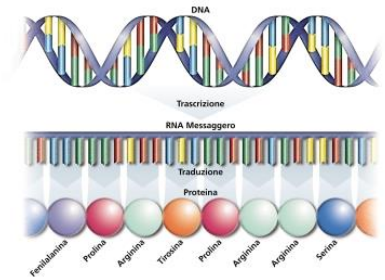


VETTORI di ESPRESSIONE

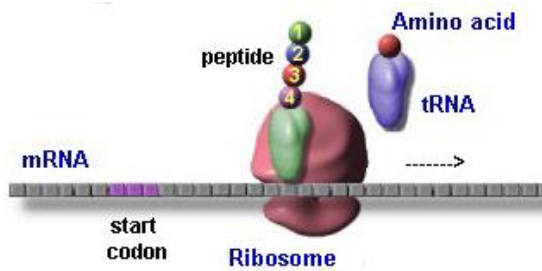


CLONARE = OTTENERE NUMEROSE COPIE IDENTICHE di un certo frammento di DNA

MA,

CLONARE IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE

= OTTENERE DISCRETE QUANTITÀ del PRODOTTO PROTEICO codificato dal gene di interesse



**INSULINA
ORMONE DELLA CRESCITA UMANO
INTERFERONI**

sono solo pochi esempi di proteine commercializzate prodotte da batteri

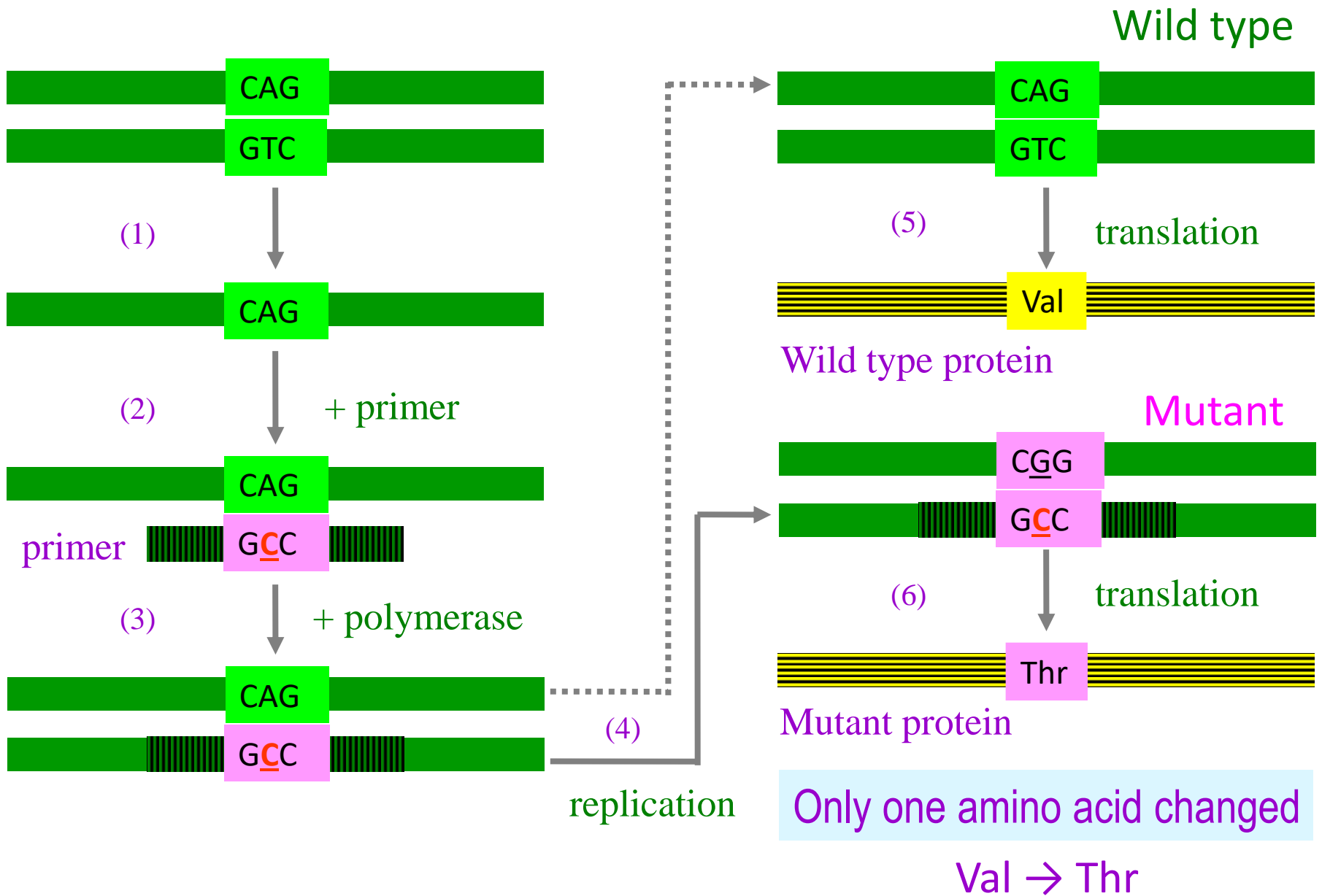
IL DNA RICOMBINANTE NON SERVE SOLO PER STUDIARE I GENI:

PRODUZIONE DI PROTEINE PER MEZZO DELL' INGEGNERIA GENETICA

A cosa possono servire le proteine ricombinanti?

- PROTEINE DI INTERESSE TERAPEUTICO.**
- PROTEINE DI INTERESSE COMMERCIALE (ENZIMI).**
- PROTEINE DA UTILIZZARE COME ANTIGENI PER LA
PRODUZIONE DI ANTICORPI POLICLONALI E
MONOCLONALI.**
- REAGENTI PER LA RICERCA BI BASE E APPLICATA.**

Site-directed mutagenesis



ESPRESSIONE GENICA

IN SISTEMI ETEROLOGHI

QUALI SISTEMI ETEROLOGHI UTILIZZARE PER L'ESPRESSIONE DEI GENI ?

E' virtualmente possibile esprimere geni in sistemi di ogni tipo utilizzando vettori d'espressione appropriati, in funzione di esigenze specifiche.

I più diffusi:

- *Escherichia coli*,
- *Bacillus subtilis*,
- lieviti,
- cellule d'insetto/sistemi virali
- cellule vegetali
- cellule di mammifero in coltura.

L'espressione in E.coli è di gran lunga la più semplice e, forse, per questo la più utilizzata come prototipo di espressione genica in sistemi eterologhi.

Le conoscenze correnti permettono di sfruttare le potenzialità dell'espressione genica in organismi complessi che, sempre più spesso vengono utilizzati come bioreattori

The first generation of therapeutic proteins

Brand	Generic	Company	Therapeutic category	Indications
Humulin	Insulin	Eli Lilly	Diabetes	Diabetes
Humatrope	Recombinant Somatropin	Eli Lilly	Hormones	Growth failure
Genotropin	Somatropin	Pfizer	Hormones	Growth failure
Saizen	Somatropin	Serono	Hormones	Growth failure
Nutropin/Protropin	Somatropin/Somatrem	Genentech	Hormones	Growth failure
Intron A &	Interferon alpha-2b/	Schering-Plough	Anti-infective	Viral infections
Avonex	Interferon beta-1a	Biogen Idec	Multiple sclerosis	Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy
Betaseron/Betaferon	Interferon beta-1b	Schering AG	Multiple sclerosis	Multiple sclerosis
Procrit/Eporex	Epoetin alpha	J&J	Blood modifier	Anaemia
Epogen	Epoetin alpha	Amgen	Blood modifier	Anaemia
NeoRecormon	Epoetin beta	Roche	Blood modifier	Anaemia
Kogenate	Factor VIII	Bayer	Blood modifier	Haemophilia
NovoSeven	Factor VIIa	Novo Nordisk	Blood modifier	Haemophilia
Benefix	Factor IX	Wyeth	Blood modifier	Haemophilia
Fabrazyme	Agalsidase beta	Genzyme	Enzymes	Fabry disease
Replagal	Agalsidase alfa	TKT Europe	Enzymes	Fabry disease
Pulmozyme	Dornase alpha	Genentech	Enzymes	Cystic fibrosis
Activase/Actilyse	Alteplase	Genentech	Blood factor	Myocardial infarction

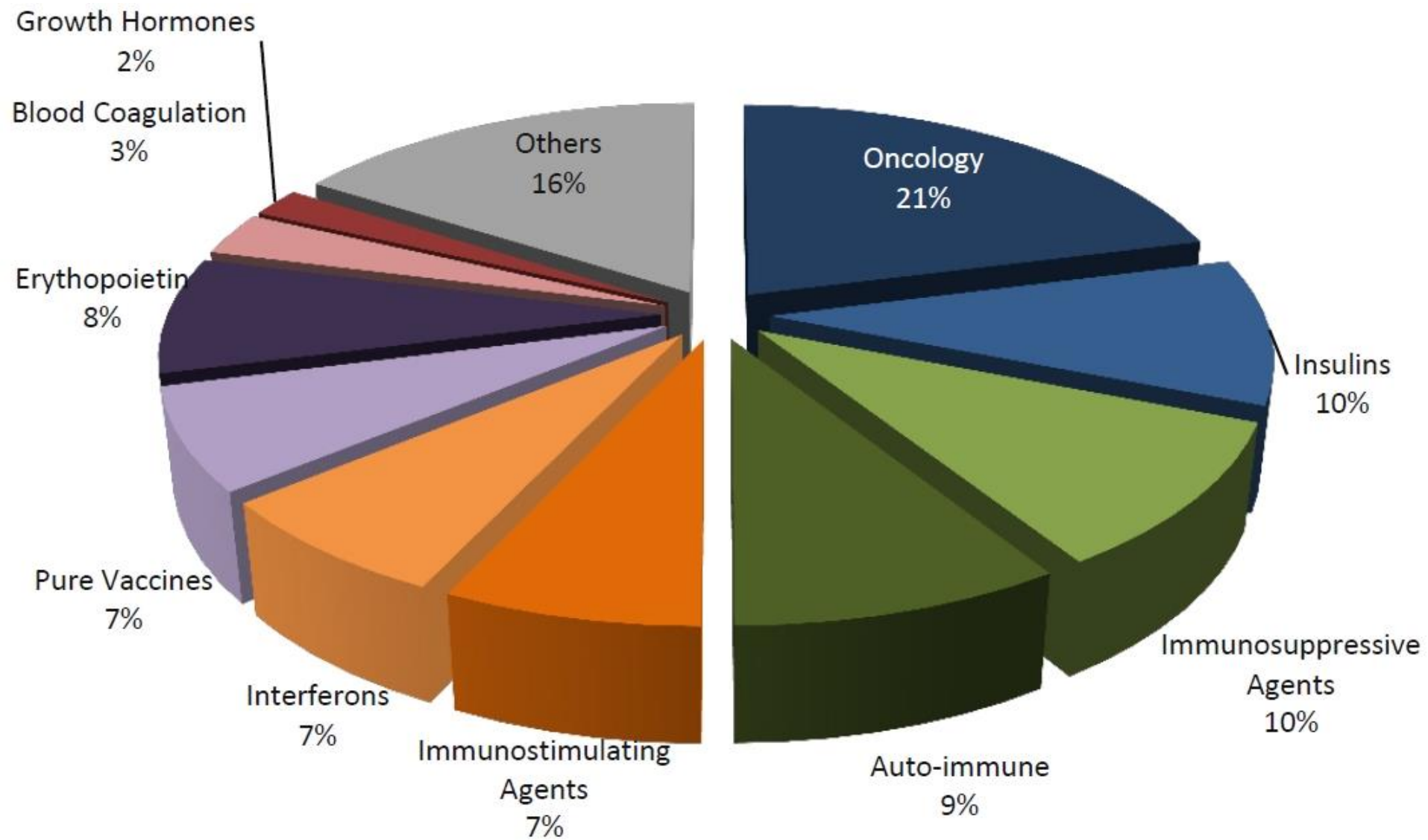
The second generation of therapeutic proteins

Brand	Generic	Company	Therapeutic category	Indications
Humalog/Liprolog	insulin lispro,	Eli Lilly	Diabetes	Diabetes
Lantus	Glargine insulin	Sanofi-Aventis	Diabetes	Diabetes
Levemir	Datimir insulin	Novo Nordisk	Diabetes	Diabetes
Pegasys	Pegylated interferon alpha-2a	Roche	Interferon	Hepatitis C
Peg-Intron	Pegylated interferon alpha-2a	Schering Plough	Interferon	Hepatitis C
Aranesp	Darbepoetin alpha	Amgen	Blood modifier	Anaemia
Neulasta	PEG-Filgrastim	Amgen	Blood modifier	Neutropenia
ReFacto	Factor VIII	Wyeth	Blood modifier	Haemophilia
Amevive	alefacept	Biogen Idec.	Inflammation/Bone	Plaque psoriasis
Enbrel	Etanercept	Amgen	Anti-arthritic	Arthritis
Ontak	rIL2-diphtheria toxin	Ligand Pharmaceuticals	Cancer	Cancer

Monoclonal Antibodies

Brand	Generic	Company	Therapeutic category	Indications
ReoPro	Abciximab	Eli Lilly	Blood modifier	Acute coronary syndrome
Rituxan	rituxumab	Genentech	Cancer	Non-Hodgkin's lymphoma
Herceptin	Trastuzumab	Genentech	Cancer	Breast cancer
Synagis	Palivizumab	MedImmune	Respiratory	Respiratory syncytial virus
Campath	Alemtuzumab	Schering AG	Cancer	Non-Hodgkin's lymphoma
Humira	Adalimumab	Abbott Labs	Anti-arthritic	Rheumatoid arthritis
Xolair Omalizumab	Omalizumab	Genentech	Respiratory diseases	Paediatric asthma, peanut allergies
Erbix	Cetuximab	Imclone Systems	Cancer	Colon cancer
Avastin	Bevacizumab	Genentech	Cancer	Colon cancer

Market share of the Leading Therapy Classes, 2015



☺ Scelta della cellula ospite

Esistono diversi organismi sia Procariotici che Eucariotici per esprimere geni eterologhi

***Ciascuno di questi sistemi offre dei
VANTAGGI ma anche degli
SVANTAGGI***

VETTORI D'ESPRESSIONE

considerazioni generali

I segnali che assicurano l'espressione genica nei procarioti sono molto diversi e se un gene eucariotico viene semplicemente trasferito in una cellula batterica ha poche probabilità di essere espresso.

Costruire un vettore d'espressione significa essenzialmente costruire un vettore di replicazione contenente tutti quei segnali capaci di ottimizzare la corretta trascrizione e traduzione dei geni eterologhi nell'ospite in cui avviene l'espressione.

Per aumentare le rese, infine, in genere si cerca di ottimizzare la stabilità dei prodotti di espressione, sia a livello trascrizionale che traduzionale.

Espressione in sistemi PROCARIOTICI

Vantaggi:

Semplicità delle cellule batteriche

Breve tempo di replicazione

Ottenimento di grandi quantità di prodotto a basso costo

Talvolta la proteina ricombinante è secreta nel mezzo di coltura

Svantaggi:

Formazione di corpi inclusi insolubili (proteine inattive biologicamente)

Tossicità di alcune proteine esogene per i batteri che le producono

Mancanza degli enzimi responsabili delle modifiche post-traduzionali necessarie per ottenere proteine ricombinanti biologicamente attive (maturazione proteolitica, metilazione, fosforilazione, glicosilazione, etc.)

...VETTORI di ESPRESSIONE

PROPRIETA':

Oltre alle normali caratteristiche di un vettore di clonaggio, un vettore per l'espressione di geni in cellule batteriche

DEVE POSSEDERE:

SEQUENZA PROMOTRICE

SEQUENZA SHINE-DALGARNO



a monte di uno o più siti di inserzione del DNA estraneo



AVVERTENZE:

UTILIZZARE il cDNA

CLONARE il cDNA nella CORRETTA CORNICE di LETTURA



CONSIDERAZIONI:

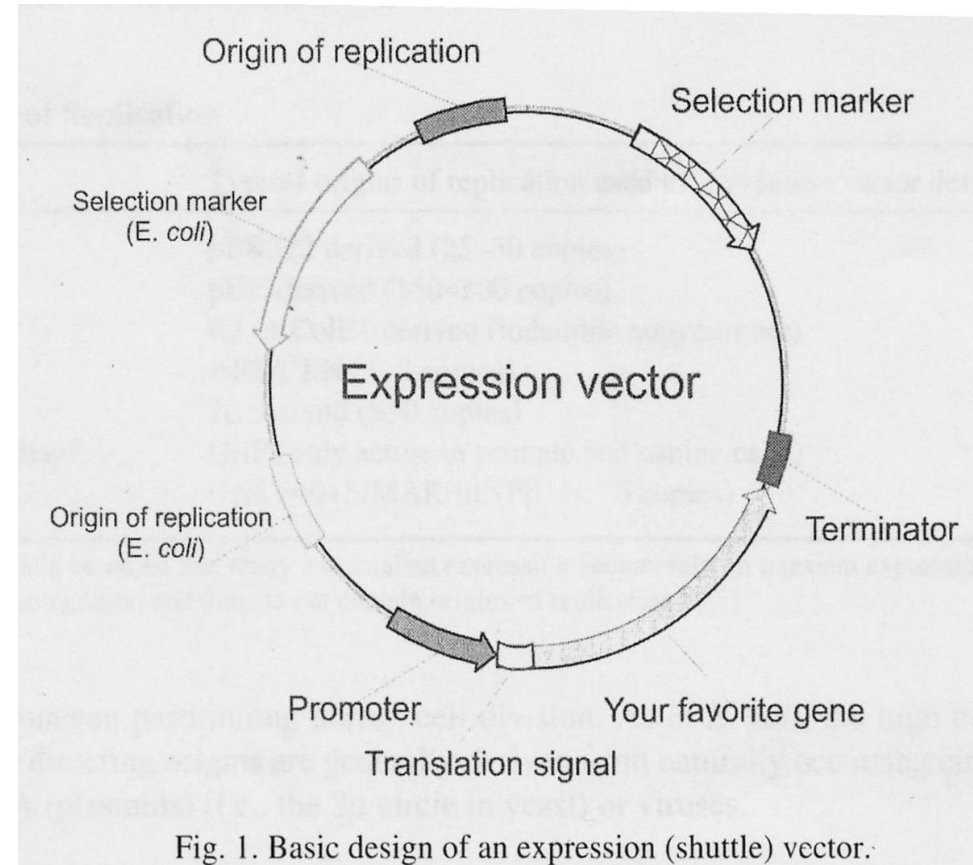
I batteri non sono in grado di eseguire modificazioni post-traduzionali

VETTORI D'ESPRESSIONE

caratteristiche generali

Un vettore per l'espressione eterologa dovrà contenere i seguenti elementi:

- Origine di replicazione
- Marker di selezione
- Promotore
- Terminatori di trascrizione
- Segnali per ottimizzare mRNA
- Codoni di terminazione della traduzione
- Elementi genetici specifici per diverse applicazioni:
 - Sequenze segnale per secrezione
 - Molecole di fusione
 - Peptidi per purificazione
 - Ecc.



