Appunti e Riassunti
di
Animali Modello ed Organismi Transgenici

Docente: M. Pasqualetti.

AA: 2016/2017.

master COPY

Legenda:


Ciclo vitale dell'organismo/anatomia


Espansioni-applicazioni concettuali


Trasngenesi/manipolazioni/tecniche


Nozioni di background


Esperimenti svolti


Approfondimenti generici


Cose che non c'entrano nulla con quanto detto prima


Sviluppo embrionale

master COPY

master COPY

DISCLAIMER:

Questi sono appunti tratti dal corso tenutosi nell'anno 2016/2017. Alcune cose potrebbero variare, si consiglia di implementare con slides, articoli forniti e qualsiasi cosa presente nel materiale didattico.

Animali Modello ed Organismi Transgenici

1.1.1 Introduzione

L'uomo ha agito su specie animali e vegetali da più di 10000 anni, al fine di modificarne e caratteristiche (anche se si parla di incroci e generazione di ibridi). Nel caso delle piante, per migliorare la resa della produzione, nel caso degli animali per velocizzare la **speciazione naturale**.

La mutazione casuale può richiedere anche tempi geologici, per ottenere un certo carattere favorevole: negli ultimi decenni si è iniziato a promuovere i cambiamenti usando **agenti mutageni** (chimici o fisici).

Agente chimico: etil nitroso di urea, induce mutazioni puntiormi.

Agente fisico: raggi X. Usati per generare grano della pasta, ha causato delezione 50Mb.

Questa sorta di "pressione selettiva" adoperata dall'uomo per cercare dei caratteri di interesse può essere fatta con un approccio casuale (come sopra), o con un approccio genetico (e quindi più mirato).

L'OGM, nell'accezione di oggi, è un organismo vivente che viene modificato in maniera precisa, secondo quanto deciso dal ricercatore a tavolino. Le modifiche che possono essere fatte sono varie: posso andare ad introdurre un frammento di DNA (dalla stessa specie o da un'altra), posso rimuovere porzioni del genoma, posso spostarle (invertire, traslocare ecc) e posso decidere se far avvenire tali processi in un determinato punto oppure no.

Utilizzi di questi approcci:

- **Miglioramento genetico.**
- **Produzione di sostanze** (es. farmaci, enzimi).
- **Studio di un organismo** (es. sviluppo).
- **Avere modelli di certe patologie.**
- **Utilizzo dell'organismo come "banco di prova" per interventi terapeutici.**

Genetica diretta: si osserva cosa va ad alterare la modifica introdotta (casualmente o no).

Genetica indiretta: si parte dal fenotipo, e si cerca l'alterazione nel genoma che sta a monte di questo cambiamento.

Sono due diversi modi di studiare la relazione fra modifica al genoma – fenotipo osservato.

1.1.2 Animali modello – il topo

L'animale modello per eccellenza è il topo (***Mus Musculus***), visto che possiede molte caratteristiche in comune con l'uomo (va sottolineato che comunque alcuni meccanismi fisiologici sono profondamente diversi: di fatto è difficile modellizzare con il topo, molto più vicino a noi è il ratto). Altri modelli sono CED9 (***C. elegans***), verme di 1 mm con esattamente 959 cellule, diversi geni hanno omologia di sequenza con l'uomo, alcuni persino di funzione (si pensi alle caspasi).

Il topo, *Mus musculus*

Il topo ha iniziato ad avere successo nella ricerca tra fine '800 ed inizio '900: tutto ha avuto origine con l'allevamento per puro divertimento -> ciò ha portato alla nascita dei primi ceppi particolari (***strain***) che hanno poi gettato le basi per l'impiego di questo organismo nella ricerca, in quanto mammifero e quindi fisiologicamente molto vicino a noi (tutt'ora si usano i ceppi creati all'epoca).

N. di cromosomi	21 (19 autosomi, XY)	**Maturità sessuale**	7-8 settimane
N. di geni	Circa 21000-22000	**Aspettativa di vita**	1,5 /2,5 anni
Tempo di gestazione	19-20 giorni	**N. di cuccioli/parto**	Da 4 ai 15, media sui 6-9
Tempo di svezzamento	3 settimane circa	**Cucciolate per femmina**	4-8

The Jackson Laboratory: Sono la ditta di riferimento per i topi da laboratorio. Hanno un database con tutte le varie linee ed i rispettivi genomi -> le linee possono essere vive o congelate in azoto liquido (embrioni e sperma).

