

LEZIONE 19 - ZEBRAFISH 2.0

Nella scorsa lezione stavamo parlando di come sia possibile modificare il genoma dell'organismo e abbiamo visto un paio di approcci che aiutano ad aumentare l'efficienza di integrazione del transgene all'interno del genoma del nostro animaletto. (la meganucleasi e il trasposone di Medaka)

Un altro approccio per rendere il processo il più efficiente possibile è quello del Knock-down, che si applica benissimo a zebrafish in quanto modello animale per sperimentazioni anche in vivo. Sappiamo che knock-in e knock-out sono delle modificazioni a carico del genoma in punti specifici, Ora noi possiamo in un certo qual modo ottenere passate "lo stesso risultato" senza andare a toccare il genoma, perché noi possiamo iniettare in sistemi come lo zebrafish appunto, ma lo potrebbe fare anche a cellule in coltura così come ad altri modelli che possono essere manipolabili abbastanza facilmente.

Potete utilizzare l'approccio dell'Oligo-antisense: quello che si fa è di iniettare degli oligomeri antisense che vanno a targhettare in modo specifico il messaggero di interesse. Vuol dire andarlo a sfruculiare, nel senso che ci appiccichiamo a lui e gli impediamo di fare il suo lavoro. Quindi noi cosa possiamo fare? possiamo studiarci questi oligomeri che sono dei singoli strand e iniettarli all'interno dello oocita fecondato, questa quantità di molecola nucleotidica antisense, che è diretta contro il messaggero di interesse andrà a distribuirsi equamente, man mano che il nostro pesciolino si sviluppa e produce sempre più blastomeri. Andrà a riconoscere il messaggero di interesse deve essere presente silenziandolo in modo tale che noi alla fine della giornata otterremo la assenza della proteina corrispondente al gene di interesse pur senza aver toccato in alcun modo il genoma. Guardiamo un'immagine, in alto vedete il doppio strand del DNA corrispondente al gene che vogliamo andare a knockare-down e subito sotto vedete il messaggero che si produce da quel gene. Noi facciamo un oligomero antisense di circa 25 nucleotidi che riconosce in modo specifico la regione nell'intorno della ATG. Il nostro nucleotide è assolutamente complementare per poter funzionare con una questione di stabilità e di energia libera del sistema deve interagire il più possibile con il messaggero. Interagire perfettamente quel messaggio vuol dire formare il legame idrogeno in modo opportuno sapete che ogni legame idrogeno stabilizza il sistema per un importo pari a 7 kcal/mole, ma senza andare nel dettaglio della nostra chimica organica, ma il sistema in questo modo è molto più stabile e l'energia libera è molto più bassa. Cosa succede in questa situazione? Succede che i ribosomi arrivano e sbattono la testa contro questo complesso perché è un complesso molto stabile il ribosoma non può scorrere e non traduce il messaggero alla fine della fiera avete l'assenza della proteina di interesse. Il motivo per cui non viene espresso è l'ingombro sterico. Questa situazione è replicabile in un altro modo: invece di fare un morpholino che va a targhettare la regione della ATG, voi lo potete usare per targhettare le regioni di splicing all'interno dell'RNA eterogeneo nucleare. L'RNA in questo caso è l'equivalente del gene con introni ed esoni e che deve essere processato, se voi piazzate un morpholino in una giunzione a cavallo tra introne ed esone impedisce allo spliceosoma di agire correttamente, quindi alterate il

