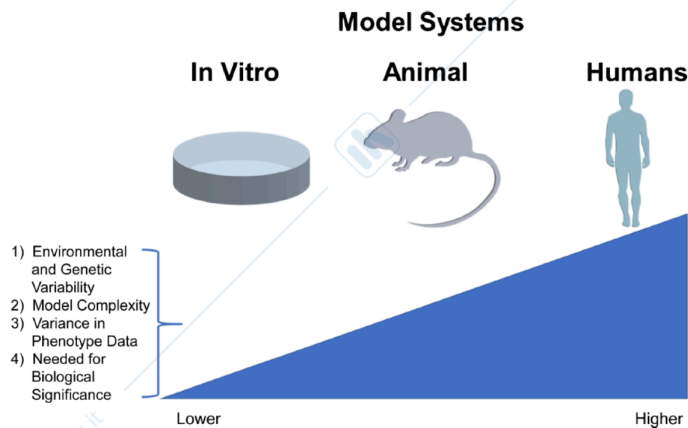


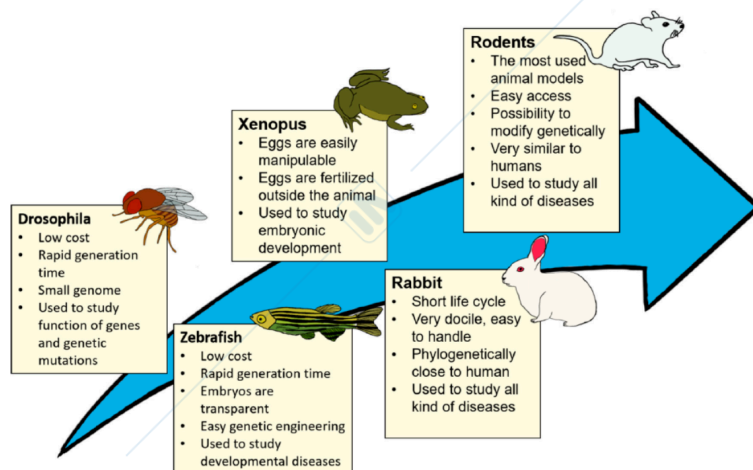
## Lezione 1,

# Modelli murini di patologie umane

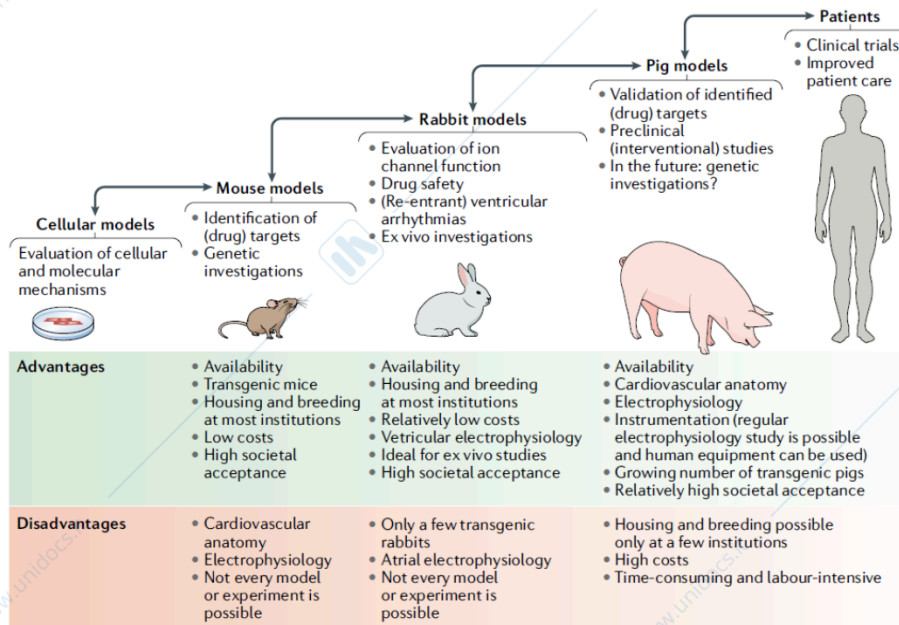
comparazione studio modelli in vitro, animali e umani



# Vantaggi e applicazioni comuni modelli animali



## Lezione 1,



Un trio pratico di modelli animali per la ricerca traslazionale. Considerando i vantaggi e gli svantaggi complessivi delle diverse specie animali per la ricerca, questi tre modelli animali — topi, conigli e maiali — sono i modelli più appropriati per la maggior parte degli studi sulle aritmie

## Animali transgenici

sono “Animali mutanti che portano elementi genetici estranei introdotti sperimentalmente in tutte le loro cellule, inclusa la linea germinale.”

applicazioni di topi transgenici

I topi transgenici vengono spesso generati per affrontare il ruolo che un gene svolge in un processo biologico a livello dell'intero organismo:

- Per confermare il ruolo di una mutazione genetica
- Per aiutare a svelare i meccanismi molecolari che controllano l'espressione genica
- **Per aiutare a svelare i meccanismi biochimici in vivo e l'origine della malattia**
- **Per sviluppare un modello animale per testare strategie terapeutiche**

## perchè i topi?

Tra gli organismi modello che possono essere geneticamente modificati, il topo è:

- **I più simili agli esseri umani –**
- **I più complessi**
- **La manipolazione genetica è estremamente versatile –** Guadagno di funzione (transgenesi), perdita di funzione (knock-out), cambiamento di funzione (knock-in); limitato temporalmente e spazialmente (condizionale)

Lezione 1,

# Classical Transgenesis Foreign DNA

**Fertilized Oocyte**

**Random insertion**

Gordon, J.; Ruddle, F. **Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei.** Science 1981

Costantini, F.; Lacy, E., **Introduction of a rabbit  $\beta$ -globin gene into the mouse germ line.** Nature. 1981

Brinster R, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD, **Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs.** Cell. 1981