1.1.3 Vantaggi nell'uso del topo

- È un **mammifero di piccole dimensioni** (25-40gr): ciò lo rende facile da allevare e poco costoso da mantenere.
- È **evolutivamente vicino all'uomo**: dista "solo" 60 milioni di anni.
- Ha un **tempo di gestazione breve**, di circa 19-20 giorni
- **Entra in pubertà relativamente presto**, si parla di 6-8 settimane di vita (una generazione ogni 3 mesi). Ciò è molto utile per gli studi di genomica in cui servono varie generazioni.
- Produce **cucciolate di dimensioni importanti**, a seconda degli strain da 4-5 fino a 15-20 cuccioli per parto.
- Hanno una **lunga vita riproduttiva.** I maschi fino ad un anno e mezzo, anche due, le femmine un po'

master COPY

meno (si usano per 3-4 cucciolate al massimo). Si dice che diminuisce la "resa".
- **I maschi non attaccano la prole**. Ciò rende possibile mantenere nella stessa gabbia la famiglia. Il giorno del parto, la femmina raggiunge nuovamente l'estro (grado di massima fecondità) ed il maschio può ri-accoppiarsi con lei (lo svezzamento avviene a 20 giorni perché è proprio il tempo in cui la femmina partorirà i nuovi piccoli).
- Sono **utili per studi di biologia dello sviluppo.** Tendono ad accoppiarsi durante la notte. Ciò si verifica ispezionando la vagina della femmina: infatti lo sperma e le secrezioni creano un tappo ceroso (*plug*) -> è un escamotage evolutivo per impedire altri accoppiamenti. Se trovo il plug alla mattina, significa che è gravida e l'accoppiamento è avvenuto nella notte. Si iniziano dunque a contare i giorni dello sviluppo embrionale. Normalmente si parla di X,5 giorni (si segna come mezzanotte l'orario di accoppiamento, e si controlla verso mezzogiorno se c'è il plug). Si può mettere una E prima della cifra, che sta ad indicare "Embryonic stage". Il ciclo estrale nella femmina dura 5 giorni, ma sopraggiunge in 3 se viene esposta all'urina del maschio. L'estro vero e proprio dura una ventina di ore, ma non si ha ovulazione (è solo una propensione) -> avviene solo se si ha stimolazione vaginale, in seguito a penetrazione (quindi non si perdono ovuli).
- Hanno **placentazione e sviluppo embrionale simile all'uomo.** Molte delle informazioni che si hanno sulla formazione della placenta e sui processi di sviluppo umano sono stati ricavati dai topi. Un embrione di solito si prende a 18,5 (verso la fine della gravidanza).
    NB -> si parla di embrione impropriamente, visto che il termine è valido solo per prima della formazione di un sistema circolatorio attivo: dopo si parla di feto.
- Presentano una **elevata e conservata sintenia con il genoma umano**. Per "sintenia" s'intende l'associazione di uno o più geni allo stesso cromosoma: nel topo ci sono cluster di geni organizzati in maniera simile/uguale all'uomo (si parla di fino a 0-20Mb di sintenia) -> ciò è utile per studi su malattie dovute a traslocazioni o duplicazioni.

1.1.4 Svantaggi nell'uso del topo

- **Non è esattamente umano**. Ci sono differenze cognitive, nel comportamento e nell'espressione dei geni. Tuttavia, non è che si può fare sperimentazione umana, ed eticamente è quanto c'è di più vicino "facilmente" disponibile. Si possono generare dei modelli di patologie come schizofrenia, depressione ecc, andando a trovare e ricondurre determinati comportamenti ai corrispettivi umani.
- Vi sono delle **difficoltà nel monitorare lo sviluppo in utero** -> no ecografie.
- Ha un **genoma molto grande**, circa 3 miliardi di pb (2.8Gb). Ciò rende difficile targettarlo e lavorarci.
- Paragonato ad altri organismi modello, il suo **tempo di gestazione è lungo** (Drosophila ci mette solo 5-6 giorni).
- Sono necessarie **aree di stabulazione molto grandi** rispetto a quelle di altri organismi modello. Occorre poi tenere la temperatura in un certo range, e serve un ricambio d'aria continuo (ciò aumenta i costi).

