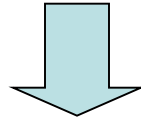


La tecnologia del DNA ricombinante

- I primi passi furono resi possibili verso il 1970 grazie alla scoperta e all'utilizzo in laboratorio degli **enzimi di restrizione**, nonché alle conoscenze acquisite sui **plasmidi**, **batteriofagi** e **virus** e alla possibilità di adattarli a fungere da vettori per introdurre DNA esogeno in cellule batteriche ed in seguito anche in cellule eucariotiche.
- Un grosso impulso venne poi negli anni successivi con la messa a punto delle tecniche di **sequenziamento del DNA** (che permetteva una conoscenza dettagliata a livello molecolare del DNA manipolato) e delle tecniche di **sintesi chimica del DNA** (che permetteva la costruzione ex novo di frammenti di DNA a sequenza desiderata da utilizzare nelle ricombinazioni).

COME FACCIAMO A ISOLARE I GENI E A STUDIARLI?



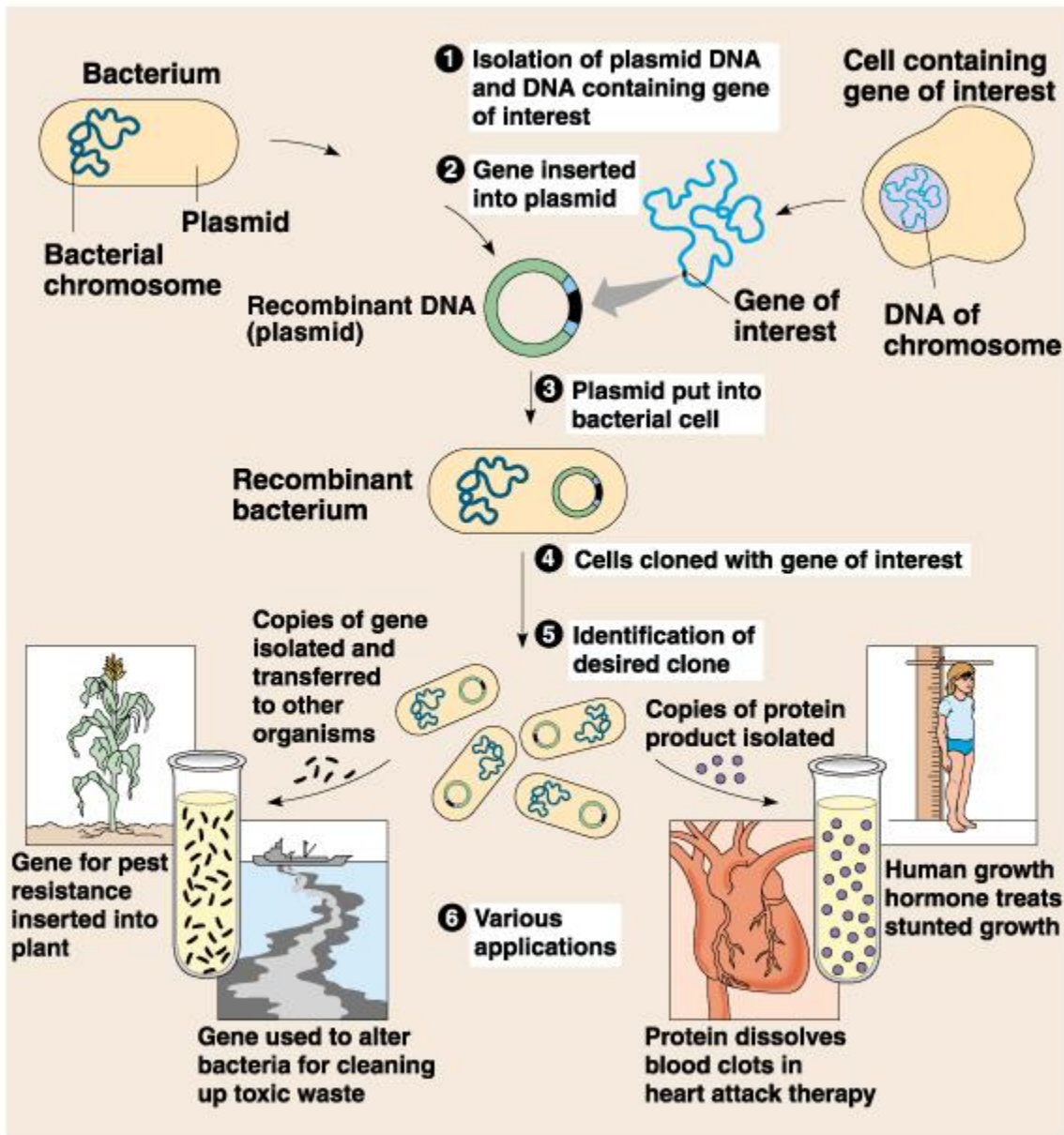
**LA TECNOLOGIA DEL DNA
RICOMBINANTE CI PERMETTE DI
CLONARE I GENI**

**LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE
CI PERMETTE DI
CLONARE I GENI e di ESPRIMERE LE LORO PROTEINE**

DNA RICOMBINANTE

tecnica che permette di

- ❖ ottenere brevi segmenti di DNA clonati e di studiarne la sequenza nucleotidica**
- ❖ di trasferirli nel genoma di altre cellule**
- ❖ di controllare l'incorporazione e l'espressione del DNA clonato**
- ❖ di introdurre mutazioni nel DNA e di studiarne gli effetti**



Biotecnologia in medicina

La maggior parte delle ricerche del DNA ricombinante sono volte alla produzione di proteine o peptidi per scopi terapeutici:

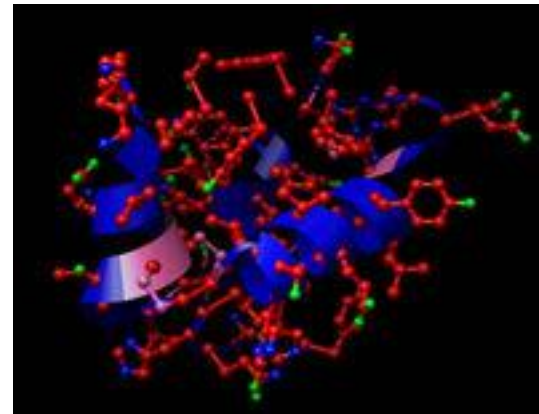
- ✓ Ormoni polipetidici
 - ✓ Prodotti del sangue (coagulanti e trombolitici)
 - ✓ Farmaci antinfettivi e antitumorali
 - ✓ Immunomodulatori e vaccini
-

Rischi e benefici dei farmaci biotecnologici

- Le tecniche di ingegneria genetica non sono prive di rischi e pertanto devono essere utilizzate con cautela.
- Per evitare che dai risultati di queste manipolazioni si producano effetti indesiderati o imprevisti, gli esperimenti sul DNA ricombinante sono sottoposti a regole e a controlli molto severi.
- L'importanza assunta dai farmaci biotecnologici è comunque ormai dimostrata dal fatto che a livello mondiale questi prodotti **rappresentano circa il 20%** di tutti i nuovi farmaci convenzionali approvati ogni anno.

Farmaci biotecnologici

- Il **primo farmaco** ottenuto ingegnerizzando un sistema vivente (batterico) è stato **l'insulina**, approvato dalla FDA nel 1982.
- Anche l'ormone della crescita umano, precedentemente estratto dai cadaveri, fu rapidamente ingegnerizzato.
- Nel 1986 la FDA approvò il **primo vaccino umano**, contro l'epatite B.



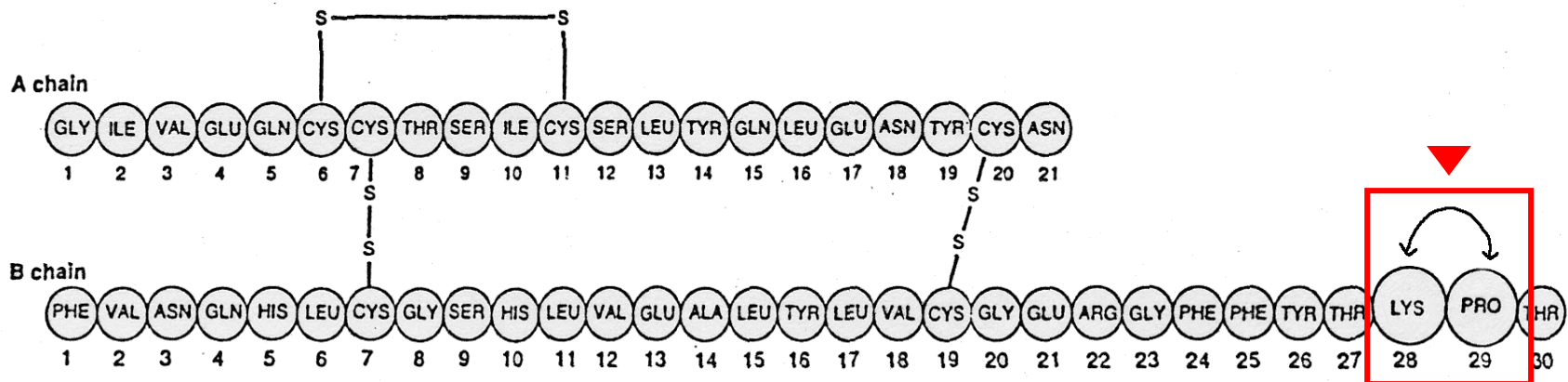
La struttura dell'Insulina
rosso:carbonio, verde:ossigeno;
blu:azoto; rosa:zolfo

La produzione industriale di farmaci utilizzando i sistemi viventi come bioreattori si è da allora largamente diffusa, diventando attualmente la via preferita di sintesi di numerosi farmaci, in particolare per il costo di produzione relativamente basso.