PROMOTORI

IL LIVELLO DI ESPRESSIONE DI UN GENE DIPENDE IN LARGA MISURA DALLA FORZA DEL PROMOTORE CHE LO CONTROLLA DETERMINANDO LA FREQUENZA CON LA QUALE LA RNA POLIMERASI INIZIA LA TRASCRIZIONE. LA SCELTA DEL PROMOTORE DIPENDE DAL TIPO DI PROTEINA E DAGLI SCOPI DELL'ESPRESSIONE

SONO STATI ISOLATI ED OTTIMIZZATI UN CERTO NUMERO DI PROMOTORI FORTI DI *E.coli* CHE SONO PRESENTI NELLA MAGGIOR PARTE DEI VETTORI D'ESPRESSIONE ATTUALI.

IL LIVELLO DI CONOSCENZA DEI PROMOTORI PROCARIOTICI E' MOLTO AVANZATO, SONO STATI ELABORATI ANCHE PROMOTORI IN PARTE O TOTALMENTE SINTETICI SULLA BASE DELLE SEQUENZE CONSENSUS OTTIMALI.

UN PROMOTORE PROCARIOTICO TIPICO E' COSTITUITO DA CIRCA 60 bp CONTENENTI DUE SEQUENZE CONSENSO A -35 (ttcaga) e -10 (tataat). LA SPAZIATURA IDEALE TRA -35 e -10 VARIA TRA 16 a 17 bp. QUELLA TRA -10 E ATG E' DI 9 bp.

TERMINATORI DELLA TRASCRIZIONE

Una volta che L'RNA polimerasi ha iniziato la trascrizione, continua a incorporare ribonucleotidi fino a quando non incontra un segnale di stop.

I terminatori della trascrizione assicurano un'appropriata terminazione del gene inserito per:

- aumentare la stabilità del gene trascritto;**
- impedire la formazione di trascritti troppo lunghi con sequenze non codificanti**

I migliori terminatori di trascrizione derivano spesso da geni altamente espressi nella cellula ospite

Questi segnali sono molto diversi tra eucarioti e procarioti

SEGNALI PER MIGLIORARE LA TRADUZIONE

Per un'ottimale assemblamento, partenza e terminazione della macchina ribosomale sono necessari segnali di traduzione che riguardano mRNA trascritto. Si può comunque ottenere una buona traduzione e buona resa anche in assenza di segnali ottimizzati per l'ospite di espressione.

In generale diversi organismi hanno differenti livelli di diversi tRNA e quindi per ottenere i migliori livelli di espressione è vantaggioso evitare assemblamenti di codoni che richiedono tRNA rari nella cellula ospite

L'inizio della traduzione in *E.coli*, richiede la presenza, sulla porzione non tradotta al 5' del mRNA, di una regione di legame al ribosoma (RBS). Nei batteri è costituita da una sequenza, chiamata SHINE-DALGARNO (SD), complementare al 3' del rRNA 16S presente nella subunità ribosomale minore 30S. La sua sequenza consenso è: 5'-UAAGGAGG-3'

Subito dopo la sequenza di Shine-Dalgarno deve essere presente un codone di inizio, quasi sempre AUG (in una piccola percentuale di casi può essere presente il codone GUG).

Anche la **composizione della tripletta immediatamente precedente l'AUG è rilevante**: Per alcuni geni, come ad esempio la β -galattosidasi sono stati sistematicamente cambiate le basi vicine all'AUG rivelando **variazioni di stabilità** fino al 20%.

La spaziatura ottimale tra SD e AUG è di 8 bp

E' importante che la sequenza nucleotidica tra la SD e il codone d'inizio non sia disturbata da **strutture secondarie** (es. hairpin loops) che possono interferire drasticamente con il legame al ribosoma e la conseguente traduzione.

Table 3.2 The genetic code and codon usage in *E. coli* and humans

Codon	Amino acid	Frequency of use in:	
		<i>E. coli</i>	Humans
GAG	Glutamic acid	0.30	0.59
GAA	Glutamic acid	0.70	0.41
CGG	Arginine	0.08	0.19
CGA	Arginine	0.05	0.10
CGU	Arginine	0.42	0.09
CGC	Arginine	0.37	0.19
AGG	Arginine	0.03	0.22
AGA	Arginine	0.04	0.21
CCG	Proline	0.55	0.11
CCA	Proline	0.20	0.27
CCU	Proline	0.16	0.29
CCC	Proline	0.10	0.33
UGA	Stop	0.30	0.61
UAG	Stop	0.09	0.17
UAA	Stop	0.62	0.22

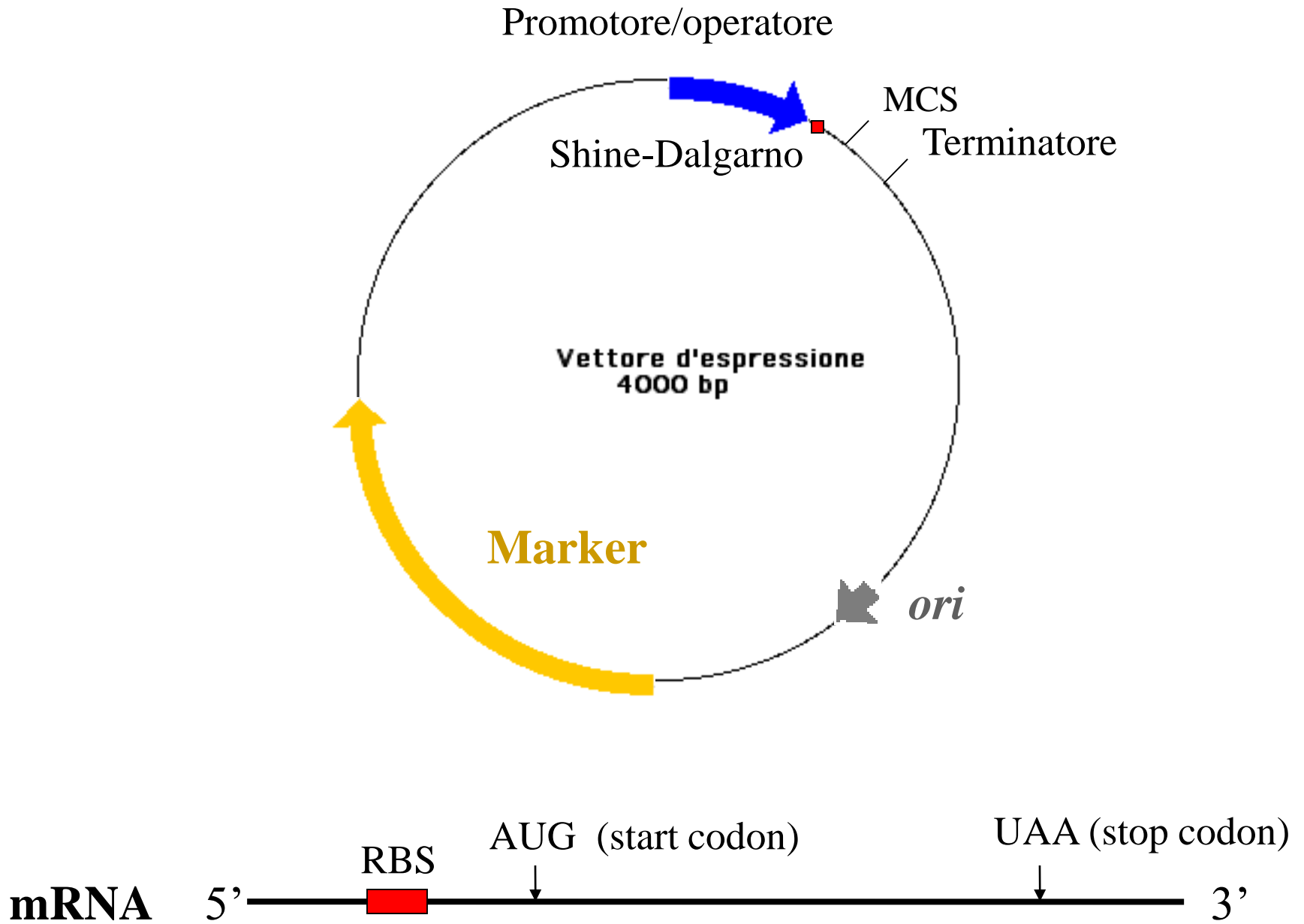
PERCHÈ I VETTORI D'ESPRESSIONE SONO (QUASI) SEMPRE REGOLATI

- **L'espressione di una proteina eterologa tende ad essere identificata come "estranea" e degradata dalla cellula che attiva specifiche proteasi.**

La possibilità di indurre l'espressione della proteina permette di minimizzare le degradazioni proteolitiche aumentando le rese.

- **Alcune proteine possono essere tossiche o, comunque, interferire con la crescita dell'ospite di espressione. In alcuni casi fino al 50% delle proteine totali sono costituite dalla proteina ricombinante, a discapito delle proteine che assicurano il normale metabolismo di E.coli. La possibilità di limitare l'espressione della proteina alla sola fase di induzione permette il normale sviluppo della cellula.**

La possibilità di indurre sperimentalmente l'espressione della proteina viene verificato analizzando i livelli di espressione: comparando un estratto proteico indotto con uno non indotto si riesce facilmente ad evidenziare la presenza della proteina eterologa putativa (di cui conosciamo il peso molecolare)



Batteri: modello

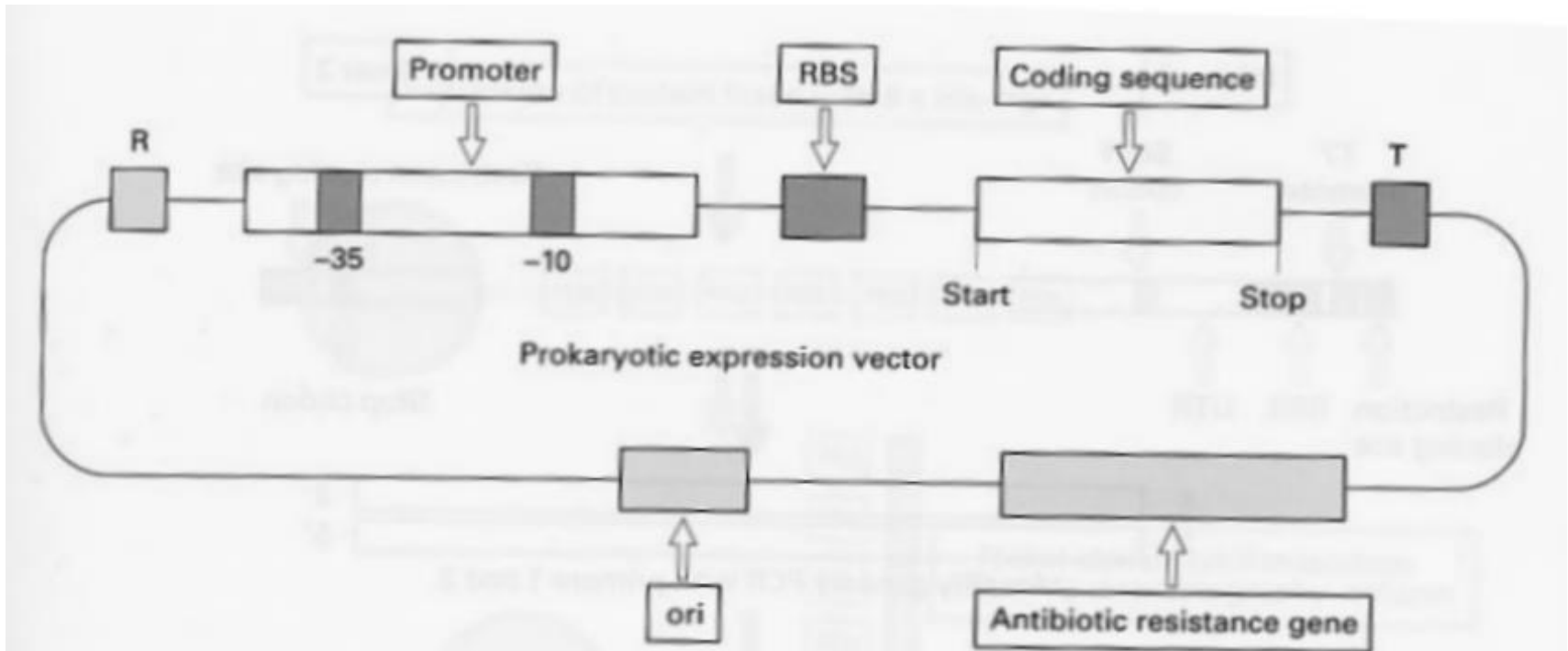


Fig. 3.34. Components of a typical prokaryotic expression vector. To produce a transcript (coding sequence) and translate it, a number of sequences in the vector are required. These include the promoter and ribosome-binding site (RBS). The activity of the promoter may be modulated by a regulatory gene (R), which acts in a way similar to that of the regulatory gene in the *lac* operon. T indicates a transcription terminator.

Batteri: promotori

Molti promotori sono disponibili per *E. coli*

Table 4 Some *E. coli* promoter systems that are in use for heterologous protein production and their characteristics

Expression system based on	Induction (range of inducer)	Level of expression	Key features	Original reference
<i>lac</i> promoter	Addition of IPTG 0.2 mM (0.05–2.0 mM)	Low level up to middle	Weak, regulated suitable for gene products at very low intracellular level Comparatively expensive induction	Gronenborn (1976)
<i>trc</i> and <i>tac</i> promoter	Addition of IPTG 0.2 mM (0.05–2.0 mM)	Moderately high	High-level, but lower than T7 system Regulated expression still possible Comparatively expensive induction	Brosius et al. (1985)
T7 RNA polymerase	Addition of IPTG 0.2 mM (0.05–2.0 mM)	Very high	High basal level Utilizes T7 RNA polymerase High-level inducible over expression T7 <i>lac</i> system for tight control of induction needed for more toxic clones Relative expensive induction	Studier and Moffatt (1986)
Phage promoter p_L	Shifting the temperature from 30 to 42 °C (45 °C)	Moderately high	Basal level depends on used strain (pLys) Temperature-sensitive host required Less likelihood of “leaky” uninduced expression Basal level, high basal level by temperatures below 30 °C No inducer	Elvin et al. (1990)
<i>tetA</i> promoter/operator	Anhydrotetracycline 200 µg/l	Variable from middle to high level	Tight regulation Independent on metabolic state Independent on <i>E. coli</i> strain Relative inexpensive inducer Low basal level	Skerra (1994)
<i>araBAD</i> promoter (P_{BAD})	Addition of L-arabinose 0.2 % (0.001–1.0 %)	Variable from low to high level	Can fine-tune expression levels in a dose-dependent manner Tight regulation possible Low basal level Inexpensive inducer	Guzman et al. (1995)
<i>rhaP_{BAD}</i> promoter	L-rhamnose 0.2 %	Variable from low to high level	Tight regulation Low basal activity Relative expensive inducer	Haldimann et al. (1998)

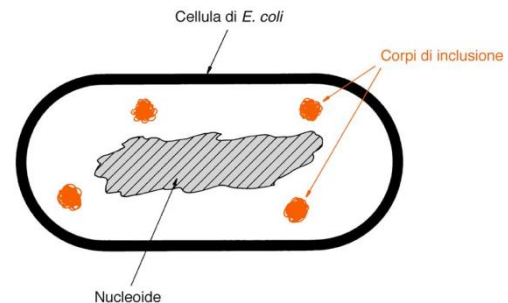
MANIPOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI PROCARIOTI

Fattori da considerare

- PROMOTORE
- SEQUENZE LEGANTI I RIBOSOMI (6-8 nt seq. di Shine Dalgarno)
- NUMERO COPIE DEL GENE CLONATO
- LOCALIZZAZIONE FINALE PROTEINA
- STABILITA' PROTEINA IN CELLULA OSPITE

Clonaggio di espressione nei batteri

- Maggior parte di proteine espresse in *E. coli* sono intracellulari
- Produzione fino al 25% del totale delle proteine del batterio
- Impiego di ceppi carenti di proteasi: *E. coli* possiede almeno 25 proteasi, molte delle quali indispensabili per la vitalità delle cellule.
- La produzione della proteina eterologa può dar luogo alla formazione di corpi di inclusione (body inclusion) dovuti all'aggregazione e precipitazione della proteina eterologa espressa



Proteina priva di struttura terziaria precipita e forma corpi di inclusione. Aggregati recuperati in forti condizioni denaturanti che non permettono il corretto ripiegamento in vitro della proteina che quindi sarà inattiva!