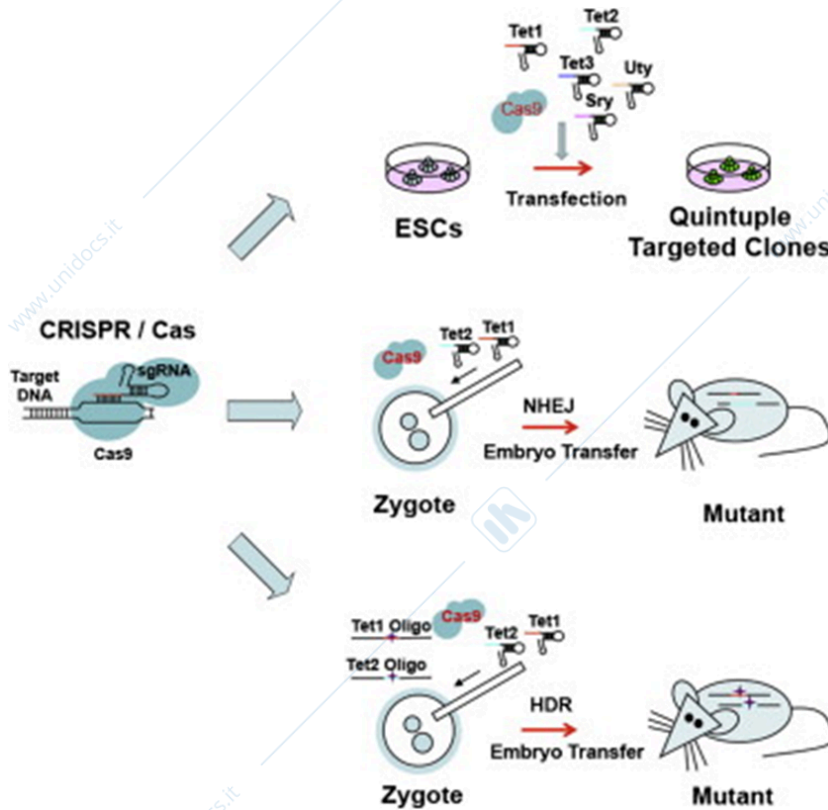
**Embryonic Stem (ES) cells**

**Targeted insertion**

**Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells.**  
Thomas KR, Capecchi MR  
Cell, 1987

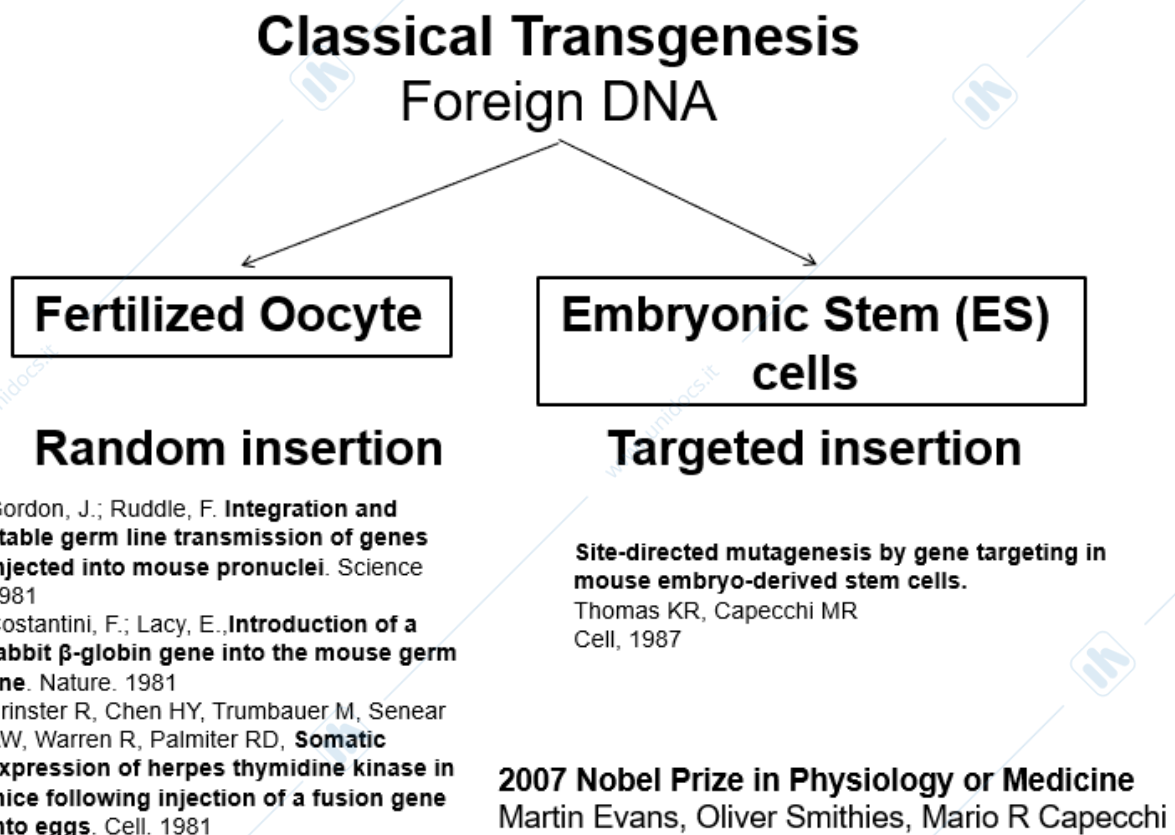
**2007 Nobel Prize in Physiology or Medicine**  
Martin Evans, Oliver Smithies, Mario R Capecchi

## Genome editing



Lezione 1,

## Generazione di topi transgenici tramite iniezione di DNA negli oociti fecondati



### Passi verso un modello transgenico

- Ipotesi di lavoro
- Costrutto genico
- Microiniezione negli oociti fecondati
- Screening degli animali transgenici
- Profilazione del pattern di espressione
- Fenotipizzazione
- Validazione del modello / Sperimentazione

#### Ipotesi lavoro:

per studiare funzione di un gene

- Overexpression
- Misexpression
- Down-regulation of expression

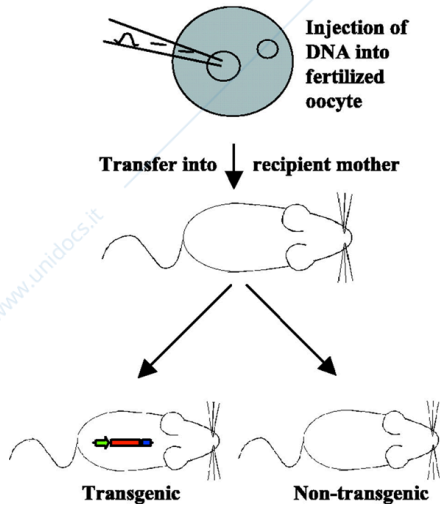
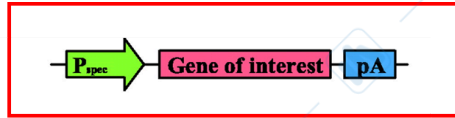
per identificare regioni regolatorie

- Caratterizzare la capacità di un promotore di dirigere l'espressione genica specifica per tessuto.\*\*

## Lezione 1,

Per modellare le malattie umane.

