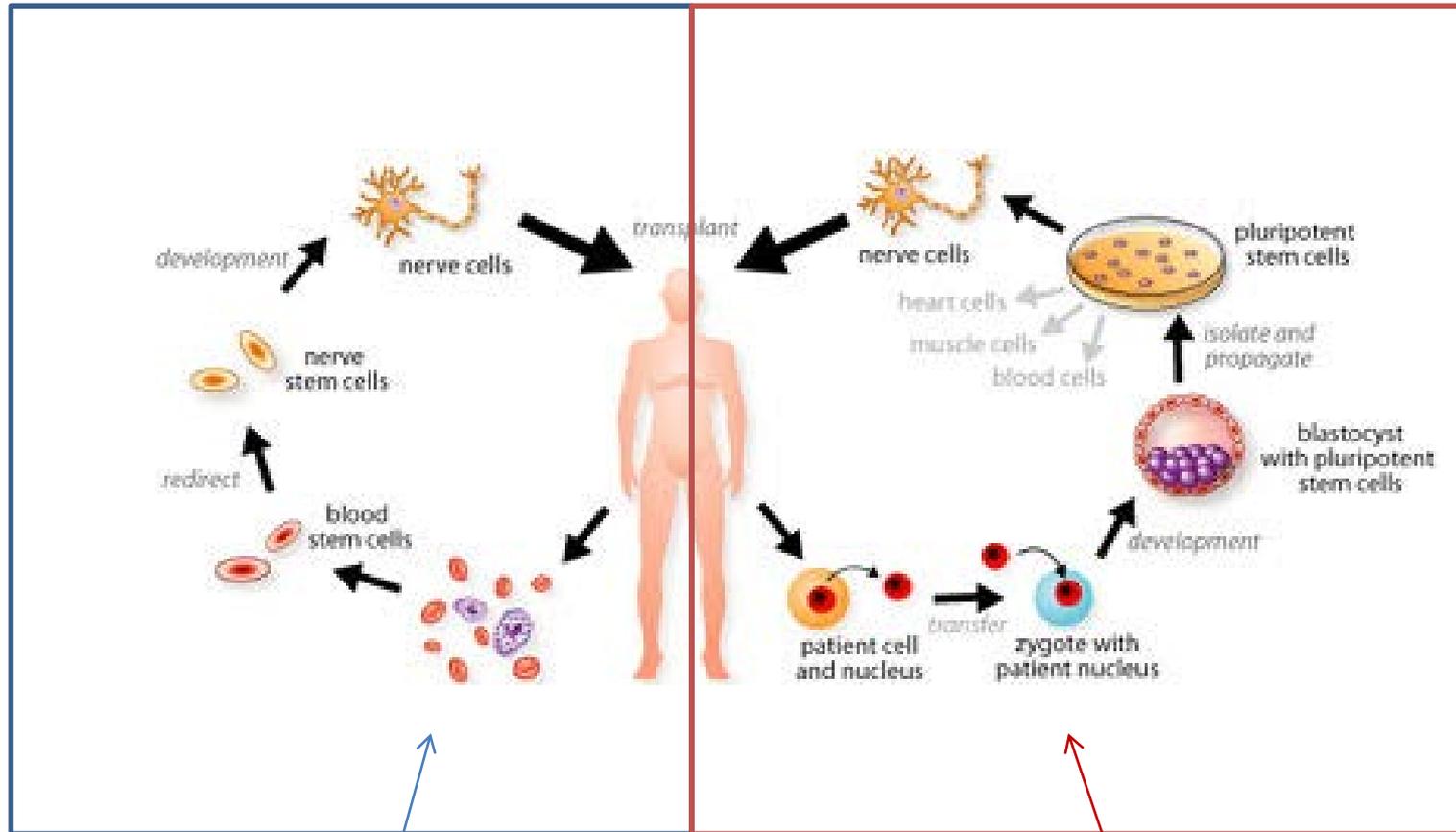


TRASFERIMENTO DEL NUCLEO NELL'UOMO (generazione ESC autologhe → TRAPIANTO)

SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER "The nucleus of an unfertilized egg is replaced with the nucleus from a somatic cell, such as a skin cell, from the patient who will ultimately be transplanted with the appropriate differential cells. It becomes a structure that looks similar to—but is very different from—a blastocyst produced by a sperm and an egg. Within it are embryonic stem cells but—and this is critical—they are unable to undergo the genetic reprogramming that, after sexual reproduction, permits the development of a healthy baby. And these SCNT-generated embryonic stem cells (ESC) have nothing to do with products of abortion and nothing to do with a sperm fertilizing an egg." Because the cells produced by SCNT contain the patient's own DNA, there is a strong possibility that they will not be rejected after transplantation, even without the use of anti-rejection medication with its severe side-effects.



TRAPIANTO con cellule AUTOLOGHE



Cellule staminali ADULTE

SCNT