

Relazione scientifica relativa alla missione presso il Salk Institute (La Jolla San Diego, CA)

per lo svolgimento del progetto:

“Vettori lentivirali per la produzione di animali geneticamente modificati. La tecnologia e il suo uso per lo studio del gene AKTIP.”

Il gene umano AKTIP è omologo al murino *Ftl* e al gene *peo* di *D. melanogaster*. Il nostro laboratorio (I.Saggio, *fruitore*) ha studiato il gene umano AKTIP, e determinato che questo svolge un ruolo importante nel metabolismo cellulare. Abbiamo in particolare osservato che la riduzione di AKTIP condiziona la proliferazione cellulare in modo p53-dipendente. Abbiamo anche dimostrato che cellule interferite per AKTIP attivano le proteine del *checkpoint* del ciclo cellulare indotto da danno al DNA e della sua riparazione, come ATM, p53, Chk1, p21. Abbiamo infine osservato la formazione di *foci* contenenti proteine della riparazione del danno al DNA in cellule con ridotti livelli di AKTIP. Questi risultati mostrano sostanziali analogie con il comportamento di cellule private di un gene chiave per la funzione telomerica, la shelterina TRF2 (2), e suggeriscono che AKTIP potrebbe svolgere un ruolo correlato ai telomeri umani.

Per estendere, integrare e confermare il ruolo di AKTIP nel metabolismo cellulare e, in particolare, in quello telomerico, abbiamo pianificato lo studio dell'omologo murino del gene AKTIP, *Ftl*, attraverso analisi in vitro e produzione di animali geneticamente modificati in *Ftl*. Parte di questo lavoro è stato svolto presso il Salk Institute nel laboratorio del prof. Verma, con tre obiettivi:

- l' acquisizione della tecnologia dei lentivirus ricombinanti per la produzione di animali transgenici
- la produzione di vettori lentivirali ricombinanti codificanti per sequenze interferenti dirette contro *Ftl*
- l' infezione con lentivirus ricombinanti di embrioni murini allo stadio di due cellule.

Sono state identificate piccole sequenze interferenti (siRNA) in grado di spegnere selettivamente l'espressione del gene *Ftl* in fibroblasti embrionali murini (MEF), la cui efficienza di silenziamento è stata analizzata per RT-PCR quantitativa in seguito a infezione di MEF con vettori lentivirali codificanti per gli siRNA (Figura 1).

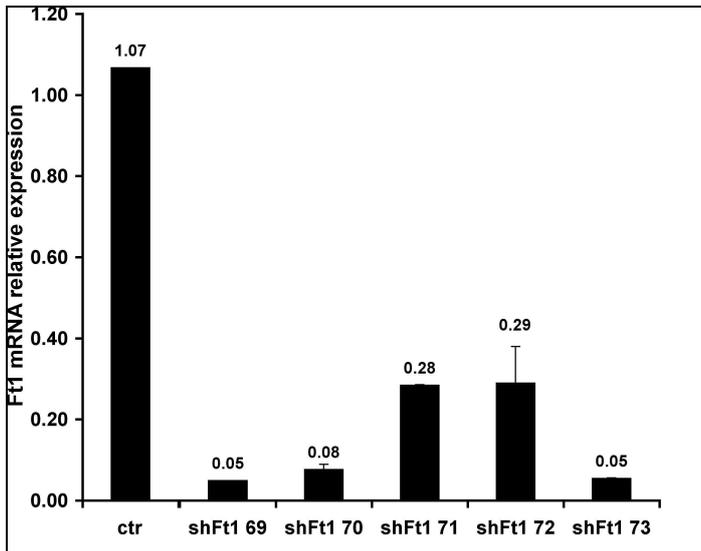


Figura 1: Analisi dell'efficienza di silenziamento di vettori lentivirali codificanti sequenze interferenti il gene *Ff1*. MEF sono stati infettati con lentivettori codificanti per cinque diverse sequenze interferenti dirette contro il gene *Ff1* (*shFf1 69*, *shFf1 70*, *shFf1 71*, *shFf1 72* and *shFf1 73*) o con un vettore di controllo (*ctr*). L' RNA è stato estratto dalle cellule infettate e analizzato per PCR quantitativa. I risultati corrispondono ai valori relativi di espressione del gene *Ff1* avendo assegnato arbitrariamente il valore 1 all'espressione del gene nelle cellule trattate con il vettore di controllo.

Si è acquisita la tecnica della infezione di embrioni murini con i vettori lentivirali, secondo il protocollo messo a punto nel laboratorio del prof. Verma (1). Sono stati prelevati embrioni murini allo stadio di 2 o più cellule, trattati per l'eliminazione della zona pellucida e quindi infettati con i lentivettori ricombinanti ($\sim 10^7$ TU/embrione). Gli embrioni sono stati seguiti per la verifica della tossicità dei trattamenti e per l'espressione del gene reporter eGFP per le 72h che seguivano l'infezione (figura 2), quindi predisposti per l'impianto in femmine di topo pseudo-gravide per la produzione di animali geneticamente modificati.

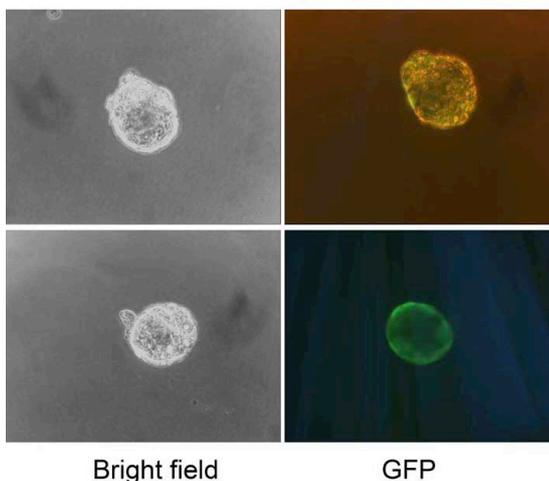


Figura 2: Immagini di embrioni 48h dopo infezione con lentivettori. Nelle immagini ottenute con luce fluorescente è visibile l'espressione del gene reporter eGFP.

Complessivamente, la missione svolta presso il laboratorio diretto dal prof. I. Verma presso il Salk ha permesso di acquisire la tecnologia basata su lentivettori per la produzione di topi geneticamente modificati, fornendo nuove competenze, strumentali agli studi di genetica avanzata che costituiscono un tema dominante per molti dei ricercatori che appartengono al Dipartimento di Genetica e Biologia Molecolare e all'Istituto di Biologia e Patologia Molecolari (CNR).

Referenze

1. **Singer, O., G. Tiscornia, M. Ikawa, and I. M. Verma.** 2006. Rapid generation of knockdown transgenic mice by silencing lentiviral vectors. *Nat Protoc* **1**:286-92.
2. **Smogorzewska, A., and T. de Lange.** 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo J* **21**:4338-48.