Il costrutto transgenico consiste in un enhancer e/o promotore selezionato, che può dirigere l'espressione genica verso un tessuto specifico o una fase dello sviluppo, collegato alla sequenza da esprimere.



### Costruzione di un gene



Plasmid vector

Viral vector

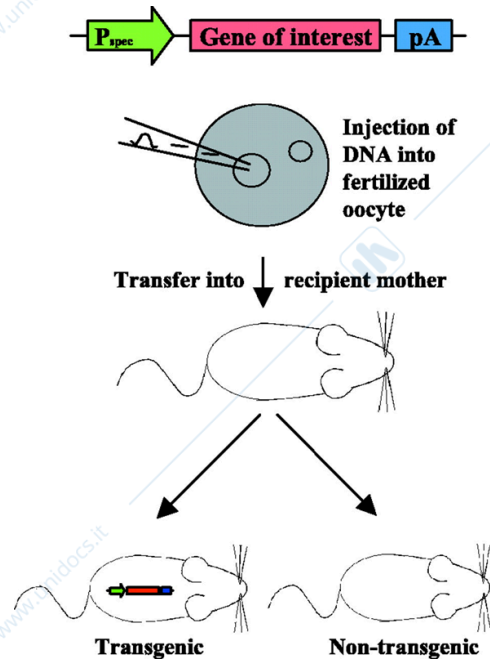
**Tissue-specific promoter**

**Wild-type or mutated cDNA**

**RNAi**

**Rappresentazione schematica per la produzione di topi transgenici:** viene mostrato un costrutto transgenico contenente un promotore specifico (Pspec), il gene di interesse e un segnale di poliadenilazione (pA).

## Lezione 1,

**Pronuclear microinjection**

- Microiniezione del DNA direttamente nei pronuclei degli ovuli fecondati
- Impianto degli ovuli microiniettati in una madre surrogata
- Permettere agli embrioni di svilupparsi fino alla nascita
- Dimostrare che il gene estraneo è stato stabilmente incorporato nel genoma dell'ospite e che è ereditabile
- Dimostrare che il gene viene espresso e regolato correttamente nell'organismo ospite

## Lezione 1,

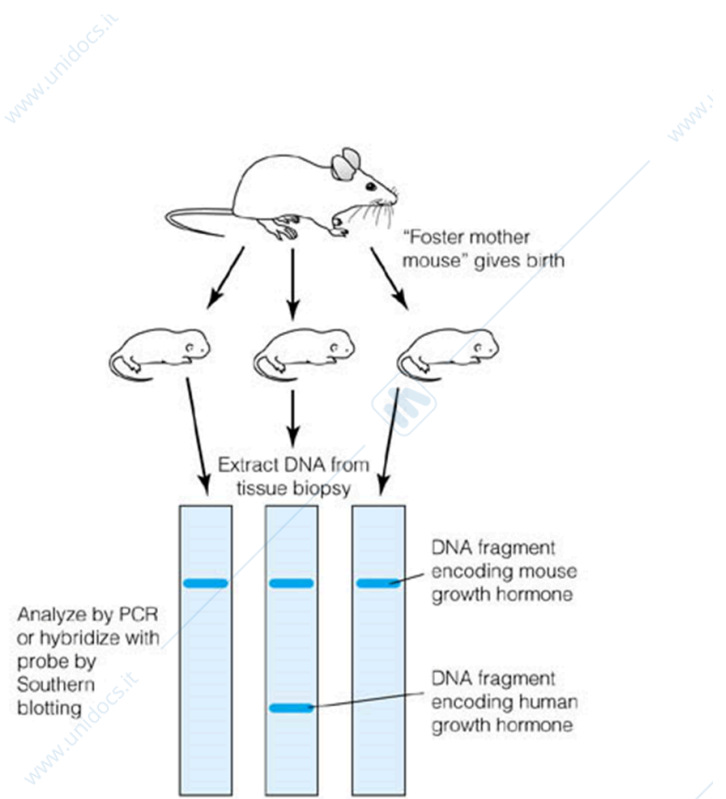
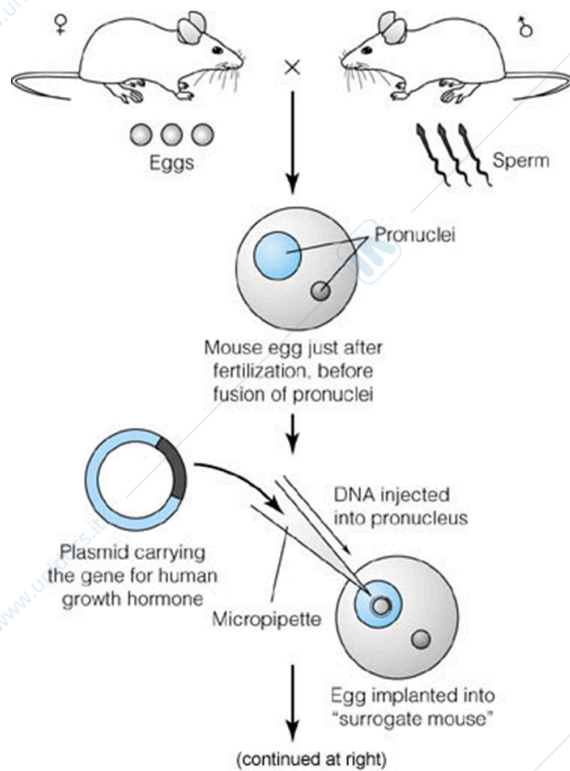


FIGURE 7.2

The production of transgenic mice.