Body inclusion:

- Cosa sono?
- **Aggregati insolubili che si formano in seguito ad overespressione di proteina in E. coli.**
- **Opache al microscopio**
- **Diametro 1 μ m**
- **Composte per lo più di proteina eterologa**
- Cause probabili
- **Precipitazioni non specifiche dovute ad un contenuto elevato di proteina**
- **Presenza insufficiente di chaperons/foldig enzymes con conseguente aggregazione di intermedi parzialmente ripiegati**
- **Mancanza di modificazioni post-trasduzionali (proteine eucariote) portano a prodotti meno stabili**

GENI IN PROCARIOTI POSSONO AVERE

- ESPRESSIONE COSTITUTIVA
- ESPRESSIONE REGOLATA (es. lac operon)

NELLA PRODUZIONE DI PROTEINE ETEROLOGHE IN BATTERI VENGONO UTILIZZATI SPESSO PROMOTORI FORTI E REGOLABILI

UNA PRODUZIONE CONTINUA PROVOCA:

- INIBIZIONE FUNZIONI CELLULA
- PERDITA ENERGIA
- PERDITA PLASMIDE

OTTIMIZZAZIONE DELLA STABILITA' (1)

La resa di un prodotto di espressione dipende, in larga misura, dalla stabilità della proteina. Sappiamo che la stabilità delle proteine dipende dalla presenza di aminoacidi **stabilizzanti** all'estremità **N-terminale** e di aminoacidi **destabilizzanti** all'estremità **C-terminale**. Modificando, tramite ingegneria genetica, la sequenza codificante una proteina, possiamo alterarne la composizione aminoacidica ed aumentarne la stabilità.

Stabilità conferita alla β -galattosidasi da diversi aa all' N-terminale

Aminoacido	Tempo di dimezzamento
Met, Ser, Ala, Thr, Val, Gly	> 20 ore
Ile, Glu	> 30'
Tyr, Gln	> 20'
Pro	\approx 10'
Phe, Leu, Asp, Lys	\approx 3'
Arg	\approx 1'

OTTIMIZZAZIONE DELLA STABILITA' (2)

Le sequenze PEST

Le sequenze PEST , ricche in prolina (P), acido glutammico (E), serina (S) e treonina (T), spesso fiancheggiate da gruppi di aminoacidi positivi, sono bersagli di degradazione e destabilizzano le proteine batteriche che le contengono. L'eliminazione delle sequenze PEST, mediante mutagenesi sito-specifica, può migliorare la stabilità delle proteine ricombinanti

L'utilizzo di ceppi carenti in proteasi

Un altro modo per ottimizzare la stabilità dei prodotti di espressione, consiste nel minimizzare la degradazione proteolitica a carico delle proteine espresse

A causa della presenza in *E.coli* di più venti proteasi, solo alcune delle quali risultano essere caratterizzate, questo obiettivo è difficile da ottenere.

Sono tuttavia disponibili ceppi di coli mutanti che risultano difettiva in una o più di queste proteasi, come ad esempio *omp*

Espressione in sistemi procariotici

La trascrizione è il più importante “control point”

CARATTERISTICHE DEL PROMOTORE

❖ FORTE

Alta affinità per l'RNA polimerasi

❖ REGOLABILE/INDUCIBILE

Il ricercatore decide quando la cellula deve esprimere il gene

Si possono utilizzare induttori/repressori della trascrizione

Proteine native

Quando si vuole studiare l'attività biologica di una proteina si preferisce utilizzare un vettore d'espressione nativo.

Proteine di fusione

Un vettore d'espressione può essere usato per produrre una proteina chimerica.

Espressione di proteine di fusione

Sempre più spesso si preferisce esprimere proteine di fusione, per la loro maggiore stabilità, gli alti livelli di espressione e la relativa facilità con cui si purificano.

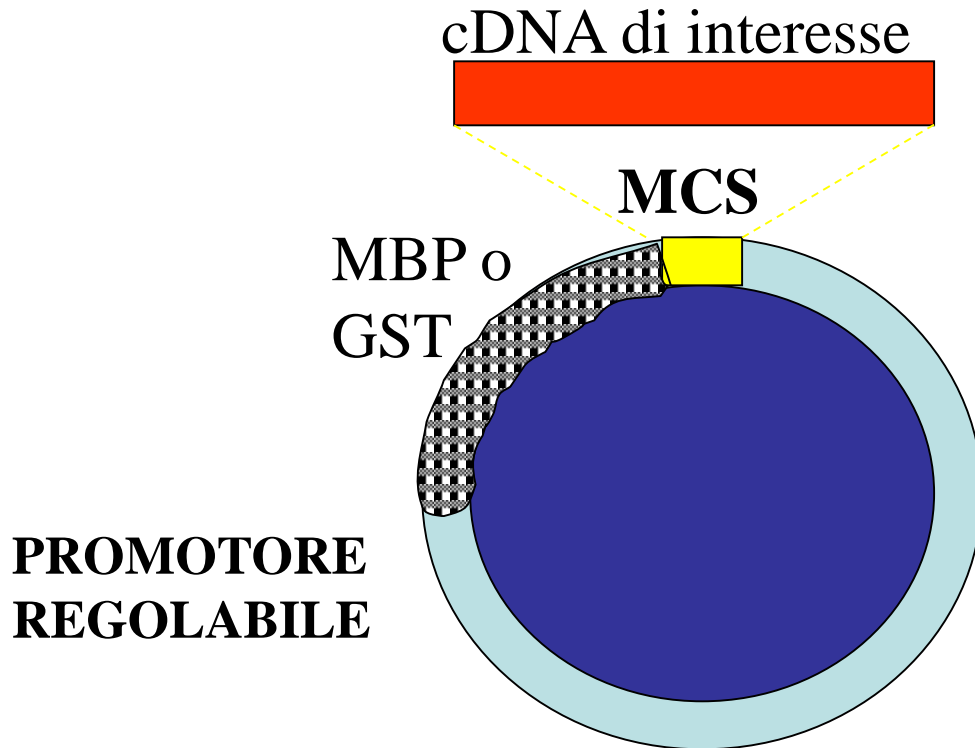
IL PROBLEMA DELLO SCHEMA DI LETTURA (FRAME)

**LEI NON AMA CHE LUI. LUI NON AMA PIU' LEI.
NON SAI PIU' CHI SEI.**

**L EIN ONA MAC HEL UIL UIN ONA MAP IU'L EIN
ONS API U'CH ISE I**

**LE INO NAM ACH ELU ILU INO NAM API U'LE INO
NSA IPI U'CH ISE I**

PROTEINE DI FUSIONE



**-PER EVITARE LA
DEGRADAZIONE DI PICCOLE
PROTEINE ETEROLOGHE
QUESTE VENGONO
PRODOTTE COME PROTEINE
DI FUSIONE CON UNA
PROTEINA STABILE
DELL'ORGANISMO OSPITE.**

**-I DUE cDNA DEVONO ESSERE
FUSI MANTENENDO LA
CORRETTA CORNICE DI
LETTURA**

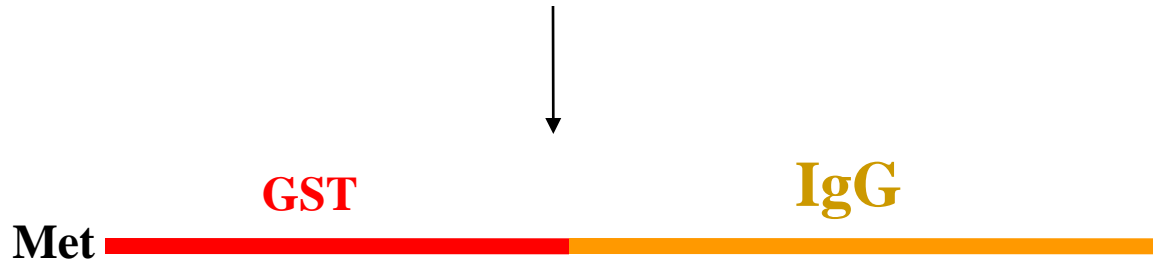
Espressione di proteine di fusione

AGGAAAC AGAACC**ATG** GST BamHI HindIII
 TCC TTTG TCTT GG**TAC** GGATCCGTCGA**AAGCTT**GAT**TA**ATTAGCTGA
CCTAGGCAGCTT**TCGAA**CT**ATTA**AATCGA CT

AGGAAAC AGAACC**ATG** GST G AGCTTGAT**TA**ATTAGCTGA
 TCC TTTG TCTT GG**TAC** CCTAG ACT**ATTA**AATCGACT



AGGAAAC AGAACC**ATG** GST GGATCC cDNA IgG AAGCTT
 TCC TTTG TCTT GG**TAC** CCTAGG TTCGAA



**GST o MBP
UTILIZZATE PER PURIFICAZIONE**

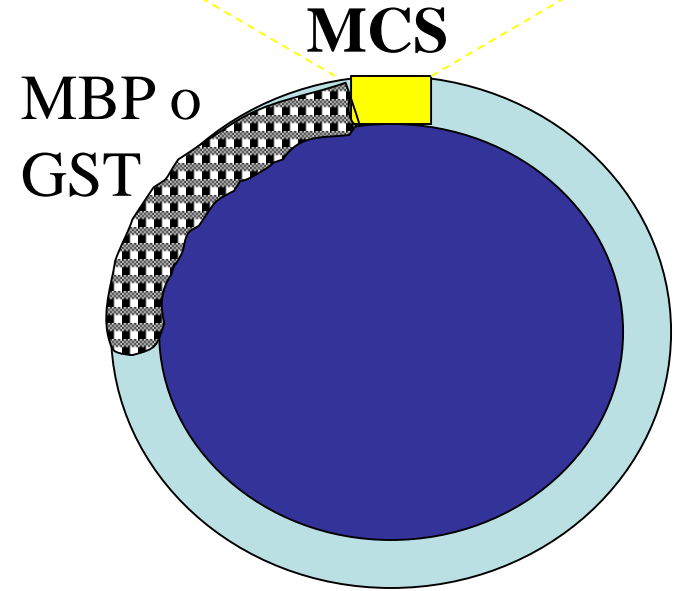


**SITO DI TAGLIO
PER PROTEASI**

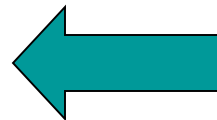
**PROTEINA DI
INTERESSE**

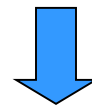
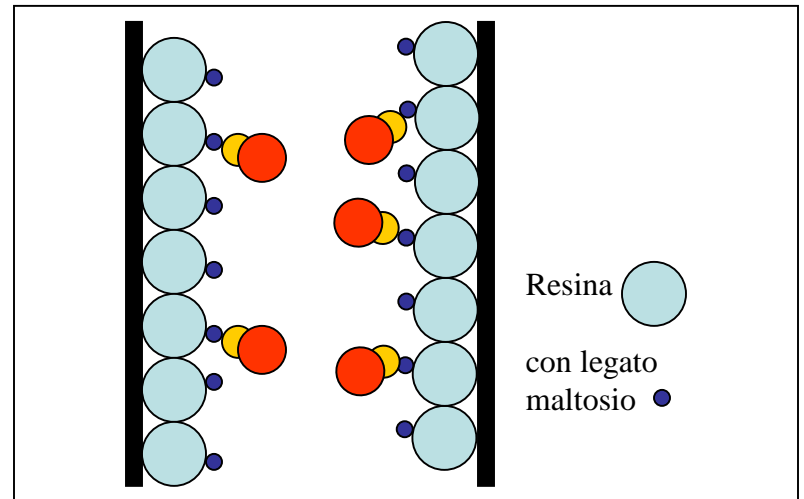
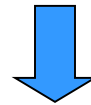
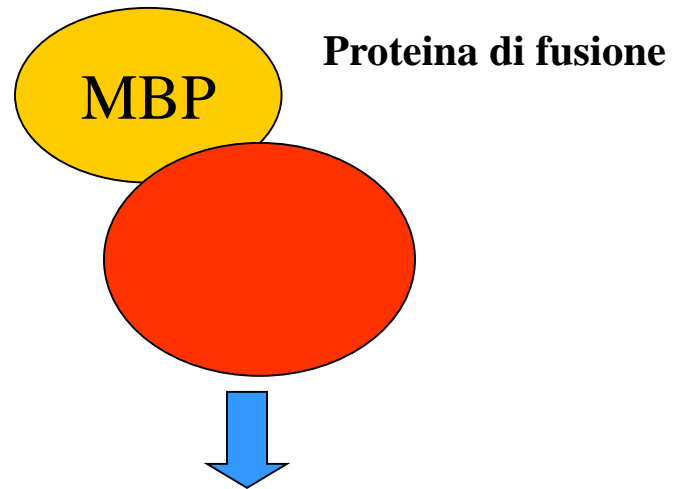
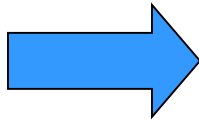
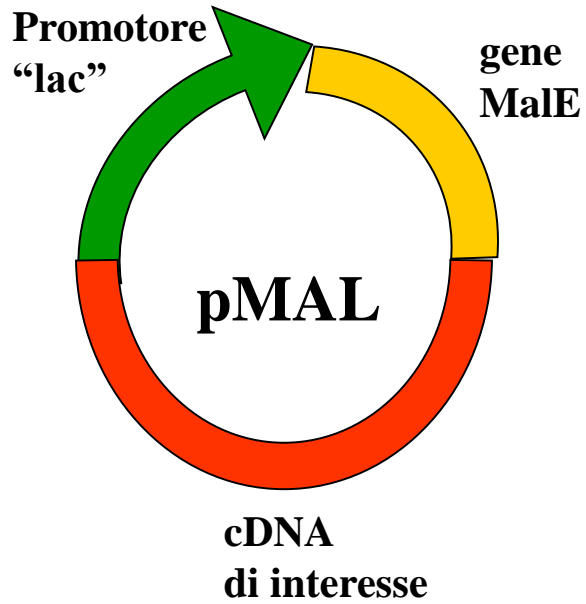
**INDUZIONE DI
ESPRESSIONE
PROTEINA DI
FUSIONE
(PROMOTORI
REGOLABILI)**

cDNA di interesse



**TRASFORMAZIONE IN
BATTERI**





Eluizione



Proteina di fusione purificata

Vantaggi del tag:

Semplificazione nei processi di purificazione:

- *Cromatografia di affinità*

Semplificazione nei processi di rivelazione:

- *Western Blotting*

Studio d'interazione proteina-proteina:

- *Cromatografia di pseudoaffinità*
- *Immunoprecipitazione*

Solubilizzazione e localizzazione cellulare

TAG per affinità

TAG

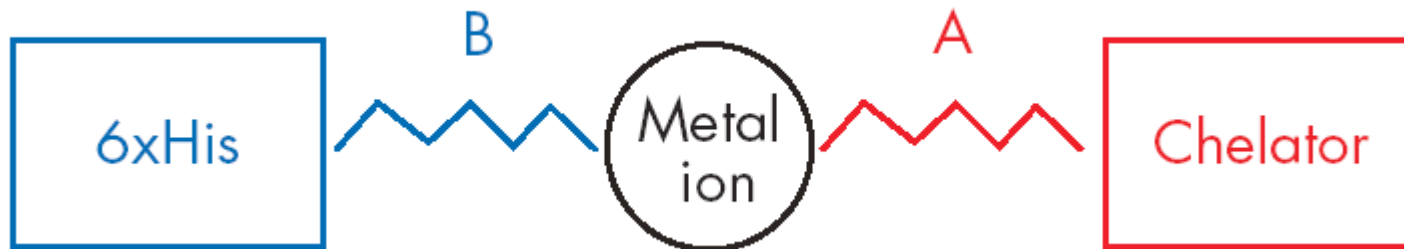
- **Calmodulin binding peptide (CBP)**
- **6xHis**
- **Proteina A (IgG binding domain)**
- **Chitin binding domain (CBD)**
- **Glutathione S-transferasi (GST)**
- **MBP (Maltose binding protein)**
- **Strep tag (Streptavidin binding tag)**