1.1.5 Ceppi di topo più usati

I topi usati in lab derivano da ceppi molto particolari, detti **ceppi inbred**, ottenuti da incroci fra fratelli -> serve omozigosi per poter fare studi (la variabilità ci è nemica). Se si va a modificare il genoma in un certo modo, o se si fa un certo trattamento su una coorte di topi identici, si riesce molto più facilmente ad individuare le minime variazioni fenotipiche.

Una linea inbred è definita come una linea che è stata mantenuta per più di 20 generazioni di incroci fa fratelli e sorelle, portando in omozigosi tutti i loci genetici, eccetto quelli che possono derivare da mutazioni spontanee.

Praticamente si incrociano due F1 e si continua fino a circa 20 incroci, dove si avrà un'omologia di circa il 98,7%. Ovviamente poi non è così semplice: si possono portare in omozigosi mutazioni letali o comunque controproducenti (tipo minor fertilità). In tal caso, si coprano dei riproduttori nuovi, per smorzare gli effetti.

Per studiare patologie in cui il comportamento è importante, i ceppi inbred sono molto utili e se si crescono tutti nelle stesse condizioni il range comportamentale è molto piccolo.

Sono state selezionate tutta una serie di razze, tra cui le più usate sono:

- **C57BL/6J**, il classico topolino nero. Ci si possono modellizzare tutte quelle alterazioni del comportamento riconducibili a malattie neuropsichiatriche.
- **FVB/NJ**, sono utili per studi epigenetici: il pronucleo a seguito della fecondazione è molto grande (utile in un passaggio della trangenesi).
- **129/SvJ** è usato per ottenere staminali embrionali (ESC) in quanto questo ceppo fornisce meglio di altri una massa cellulare interna che, se opportunamente trattata, fornisce cellule pluripotenti che possono reintegrarsi in una blastocisti a formare un topo chimerico.
- **CD1** sono topi bianchi, le cui femmine sono ottime fattrici e forniscono ottime cure alla prole (si usa in quei passaggi in cui serve una madre adottiva e non sono inbred).

master COPY

1.1.6 Mouse genome project

Nel 2002 si è venuti a conoscenza del genoma del topo grazie al **Mouse Genome Project** -> ha portato a galla la sintenia e le omologie con l'uomo. Non siamo simili solo a livello di sequenza, ma anche a livello di organizzazione dei vari geni in cis (sullo stesso cromosoma).

Questo è importante per quanto riguarda la conservazione di tutte quelle sequenze intergeniche e per la regolazione dell'espressione genica -> ormai sappiamo fin troppo bene che anche la posizione ed il "junk DNA" sono importanti nella regolazione, quindi avere conservazione è sicuramente d'aiuto.

Si può usare il topo, quindi, anche per generare modelli di patologie da traslocazione, duplicazione ecc.

www.informatics.jax.org

Sito utile, fornisce info su dove sta un certo gene, se è già stato modificato ecc.

Allen Brain Atlas -> fonte di dati su espressione genica forniti da un grosso ente. È possibile fare studi di espressione genica sul cervello dei topi, senza toccarne uno (è un'enorme banca dati).

2.1.1 Sviluppo embrionale del topo

Comprendere i meccanismi di sviluppo di un embrione è importante per capire quando andare ad aggredire il genoma dell'organismo, per poterlo modificare e generare il nostro transgenico.

Solitamente con "***organismo transgenico***" s'intende un organismo in cui si è introdotto un frammento di DNA.

Se si va ad inserire in maniera ***mirata*** un frammento di DNA nel genoma, si parla allora di Knock-Out, Knock-In, Knock-Out condizionale e via dicendo.