Analoghi dell'insulina

Sono prodotti in cui la sequenza aminoacidica propria dell'insulina umana viene modificata ad arte con delle sostituzioni di uno o più aminoacidi.

Insulina Lispro



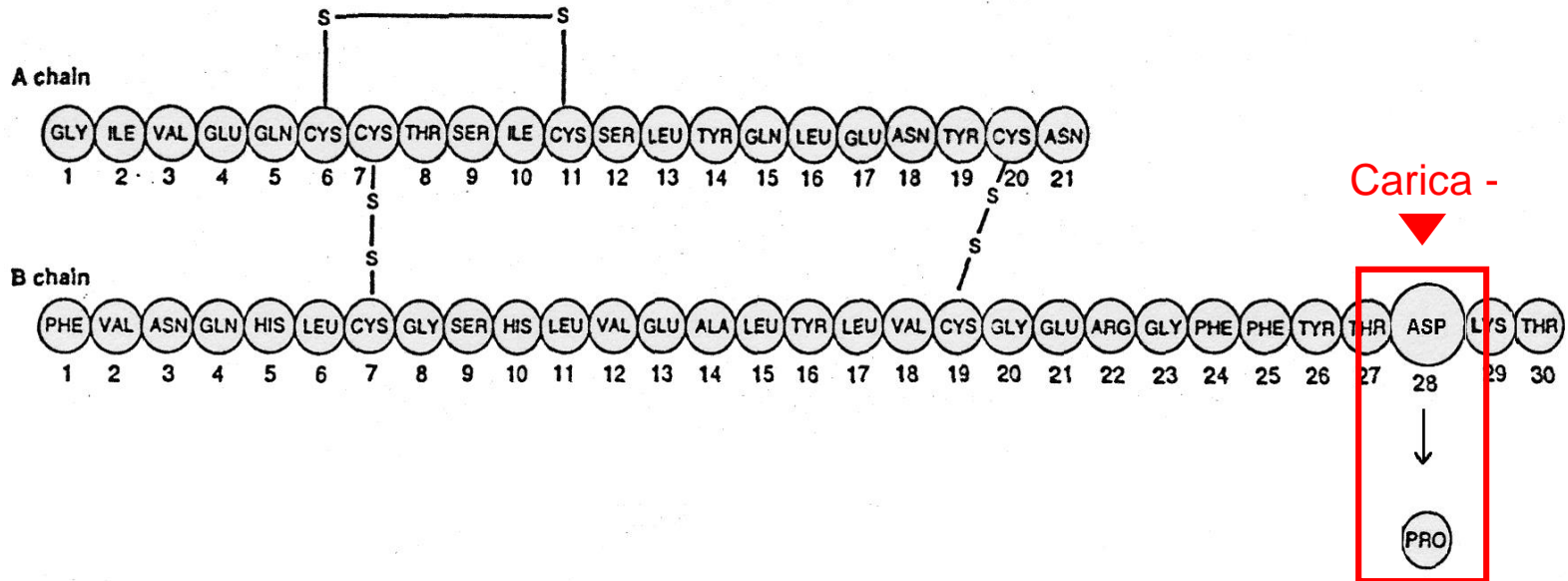
Azione rapida (< 30 minuti)

Durata breve (3 ore)



Analoghi dell'insulina

Insulina Aspart



Azione rapida (~ 60 minuti)

Durata breve (3 ore)



Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Ormoni Polipeptidici

Peptidi o piccole proteine che svolgono funzioni essenziali nel controllo del metabolismo nei mammiferi.

Alcuni sono farmaci salvavita



Ormone della crescita:
Humatrope®

Eritropoietina: regola la produzione di globuli rossi da parte del midollo osseo Epcim®

Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Proteine del sangue

Proteine o fattori coinvolti nei processi della coagulazione del sangue (fattori VII, VIII, IX) sia nei processi che degradano i coaguli (TPA)

Si sono eliminati i rischi associati alla potenziale contaminazione da parte di agenti virali (HIV, HBV, HCV)



TPA: [Activase®](#)



Fattore VIII: [Recombinate®](#)

Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Immunomodulatori e Antitumorali

I più noti sono gli interferoni che a seconda del tipo possono esplicare attività antivirale (α e β), immunomodulatrice (γ) o antitumorale (α).



Interferone β : usato nel trattamento della SM, agisce sui linfociti T inibendone la migrazione e riduce la produzione di citochine. **Avonex[®]**, **Betaferon[®]**, **Rebif[®]**



Interferone α : usato nel trattamento di cancro al rene, melanoma, alcune forme di linfoma e leucemie.

IntronA[®], **Infergen[®]**, **Alfaferone[®]**, **Roferon-A[®]**

Interferone γ : usato per ridurre l'incidenza di infezioni in pazienti con ridotte difese immunitarie. **Imukin[®]**



Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Immunomodulatori e Antitumorali

Altre molecole che trovano applicazione nella terapia antitumorale sono le interleuchine (IL-2), antagonisti del TNF



IL-2: usata nel trattamento di alcune forme tumorali come il cancro al rene e alcuni melanomi. [Proleukin®](#)

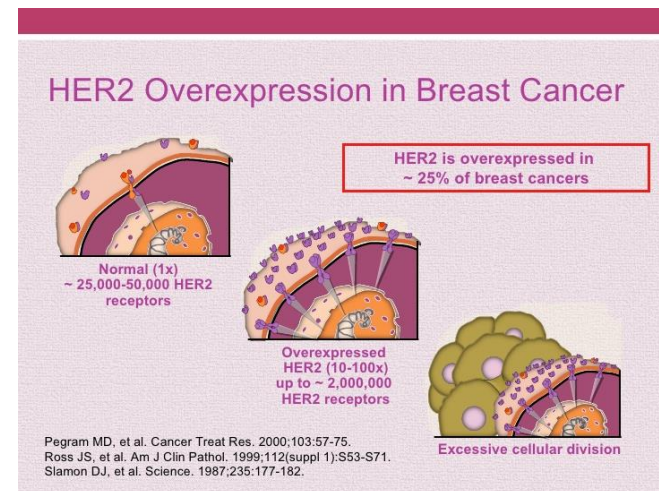


Antagonisti del TNF: usati nel trattamento dell'artrite reumatoide e psoriasica [Enbrel®](#), [Remicade®](#),

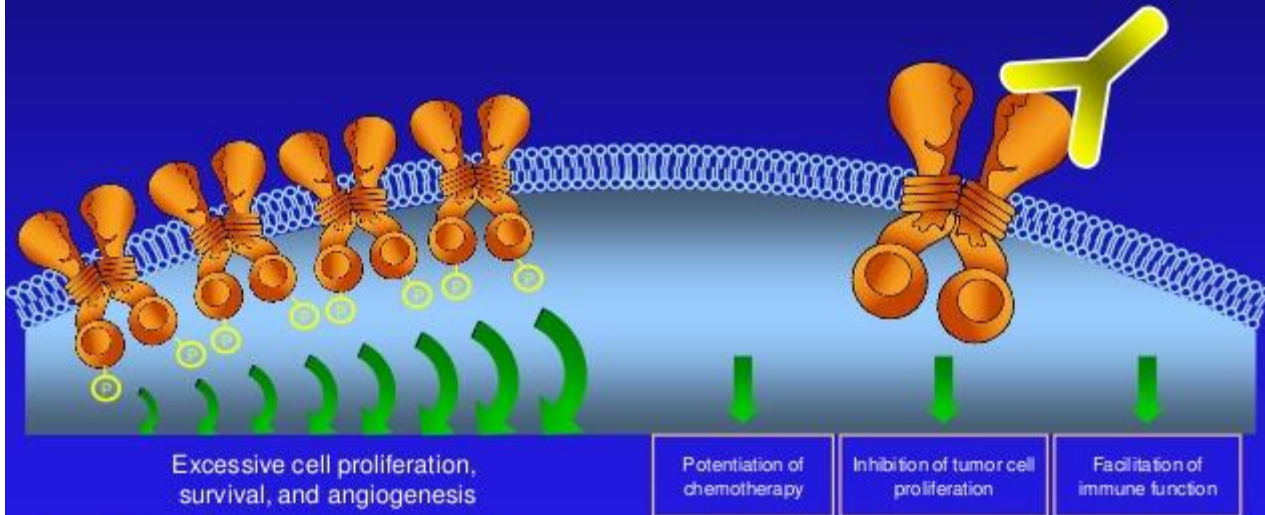
I risultati dei farmaci biotecnologici: anticorpi nella terapia antitumorale

Circa il 30% delle pazienti con tumore mammario, produce un'elevata quantità di una proteina, chiamata HER2, fondamentale per la crescita del tumore. Contro l'HER2 è stato messo a punto un farmaco, il **trastuzumab**, anticorpo monoclonale impiegato con successo negli anni passati per trattare il tumore mammario metastatico. Scarsi gli effetti collaterali con l'eccezione di un certo grado di cardiotoxicità in meno del 4-5% delle pazienti trattate.