Semplificazione nei processi di purificazione

His Tag

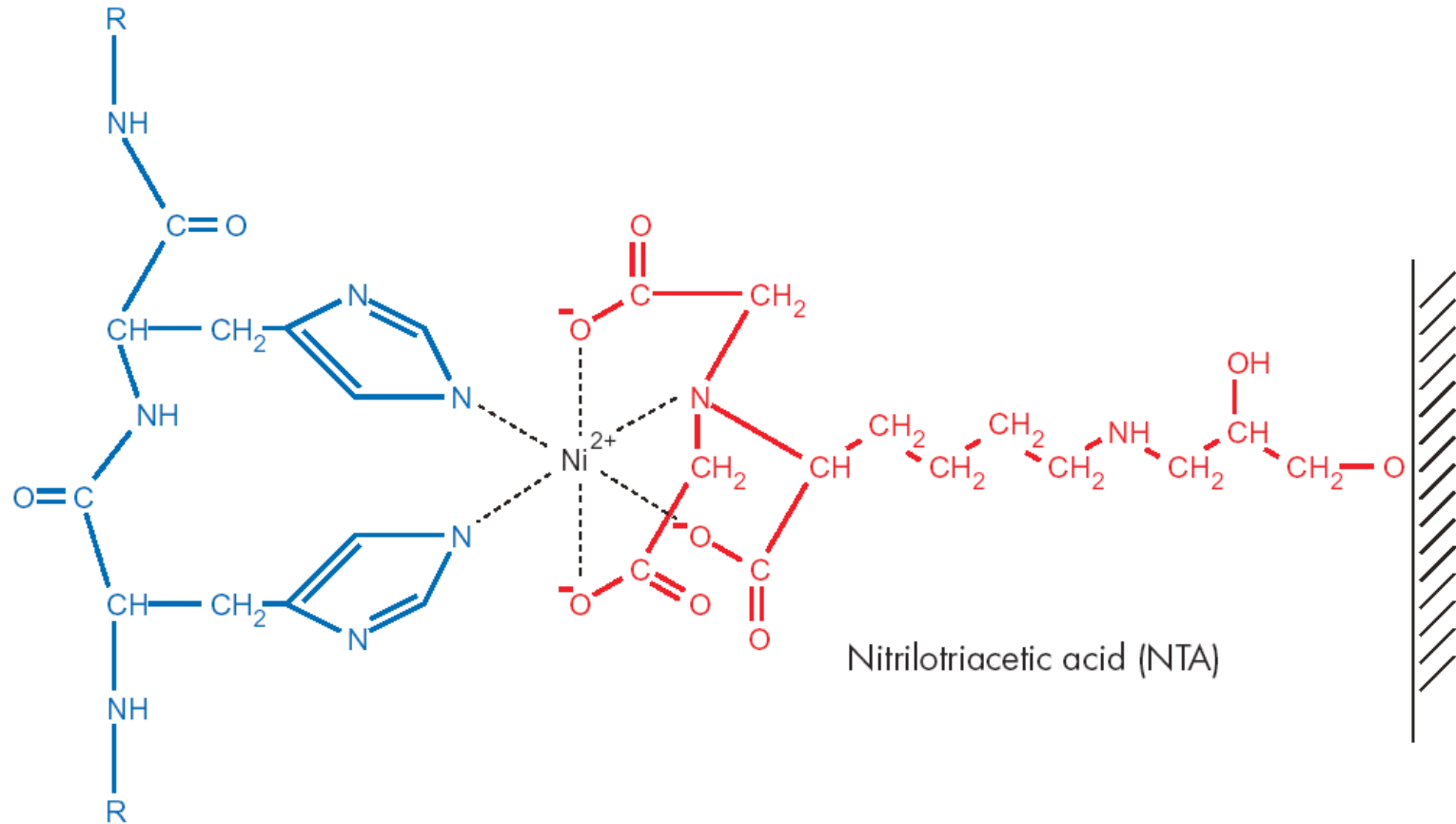


Cromatografia di affinità mediante chelazione di metalli



Matrice di Agarosio

Sfere magnetiche rivestire di agarosio



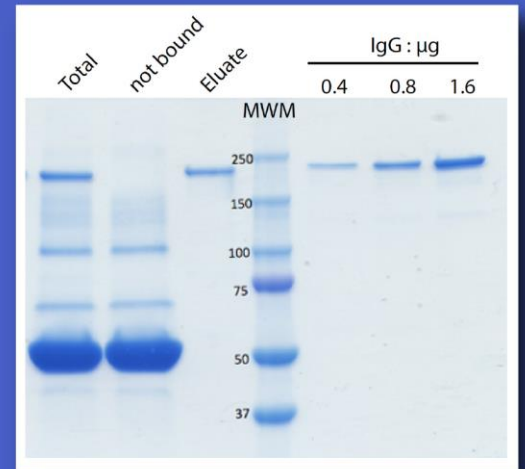
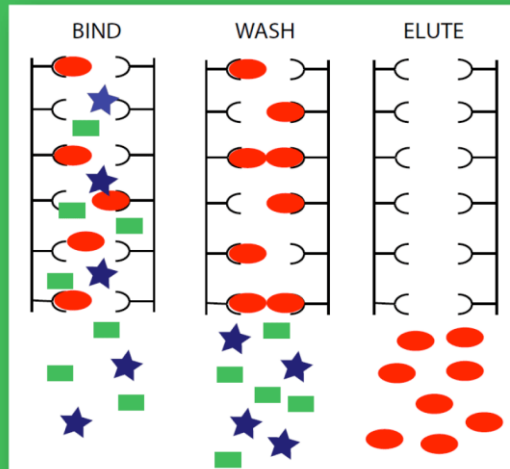
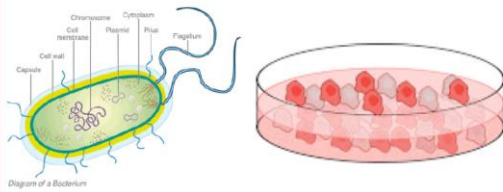
Nitrilotriacetic acid (NTA)

Eluizione

Diminuzione di PH a 5

Tampone imidazolo

Guanidina



PROTEINE DI INTERESSE TERAPEUTICO IN PROCARIOTI:

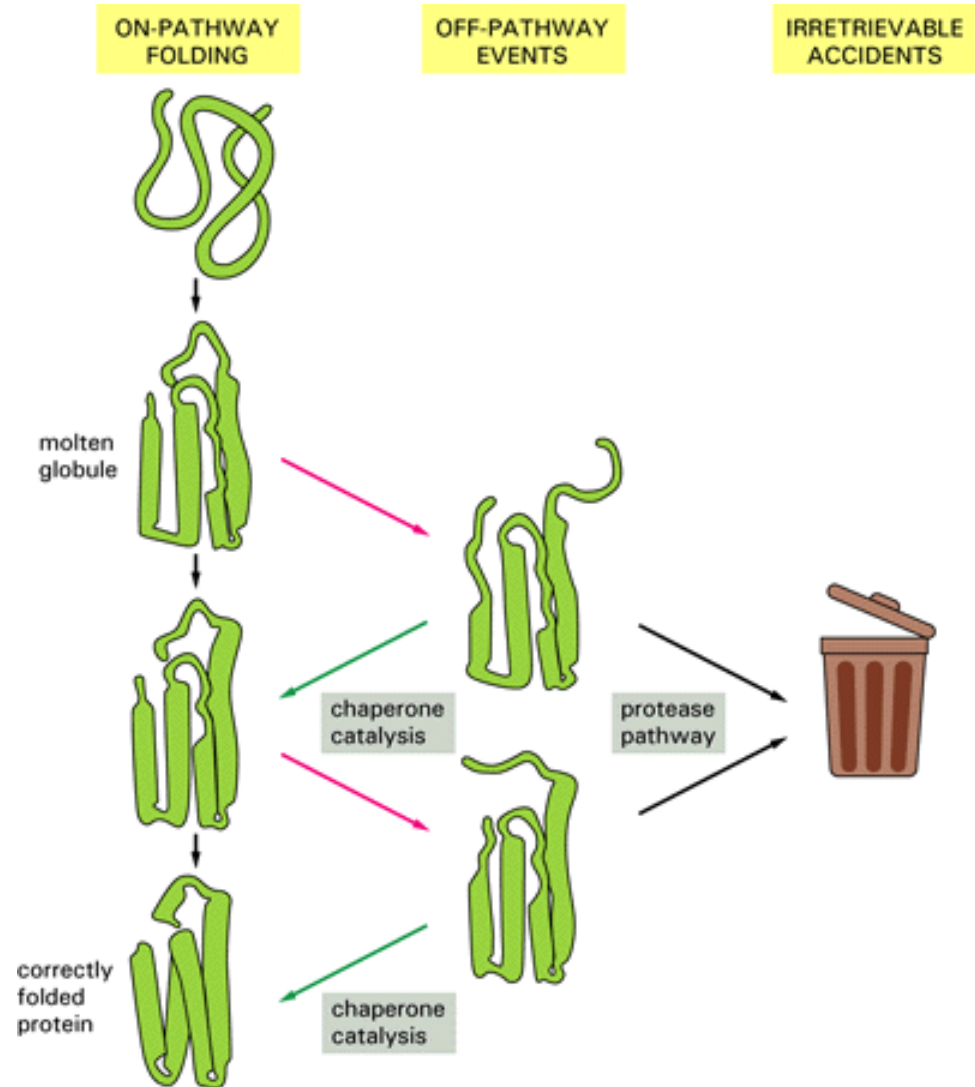
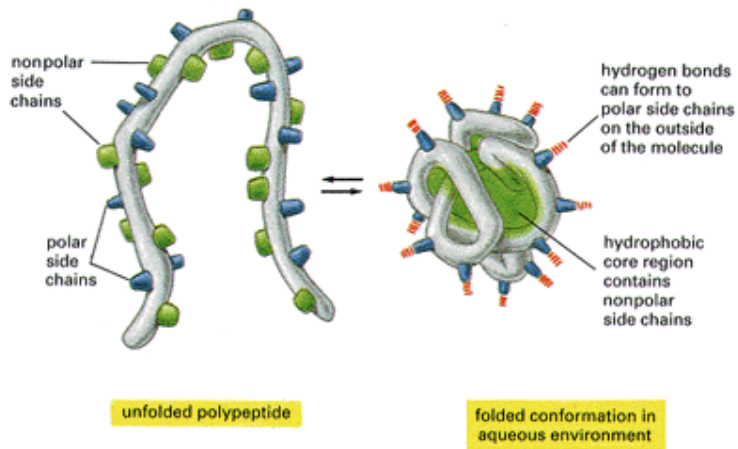
Vantaggi

- SISTEMI DI ESPRESSIONE MOLTO SEMPLICI DA MANIPOLARE**
- PRODUZIONE DI PROTEINE IN GRANDI QUANTITA' E A BASSO COSTO**
- RISCHIO CONTAMINAZIONE VIRALE NULLO**
- RISCHIO ALLERGIE RIDOTTO RISPETTO ALLA PURIFICAZIONE DI PROTEINE ETEROLOGHE (vengono prodotte proteine umane)**

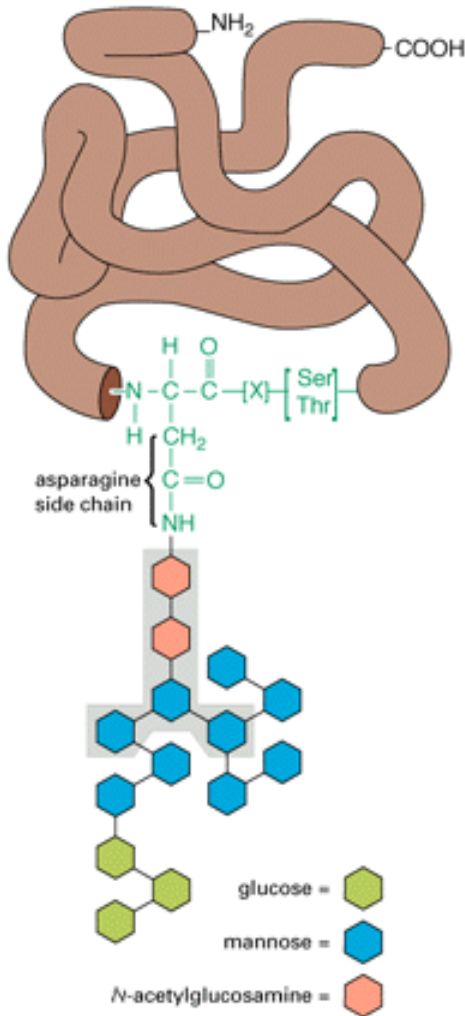
Problemi

- E' DIFFICILE OTTENERE PROTEINE CHE MANTENGONO LA CONFORMAZIONE NATIVA DELLE PROTEINE UMANE (i sistemi di folding dei batteri sono molto meno sofisticati che negli eucarioti)**
- I BATTERI NON MANCANO DI ADEGUATI SISTEMI DI MODIFICAZIONE POST-TRADUZIONALE (glicosilazione, clivaggi proteolitici, fosforilazione, aggiunta di lipidi). IMPORTANTI CONSEGUENZE SULLA ATTIVITA' BIOLOGICA E SULLA ANTIGENICITA'**

Il problema del 'folding'



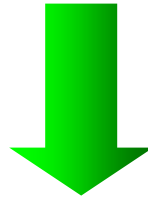
Il problema delle modificazioni post-traduzionali



Modification	Amino acids that are modified	Examples of proteins
Addition of small chemical groups		
Acetylation	Lysine	Histones
Methylation	Lysine	Histones
Phosphorylation	Serine, threonine, tyrosine	Some proteins involved in signal transduction
Hydroxylation	Proline, lysine	Collagen
N-formylation	N-terminal glycine	Melittin
Addition of sugar side chains		
O-linked glycosylation	Serine, threonine	Many membrane proteins and secreted proteins
N-linked glycosylation	Asparagine	Many membrane proteins and secreted proteins
Addition of lipid side chains		
Acylation	Serine, threonine, cysteine	Many membrane proteins
N-myristoylation	N-terminal glycine	Some protein kinases involved in signal transduction
Addition of biotin		
Biotinylation	Lysine	Various carboxylase enzymes

**Principale problematica legata
all'espressione eterologa di proteine in
*E. coli***

Proteine insolubili



- 1. Proteine di fusione**
- 2. Co-espressione**

Proteine di fusione



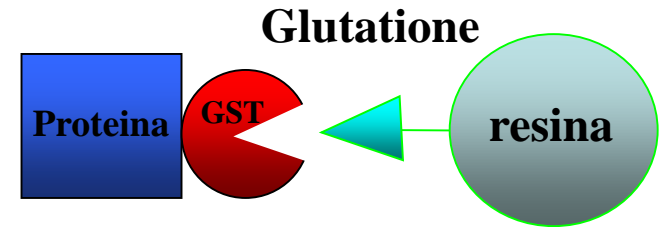
Aumento della solubilità delle proteine e specifica localizzazione cellulare

- 1. Fusione con un polipeptide molto solubile (GST, tioredossina, NusA)**
- 2. Fusione con una sequenza segnale per la traslocazione nello spazio periplasmico (peptide segnale della disolfuro ossidoreduttasi DsbA)**
- 3. Fusione con un enzima che assiste la formazione di ponti disolfurici (DsbA e la disolfuro isomerasi DsbC)**

Fusione con un polipeptide molto solubile (GST, tioredossina, NusA)

GST Fusion Protein

Glutathione S-trasferasi



Sito di taglio per proteasi

Eluizione con Glutathione

Fusione con un enzima che assiste la formazione di ponti disolfurici

(DsbA, DsbC)

Fusione con DsbA/DsbC



DsbA
(208 aa)

DsbC
(236 aa)

Sono enzimi periplasmatici che catalizzano la formazione e l'isomerizzazione di ponti disolfurici

Fusi all'estremità N-Terminale della proteina ricombinante

Scopo:

Esportare le proteine nel periplasma

Promuovere il *fold*ing

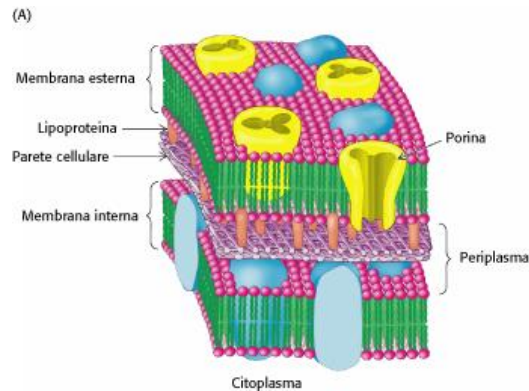
Aumentare la solubilità

Fusione con una sequenza segnale per la traslocazione nello spazio periplasmico (peptide segnale DsbA)

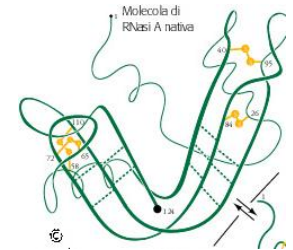
L'ambiente ossidante del periplasma permette la formazione dei ponti disolfurici, ciò non avviene nell'ambiente riducente del citoplasma. Il periplasma contiene la disolfuro ossidoreduttasi (DsbA) e la disolfuro isomerasi (DsbC), che catalizzano la formazione e l'isomerizzazione dei ponti disolfurici.