Le prime fasi dello sviluppo sono quelle che vanno prese in considerazione: ***tanto più è precoce lo stadio in cui è introdotta una mutazione, tanto più probabile che questa sarà presente in tutto l'organismo.*** Proprio per questo l'ideale sarebbe lavorare allo stadio di zigote.

Nella ***fecondazione interna,*** il principale ostacolo a ciò è lo ***sviluppo interno.*** Caratteristica dei mammiferi è infatti che i primi 3-4 giorni lo sviluppo (dallo stadio di zigote fino alla blastocisti) avviene nel ***lume dell'ovidotto*** e solo in seguito nell'***utero.***

Ciononostante, è possibile prelevare gli embrioni nei primi 3-4 giorni dal lume dell'ovidotto per poterli manipolare e poi re-impiantare in utero.

Dal quarto giorno in poi, avviene l'i ***impianto in utero,*** a seguito del quale si ha formazione della placenta. Da questo momento in poi non sarà più possibile estrarre l'embrione, manipolarlo e re-inserirlo.

A livello formale, si può parlare di ***embrione*** fino a poco prima di 8 giorni di gestazione.
Da quel momento in poi, i tessuti iniziano ad ispessirsi e c'è necessità di trasporto di nutrienti/cataboliti -> inizia ad esserci una circolazione sanguigna e si parla di ***feto.***

RIASSUMENDO: il topo rimane in utero per circa 19 giorni, anche se i primi 3-4 giorni dello sviluppo avvengono nell'ovidotto (dove l'ovulo incontra lo spermatozoo). Seguiti i primi giorni va ad impiantarsi in utero, con formazione della placenta. Segue lo sviluppo secondo le tappe classiche (segmentazione-gastrulazione-modulazione-organogenesi) ed in seguito si ha la formazione del cuore e di un sistema circolatorio funzionante.

Il topo appena nato sta vicino alla madre per circa una ventina di giorni, poi la madre lo rifiuta e diventa un giovane adulto indipendente.

Da lì ad un paio di settimane raggiunge la maturità sessuale ed è pronto ad accoppiarsi.

2.1.2 Anatomia femminile del topo

Presenta una ***vagina*** seguita da ***utero biforcuto*** (2 braccia) -> questi tube uterine si connettono con l'***ovidotto,*** che presenta una struttura slargata detta ***ampolla*** (dove avviene la fecondazione).

In questa struttura soggiornano gli oociti avvolti dalle cellule follicolari e poi gli zigoti.

L'ovidotto è un vero e proprio infundibulo (ricorda un imbuto) e si trova vicino all'ovario. Ha dimensioni di circa 1mm (importante per le manipolazioni sperimentali).

2.1.3 Lo sviluppo nel dettaglio

A livello scientifico, per indicare i giorni di gestazione, si usa l'acronimo ***DPC – Day Post Coitum***, oppure si mette una ***E – Embryo*** davanti al giorno di gestazione.

Questa nomenclatura risulta utile, essendoci un ***timing dello sviluppo del topo***: è possibile dunque capire a che livello dello sviluppo sono andati a lavorare i ricercatori in un esperimento.

0,5 DPC (si vedono i pronuclei non ancora fusi)

Una volta che l'ovulo è stato fecondato, saranno presenti due pronuclei (maschile e femminile), corpi polari estroflessi dallo zigote, ed un sacco di cellule follicolari attorno.

1,5 DPC (è avvenuta la prima divisione dello zigote e sono presenti due cellule)

Abbiamo due cellule. Se si vuole valutare se un maschio è fertile, lo si fa accoppiare con una femmina e si vanno a valutare la presenza di embrioni 1,5.

2-2,5 DPC (avvengono le ulteriori due divisioni cellulari e si passa a 3-4 cellule, fino a 5-8)

Si ha lo stadio di morula (struttura grumosa, in cui si possono distinguere i singoli blastomeri, che hanno appunto una sfericità che ricorda una mora). A 7-8 cellule si ha il fenomeno della *compattazione*. Queste divisioni possono essere asincrone: se si va a prelevare un blastomero, è possibile, sperimentalmente, ottenere due embrioni identici se lo si reimpianta.