messaggero maturo che viene fuori. Quindi potete fare dei giochini tipo inserire piuttosto che deletare esoni quindi far saltare via dei domini della proteina, ma non entriamo nei dettagli. Questa è una metodica estremamente rapida perché voi eravate in una mattina di iniezioni. Si può studiare lo sviluppo e analizzare le patologie. La problematica di questo approccio è ovviamente che ci troviamo in una situazione transiente, cioè man mano che il nostro pesciolino si sviluppa produrrà sempre nuove cellule, che si spartiranno in modo equo il morpholino, fino a che la spartizione sarà tale e tanta che ogni cellula erediterà una micro quota di morpholino o addirittura più niente, quindi l'effetto di questo tipo di approccio possiamo considerarlo valido fino a 4-5 giorni. Dopodiché la diluizione è tale e tanta che non avremo più effetti ma attenzione tutti gli effetti che abbiamo sul sito durante le prime fasi dello sviluppo sono assolutamente visibili, quindi voi potete senza imbarcarvi in una modificazione del genoma che mi prenderebbe molto molto più tempo potete imbarcarvi in questo tipo di approccio e ottenere dei risultati in modo molto rapido. Ovviamente questo approccio non sostituisce la vera manipolazione del genoma però in grado di non avere risultati molto interessanti e escludere o includere una serie di possibilità, cioè sulla base di quello che vedete dopo aver operato in questo modo potete decidere se imbarcati o meno in una vera manipolazione genica. Piccola parentesi questo tipo di approccio intransiente che abbiamo visto essere fatto con l'intenzione di Down regolare l'espressione di gene possiamo farla al contrario, cioè se io voglio vedere qual è l'effetto dell'overespressione di un gene non faccio che iniettare, anziché un oligomero antisense contro il messaggero, il messaggero sintetico. Quindi anziché down regolare l'espressione del gene anziché portare giù la quantità di proteina a disposizione io l'aumento rispetto alla condizione fisiologica iniettando il messaggero sintetico. Anche qui il messaggero sintetico si distribuirà in tutte le cellule e tutte le cellule overesprimeranno il gene. Adesso facciamo una cosa ancora più intrigante immaginiamo di voler vedere e stare nello zebrafish qual è l'effetto di una mutazione che sospettiamo possa indurre nell'uomo una patologia, allora andiamo a innanzitutto a vedere se c'è l'ortologo del gene, cioè la copia evolutivamente conservata del gene che abbiamo nell'uomo anche nello zebrafish, questo è molto probabile, anzi a volte sono addirittura due. Cosa possiamo fare? Andiamo a vedere se trovo l'ortologo, vediamo cosa succede al pesce quando noi blocchiamo l'espressione del gene endogeno col morpholino. Quindi iniettiamo il morpholino e lo silenziamo e cosa succede se insieme al morpholino iniettiamo il messaggero codificante per la proteina di interesse che reca la mutazione. Noi ci troviamo in una situazione nella quale il pesce non avrà più il gene endogeno espresso perché gli abbiamo buttato dentro il morpholino, che blocca la produzione della proteina quindi l'embrione si trova senza la proteina necessaria, ma gli forniamo anche il messaggero per recuperare questa proteina, quindi la proteina ci sarà, ma funziona o meno perché gli avevo messo dentro la mutazione? Vediamo cosa succede nel pesce, vediamo se possiamo in qualche modo ricapitolare quello che succede nell'uomo. Quindi sulla base di questi esperimenti che possiamo considerare preliminari ovviamente, perché non possiamo prescindere poi dalla andare a manipolare direttamente il genoma, perché abbiamo bisogno di una situazione transiente, però a fronte di questi dei dati ottenuti in modo

transiente possiamo ottenere sicuramente una piattaforma un po' più sicuro, un po' più solida dalla quale tuffarci verso nuovi orizzonti. Ok ora abbiamo deciso che i nuovi orizzonti sono solo quello che noi vogliamo andare a guardare, perché abbiamo deciso che sulla base del del transiente abbiamo dei bellissimi preliminari che ci inducono ad andare a vedere un qualcosa nello specifico, ricordiamoci quello che abbiamo detto l'altra volta lo zebrafish è uno di quegli animali in cui è stato sequenziato l'intero genoma, quindi noi apriamo un qualsiasi sito che contenga i database dei genomi e troviamo quello di zebrafish, quindi se a noi interessa andare a vedere qual è l'effetto di una down regolazione, abbiamo per espressione transiente è fondamentale avere la sequenza. Se io voglio fare un morpholino devo conoscere la sequenza del messaggero contro il quale questo morpholino deve essere diretto, stessa cosa per overesprimerlo. Questa conoscenza è necessaria anche per andare a fare una genome editing, cioè modificare il gene o una regione di interesse direttamente nel genoma. Qual è il concetto fondamentale di quando noi vogliamo andare a modificare il genoma? Vogliamo fare un KO, cioè vogliamo distruggere un gene. Per fare questa cosa è fondamentale portare in corrispondenza della regione del gene, che sia il promotore che sia la codificante, una nucleasi, cioè una proteina che è in grado di fare dei tagli, è una forbice molecolare. Questa noi la possiamo portare nel punto di interesse in molti modi differenti. In questa slide la forbice molecolare nei primi due casi quantomeno si chiama Fok1, è una forbice molecolare che per agire deve essere presente in due copie, una su un filamento è una sull'altro. Per portare questa Fok1 in situ, cioè nel punto in cui vogliamo indurre la mutazione possiamo usare degli approcci che solitamente prevedono la costruzione di proteine di fusione, che portano al loro estremo la forbice molecolare e a monte dei domini che sono in grado di riconoscere la sequenza di DNA di nostro interesse.