© 2005 Brooks/Cole, a division of Thomson Learning, Inc.

**inserimento del gene**

- Inserimento mediante meccanismi di riparazione/ricombinazione del DNA nucleare
- Casuale
- Soggetti agli effetti di posizione

**Fondatori di Breeding Tg**

- Incrociati individualmente con il ceppo di scelta
- NON incrociare diversi fondatori - ogni fondatore risulta da una integrazione transgenica separata anche CASUALE

Sistemi transgenici più raffinati:

- regolazione temporale (tet ON/OFF)
- regolazione specifica del tessuto ( Cre/lox)
- Silenziamento del gene indotto da RNAi
- Transgenesi YAC/BAC
- transgeni negativi dominanti

**Generazione di modelli condizionali: il sistema T&T on/off**

Il topo transgenico condizionato perfetto dovrebbe, in linea di principio, includere i seguenti criteri:

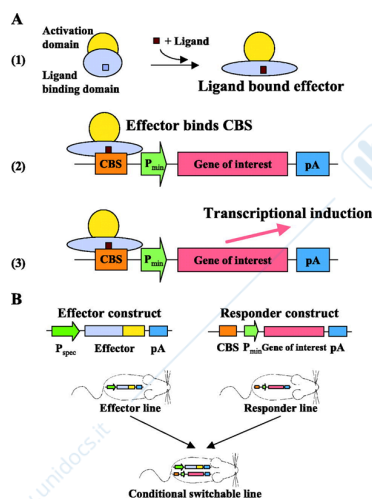
## Lezione 1,

1. In primo luogo, la sovraespressione indotta del transgene deve essere strettamente controllata.
2. In secondo luogo, il composto che induce deve essere non tossico e altamente specifico per il gene bersaglio.
3. In terzo luogo, la cinetica di induzione dovrebbe essere rapida e i livelli di espressione sufficientemente elevati per produrre un effetto rapido e rilevabile.
4. Quarto, il cambiamento indotto dovrebbe essere reversibile in modo che i periodi di sviluppo definiti o le fasi critiche della malattia possano essere adeguatamente monitorati

## Transgenesi condizionata

1) attivazione mediata da legante di un transattivatore trascrizionale, 2) legame del transattivatore al DNA e 3) attivazione trascrizionale indotta dal transattivatore

Mouse effettore, che esprime un attivatore trascrizionale inducibile a legante;  
Linea di mouse del rispondente, che ha la capacità di esprimere specificamente un transgene scelto sulla stimolazione dal transattivatore.

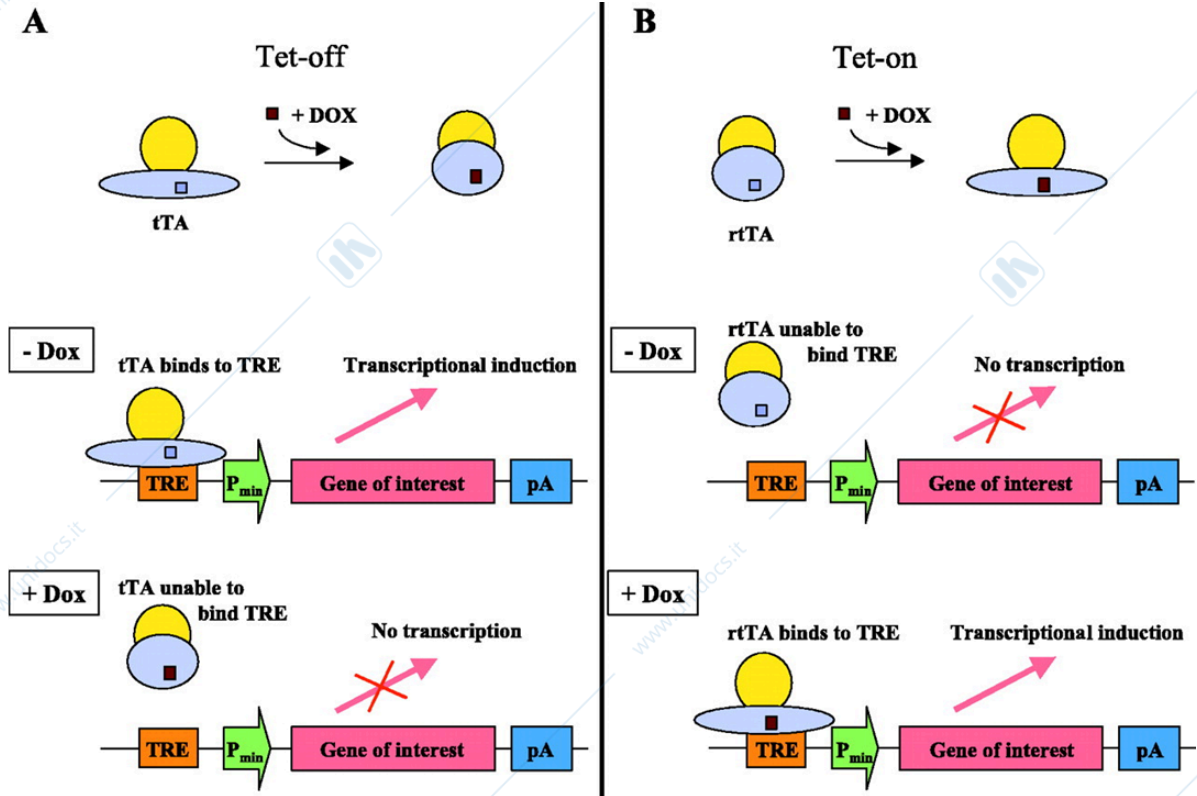


Bockamp, E. et al. *Physiol. Genomics* 11: 115-132 2002;  
doi:10.1152/physiolgenomics.00067.2002

## il sistema dei tet

Il repressore del tet (TetR) è stato fuso al dominio di transattivazione VP16 del virus dell'herpes simplex, con conseguente trasattivatore controllato dalla tetraciclina (tTA).