L'anticorpo monoclonale è stato utilizzato associato alla chemioterapia, nei tumori del seno in fase iniziale, subito dopo il trattamento chirurgico. Il **trastuzumab** ha ridotto il rischio di ricaduta del 50%. La sopravvivenza libera da malattia a 4 anni nelle pazienti trattate con sola chemioterapia è stata del 67%, mentre in quelle trattate con chemioterapia più trastuzumab è stata dell' **85%**.



Anti-HER2 Antibodies: Mechanism of Action



Baselga and Albanell. *Ann Oncol.* 2001;12(suppl 1):S35.
Noonberg and Benz. *Drugs.* 2000;59:753.

DNA ricombinante

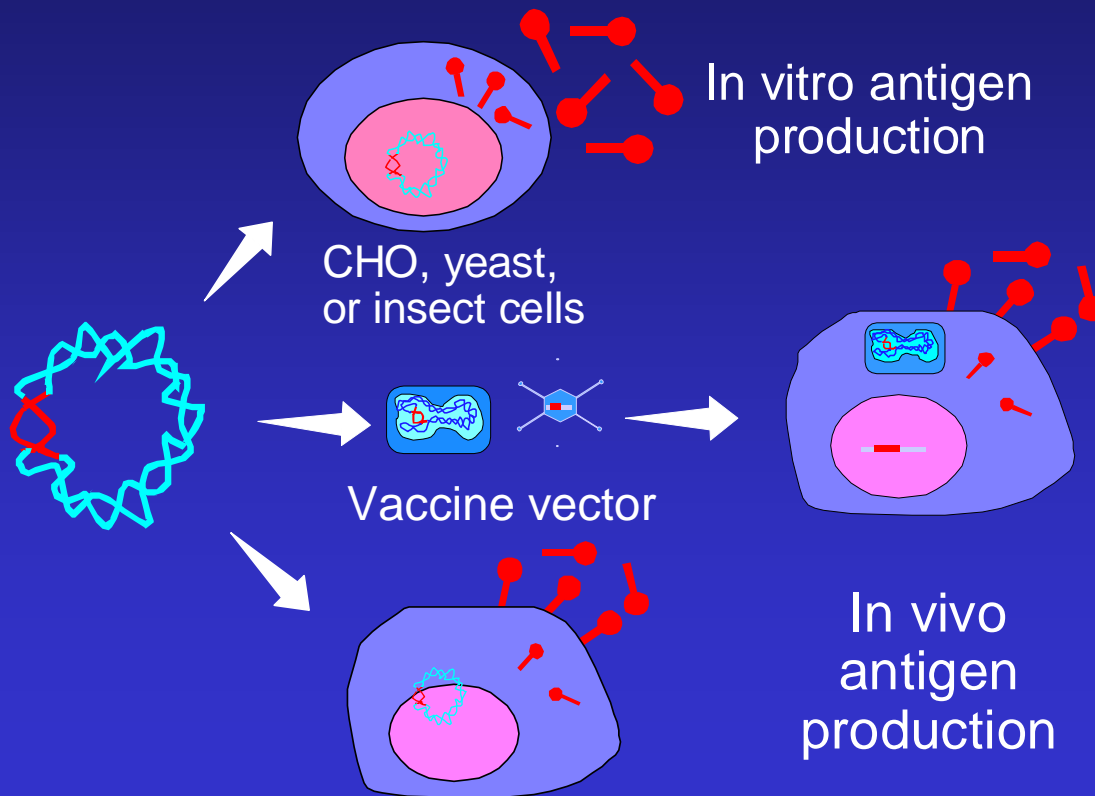


**proteine virali
antigenicamente reattive
altamente purificate**



VACCINI

Recombinant DNA Technology and Vaccine Development



Vaccini Ricombinanti

Mediante la tecnica del DNA ricombinante sono stati prodotti diversi vaccini la maggior parte dei quali è stata allestita clonando in una cellula procariota o eucariota il gene del microrganismo che codifica per la principale proteina immunogena, cioè quella proteina che nell'ospite porta alla produzione di anticorpi in grande quantità.

Vaccini a sub-unità



Vaccini virali: una proteina del capsido o della membrana esterna (envelope)

Vaccini batterici: proteine di adesione (antigeni delle fimbrie) o specifiche tossine modificate (anatossine)

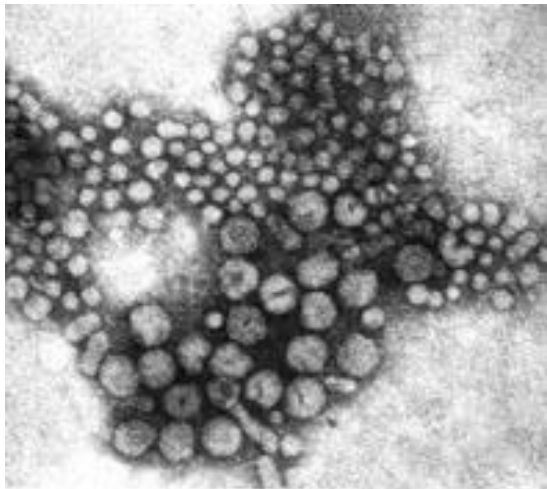
Vaccino contro l'Epatite B:

1° Vaccino Ricombinante Autorizzato

- Epatite B rappresenta un grosso problema sanitario: il virus responsabile (HBV), oltre che a causare la cirrosi epatica è anche un agente cancerogeno (cancro al fegato).
 - Ad oggi il numero dei portatori cronici è stimati sui 300 milioni e possono trasmettere il virus a coloro che vengano in contatto con sangue infetto, liquido seminale, secrezioni vaginali, saliva, sudore o lacrime perpetuando così il mantenimento dell'infezione.
-

Vaccino contro l'Epatite B: 1° Vaccino Ricombinante Autorizzato

- Virus a DNA con envelope
- Il virione contiene due antigeni associati al guscio proteico interno (*core*): *Hbc* e *Hbe* e un antigene di superficie (sull'*envelope*) *HBsAg* (*Hepatitis B surface Antigen*)



HBsAg rappresenta quindi la molecola di scelta per allestire il vaccino.

Vaccino contro l'Epatite B:

1° Vaccino Ricombinante Autorizzato

- Il gene virale che codifica per *HBsAg* è stato clonato in un vettore e quindi trasferito ed espresso in un lievito *S. Cerevisiae*
- L'antigene prodotto dal lievito presenta tutte le caratteristiche della proteina *HBsAg* nativa (glicosilazione e altre modifiche post-traduzionali)
- Antigene viene purificato per ultracentrifugazione, cromatografia e precipitazioni frazionate (purezza > 98%) viene adsorbito su $Al(OH)_3$ che funziona da adiuvante



Enderix-B®



Vaccino contro la Meningite Batterica

- Il maggior responsabile di questa patologia è il batterio *Haemophilus Influenzae* di tipo b (Hib).
- Prima della diffusione del vaccino la Meningite Batterica colpiva negli Stati Uniti 1 bambino su 200
- 1/4 dei bambini che sopravvivevano all'infezione presentavano lesioni cerebrali o perdita dell'udito

Oggi, grazie al vaccino ricombinante la meningite da Hib è una rarità: l'incidenza di infezione si è ridotta del 90% ed in alcuni paesi è addirittura scomparsa



Hiberix®

Produzione di tossine batteriche modificate, da parte dello stesso ceppo patogeno, dopo mutazione genetica

Vaccino Antipertosse

- Mediante la tecnica del DNA ricombinante è stato ottenuto un ceppo di Bordetella Pertussis capace di produrre una tossina della pertosse del tutto identica, antigenicamente, a quella del ceppo patogeno, ma assolutamente priva di tossicità.
- La tossina mutata, prodotta in laboratorio su larga scala, viene purificata e impiegata come vaccino



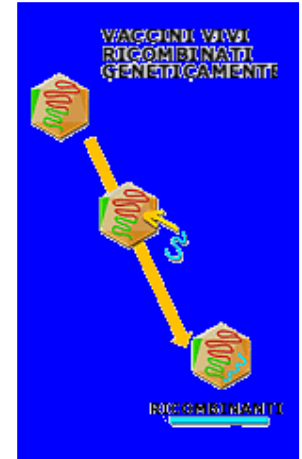
Vaccini vivi ricombinanti

Batteri o virus modificati
geneticamente in modo da poter
essere impiegati come vaccini
vivi ricombinanti