Questi approcci sono per esempio le Zinc Finger piuttosto che le TALEN, sono degli approcci che si basano su proteine che troviamo in natura perché queste sono dei fattori trascrizionali, quindi sono per loro stessa natura in grado di riconoscere sequenze specifiche sul DNA. Operando la fusione tra la forbice molecolare Fok1 e una regione, una sequenza di domini proteici, fusi a questa Fok1, che sono in grado di riconoscere il DNA in modo specifico, noi possiamo andare a indurre dei tagli dove vogliamo noi. L'ultima versione è quella del CRISPR, questo sistema immunitario dei batteri ci consente di andare a tagliare il modo specifico il DNA genomico utilizzando semplicemente oltre la forbice molecolare anche una piccola sequenza RNA complementare al punto di interesse. Qui la specificità del taglio non è data da una proteina che è fusa alla forbice e che deve riconoscere la regione di interesse, cosa piuttosto difficile da generare soprattutto per quanto riguarda le Zinc finger, qua non facciamo altro che costruirci una piccola sequenza di RNA complementare al punto che vogliamo andare a tagliare e questa piccola sequenza di RNA, indicata come girRNA è complementare alla regione che vogliamo tagliare ed è anche una piccola codina che capta l'enzima forbice, che in questo caso è la Cas9, che viene portata nel punto di interesse e taglia il DNA. Cosa succede nel momento in cui con uno di questi metodi noi andiamo a operare un taglio specifico in una regione di interesse sul DNA? Succede che la cellula si trova ad avere un bel taglio in una sequenza genomica che

è un bel danno, è tale e tanto il danno che la cellula poco si preoccupa di riparare il buco in modo opportuno. Però cerca di farlo nel miglior modo possibile per interrompere questa rottura. Quindi la nostra cellula non fa altro che incollare le due parti in modo assolutamente poco corretto, non si preoccupa di guardare cosa ci fosse prima a livello di sequenza, ma butta dentro dei nucleotidi in modo tale da tappare il buco. Cosa vuol dire che la cellula fa questo lavoro? Questo modo di riparare determina la comparsa di quelle che si chiamano "in cell", cioè inserzioni o delezioni, vuol dire che anziché ricostituire la sequenza originale, facciamo per esempio il caso di essere finiti in un esone, la nostra cellula inserisce dei nucleotidi a caso che non necessariamente rispettano quello che c'era prima e non necessariamente rispettano il numero di nucleotidi che c'era prima. Quindi molto spesso accade che non soltanto avete una sequenza che in quel punto è diversa, ma avete una sequenza che da lì in poi sarà differente, perché anziché semplicemente risaldare le due estremità abbiamo, per riparare, inserito o eliminato dei nucleotidi. Se voi da una sequenza codificante levate uno o due nucleotidi o inserite uno o due nucleotidi, perdetevi il frame completamente a valle e questo determina il completo cambio di significato della sequenza. Quindi non codificherete più per la proteina che avevate in mente di codificare, ma codificherete per una cosa che non ha niente a che vedere e spesso e volentieri facendo delle inserzioni o delle delezioni di questo tipo otterrete prima o dopo l'insorgenza di un segnale di stop e quindi ovviamente non avrete più nessun tipo di proteina. Quindi tagliamo la sequenza, viene incollata male perché la cellula è di fretta in questo momento e quindi otteniamo delle inserzioni e delezioni, in questo modo abbiamo fatto un knock-out, in questo modo abbiamo rotto il gene, abbiamo alterato spesso e volentieri il frame della sequenza codificante ed ecco che il danno è fatto, il gene viene silenziato. L'embrione crescerà e avrete un pesce che manca di questo gene. Cosa possiamo fare di più carino? Un knock-in, cioè utilizzando lo stesso tipo di approccio possiamo andare a generare questa rottura, ma attenzione, stavolta insieme a tutto l'armamentario per determinare la rottura in quel punto specifico, noi forniamo anche semplicemente una copia di quella regione che siamo andati a tagliare, che recchi la mutazione che noi vogliamo indurre all'interno del genoma. Quindi facciamo tutta la nostra bella macchina con il TALEN o il CRISPR, per andare a indurre in modo specifico un taglio in una posizione particolare, insieme a tutto il macchinario, ci mettiamo dentro anche una sequenza di qualche decina di nucleotidi che è complementare alla regione dove abbiamo operato il taglio, ma porta la mutazione che ci interessa, magari semplicemente un cambio di nucleotide che mi cambierà un aminoacido. Questo influenza il nostro gene editing perché nel momento in cui la cellula va ad aggiustare il buco che abbiamo creato trova anche uno stampo, che abbiamo dato noi, sul quale basarsi per ricostruire la sequenza originale che poi non è più originale perché lei non ha uno stampo su cui basarsi, si basa sul nostro stampo nel quale noi abbiamo inserito la mutazione puntiforme per esempio. Quindi quello che otterremo è una cellula, nel nostro caso il nostro zigote, nel quale abbiamo il taglio, ma anche un meccanismo di riparazione specifico, preciso tramite il quale abbiamo inserito all'interno del genoma la variazione che noi volevamo. Guardiamo adesso cosa si può fare per esempio a livello di studio sui tumori.