3 DPC (compattazione della morula per via delle tight junction)

Le tight junctions, durante la compattazione, fanno assumere una forma sferica e più rotondeggiante. Non è più possibile distinguere i singoli blastomeri.

3,5 – 4 DPC (la blastocisti forma la ICM – Inner Cell Mass e poi si chiude)

Si passa alla cavità uterina. Si inizia a formare la cavitazione che sarà il blastocele della blastocisti. Questa cavità va ad espandersi e conterrà la maggior parte delle cellule e prende il nome di ICM (è da qui che si prendono le cellule staminali embrionali)

4,5 DPC (avviene l'impianto in utero e finiscono le possibilità di intervento sperimentale)

La blastocisti si allunga a prende contatto con l'epitelio dell'utero, va a cavitarsi, si introduce all'interno ed a questo punto inizia il vero e proprio rapporto dell'embrione con la madre.

2.1.4 Recuperare gli zigoti

Il vantaggio nello sviluppo esterno, come da nome, è il fatto che si può guardare in tempo reale quello che succede allo zigote e manipolarlo (è su animali con questo sviluppo che si sono scoperte molte delle proprietà di queste fasi dello sviluppo).

Nei mammiferi, essendo lo sviluppo interno, ciò non è possibile (e gli ornitorinchi? Eh? beccati questa! 1 a 0 per me).

Negli anni '60 sono state messe a punto tutta una serie di tecniche e di condizioni per provare a mettere in coltura gli embrioni. L'idea di fondo era di ricreare *in vitro* delle condizioni paragonabili a quelle *in vivo*.

NB. Alcune situazioni si possono sperimentare solo *in vivo*, perché è troppo complesso replicare in laboratorio l'intero sistema.

Andando a modificare/modulare il sistema è poi possibile studiare quello che succede e formulare delle ipotesi.

Come si ottengono gli embrioni?

La topolina viene anestetizzata con una dose letale, dopo si fa un taglio a livello della cavità addominale. Rimossi gli intestini, è possibile vedere i due uteri, un "gomitolo" di circa 1mm che sarebbe l'ovidotto, l'ovario, i corpi grassi.

Con delle pinze da orologiaio viene rimosso utero ed ovidotto (utero se si vogliono le blastocisti, ma bisogna fare l'estrazione molto presto, prima dell'impianto, ovidotto per stadi precedenti) e si dispone in una petri di 3cm con un liquido che mimi le condizioni uterine.

All'interno dell'infundibulo, nell'ampolla, ci saranno tanti batuffoli di cellule follicolari, con all'interno lo zigote.

Come si reimpiantano gli zigoti?

Si apre sempre la cavità addominale, con una pinza si prende l'infundibulo e con un capillare in vetro/silicone con filtro si aspirano prima gli zigoti e poi si "soffiano" (deh, 2018 e non c'è un pipettatore automatico, io non ci credo) dentro l'infundibulo. Durante l'operazione la madre adottiva è anestetizzata ma sveglia, posta su una garza e tenuta ferma (immagino) da uno strumento chirurgico.

Finita l'operazione, si richiude tutto (un punto di sutura sul peritoneo ed uno sulla pelle). Dopo mezz'ora il topo è come prima (secondo me, medita segretamente vendetta).

Dopo19 giorni nascono i cuccioli. Se si usa un embrione più anziano (sempre sui 3-5 DPC) lo si può iniettare con la stessa strategia in utero. In questo caso, i topi nasceranno dopo 16-17 giorni.

Il capillare viene passato su una fiamma per sterilizzarlo. Avendo una sezione di qualche decina di micron, la tensione superficiale fa risalire il liquido e gli zigoti all'interno ed essi non escono, almeno finché non iniettati nell'infundibulo (dove c'è altro liquido e la tensione superficiale è meno importante).

Bisogna stare attenti alle bolle d'aria quando si aspira: la tensione superficiale è forte se c'è dell'aria e non si riesce più a far defluire semplicemente soffiando.

2.1.5 Coltura e manipolazioni degli zigoti.

Ralph Brinster, nel 1963, pubblicò un articolo in cui dichiarava di aver messo a punto le condizioni di coltura che mimavano quanto accadeva all'embrione *in vivo*.