Lezione 1,



Bockamp, E. et al. *Physiol. Genomics* 11: 115-132 2002;  
doi:10.1152/physiolgenomics.00067.2002

**Generazione di modelli knock-out mediante manipolazione di cellule staminali embrionali**

**Classical Transgenesis**  
Foreign DNA

**Fertilized Oocyte**

**Embryonic Stem (ES) cells**

**Random insertion**

**Targeted insertion**

Gordon, J.; Ruddle, F. **Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei.** *Science* 1981

Costantini, F.; Lacy, E. **Introduction of a rabbit  $\beta$ -globin gene into the mouse germ line.** *Nature*. 1981

Brinster R, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. **Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs.** *Cell*. 1981

**Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells.**  
Thomas KR, Capecchi MR  
*Cell*, 1987

## Transgenic and Knockout Animals

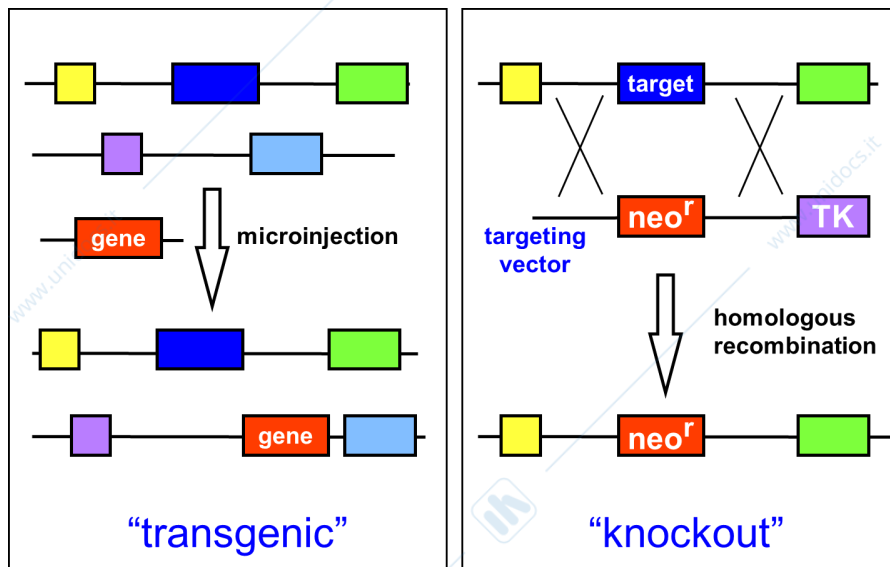
### Transgenic:

- **Introduction of foreign or altered gene: transgenic**  
Over-expression, mis-expression, dominant-negative (*gain-of-function alleles*)  
Normal allele also present - product from two alleles

### Knockout:

- **Replace normal with mutant allele:**  
Gene knock-out - removal of a part of or a whole gene (*loss-of-function alleles*)  
No normal allele - product of manipulated allele only

### generazione di un modello di topo

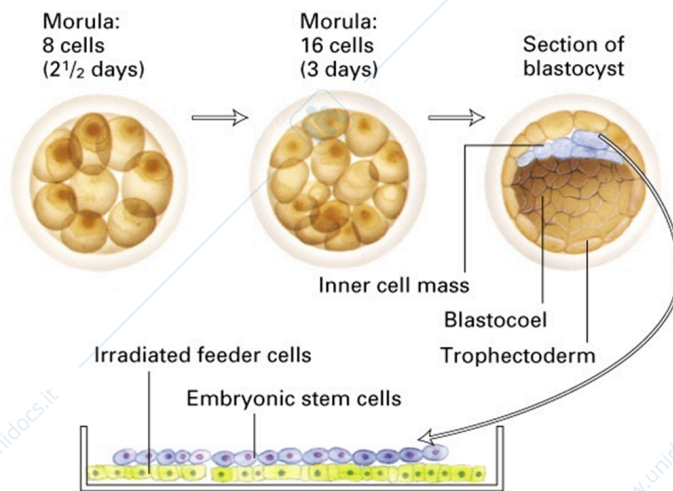


### Knockout del gene (targeting del gene)

- Inattivazione selettiva di un gene sostituendolo con un mutante in un organismo altrimenti normale
- ricombinazione omologa: ricombinazione tra il DNA esogeno e il suo sito cromosomico omologo nelle cellule staminali embrionali (ES)

Lezione 1,

## Embryonic Stem Cells

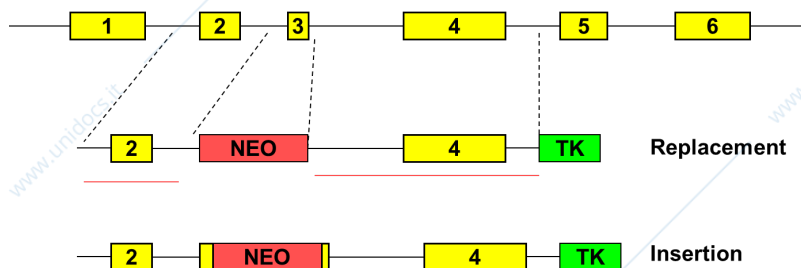


- **totipotent/pluripotent *in vivo/in vitro***
- **extraordinary proliferation potential *in vitro***
- **homologous recombination**

## Gene construct: targeting vector

Homologous arms

Selection marker (positive and negative selection)

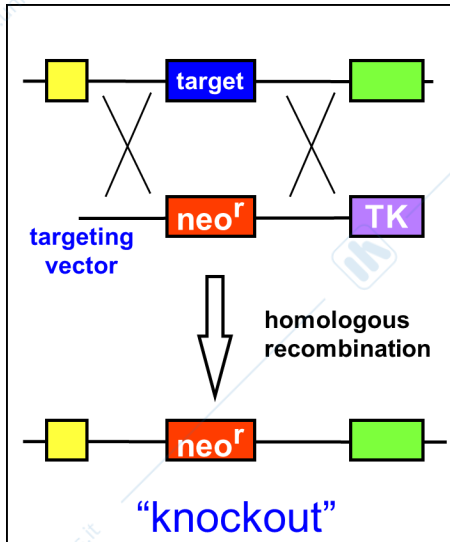


- Selezione positiva: resistenza agli antibiotici  
Le cellule sono coltivate in presenza dell'antibiotico

- Selezione negativa: herpes simplex virus-timidina chinasi  
Le cellule vengono coltivate in presenza di ganciclovir che viene convertito da TK virale in un prodotto altamente tossico