Immagino voi sappiate che sia possibile andare a vedere come un tumore si comporta utilizzando gli xenotrapianti, che solitamente nella stragrande maggioranza dei casi noi facciamo sui roditori, cioè noi andiamo a prendere delle cellule tumorali e vogliamo vedere se queste cellule sono in grado o meno di metastatizzare, le mettiamo nel topolino e andiamo a vedere dopo un certo numero di ore, giorni, mesi, anni, secoli, qual è stato il destino di queste cellule, cioè se queste sono state in grado di uscire dai vasi, piuttosto che "camminare" all'interno dell'organismo per andare a metastatizzare altre regioni e così via. Ovviamente come sicuramente vi è stato detto ci sono dei problemi etici in questo senso, cioè che esperimenti di questo genere sono necessariamente da sottoporre al Ministero per poter avere l'approvazione, è una cosa relativamente recente che anche utilizzando gli embrioni di zebrafish possiamo ottenere degli splendidi risultati anche in contesti di materia oncologica col vantaggio che l'embrione di zebrafish è esente dalla legge che regola la sperimentazione animale fino al quinto giorno di vita, quindi voi da 0 a 5 giorni potete fare degli xenotrapianti nell'embrione di zebrafish che come vedete già 48 ore è a tutti gli effetti un pesciolino che sta crescendo. Immagine: le cellule a destra sono cellule di controllo e quindi sono cellule che non sono in grado di metastatizzare, quindi le iniettiamo nel circolo e andiamo a vedere per esempio dopo 24-48 ore cosa sono stati capaci di fare queste cellule, circolano all'interno dei vasi, questo vuol dire che le cellule che abbiamo iniettato non sono granché capaci di uscire dal vaso, di extravasare e di andare a popolare degli altri territori; invece a sinistra abbiamo le stesse cellule, però modificate durante i vari step che hanno portato il tumore ad essere più aggressivo, cioè le cellule tumorali sono state in grado di uscire dai vasi nel giro di 24 ore e di popolare una regione nella quale non erano assolutamente stabilizzate, quindi queste cellule che sono andate incontro ad alterazioni per quanto riguarda il loro corredo genetico sono ora in grado di andare al popolare e quindi essere metastatiche. Questo ci dice che in un sistema in vivo, cioè in un organismo dove abbiamo tutte gli input che la cellula eventualmente iniettata sentirebbe dall'organismo, non semplicemente una capsula Petri dove abbiamo una situazione estremamente limitata, non abbiamo una visione completa dell'organismo, si dice quindi che nell'organismo la cellula si comporta in modo completamente differenti rispetto a quanto si comportava a stadi più primitivi, quindi a questo punto nel giro di pochissimo tempo abbiamo dei suggerimenti su cosa fare passando eventualmente a un modello successivo. Prima le industrie farmaceutiche dovevano passare dal sistema in vitro direttamente al topo, avendo dei costi elevati, qua avete una sorta di via di mezzo, un sistema alternativo. Quindi passate dal in vitro al in vivo su zebrafish al in vivo su topo o al in vivo con entrambi perché ci sono degli eventi specifici di zebrafish, che quindi con questo riusciamo a ricreare in modo molto simile a quello che accade nell'uomo, mentre non riusciamo a farlo in modelli più vicini all'uomo.

Immagine: si vede il tronco di zebrafish, nel quale le cellule endoteliali sono marcate in verde, mentre le cellule tumorali sono marcate in rosso.