Vaccini vivi ricombinanti

Microrganismi eterologhi naturalmente non patogeni o resi tali

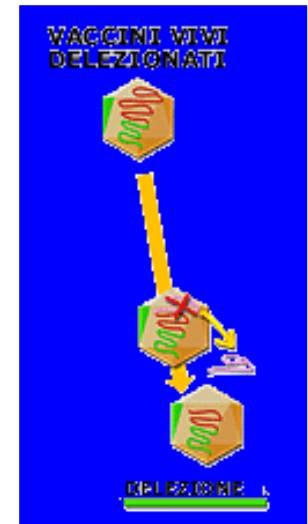
- Alcuni proxivirus e batteri del genere *Salmonella* ed *Escherichia*
- Dopo ingegnerizzazione fungono da vettori di geni esogeni, esprimono cioè le proteine immunogene dell'agente patogeno verso cui si vuole proteggere l'individuo
- Nuovi vaccini: si sono incorporati i geni di alcuni virus (Epatite B, *H. Simplex*, Influenza Virus) nel genoma del *Vaccinia Virus*
- Nel coniglio, esperimenti preliminari di vaccinazione hanno dimostrato che si ottiene protezione valida verso questi virus
- La scelta di questo virus “vettore” sta nella sua resistenza: un vaccino così allestito non deve essere refrigerato e può venire liofilizzato e somministrato mediante scarificazione cutanea



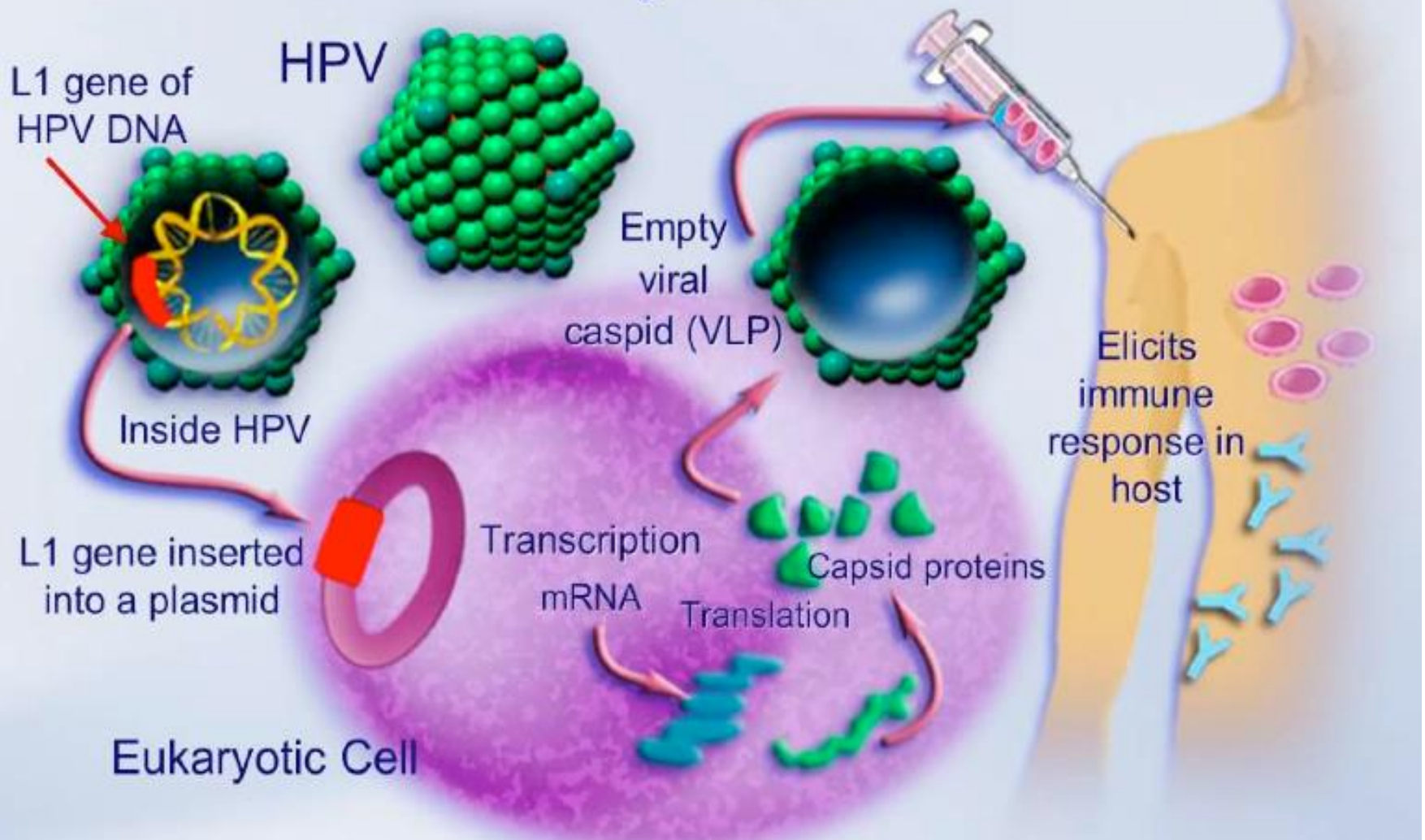
Vaccini vivi ricombinanti

Ceppi di microrganismi patogeni omologhi

- In questi microrganismi sono stati modificati o deleti i geni che ne condizionano la virulenza
- Il microrganismo potrà moltiplicarsi nel soggetto vaccinato, stimolando attivamente la risposta immunitaria specifica senza però causare la malattia
- Virus Erpetico allo studio come vaccino dopo delezione del gene TK che causa la virulenza
- Batterio *Vibrio Cholerae* allo studio come vaccino dopo averlo privato della capacità di produrre l'enterotossina attiva, ma ancora in grado di indurre immunità



HPV L1 Virus-Like-Particle (VLP) Vaccine Synthesis

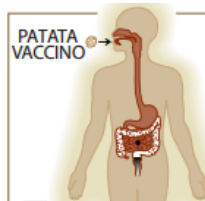
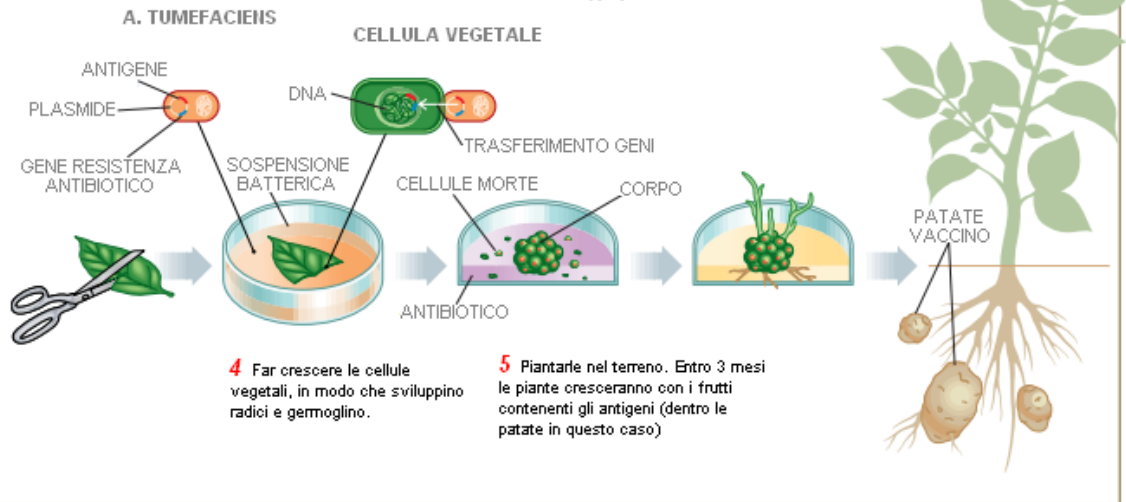


COME FARE UNA PIANTA VACCINO

1 Tagliare la foglia

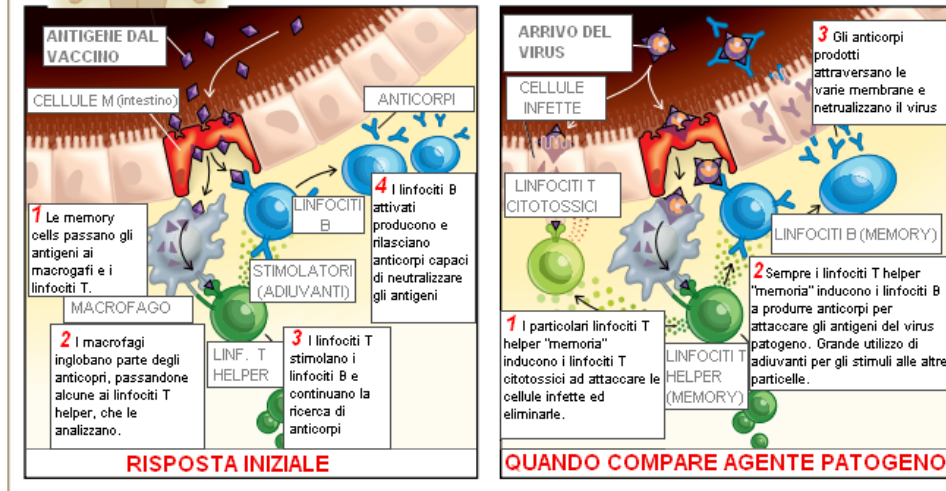
2 Esporre la foglia all'azione dei batteri con gli antigeni d'interesse. Passaggio dei geni alle cellule vegetali, attraverso la membrana cellulare

3 Immettere l'antibiotico per eliminare le cellule senza i nuovi geni. Aspettare la moltiplicazione delle cellule sopravvissute, in modo che si formi un aggregato



COME AGISCONO I CIBI VACCINO

L'antigene contenuto nell'alimento passa attraverso le cellule M (cellule altamente specializzate presenti nell'intestino con la funzione di campionare gli antigeni) e subisce l'attacco del sistema immunitario come se fosse un vero agente patogeno. Questa risposta lascia cellule "memoria" in grado di neutralizzare tempestivamente un eventuale malattia reale.



PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

Categorie di prodotti	Applicazione
<i>PROTEINE DEL SANGUE</i>	
Attivatore tissutale del plasminogeno (TPA)	Dissoluzione di trombi e coaguli
Fattori della coagulazione VII,VIII,IX	Terapia sostitutiva dell'emofilia
Eritropoietina	Terapia dell'anemia (rigenerazione eritrociti)

PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

Categorie di prodotti	Applicazione
<i>ORMONI E FATTORI DI CRESCITA</i>	
Insulina	Terapia del diabete ins.dipendente
Ormone della crescita	Terapia del nanismo
Epidermal Growth Factor (EGF)	Cicatrizzazione di ferite
Fibroblasth Growth Factor (FGF)	Trattamento delle ulcere
β-endorfine	Terapia del dolore

PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

Categorie di prodotti	Applicazione
<i>ENZIMI</i>	
α_1-antitripsina	Terapia dell'enfisema
Urochinasi	Coagulazione del sangue
Proteasi	Terapia di edemi e stati infiammatori
Idrolasi	Terapia di edemi e stati infiammatori

PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

Categorie di prodotti	Applicazione
<i>IMMUNOMODULATORI</i>	
Interferoni (α, β, γ)	Farmaci antivirali e antitumorali Terapia del sarcoma di Kaposi (HIV-positivi)
Interleuchine (IL-2)	Terapia antitumorale e dei disordini immunitari
<i>Tumor Necrosys factor</i>	Farmaco antitumorale
<i>Granulocyte-Colony Stimulating factor (G-CSF)</i>	Terapia infezioni (post-chemio)
<i>Granulocyte/Macrophage CSF (GM-CSF)</i>	Trapianto midollo osseo, antitumorale

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

<i>medicina umana</i>	Farmaci e vaccini
	Diagnosi e terapia malattie infettive
	Medicina legale
	Animali transgenici ⇒ farmaci
	Animali transgenici ⇒ trapianti

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

<i>Veterinaria</i> <i>Zootecnia</i>	Farmaci e vaccini
	Diagnosi e terapia malattie infettive e parassitarie
	Genetica e selezione
	Animali transgenici
	Animali clonati

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

agricoltura	Piante transgeniche resistenti a gelo, marcescenza, malattie, erbicidi, a terreni poveri...
	Piante transgeniche ⇒ fitofarmaci e vaccini
	Piante transgeniche per varietà florovivaistiche
	Microrganismi ⇒ bioinsetticidi

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

Chimica	Tecnologie della fermentazione per produzione di etanolo, metano etc.
	Enzimi industriali per industrie tessili, lattiero-casearie, conciaria...

PER IL CLONAGGIO SERVE:

- Un metodo per tagliare il DNA in punti precisi
- Un metodo per unire covalentemente due frammenti di DNA
- Un vettore capace di autoreplicarsi per ottenere molte copie del DNA clonato
- Una cellula ospite per permettere al vettore di replicarsi
- Un metodo di selezione delle cellule ospiti che hanno il vettore con il DNA da clonare.

ospite	vettore	prodotti
Cellule batteriche	plasmidi	farmaci ormoni enzimi vaccini
Cellule di lievito	plasmidi	farmaci enzimi vaccini
Cellule animali	vettori virali	farmaci immunodiagnostici vaccini
	vettori retrovirali	Organismi transgenici

ospite	vettore	prodotti
Cellule vegetali	plasmidi di agrobacterium	Piante transgeniche
	vettori virali	piante transgeniche

- **DNA RICOMBINANTE: DUE MOLECOLE DI DNA VENGONO UNITE IN PROVETTA E FATTE RIPRODURRE IN LABORATORIO**

La base della tecnologia del DNA ricombinante sta nella capacità di manipolare il DNA in provetta.

Ciò, a sua volta, dipende dalla disponibilità di enzimi purificati. Gli enzimi a disposizione dei biologi molecolari si dividono in 4 categorie:

Nucleasi

DNA polimerasi

Ligasi

Enzimi che modificano le estremità

Le **nucleasi** sono enzimi capaci di idrolizzare legami fosfoesterei degli acidi nucleici. In natura si sono evolute numerosissime nucleasi che si differenziano per la natura del substrato, e per il grado di specificità rispetto alla sequenza nucleotidica.

Terminologia:

DNAasi (DNAases) – agiscono solo sul DNA

RNAasi (RNAases) – agiscono solo sull'RNA

*Alcune, almeno in certe condizioni, possono agire su entrambi i substrati

Esonucleasi (Exonucleases) – possono agire solo sul nucleotide terminale di una catena lineare, liberandolo, alcune solo al terminale 5', altre solo al terminale 3', qualcuna ad entrambi

Endonucleasi (Endonucleases) – possono agire solo su legami fosfoesterei interni ad una catena, lontani dal terminale per almeno alcuni nucleotidi

Nucleasi per filo singolo (single-strand Nucleases) – possono agire solo su legami fosfoesterei di nucleotidi le cui basi non sono appaiate.

Nucleasi per doppio filamento (double-strand Nucleases) – possono agire solo su legami fosfoesterei interni ad un duplex di filamenti complementari. Normalmente idrolizzano un legame su ciascuno dei due filamenti, in posizione corrispondente (lasciando **terminali tronchi** o “**blunt ends**”, o sfalsata di qualche posizione (lasciando alcuni nucleotidi sporgenti a filo singolo, al **5'** o al **3'**, su entrambi i frammenti, **terminali adesivi** o “**sticky ends**”).

*Alcune sono in grado di agire sia su singolo che su doppio filamento.

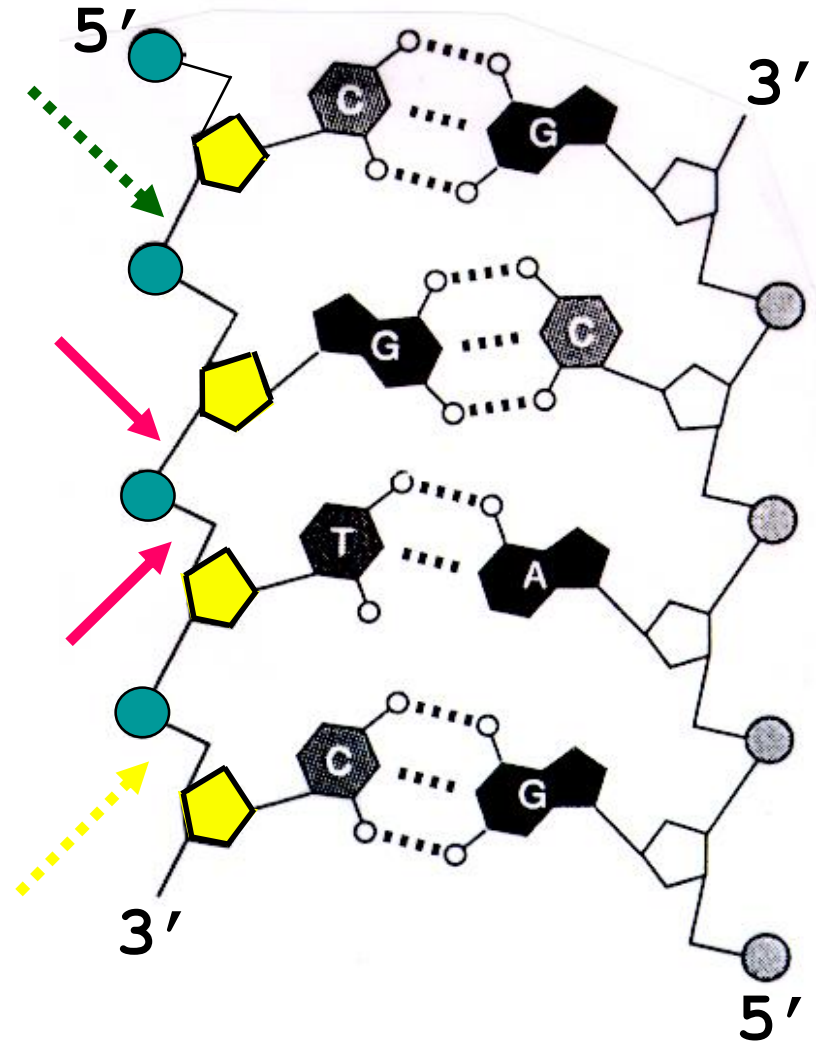
Più spesso il gruppo fosfato viene lasciato al terminale **5'**, ma da alcune al **3'**.