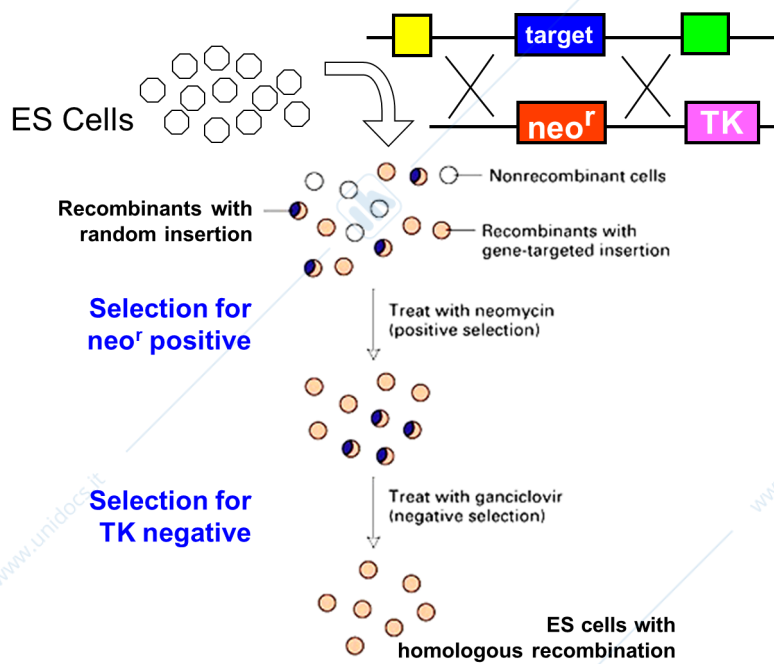
## Gene Targeting attraverso la ricombinazione omologa

