



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006
PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,
COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI
E
UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE
PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO
INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE
(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA
E
PROGETTO IN_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI
“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)
“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO
SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – sotto - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Trasatti Federica

Tutor/ Responsabile Scientifico:

Prof.ssa Barbara Barboni

Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:

Università degli studi di Roma “Tor Vergata”

Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:

Responsabile d'Istituto: Prof. A. Finazzi-Agrò

Durata soggiorno laboratorio ospitante:

N. 2 trimestri

Metodologie per la valutazione dell'efficienza di trasfezione negli spermatozoi suini.

Introduzione

L'attività di ricerca riguarda lo studio di come l'efficienza di trasfezione differisca nelle modalità con cui il transgene è integrato nel genoma dell'animale.

L'inserimento di DNA esogeno negli animali da allevamento come bovini, ovini e suini ha lo scopo di migliorare alcune caratteristiche fenotipiche importanti dal punto di vista economico come la resistenza ai patogeni, il valore nutrizionale, ecc.

L'ottenimento di linee animali transgeniche è un processo estremamente lungo e scarsamente efficiente. Nel corso degli anni sono state messe a punto diverse metodiche per la transgenizzazione di animali superiori come il maiale.

La microiniezione, un'affidabile tecnica sviluppata da Gordon e colleghi nel 1980 (Gordon *et al.*, 1980) è il metodo più idoneo per l'introduzione di un gene estraneo nel topo; altre strategie includono il trasferimento nucleare ed il trasferimento genico mediato dai retrovirus. Sfortunatamente queste tecniche hanno limitate applicazioni a causa di una bassa efficienza totale (tra lo 0 ed il 3%) e di problemi associati con la specie-specificità e l'inattivazione del transgene (Brinster RL, Busslinger M, 1989).

Il trasferimento genico mediato dagli spermatozoi è stato suggerito da Brackett e colleghi nel 1971 (Brackett *et al.*, 1971) e consiste nella transgenizzazione di spermatozoi di coniglio per mezzo del virus SV40 radiomarcato. Nel 1989 Lavitrano e colleghi hanno utilizzato spermatozoi incubati con DNA estraneo come vettori per una fecondazione *in vitro* al fine di generare topi transgenici (Lavitrano *et al.*, 1989).

Nonostante tutto, rimane molto da chiarire sui meccanismi biochimici con cui molecole di DNA plasmidico possano entrare nelle cellule spermatiche ed integrarsi all'interno del DNA genomico dello spermatozoo.

Queste conoscenze serviranno a migliorare l'efficienza con cui ottenere spermatozoi transgenici da utilizzare per la fecondazione.

Obiettivi

Scopo del presente progetto è quello di mettere a punto metodologie per la valutazione dell'efficienza di trasfezione negli spermatozoi suini.

Metodologie

Nella prima parte l'intenzione è di utilizzare due approcci: uno basato sull'ibridizzazione fluorescente "in situ" (biotinilazione del vettore e rivelazione con streptavidina FITC-coniugata), per localizzare il DNA esogeno nel nucleo spermatico, ed uno basato sull'amplificazione di una specifica regione del vettore tramite RT-PCR (quantificazione assoluta con il metodo della curva standard), per dimostrarne sia l'internalizzazione nello spermatozoo, che l'integrazione nel genoma cellulare.

Nel primo caso come transgene utilizzerò il vettore pEGFP-C3 della BD Biosciences Clontech; questo plasmide codifica sia per una variante della proteina GFP, la quale scitta verso il rosso (eccitazione massima a 488 nm, emssione massima a 507 nm) sotto il controllo del promotore CMV, che per un promotore del gene resistente alla neomicina sotto il controllo del promotore SV40. Il marker GFP sarà in grado di localizzare gli embrioni transgenici selezionati utilizzando il

gene resistente alla neomicina. Nel secondo potrei utilizzare anche altri vettori come ad esempio il pcDNA-HA dell'Invitrogen.

Nella seconda parte potrei utilizzare diverse tecniche, come la fecondazione in vitro o l'inseminazione artificiale al fine di ottimizzare lo sviluppo di embrioni normospermici nel maiale, in cui risulta un'alta incidenza di polispermia.

Risultati attesi

Al termine del presente progetto mi attendo di mettere a punto le metodologie per la valutazione dell'efficienza di integrazione del transgene negli spermatozoi suini.

Bibliografia

Gordon JW, Scangos JA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**:7380-7384

Brinster RL, Busslinger M (1989) Dangerous liaisons: spermatozoa as natural vectors for foreign DNA? *Cell* **57**(5):701-702

Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**:353-357

Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell* **57**:717-723