Le nucleasi (idrolasi) idrolizzano i legami fosfodiesterici

Le **esonucleasi** rompono il legame al termine dei filamenti

Le **endonucleasi** rompono il legame internamente nel filamento dando prodotti sia 5' sia 3' fosfati

Le **esonucleasi** rompono il legame al termine dei filamenti (proofreading)



Enzimi per manipolare DNA e RNA

1. Enzimi di restrizione (tipo II)

2. DNA polimerasi

A. DNA dipendenti

- *E. coli* DNA polimerasi I (oloenzima, Klenow)
- DNA polimerasi fagiche (T4, T7)
- *Taq* DNA polimerasi

B. RNA dipendenti

- Trascrittasi inversa

C. Indipendenti da stampo

- Terminal transferasi

3. RNA polimerasi

A. DNA dipendenti

- *E. coli* RNA polimerasi
- RNA polimerasi fagiche (SP6, T3, T7)

B. Indipendenti da stampo

- Poly(A) polimerasi

4. Fosfatasi e chinasi

- T4 polinucleotide chinasi
- Fosfatasi alcalina

Enzimi per manipolare DNA e RNA

5. Endonucleasi

- Deossiribonucleasi I (DNasi I)
- Nucleasi di micrococco
- Nucleasi P1, S1, etc.

6. Esonucleasi

- Esonucleasi VII (singolo filamento)
- Esonucleasi di lambda (doppio filamento, 5' -> 3')
- Esonucleasi III (doppio filamento, 3' -> 5')

7. Ribonucleasi

- Ribonucleasi A (RNasi A)(endoribonucleasi, taglia dopo C e U)
- Ribonucleasi H (RNasi H) (endoribonucleasi, taglia gli RNA nei duplex ibridi DNA/RNA)
- Ribonucleasi T1 (RNasi T1)(endoribonucleasi, taglia dopo G)

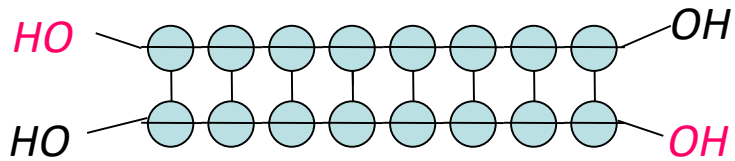
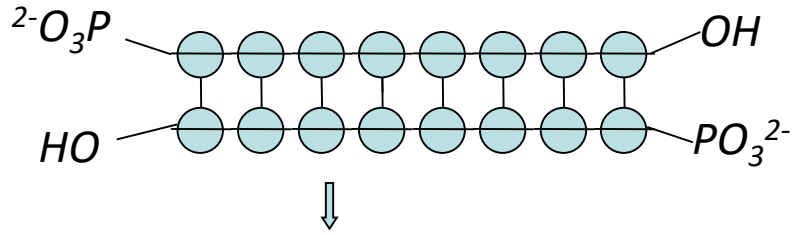
8. DNA ligasi

- *E. coli* DNA ligasi
- T4 DNA ligasi

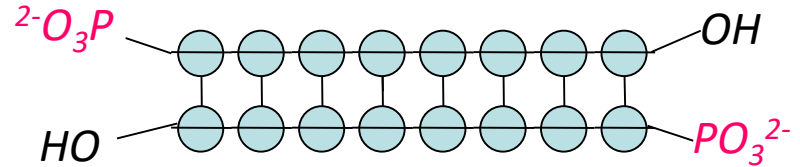
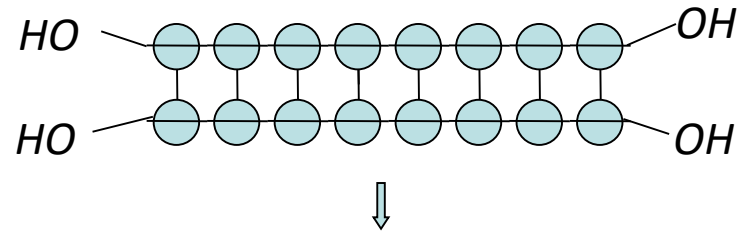
9. RNA ligasi

- T4 RNA ligasi

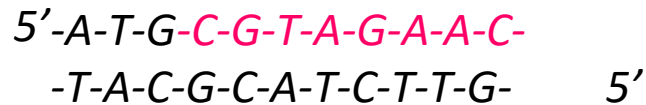
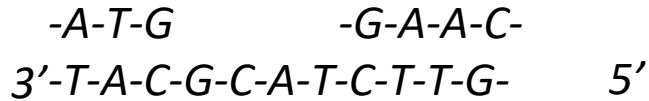
Fosfatasi alcalina



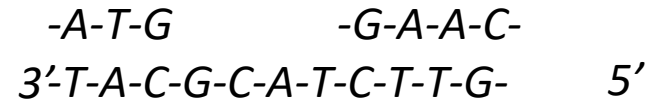
Polinucleotide chinasi



DNA polimerasi I



Frammento di Klenow



Trascrittasi inversa



La DNA polimerasi I: frammento di Klenow

L'attività esonucleasi 5' → 3' della *DNA polimerasi I di E. coli* è spesso fonte di problemi perché degrada i primer presenti nella reazione e rimuove il gruppo 5'-fosfato dei frammenti di DNA che incontra, impedendo l'azione della DNA ligasi.

Il frammento di Klenow si ottiene per delezione dei primi 323 residui di aminoacidi all'estremità N-terminale della *DNA polimerasi I di E. coli*. L'enzima è privo della pericolosa attività esonucleasi 5' → 3', pur mantenendo le attività di polimerasi e di esonucleasi 3' → 5'.

Applicazioni

- Marcatura del DNA (*random priming*)
- Riempimento di estremità 5'-sporgenti (*fill-in*) *Le sticky-end possono essere rese blunt.*

Nella procedura originale di Klenow si digeriva l'oloenzima con una proteasi (subtilisina), ottenendo un polipeptide di peso molecolare 76.000 dalton. Oggi il gene deleto è stato clonato in *E. coli*, *facilitando* la purificazione della proteina corrispondente.

Le nucleasi

Le nucleasi hanno ampio spettro di attività ma per la maggior parte si tratta di esonucleasi, che rimuovono i nucleotidi dalle estremità di molecole di DNA e/o RNA, o di endonucleasi che tagliano i legami fosfodiesterici all'interno di una catena polinucleotidica.

Una endonucleasi di restrizione è un enzima che lega una molecola di DNA a livello di una sequenza specifica e taglia il doppio filamento in quella posizione o in prossimità di essa.

Questi enzimi sono alla base del clonaggio dei geni e di tutti gli altri aspetti della tecnologia del DNA ricombinante