Lezione 1,

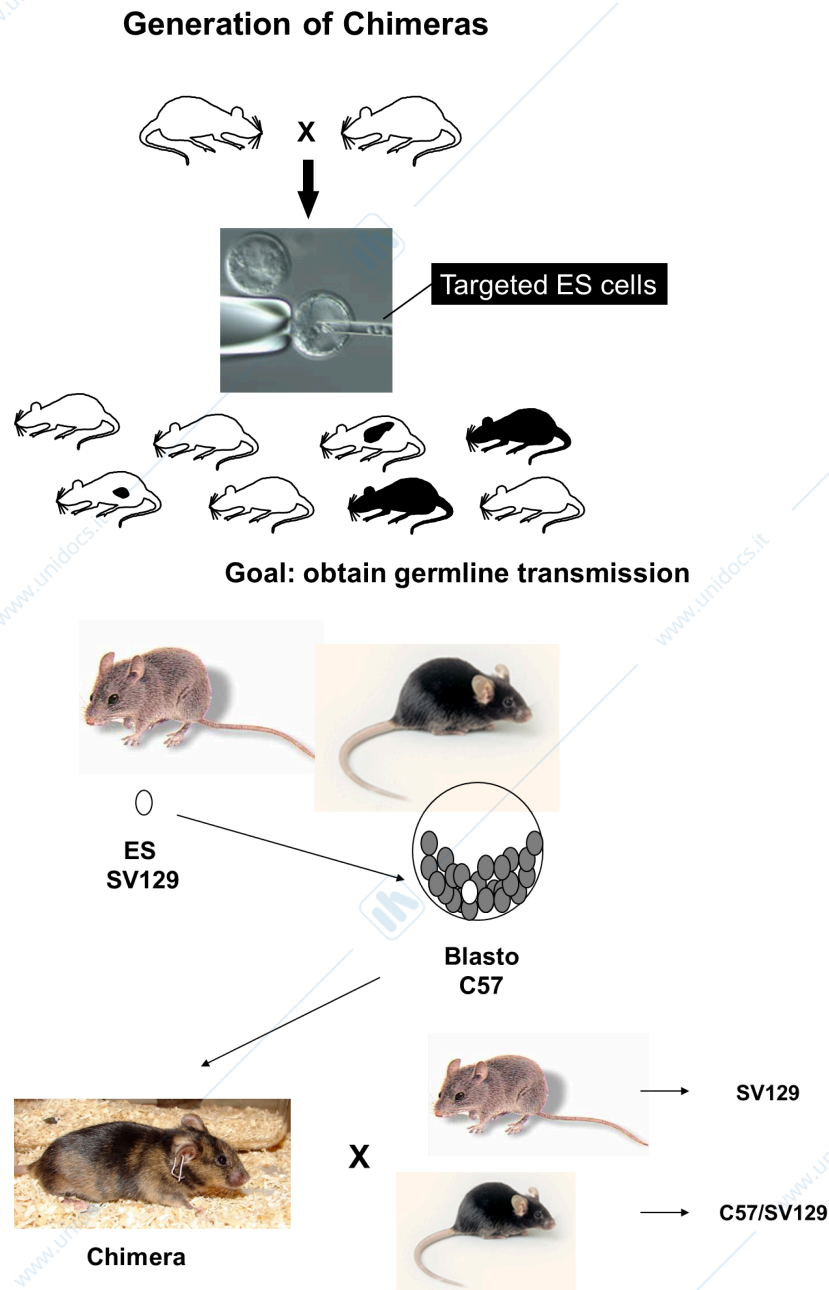


The target gene is replaced

Positive and Negative Selection of Targeted ES Cells



Lezione 1,



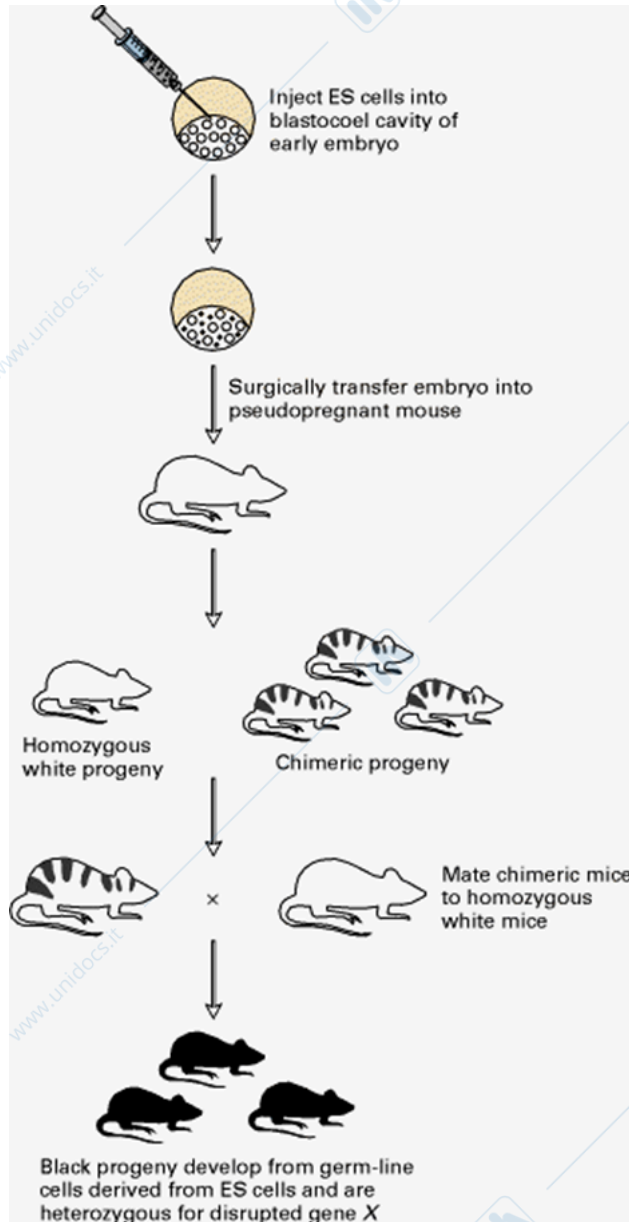
## Procedure di eliminazione dei geni

- Cellule staminali embrionali (ES) isolate dall'ICM di blastule
- Gli alleli mutanti vengono introdotti nelle cellule ES
- La ricombinazione non omologa è 1000-10.000 volte più frequente della ricombinazione omologa: sono necessarie una selezione positiva E negativa.
- Le cellule ES contenenti il gene bersaglio vengono trasferite in embrioni di topo per generare chimere
- Si allevano topi chimerici per produrre topi mutanti eterozigoti
- Gli eterozigoti mutanti si accoppiano per generare omocicosi mutanti
- knockout eterozigote: aplozione sufficiente, X-linked

## Sfide per l'analisi funzionale utilizzando topi knockout

## Lezione 1,

- Target construct: dimensione del gene
- Ricombinazione omologa: bassa efficienza
- Trasmissione da germi (totipotenza delle cellule ES)
- Tempo necessario per ottenere -/- prole
- Mortalità precoce
- Nessun fenotipo/fenotipo ambiguo



## Generazione di modelli condizionali di mouse knock-out

Diversi approcci di knock-out:

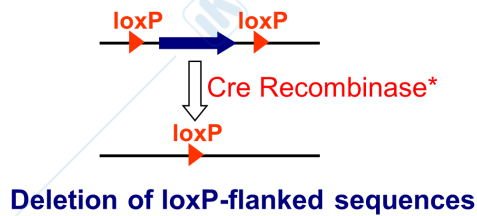
- KO convenzionale
- knock in/sostituzione
- KO specifico per il tessuto
- Knock-out inducibile: specifico per i tessuti con controllo temporale