Abbiamo anche la possibilità di fare lo screening di droghe/composti chimici. Qual è la possibilità che abbiamo in zebrafish? Abbiamo talmente tanti embrioni piccoli che li

possiamo alloggiare in multiwell da 96 e mettere quello che volete all'interno di questi pozzetti, uno differente in ogni pozzetto, una concentrazione differente di composto. Moltiplicate questo con la vostra forza lavoro, che nei posti ricchi comprende parecchia automatizzazione che consente di screenare anche migliaia di composti over weekend in modo automatico, la potenza è strabiliante. Questo screening lo si fa a prescindere da qualsiasi conoscenza, nel senso che se voi avete un fenotipo malattia in zebrafish, testate tutti i compound che volete in pochissimo tempo e in spazi ristretti con dei numeri enormi, in modo tale da avere delle statistiche molto forti. Quindi in questo modo voi riuscite a selezionare dei composti che possono o meno essere efficaci contro la malattia della quale vi state occupando senza avere assolutamente idea di cosa sta dietro al chemical che è stato utilizzato. Cioè non dovete pensare a priori alla struttura di questo chemical, dobbiamo studiarla bene perché poi abbiamo tre animali che possiamo utilizzare la statistica, no, qua vagonate e non avete di che preoccuparvi per questa conoscenza e potete utilizzare questo sistema in modo estremamente costruttivo ed efficace per screenare dei composti già provati per altre per altre patologie. Cioè dei composti già provati per altre patologie possono essere "riciclati" per vedere se funzionano contro qualche cosa d'altro, il fatto che siano già provati, taglia fuori delle attese mostruose per quanto riguarda l'applicazione del farmaco, questo recycling che è molto di moda trova in zebrafish un partner ideale. Vi faccio vedere questa cosa perché è carina e riguarda appunto lo screening di un compound, in zebrafish si addiziona l'acqua nella quale cresciamo gli embrioni, le larvette, e il compound che vogliamo studiare e anche il fatto che in zebrafish a volte riusciamo ad ottenere quello che otteniamo purtroppo questo caso dell'uomo, ma che non otteniamo in organismi modello più vicini come il topo.

Per esempio questo è il Thalidomidio, una molecola che ha diversi usi, era nata negli anni '60/'70 in Europa. Era stata studiata e applicata per le nausee mattutine delle donne in gravidanza, si è scoperto dopo che sebbene fosse assolutamente efficiente nel migliorare questo discomfort nelle donne, era però anche terribilmente efficace nell'indurre delle alterazioni nello sviluppo dei feti, infatti in quegli anni nacquero tantissimi bimbi affetti dalla mancanza degli arti superiori o addirittura tutti e quattro gli altri. Se voi andate lo utilizzate nel topo pare che non si riesca a riprodurre questo fenotipo, cosa che succede se trattate zebrafish, ne impedisce lo sviluppo delle pinne, inoltre si è stati in grado di capire quale fosse il meccanismo d'azione, va a inibire un CRBN che è un attivatore di FGF8, che è un fattore secreto fondamentale per lo sviluppo dell'arto.

Ultima slide che si riferisce al discorso sulla possibilità di utilizzare dei fenotipi malattia nello screening di droghe: questa è una ricerca che qualche anno fa ed è legata alla SLA, quindi noi abbiamo questo modellino che overesprime la forma mutata di una delle proteine la cui alterazione determina alcune delle forme familiari di SLA, la SOD1. La SOD1 che porta la mutazione del gene G93R induce la SLA nel pesce, cioè quando il pesce è adulto comincia a palesare un fenotipo che è molto simile a quello che si vede nell'uomo, cioè una degenerazione dei motoneuroni, quindi atrofia delle fibre, eccetera eccetera fino ad arrivare alla morte. Abbiamo trovato che l'embrione in fasi molto precoci, ad esempio quello che vi sto mostrando adesso sono degli embrioni a

24h di sviluppo, quello in alto è un normale, quello in basso esprime la forma mutata della SOD1. Quindi abbiamo chiaramente fenotipo movimento che ci aiuta tantissimo perché immaginate mettendone molti vicini ci è molto evidente la differenza, un movimento innaturale, una iperfrequenza nello scodamento, coiling. Questo è dato dal fatto che i motoneuroni sono sovraeccitati, i neuroni spinali sparano a raffica anziché osservare i loro tempi fisiologici e questo è il risultato. Avendo 96 embrioni, pozzetti e sostanze differenti vediamo con quale la frequenza di scodamento, il coiling, rimanga invariata, aumenti o diminuisca. Se voi date a questo pesciolino il Riluzolo, che è l'unica droga, chemical che è approvato per il trattamento della SLA, questo allunga la vita di pochi mesi, però se voi date di nuovo questa droga questi pesciolini l'ipereccitabilità diminuisce e loro si comportano normalmente.

DOMANDA:

Uso dei pesci nei 5 giorni senza problemi burocratici, poi superati i 5 giorni cosa accade? I risultati devono essere osservati entro 5 giorni, se non volete incorrere in questo tipo di problema. Transgenesi si verifica a 3 mesi, quando pesce è fertile, quindi passaggio al Ministero!

Per gli esperimenti tumorali che abbiamo visto rimaniamo nei 5 giorni.