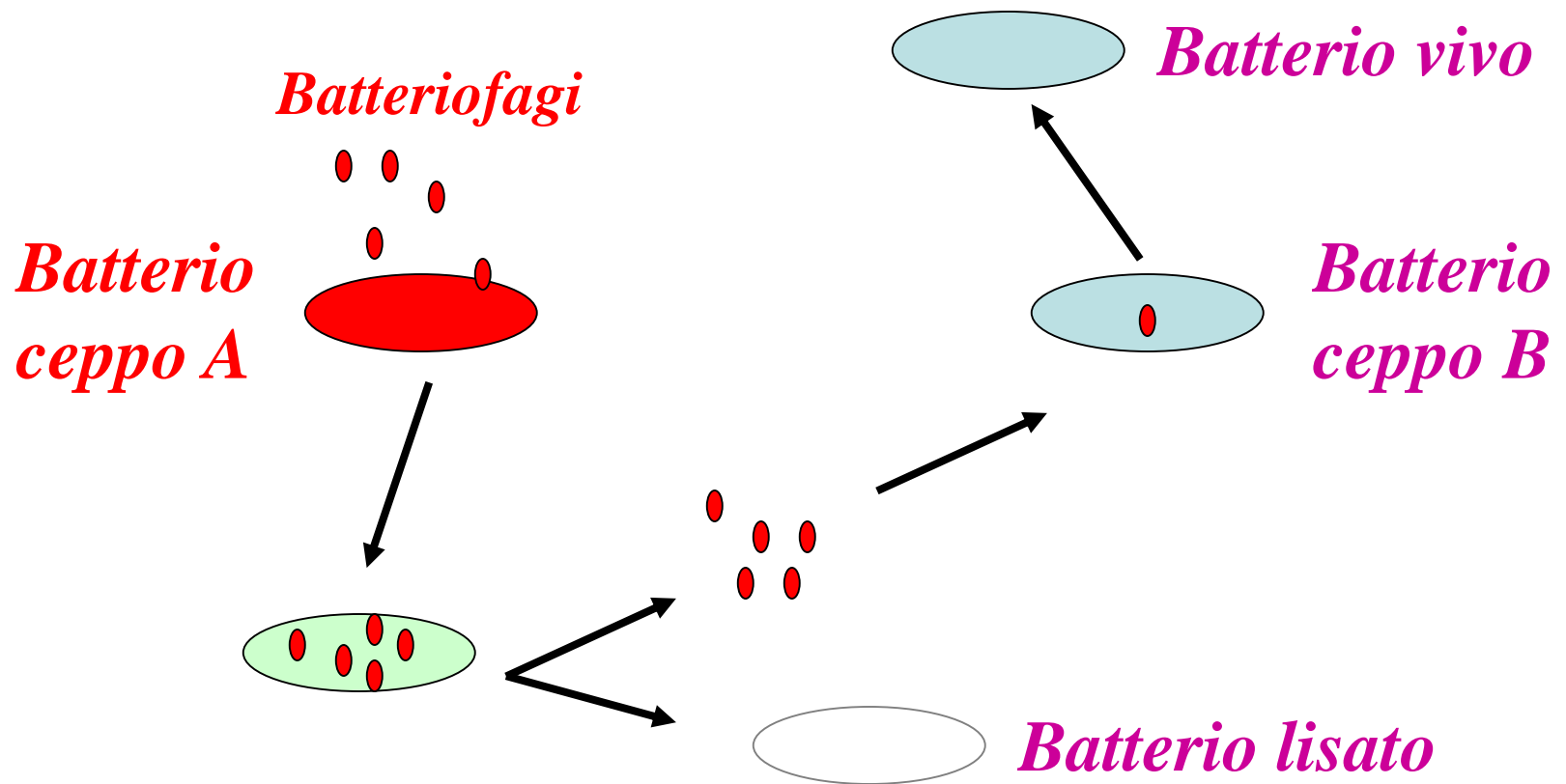
GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

- Sono enzimi che tagliano la doppia elica del DNA in corrispondenza di specifiche sequenze. Per questo motivo vengono anche detti **endonucleasi di restrizione** (invece le esonucleasi distruggono il DNA partendo dalle estremità).
- Ne esistono molti tipi diversi, ognuno dei quali riconosce una sequenza particolare.

Discovery

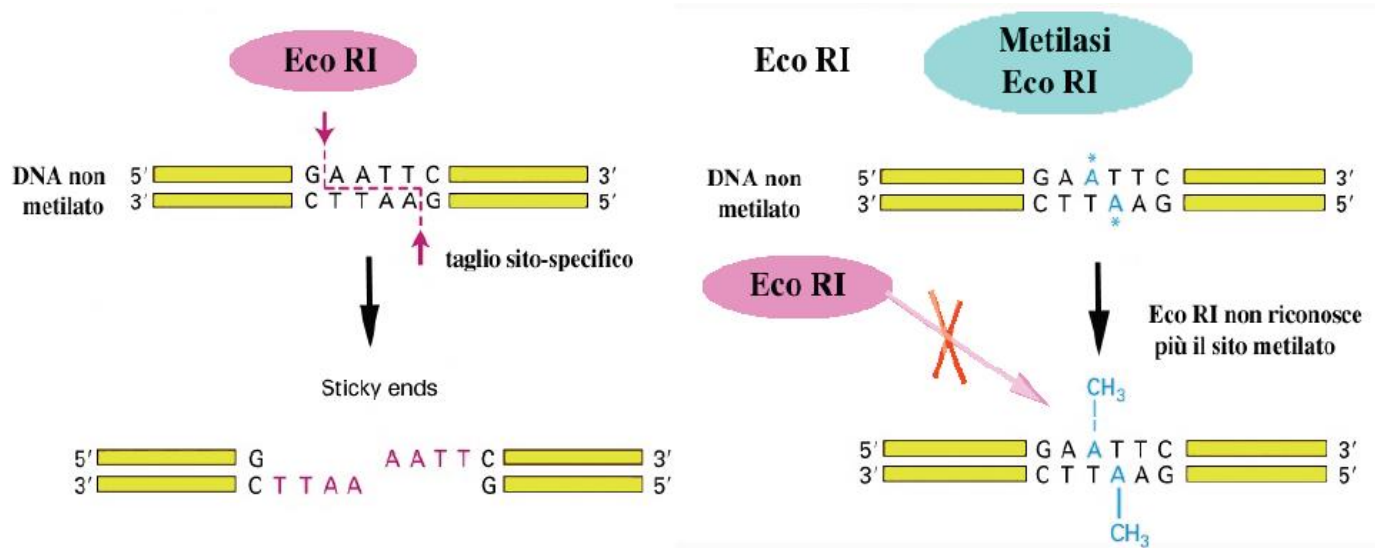
- Arber and Dussoix in 1962 discovered that certain bacteria contain Endonucleases which have the ability to cleave DNA.
- In 1970 Smith and colleagues purified and characterized the cleavage site of a Restriction Enzyme.
- Werner Arber, Hamilton Smith and Daniel Nathans shared the 1978 Nobel prize for Medicine and Physiology for their discovery of Restriction Enzymes.

Gli enzimi di restrizione proteggono i batteri dall'introduzione di molecole di DNA esogeno



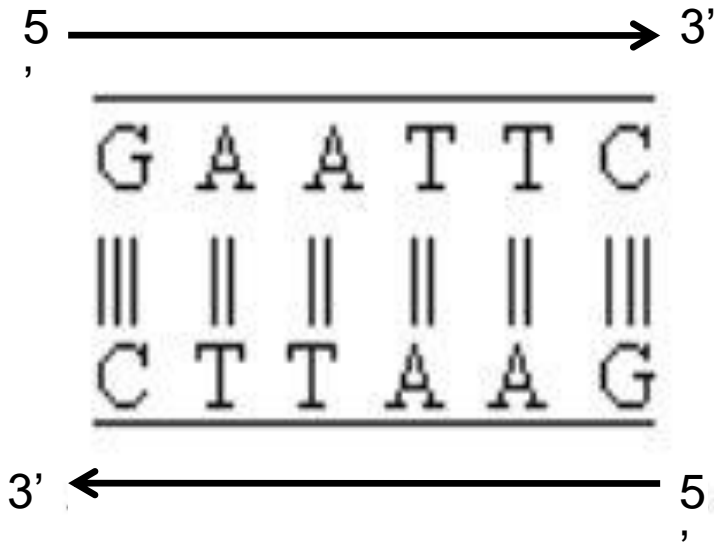
-Nel 1970 Arber, Nathans e Smith isolano il primo enzima che taglia il DNA a livello di una sequenza nucleotidica specifica.

-Endonucleasi di restrizione e metiltransferasi formano il SISTEMA DI MODIFICAZIONE E RESTRIZIONE dei batteri.



Palindromes in DNA sequences

Genetic palindromes are similar to verbal palindromes. A palindromic sequence in DNA is one in which the 5' to 3' base pair sequence is identical on both strands.



•Gli enzimi di restrizione, consentendo di tagliare il DNA in frammenti non casuali, la cui grandezza dipende unicamente dalla sequenza lasciando estremità specifiche.

•Costituiscono un formidabile strumento sia per l'analisi che per la manipolazione del DNA.

Sistemi di restrizione-modificazione

Tipo I

- Un singolo enzima contiene attività di restrizione e di metilazione su subunità diverse
- Il taglio viene effettuato in modo non specifico lontano dalla sequenza di riconoscimento (da 100 fino a 1000 bp a valle)
- Mg^{2+} , ATP e S-adenosilmetionina come cofattori

Tipo II

- Due enzimi distinti per il taglio e la metilazione.
- Non richiedono cofattori se non **Mg^{2+}**
- Riconoscono la stessa sequenza **palindromica** e agiscono al suo interno

Tipo III

- Caratteristiche analoghe a quelli di tipo I
- Riconosce e modifica una sequenza **palindromica** ma taglia a 25-27 bp di distanza

Tipo IIs

- Due enzimi separati che riconoscono una sequenza non palindromica
- Tagliano su di un solo lato delle sequenza bersaglio entro 20 bp

Nomenclatura:

1. Le prime tre lettere, scritte in corsivo, sono prese da genere e specie del batterio di origine.
2. Sierotipi differenti dello stesso organismo possono essere identificati da una quarta lettera minuscola (Es. *Hind*, *Hinf*).
3. Può seguire una lettera maiuscola o un numero, che identifica un ceppo particolare di quel batterio.
4. Un numero romano indica l'ordine di scoperta, qualora dallo stesso batterio vengano isolati enzimi diversi.