## Lezione 1,

### The Cre/loxP-Mediated Gene Deletion - Controlled

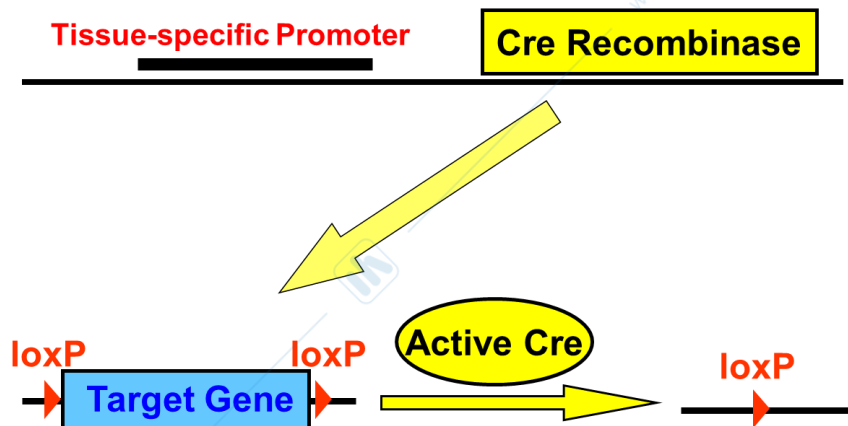


34 bp: 8-bp sequence flanked by 13-bp inverted repeats



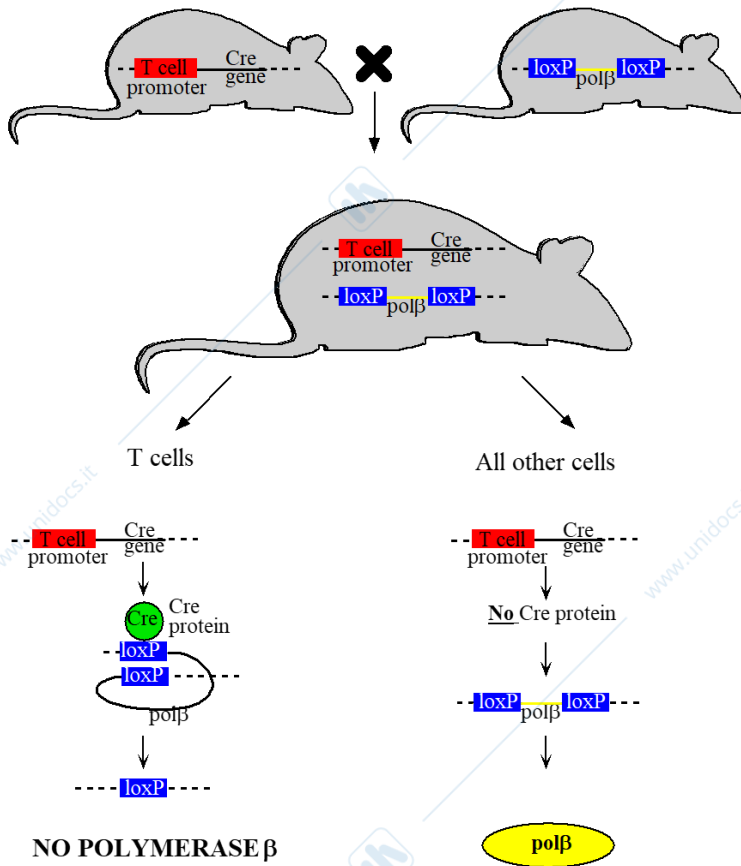
### Knockout specifico per i tessuti

Knockout condizionale - manipolazione di espressione Cre

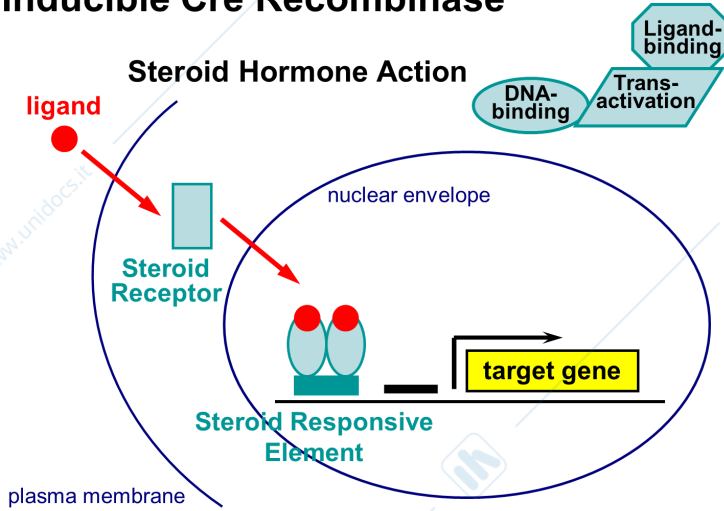


Lezione 1,

The Cre-lox system applied to conditional mutagenesis

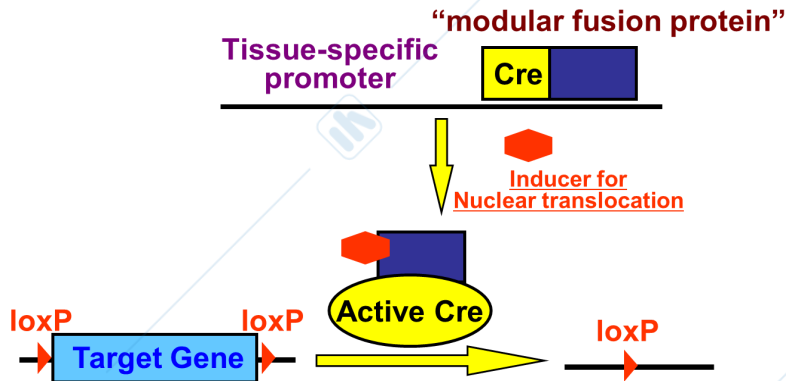


Inducible Cre Recombinase

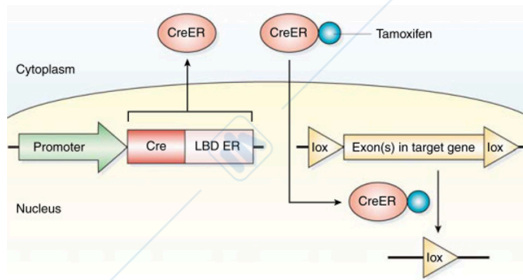


Lezione 1,

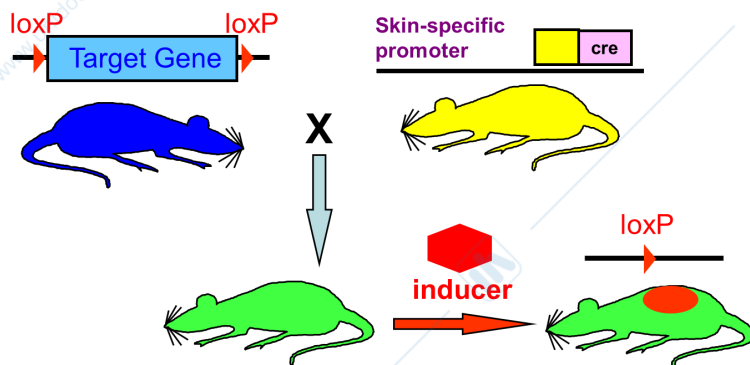
## Inducible Cre Recombinase



## Inducible Cre/loxP-Mediated Gene Deletion

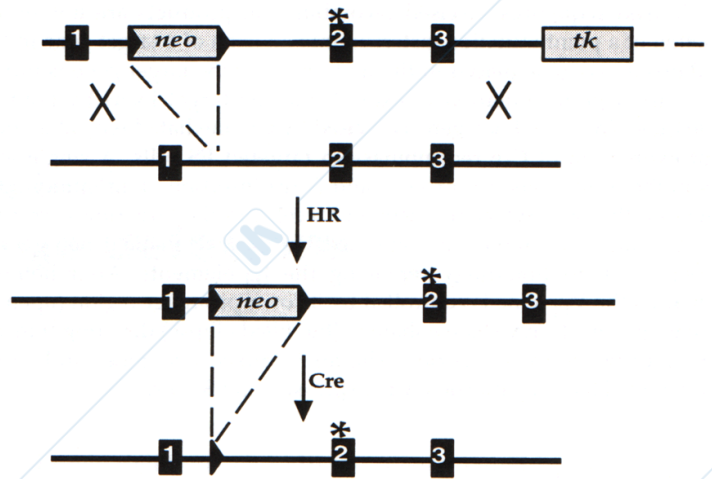


## Induced Focal Deletion of a Gene



*inserimento di mutazione puntiforme (Knock-in)*

Lezione 1,



### Comparison between Knock-outs and Transgenics

	Knock-out/in	Transgenic
Cells	ES cells	fertilized eggs
Homologous DNA	yes	no
Insertion site	targeted	random
Copy number	1	tandem repeats
	Loss-of-function	Gain-of-function
Reproducibility*	yes	no

\* Using the same construct in the same strain background