- La stabilità della proteina può aumentare (meno proteasi).
- Si permette l'accumulo di proteine che possono essere tossiche nel citoplasma
- La proteina può essere isolata più facilmente

Svantaggio: minori livelli di espressione



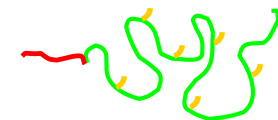
Sito di taglio per proteasi specifica



Rinaturazione in ambiente ossidante

leader

proteina

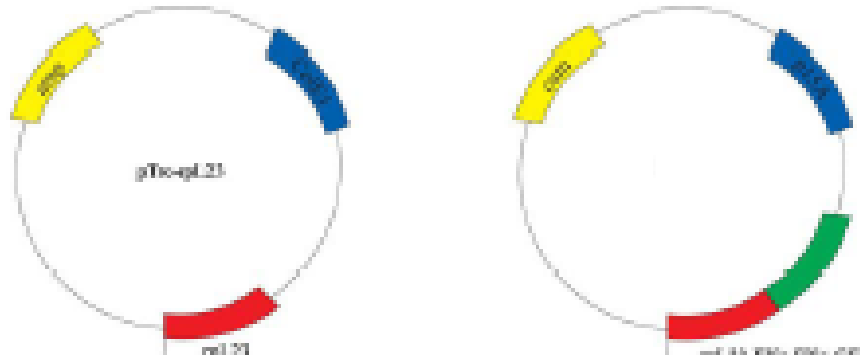


leader

proteina

20-30 aa

Aumento della solubilità delle proteine: Coespressione



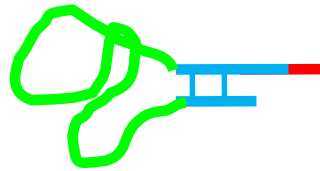
1. Coespressione con proteine che assistono il *fold*ing (DsbA/DsbC)
2. Coespressione con *chaperonine*
3. Coespressione di proteine oligomeriche

SINTESI INSULINA IN CELLULA PANCREATICA

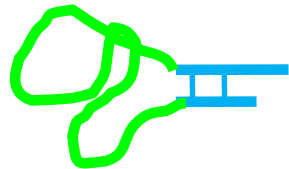
CATENA A → 30 aa

CATENA B → 21 aa

Unite da ponti S-S



PREPROINSULINA



PEPTIDE SEGNALE

PROINSULINA FORMA S-S



IN APPARATO DEL GOLGI
UN ENZIMA RIMUOVE 33aa

INSULINA

PRODUZIONE DI INSULINA UMANA IN E. coli

-70 MAIALI PER 1 PAZIENTE PER UN ANNO

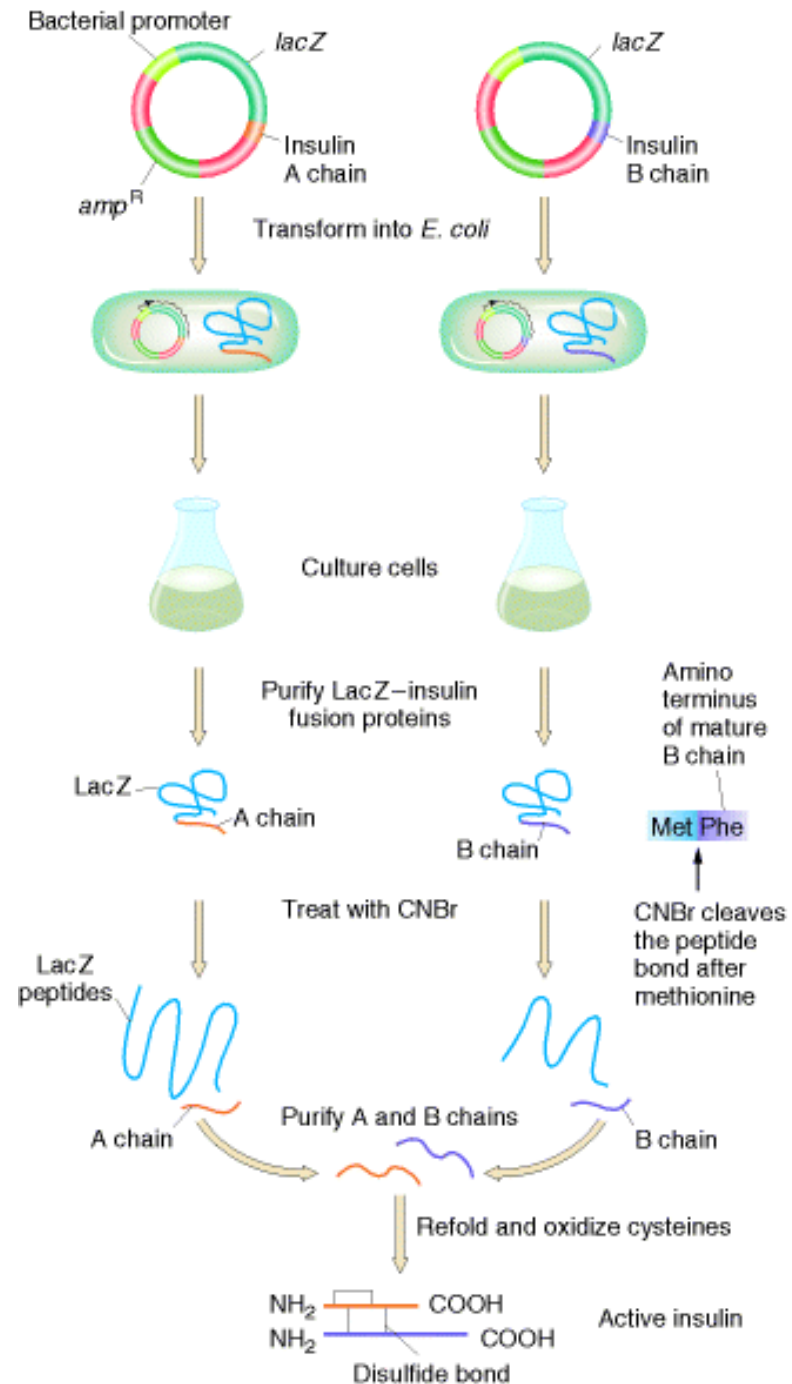
-SI PUO' PRODURRE INSULINA UMANA NEI BATTERI?

**-E. Coli NON SA MODIFICARE premRNA EUCARIOTICI
E PRODURRE MODIFICHE POST-TRADUZIONALI**

Venne realizzata per la prima volta nel 1977 dagli scienziati statunitensi Herbert Boyer e Stanley Cohen. La sua commercializzazione avvenne a partire dal 1982 con il nome HUMULIN dalla casa farmaceutica 'Eli Lilly and company' in collaborazione con la Genentech fondata dallo stesso Herbert Boyer. E' stato il primo brevetto depositato per un farmaco ottenuto con le tecniche dell'ingegneria genetica e approvato dalla U.S. Food and Drug Administration.

PRODUZIONE DI INSULINA RICOMBINANTE IN BATTERI

- Plasmidi separati codificano per Catena A e B
- promotore *trp* e alcuni codoni iniziali *trp*
- sequenze per il *trp* sono eliminate con trattamento con bromuro di cianato
- catene mescolate assieme e tramite un processo chimico si formano legami S-S



PRODUZIONE ORMONE DELLA CRESCITA UMANO IN E. Coli

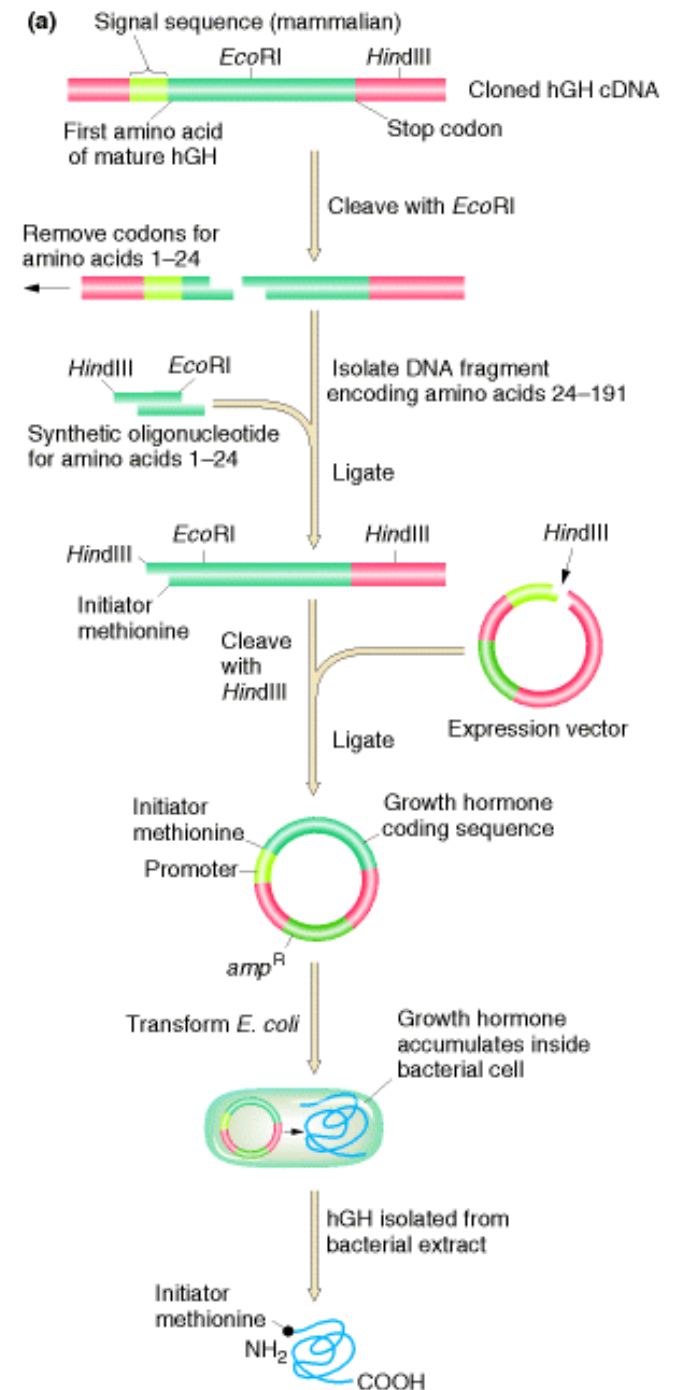
-Peptide di 191 aa

-Carenza provoca nanismo ipofisario

-GH da animali non è efficace sull'uomo

-80 ipofisi di cadaveri umani per un paziente per un anno (alto rischio infezioni - CJ)

PRODUZIONE DI GH RICOMBINANTE IN BATTERI



Batteri

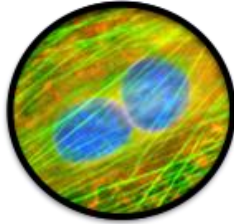
(*E. coli*)

Vantaggi:

- Vasta scelta di vettori di clonaggio
- Vasta scelta di linee cellulari
- Controllo relativamente semplice dell' espressione a livello genetico
- Buona resa della proteina ricombinante (25% del totale delle proteine)
- La proteina ricombinante può essere espressa come proteina di fusione
- La proteina ricombinante può essere disegnata per essere secreta nel terreno di crescita
- Economico

Svantaggi:

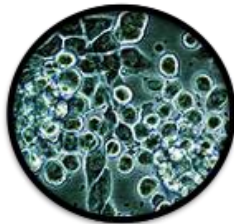
- La proteina ricombinante mancherà di modificazioni post-trasduzionali
- L' attività biologica del ricombinante può essere diverso dalla proteina naturale
- Carico metabolico molto pesante con overespressione di proteine che a volte porta alla formazione di inclusion bodies, aggregati che rendono difficoltosa la purificazione del prodotto e possono ridurre la sua attività biologica



Mammalian Cell



Bacterial Cell



Insect Cell



Yeast Cell

Protein Expression Service

Bacteria expression system

Pros: low cost, easy to scale up, high expression level, well-characterized genetics

Cons: poor folding, inclusion body, poor post-translational modifications

Yeast expression system

Pros: not expensive, easy to scale up, efficient protein folding

Cons: various glycosylation, hyperglycosylation

Insect expression system

Pros: efficient protein folding, relatively high expression level, moderate post-translational modifications

Cons: expensive, various glycosylation, N-linked glycan structures

Mammalian expression system

Pros: comprehensive post-translational modifications, efficient protein folding

Cons: expensive, difficult to scale up

MANIPOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE EUCARIOTICHE

Vantaggi rispetto a sistemi procariotici

-FORMAZIONE CORRETTA DI PONTI DISOLFURO

-FOLDING CORRETTO

-TAGLIO PROTEOLITICO DA PRECURSORE

-GLICOSILAZIONE

**-MODIFICAZIONE DI aa (FOSFORILAZIONE,
ACETILAZIONE, MIRISTILAZIONE, ecc.)**

Espressione in sistemi EUCARIOTICI

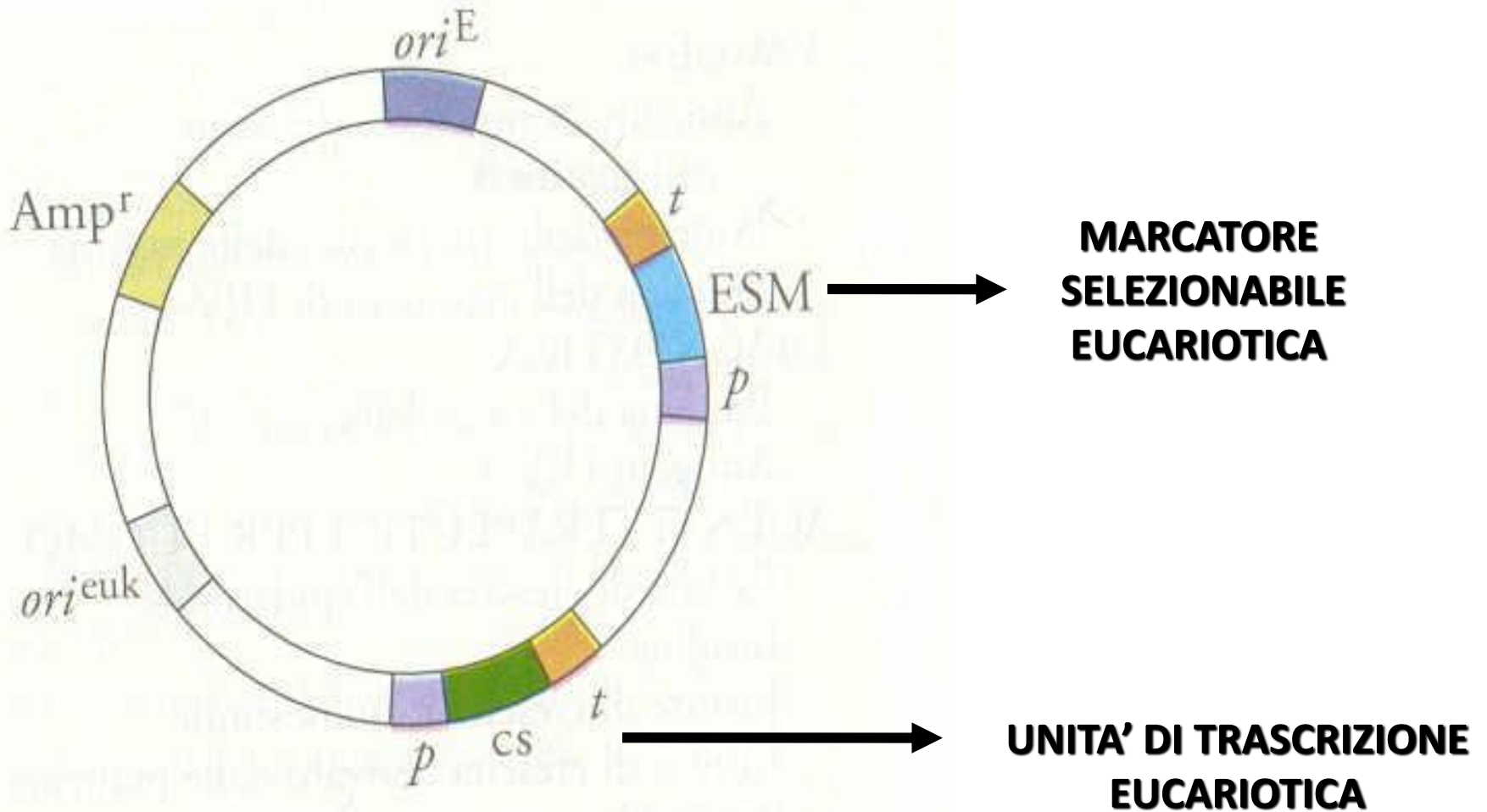
Vantaggi:

Presenza degli enzimi responsabili delle modifiche post-traduzionali necessarie per ottenere proteine ricombinanti biologicamente attive (maturazione proteolitica, metilazione, fosforilazione, glicosilazione, etc.)

Svantaggi:

**Elevata complessità cellulare
Elevato tempo di replicazione
Maggiori costi**

GENERICO VETTORE DI ESPRESSIONE EUCARIOTICO: CARATTERISTICHE PRINCIPALI



SISTEMI DI TRASFORMAZIONE/TRASFEZIONI DI CELLULE EUCARIOTICHE

- LIEVITO:
 - FORMAZIONE DI PROTOPLASTI
 - TRASFORMAZIONE CON ACETATO DI LITIO
 - ELETTROPORAZIONE

Introduzione di DNA nelle cellule di lievito

- ▶ **Produzione di sferoplasti e trattamento con polietilenglicole**
- ▶ **Elettroporazione**
- ▶ **Coniugazione batterio lievito**

Marcatori genici di selezione

Geni implicati nella biosintesi di uno specifico nutriente, in genere un amminoacido. I marcatori più utilizzati sono: **Ura3.His3, Leu2, Trp1, Lys2, Ura3**

Il ceppo di lievito utilizzato nella trasfezione deve essere difettivo per una via biosintetica.

I ceppi che hanno internalizzato il vettore vengono identificati per la loro capacità di complementare il difetto nutrizionale, pertanto vengono fatti crescere su un terreno privo dello specifico nutriente.