Enzima	Organismo di provenienza
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i> , 1° enzima
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i> , 3° enzima
<i>HindII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> , ceppo d, 2° enzima
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> , ceppo d, 3° enzima
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , ceppo H, 1° enzima

Le prime 3 lettere, scritte in corsivo sono prese dalla nomenclatura binomiale del batterio di origine

Escherichia coli ► Eco

Sierotipi differenti dello stesso organismo sono identificati da una quarta lettera minuscola

Haemophilus influenzae ► c,d e f ► Hinf

Un numero romano indica l'ordine di scoperta, qualora dallo stesso batterio vengano isolati enzimi diversi

Haemophilus influenzae ► Hinf I, Hinc II, Hind III

Endonucleasi di restrizione di tipo II

- Riconoscono specifiche sequenze palindromiche
- più di 3000 enzimi caratterizzati
- più di 500 sono disponibili per l'uso di laboratorio
- Alcuni tagliano il DNA lasciando prolungamenti fosfato 5' oppure prolungamenti ossidrilici 3' (estremità coesive)
- Altri tagliano lasciando estremità nette "blunt"
- In condizioni di reazione estreme manifestano attività non specifica "*star*"

ER che riconoscono

4 pb

Mbo I:



Hae III



Alu I



Hha I



Rsa I



ER che riconoscono

6 pb

Eco RI:



Hind III:



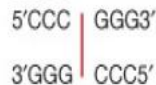
Bam HI:



Sal I:



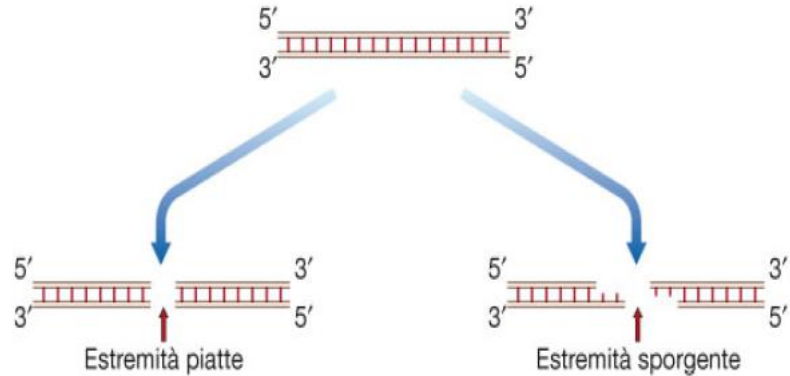
Sma I:



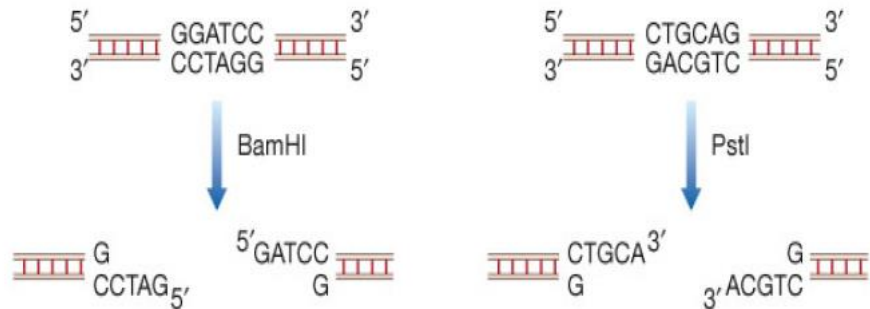
Rsa I:



A I tagli da parte di enzimi di restrizione possono generare sul DNA estremità piatte o sporgenti



B Estremità sporgenti in 5' o in 3'



Il taglio con gli enzimi di restrizione può generare diversi tipi di estremità.

Riconoscono più di 130 diverse sequenze nucleotidiche (sequenze palindromiche generalmente di 4,6 o 8 nucleotidi).

QUANTE VOLTE TAGLIA UN ENZIMA DI RESTRIZIONE?

La maggior parte riconosce palindromi di 4 o 6 nucleotidi. Se assumiamo che i 4 nucleotidi siano distribuiti a caso nelle molecole di DNA:

-per enzimi che riconoscono palindromi di 4 nt si avrà IN MEDIA un taglio ogni 256 nucleotidi (4^4).

-per enzimi che riconoscono palindromi di 6 nucleotidi avremo IN MEDIA un taglio ogni 4.096 nucleotidi (4^6).

In realtà, solo l'analisi sperimentale può fornire dati sul numero e la posizione dei siti di restrizione

Enzymes	Suppliers	Recognition Sequence	Isoschizomers	Type	Other Names
EcoRI	ABCFGHIJKMNOQRSUVXY	G↓AATTC	yes	Type II restriction enzyme	-
M.EcoRI	JKN	GAATTC	yes	Type II methyltransferase	-
EcoRII	FJMOS	↓CCWGG	yes	Type II restriction enzyme	-
M.EcoRII	-	CCWGG	yes	Type II methyltransferase	-



Enzimi diversi con la stessa specificità di riconoscimento e taglio

Due enzimi che hanno:

stesso sito di riconoscimento e stesso sito di taglio sono detti
isoschizomeri

HpaII **C/CGG** (*Haemophilus parainfluenzae*)

G/GCC

MspI **C/CGG** (*Moraxellas species*)

G/GCC

Due enzimi che hanno:

stesso sito di riconoscimento ma diverso sito di taglio sono
detti neoschizomeri

SmaI **CCC/GGG** (*Serratia marcescens*)

GGG/CCC

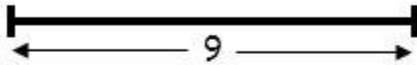
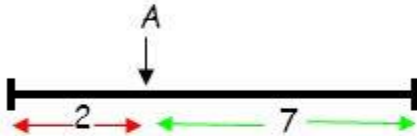
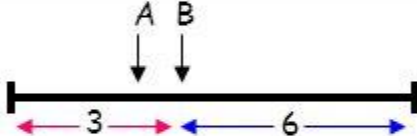
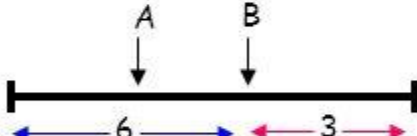
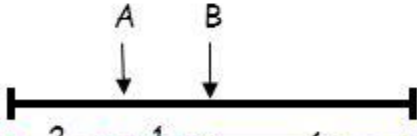

XmaI **C/CCGGG** (*Xantomonas malvacearum*)

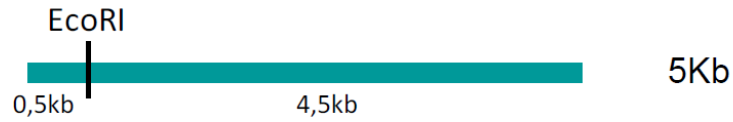
GGGCC/C

Suppliers for EcoRI:

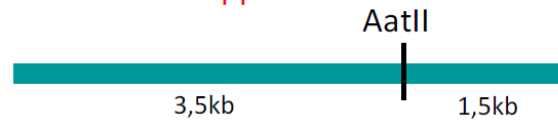
Suppliers	Buffer	Reaction Temperature
American Allied Biochemical, Inc.	American A	37
Bangalore Genei	Bangalore Genei EcoRI	37
CinnaGen Inc.	-	-
EURx Ltd.	EURx 1	37
Fermentas International Inc.	Fermentas buffer for EcoRI+, NotI+	37
GE Healthcare	Amersham H	37
Invitrogen Corporation	-	-
Minotech Biotechnology	Minotech Unique Buffer 7	37
Molecular Biology Resources	Chimerx 1	37
New England Biolabs	NEB EcoRI; SspI	37
Nippon Gene Co., Ltd.	Nippon H	37
Promega Corporation	Promega H	37
Obiogene	Obiogene III (Yellow)	37
Roche Applied Science	Boehringer H	37
SibEnzyme Ltd.	SibEnzyme W	37
Sigma Chemical Corporation	Sigma Buffer SL	37
Takara Bio Inc.	Takara H	37
Toyobo Biochemicals	Toyobo Ehel	37
Vivantis Technologies	-	-

...MAPPATURA di RESTRIZIONE

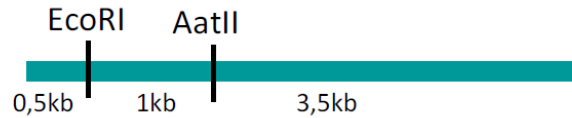
TRATTAMENTO	DIMENSIONE dei FRAMMENTI (Kb)	INTERPRETAZIONE
Nessuna digestione	9	
Enzima A	2 + 7	
Enzima B	3 + 6	
		
Enzima A + B	1 + 2 + 6	
	2 + 3 + 4	



oppure

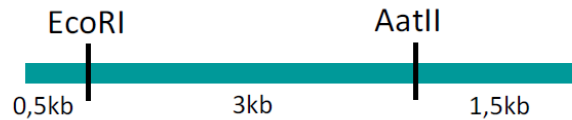


2 possibili mappe di restrizione:



Frammenti attesi:
0,5kb + 1kb + 3,5 kb

oppure



Frammenti attesi:
0,5kb + 1,5kb + 3 kb

Frammenti osservati:
0,5kb + 1,5kb + 3 kb

→ mappa corretta