PRODUZIONE DI VACCINO CONTRO EPATITE B IN LIEVITO

-VACCINI ATTENUATI SONO VIRUS ALTERATI IN MODO CHE NON POSSANO PIU' RIPRODURSI NELL'ORGANISMO IN CUI VENGONO INOCULATI

-QUESTI VACCINI SONO POTENZIALMENTE PERICOLOSI : POSSONO ESSERE CONTAMINATI CON VIRUS INFETTIVI

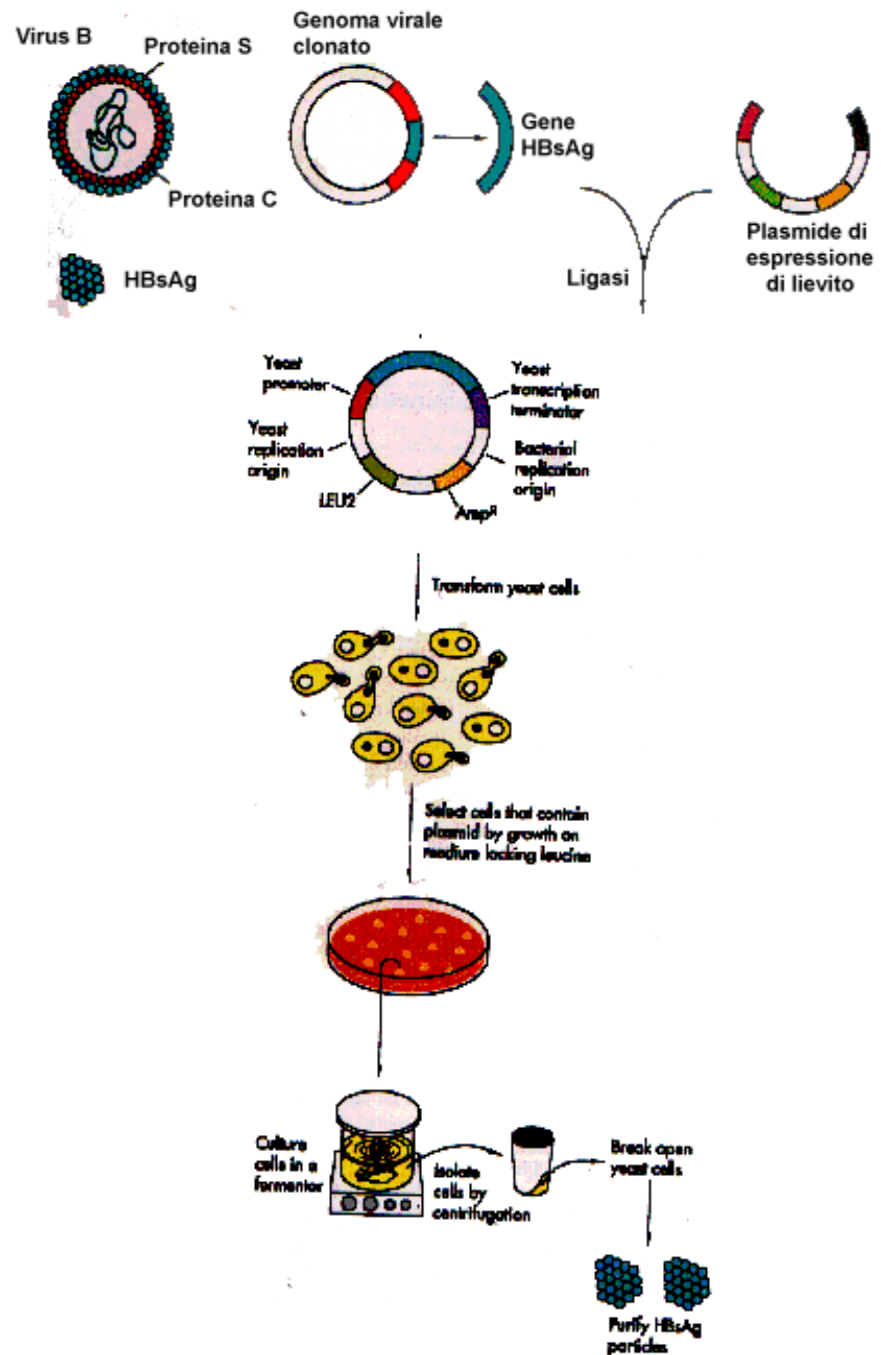
-TENTATIVI DI PRODURRE ANTIGENE DI SUPERFICIE DI VIRUS EPATITE B (HBsAg) IN E. Coli FALLIRONO

-IL GENE CODIFICANTE HBsAg E' STATO CLONATO IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE DI LIEVITO.

-LIEVITO TRASFORMATO CON QUESTO VETTORE PRODUCE ELEVATE QUANTITA' DI HBsAg

-UTILIZZANDO FERMENTATORI E' POSSIBILE OTTENERE 50-100 mg DI PROTEINA PER LITRO DI COLTURA

Produzione vaccino Ricombinante per Epatite B in lievito



PROTEINE RICOMBINANTI PRODOTTE IN *S. cerevisiae*

VACCINI

Antigene di superficie del virus
dell'epatite B

Proteina dello sporozoita della malaria

Proteina dell'involucro di HIV-1

DIAGNOSTICA

Proteina del virus dell'epatite C

Antigeni HIV-1

AGENTI TERAPEUTICI PER L'UOMO

Fattore di crescita dell'epidermide

Insulina

Fattore di crescita insulinosimile

Fattore di crescita derivato dalle piastrine

Proinsulina

Fattore di crescita dei fibroblasti

Fattore di stimolazione delle colonie di
granulociti e macrofagi

Antitripsina α_1

Fattore di coagulazione del sangue XIIIa

ESPRESSIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI IN *S. cerevisiae*

- LIMITI

1. PERDITA DEL PLASMIDE

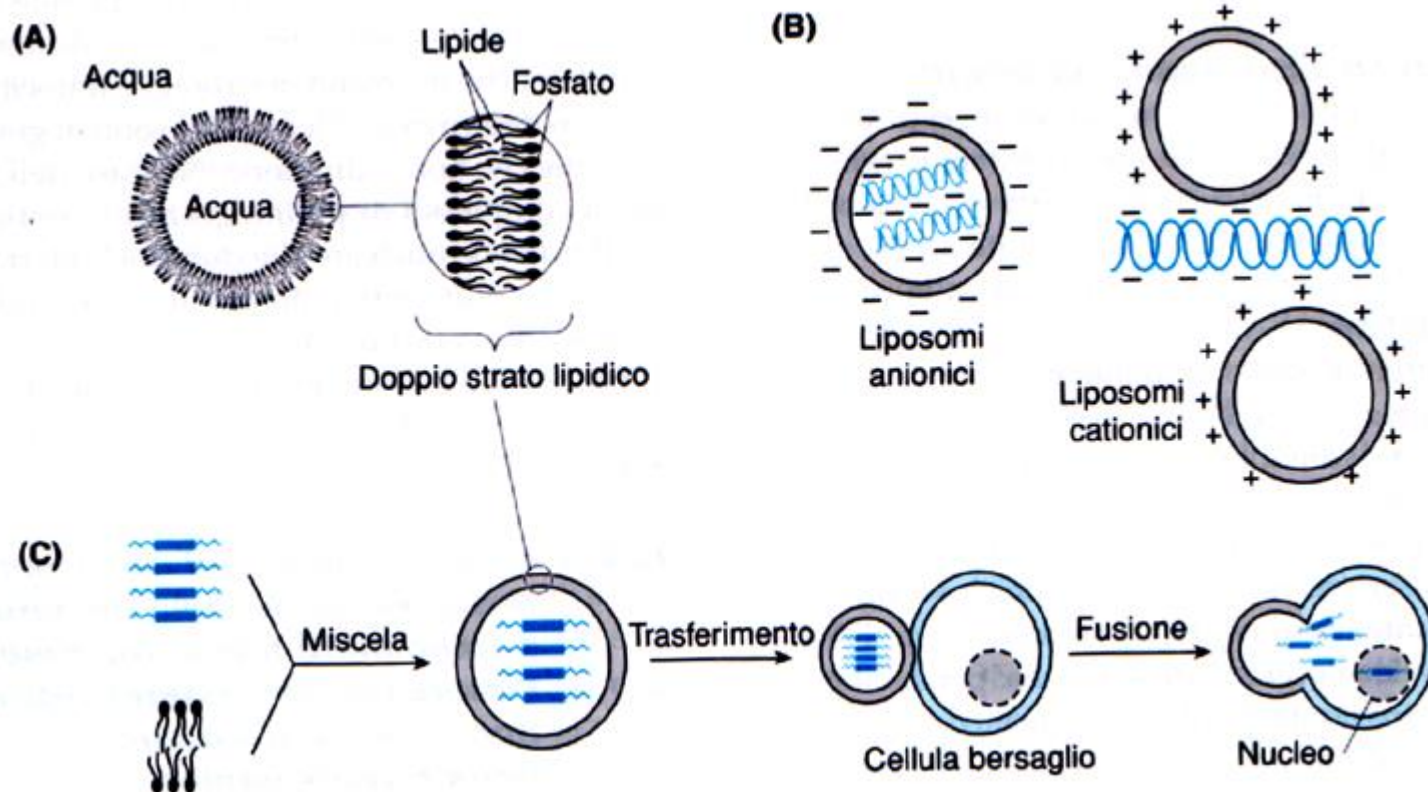
1. IPERGLICOSILAZIONE DELLA PROTEINA
ETEROLOGA  ALTERAZIONE ATTIVITA'
BIOLOGICA E IMMUNOGENICITA'

3. NO SECREZIONE PROTEICA

- **CELLULE ANIMALI:**

- **INCUBAZIONE CON DNA CO-PRECIPITATO CON FOSFATO DI CALCIO O DIETILAMINOETIL-DESTRANO (DEA)**
- **ELETTROPORAZIONE**
- **LIPOSOMI**
- **VEICOLAZIONE DI DNA DA PARTE DI UN VIRUS**

Liposomi



Vettori virali

- **Si ottengono inserendo il gene di interesse nel genoma di diversi tipi di virus, sotto il controllo di un promotore forte. In genere le modifiche vengono introdotte in modo da rendere il virus incapace di riprodursi autonomamente. Questo è importante per evitare la diffusione di virus ricombinanti**
- **Il genoma viene ingegnerizzato con le tecniche del DNA ricombinante, e trasfettato in particolari linee cellulari capaci di produrre le particelle virali ricombinanti (linee di packaging). Queste complementano i difetti introdotti nel genoma.**
- **Il principale vantaggio consiste nell'elevata efficienza di trasduzione (fino al 100% delle cellule).**

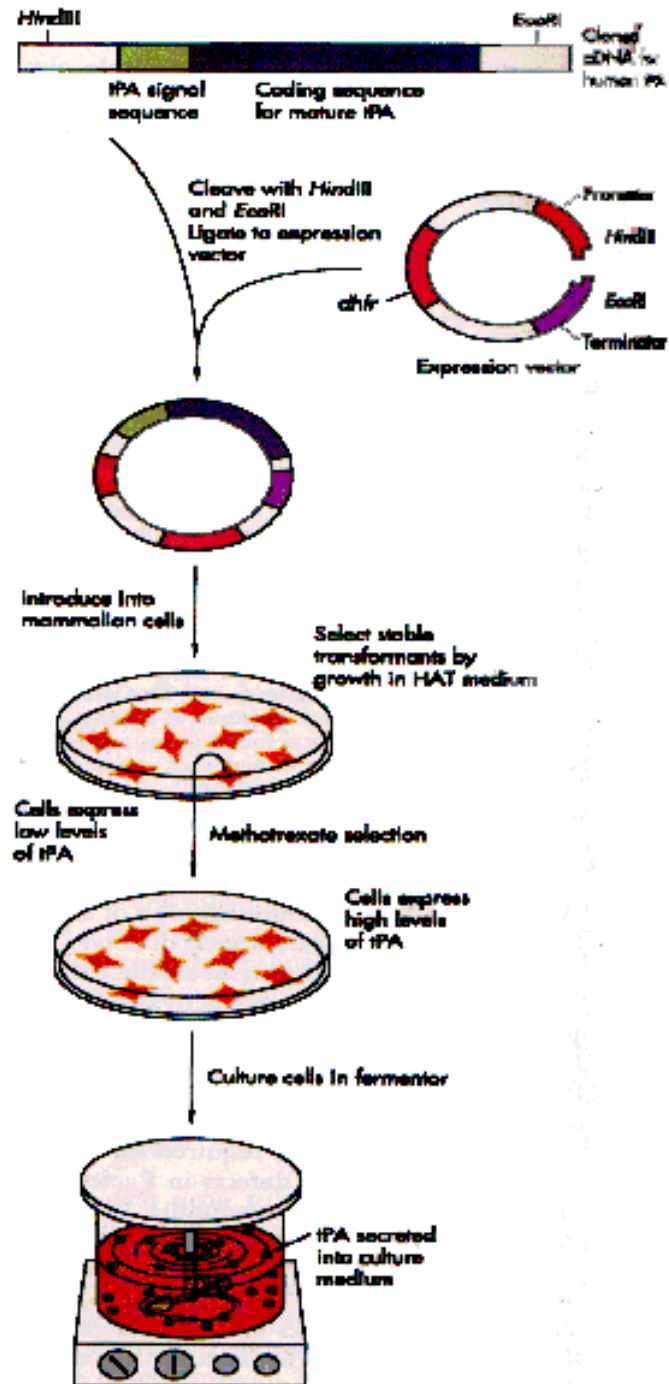
Trasfezione stabile = le cellule vengono trasfettate e messe sotto selezione (arricchimento delle cellule che hanno incorporato stabilmente la modificazione genetica)

Trasfezione transiente = le cellule vengono trasfettate ma non vengono selezionate

ATTIVATORE PLASMINOGENO TISSUTALE (t-PA) e INTERFERON BETA-1 α

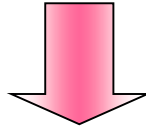
- IL PRIMO E' UTILIZZATO NELLA TERAPIA DEGLI
ATTACCHI CARDIACI (DISTRUGGE PICCOLI COAGULI
DI SANGUE), IL SECONDO NELLA TERAPIA DELLA
SCLEROSI MULTIPLA.**
- SONO PRODOTTI DA LINEE CELLULARI DI
MAMMIFERO (CHO) IN COLTURA, NEL GENOMA DELLE
QUALI I VETTORI DI ESPRESSIONE SI INTEGRANO
STABILMENTE A SEGUITO DELLA TRASFEZIONE.**

Espressione in cellule di mammifero di t-PA e Interferon- β 1 α



Organismi procariotici

L'organismo procariotico maggiormente utilizzato come ospite per la produzione di proteine ricombinanti è *E. coli*



**E' ben conosciuto il metabolismo e la genetica
Il prodotto ricombinante è ottenuto in un tempo relativamente
breve e a basso costo**

Organismi eucariotici

Gli organismi maggiormente utilizzati sono lieviti, cellule animali e vegetali o di insetto. Essi rappresentano una valida alternativa ai sistemi procariotici quando quest'ultimi non possono essere utilizzati.

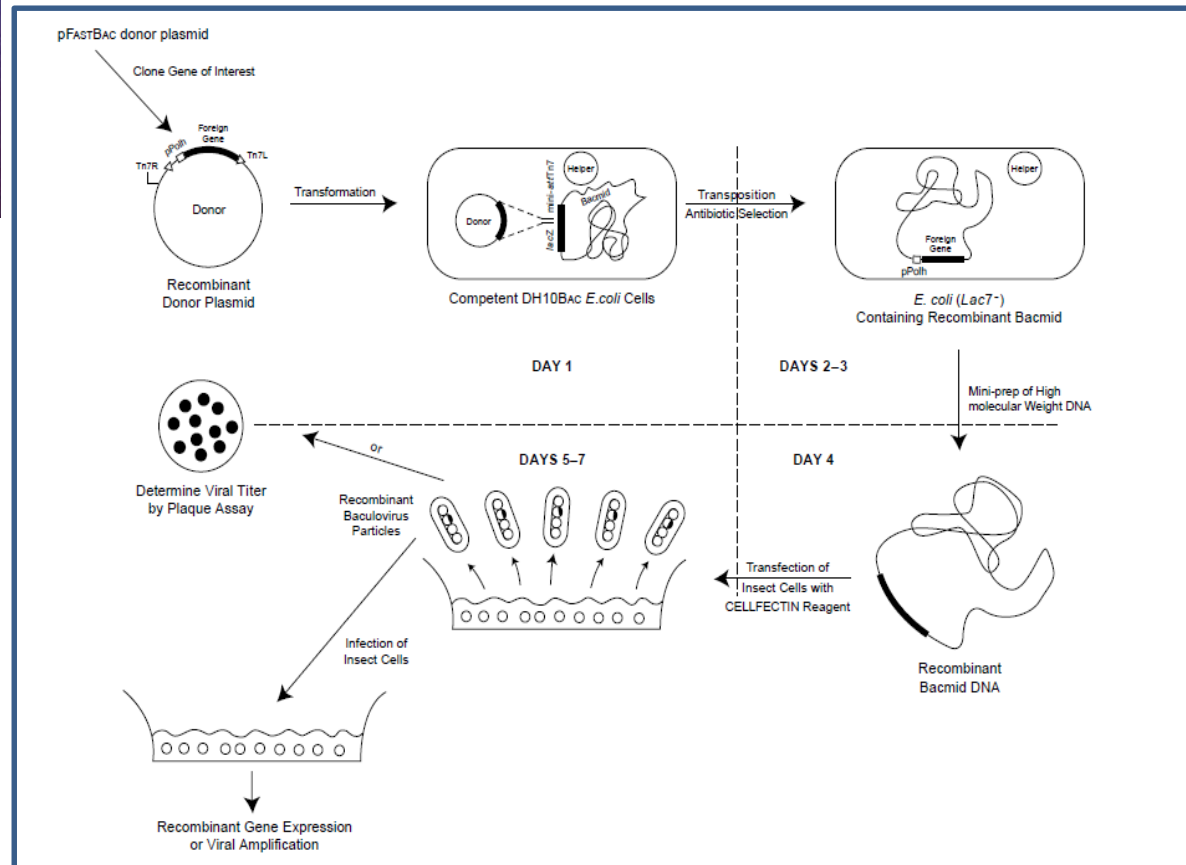
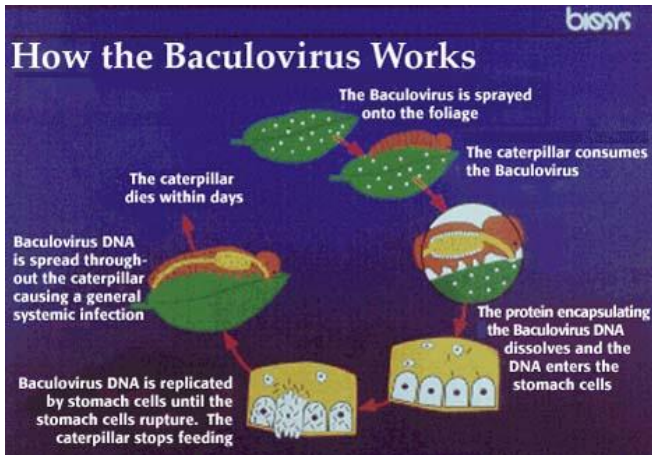
Scelta del modello di espressione

- ✓ Batteri
- ✓ Lieviti
- ✓ Funghi
- ✓ Cellule superiori (cellule di mammifero)
- ✓ Sistemi virali (cellule di insetto)
- ✓ Piante ricombinanti
- ✓ Animali ricombinanti

PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI MEDIANTE IL SISTEMA DI ESPRESSIONE DI Baculovirus

- **AcMNPV: VIRUS DELLA POLIEDROSI NUCLEARE MULTIPLA DI Autographa californica**
- **LINEA CELLULARE: Spodoptera frugiperda**
- **SI ESPRIME MOLTO BENE IL PROMOTORE DELLA POLIEDRINA**

ALCUNE DELLE PROTEINE RICOMBINANTI PRODOTTE UTILIZZANDO IL SISTEMA DEL VETTORE DI ESPRESSIONE DI BACULOVIRUS



Più di 500 proteine eterologhe prodotte con baculovirus ricombinanti
La proteina eterologa viene raccolta dopo 4-5 giorni dall'infezione
Le proteine possono essere prodotte all'interno della cellula oppure secrete nel mezzo di coltura.

Adenosina deamminasi

Anticorpi monoclonali del topo

Antigene del capsido del rotavirus della scimmia

Antigene del carbonchio

Antigene del virus sinciziale respiratorio

Antigene di neutralizzazione del virus della malattia della lingua blu

Antigene tipo 1 del virus dengue

Attivatore tissutale del plasminogeno

Emagglutinina del virus influenzale

Eritropoietina

Fosfatasi alcalina dell'uomo

Glicoproteina 50 del virus della pseudorabbia

Glicoproteina del virus della rabbia

Interferone α

Interferone β

Lipasi pancreatica dell'uomo

Proteina del Lassavirus

Proteina dell'involucro di HIV-1

Proteina precursore dell'amiloide β

Proteina trasportatrice multifarmaco

Proteine del capsido di HSV

Proteine del poliovirus

Proteine della malaria

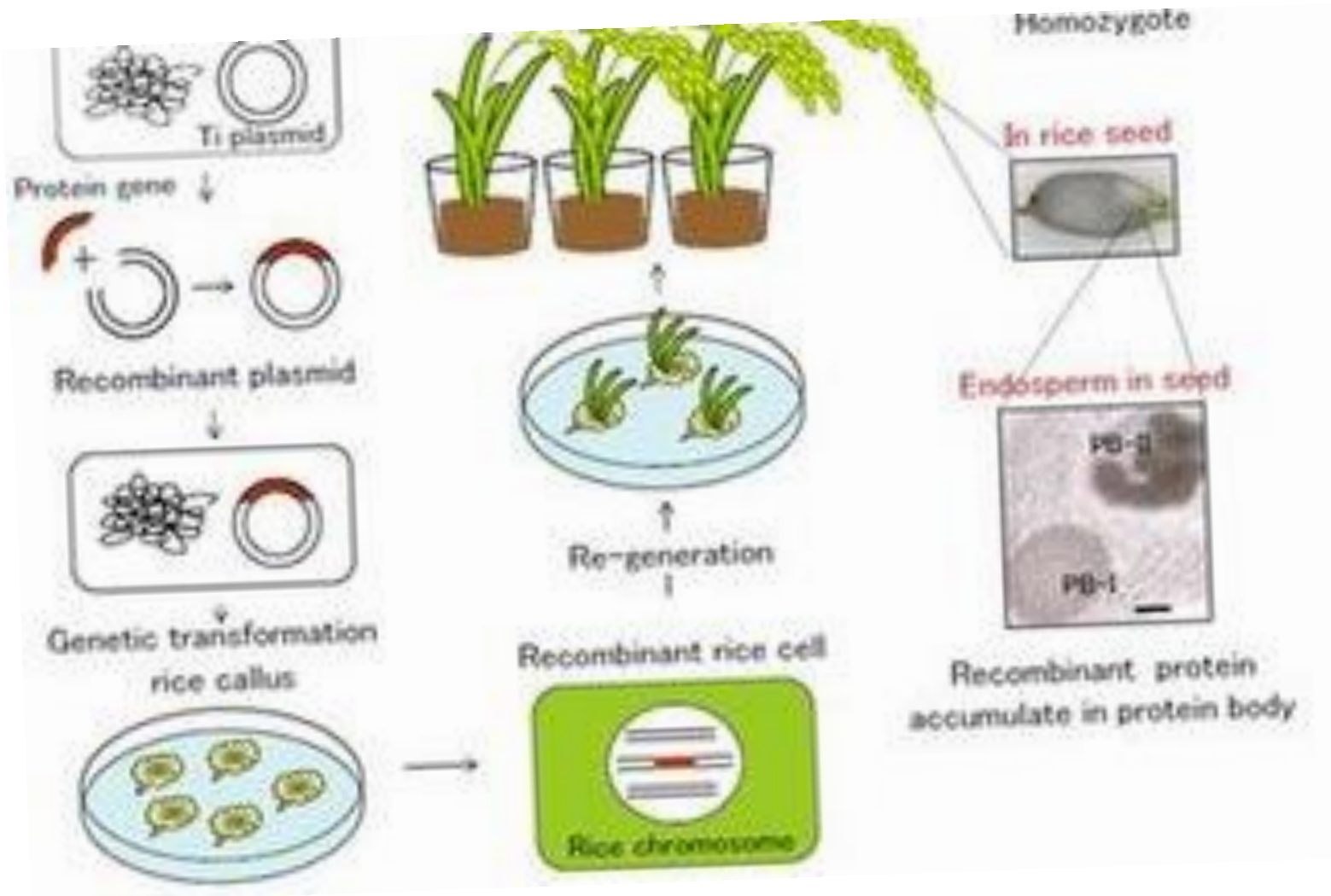
Recettori accoppiati con la proteina G

Regolatore della conduttanza

transmembrana della fibrosi cistica

Rodopsina bovina

OryzHiExp expression platform for Recombinant Protein Service





ANIMALI TRANSGENICI

- Per *animali transgenici* si intendono quegli animali ottenuti attraverso una manipolazione del genoma, inserendo uno o più geni, appartenenti alla stessa specie, o più spesso ad altre specie.
- **Animali nati da una cellula uovo fecondata in cui è stato inserito un gene proveniente da un'altra specie, allo scopo di modificarne le caratteristiche e far loro sviluppare capacità che non avrebbero mai potuto acquisire spontaneamente.**

- Il *primo animale* transgenico è stato un maiale creato nel 1992, per sintetizzare nel latte la proteina umana C. Dopo Genie, così si chiamava la prima scrofa, si è cominciato a pensare di produrre animali donatori per andare incontro alla domanda sempre crescente di organi.
- A tale scopo i maiali sono considerati i migliori candidati, visto che , geneticamente, sono molto simili a noi.
- L'obiettivo è di creare dei porcellini transgenici dotati di organi interni praticamente umani, in grado cioè di ingannare il sistema immunitario e impedire il processo di rigetto.

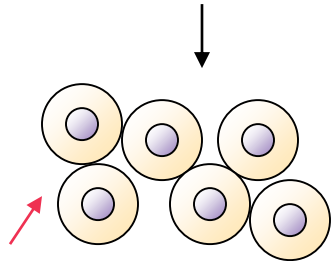
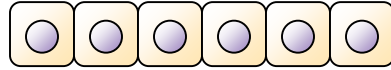


Clonazione: la pecora Dolly (Wilmut et al. 1997)

Pecora donatrice

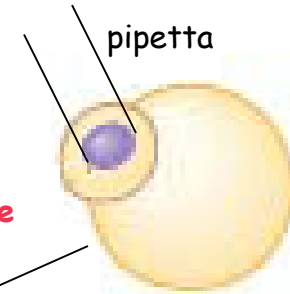


Epitelio mammario



Separazione delle cellule e induzione al dedifferenziamento tenendole in un mezzo privo di nutrimento

Il nucleo viene eliminato

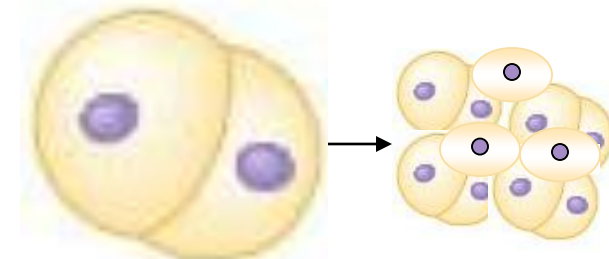


Cellula uovo non fecondata

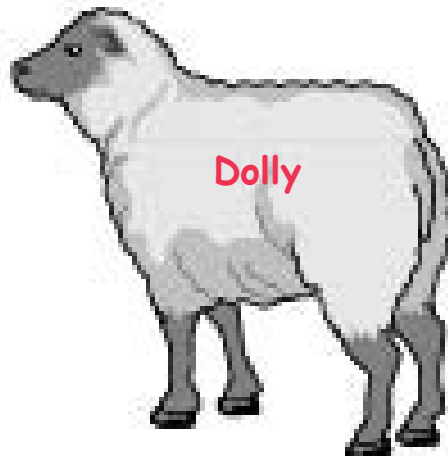
Fusione e attivazione mediante una piccola scarica elettrica



L'embrione viene coltivato in vitro

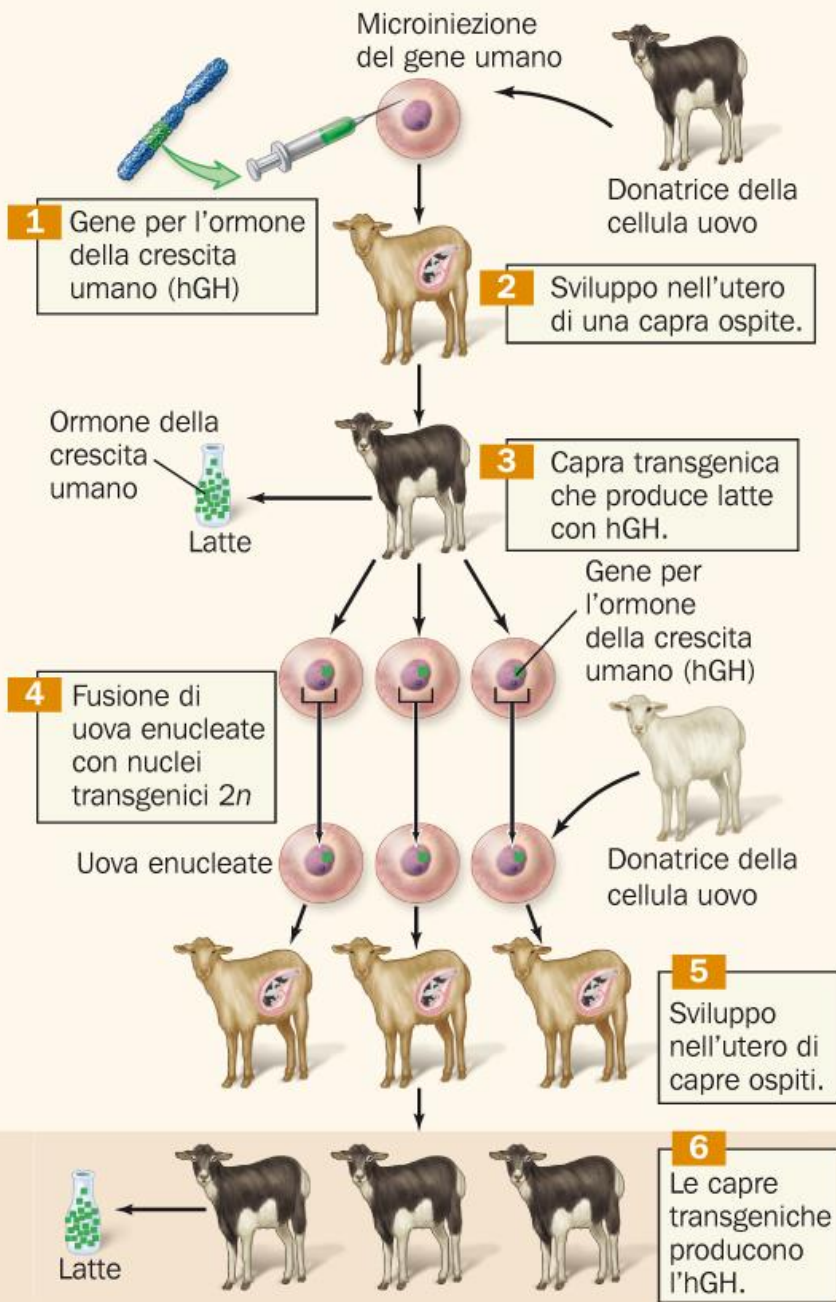


L'embrione viene impiantato nell'utero di una madre adottiva



Da questo embrione si sviluppa un agnello del tutto simile alla pecora donatrice

Gli animali vengono modificati per esaltare tratti scelti o ottenere prodotti



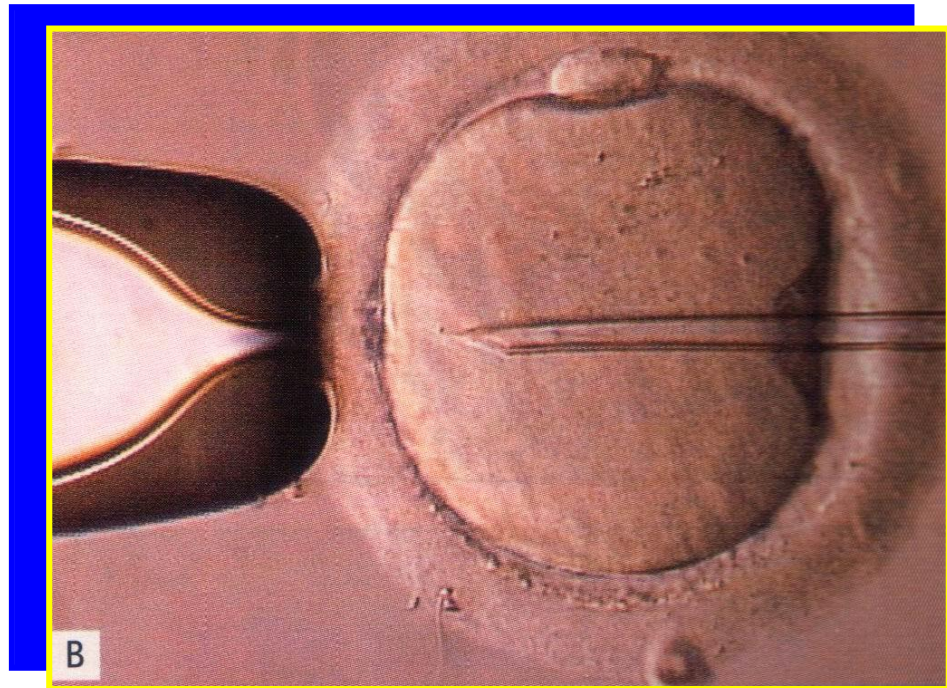
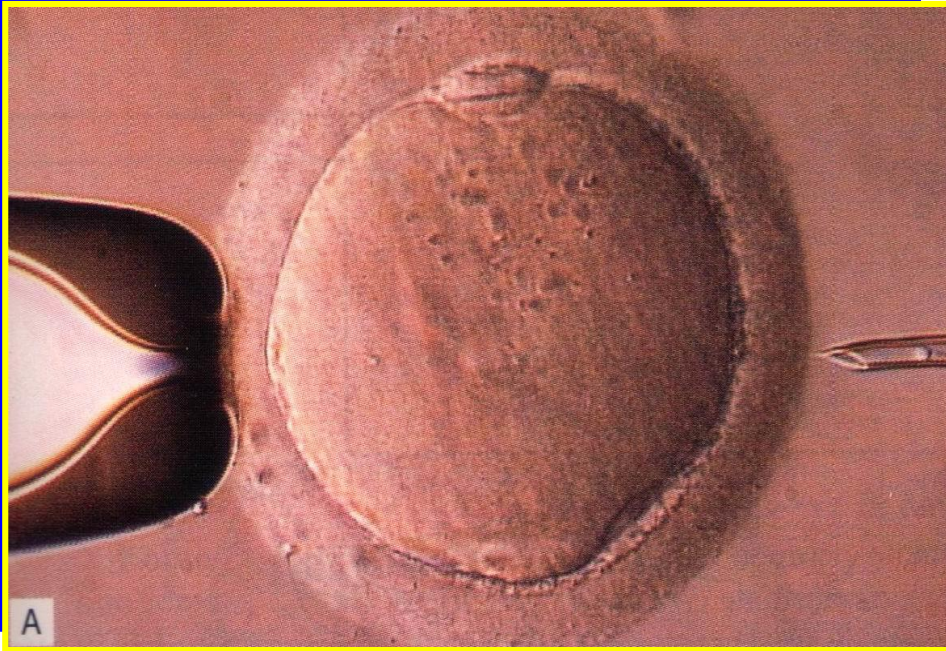
- Gli animali GM possono produrre principi attivi **farmaceutici**.
- I topi GM sono usati per la **ricerca genetica**, anche applicata allo studio delle malattie umane.
- Alcuni animali GM possono essere usati come donatori di organi (**xenotrapianto**).
- Alcuni mammiferi sono usati per creare femmine GM che producono latte contenente l'**ormone della crescita (hGH)**.

- L'interesse degli animali transgenici è indirizzato, inoltre, a produrre linee genetiche controllate di animali che producano alimenti migliori e in maggiori quantità. Ad esempio sono stati prodotti *suini transgenici* che crescono più rapidamente, utilizzando meglio l'alimento e producendo una carne con meno grasso.

MICROINIEZIONE DI DNA

Per produrre animali transgenici e cioè poter inserire un gene "nuovo" in un animale, in modo da farlo esprimere anche alla sua progenie, è necessario inserirlo quando l'individuo è costituito da poche cellule o addirittura dall'oocita appena fecondato

INIEZIONE DI DNA nel pronucleo maschile di un oocita appena fecondato. Più precisamente, si depositano con una microsiringa 1-2 picolitri di DNA che contengono circa 100-200 copie del gene da inserire. A monte del gene(cDNA) da trasferire nel pronucleo si utilizza una sequenza promotore che conferisce al gene la specificità di espressione in un particolare tessuto



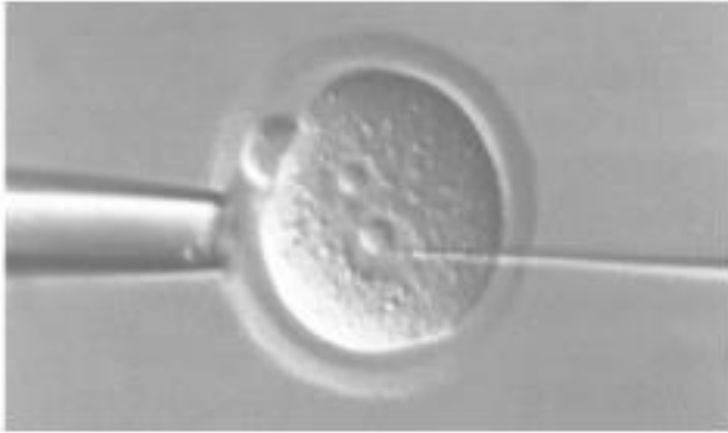
Gli animali che sono stati ingegnerizzati per inserzione di un gene, delezione di un gene o sostituzione di un gene si chiamano ORGANISMI TRANSGENICI e qualunque gene estraneo o modificato che è stato aggiunto si chiama transgene.

- Se si usano gli zigoti appena fertilizzati il transgene viene iniettato nel pronucleo maschile.
- Se si usano le cellule embrionali staminali totipotenti (ES) prelevate allo stadio di blastocisti, il transgene viene fatto assumere alle cellule per trasfezione o elettroporazione.

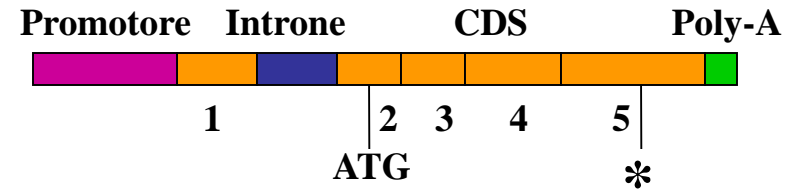
-Nei transgenici in cui si ha l'inserzione di nuove copie geniche il DNA puo' inserirsi casualmente nel genoma ospite (a patto che non modifichi altri geni o sia silenziato)

-Nei "gene Knock-out" il DNA deve ricombinare esattamente con la copia del medesimo gene del genoma ospite (TECNICA DEL GENE TARGETING)

Esempio: generazione di topi transgenici mediante microiniezione di DNA nei pronuclei maschili



Iniezione di costrutti di espressione lineari, che si integrano sotto forma di concatameri a partire dai primissimi stadi di sviluppo.

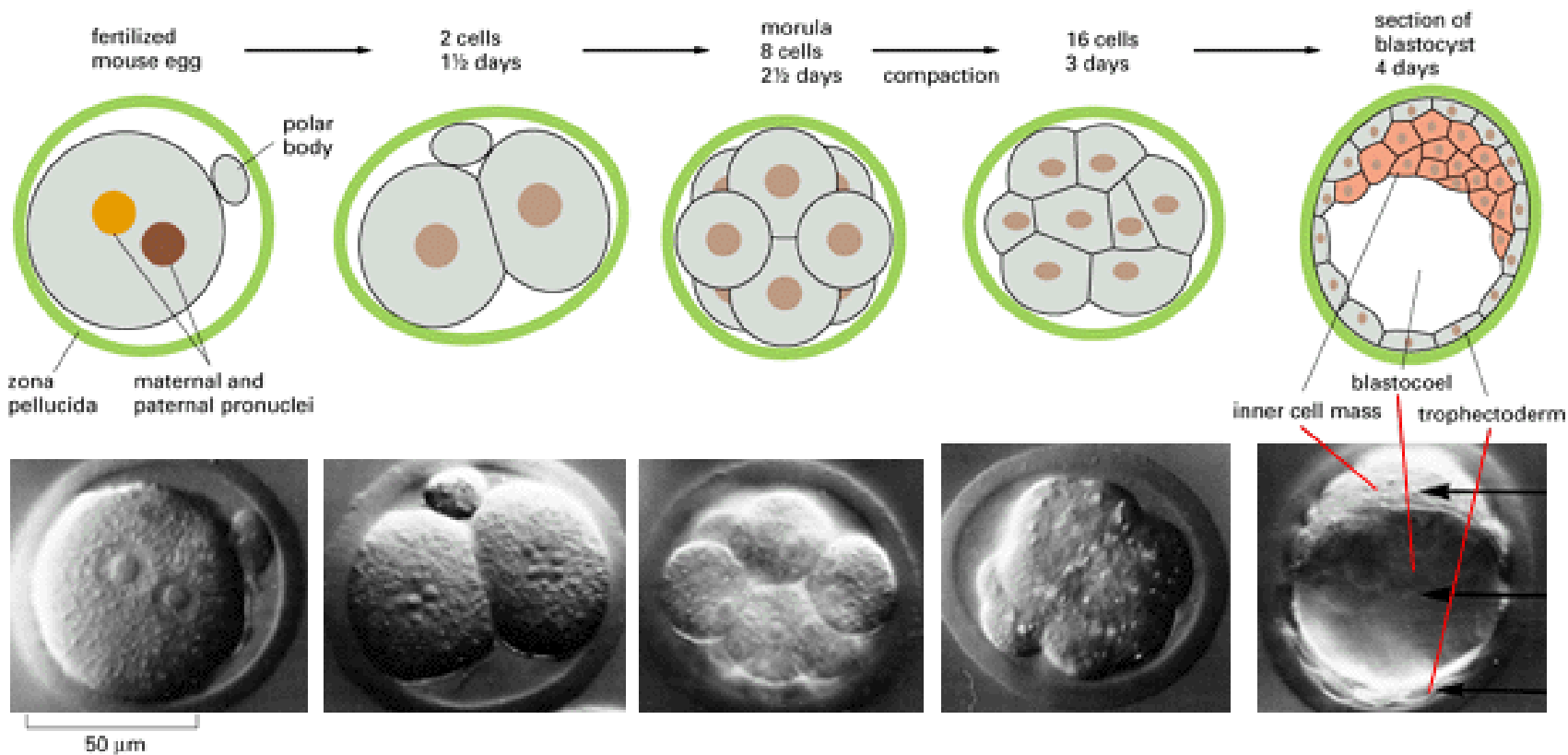


- Dopo la microiniezione gli embrioni vengono reimpiantati in femmine pseudogravide
- Gli animali nati da questi esperimenti devono essere analizzati per mezzo di Southern blotting o PCR per valutare se il transgene si è integrato e in quante copie.
- Gli animali transgenici (founders e/o loro discendenza) vengono successivamente analizzati per valutare se il transgene si esprime in, ed eventualmente gli effetti fenotipici della sua espressione



Produzione di organismi transgenici

Gli organismi transgenici possono essere ottenuti modificando cellule embrionali totipotenti



CELLULE ES

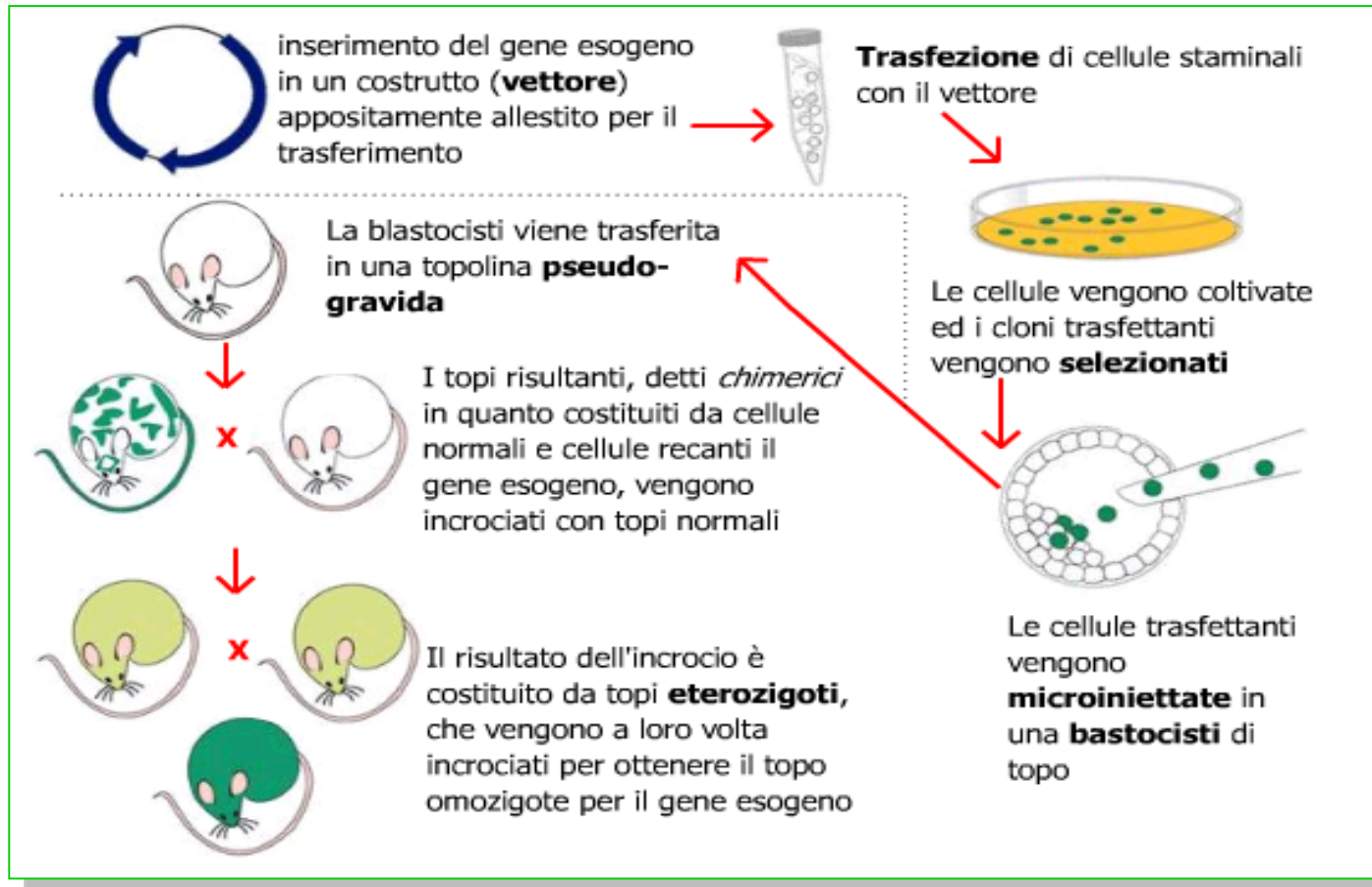
- **Le ES cells sono la parte della blastocisti di mammifero che darà luogo all'embrione.**
- **Le cellule ES sono cellule embrionali totipotenti, infatti possono dare origine a cellule di tessuti differenti.**
- **Le cellule ES vengono prelevate dalla massa cellulare interna della blastocisti (cellula embrionale indifferenziata) e mantenute in coltura in presenza di cellule o fattori che ne impediscono il differenziamento.**
- **In queste condizioni le cellule ES mantengono intatta la loro capacità di differenziarsi in modo appropriato in qualunque tessuto, una volta reintrodotte in un embrione**

MICROINIEZIONE DI DNA E PRODUZIONE DI TOPI TRANSGENICI

Il gene inserito viene integrato nel genoma della cellula uovo che viene trapiantata in una madre adottiva , che darà origine alla nascita di un topino “**chimera**” (mosaico di cellule con patrimoni genetici diversi). Nella fase successiva si effettua un incrocio riproduttivo tra il topino chimera e un topo normale con la nascita di topini con i nuovi geni ma eterozigotici.

Solo nell’incrocio successivo tra i precedenti avremo la nascita di **topini omozigotici** per il gene introdotto

PRODUZIONE DI TOPI TRANSGENICI



L'animale chimera possiede solo in alcuni tessuti il transgene o la copia non funzionale del gene (quelli derivati dalle ES cells modificate e reinsertite). Solo le chimere che avranno incorporato la copia genica nella linea germinale potranno passarla alle generazioni future.

TOPO CHIMERA INCROCIATO CON TOPO NORMALE

Il topo “chimera” verrà incrociato con un topo normale e alcuni discendenti (2 su dieci) avranno un gene modificato in tutte le loro cellule (eterozigosi).

Incrociando tra loro questi topi portatori del gene modificato si ottiene qualcuno dei discendenti contenente 2 geni alterati in tutte le sue cellule (omozigosi).







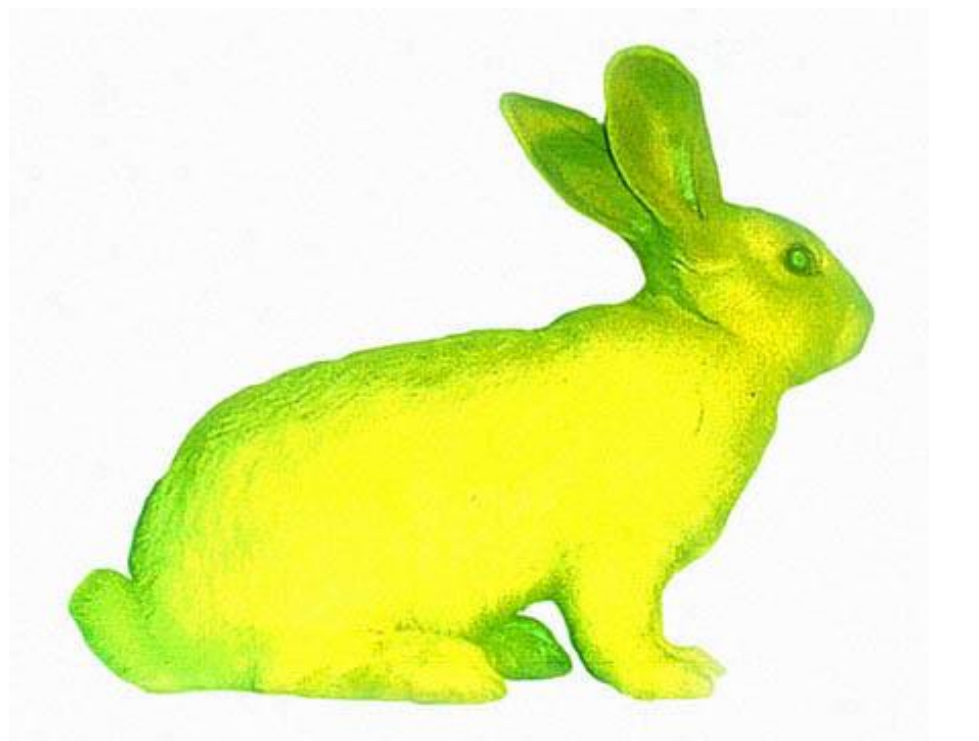
Alba (GFP Bunny)

Alba, un coniglio femmina transgenico contiene in tutte le sue cellule il gene GFP e quindi brilla di verde quando illuminato con la luce giusta.

Questo coniglio è nato nel 2000 e fa parte di un “**progetto di ARTE TRANSGENICA**” chiamata GFP Bunny, di un artista di Chicago: Eduardo Kac che si è avvalso della collaborazione di un Istituto francese di ricerca

Il progetto prevedeva non solo la creazione del coniglio fluorescente, ma anche il dialogo generato dal progetto e l'integrazione dell'animale transgenico nella società (vive con l'artista)

Il coniglio fluorescente ha fatto sorgere questioni etiche ed anche la domanda se questo tipo di sperimentazione può essere considerata ARTE



- Quando i ricercatori isolano un gene umano dalle funzioni **ignote**, per comprenderne la funzione inseriscono nel topo una **sequenza inattiva** del gene isolato, rimpiazzando quello stesso gene presente nell'animale. In questo modo viene creato un particolare tipo di topo transgenico, il topo ***knock-out***, privo cioè di quella certa funzione genica.

Basterà quindi osservare il topo **knock-out** per comprendere la funzione del gene in questione (ad esempio, se il topo perde l'udito, si deduce che il gene in questione è coinvolto nei meccanismi dell'udito, e la sua alterazione provoca la sordità).

- L'uso del topo per questi scopi nasce dalla particolare similitudine tra il genoma umano e quello del roditore.

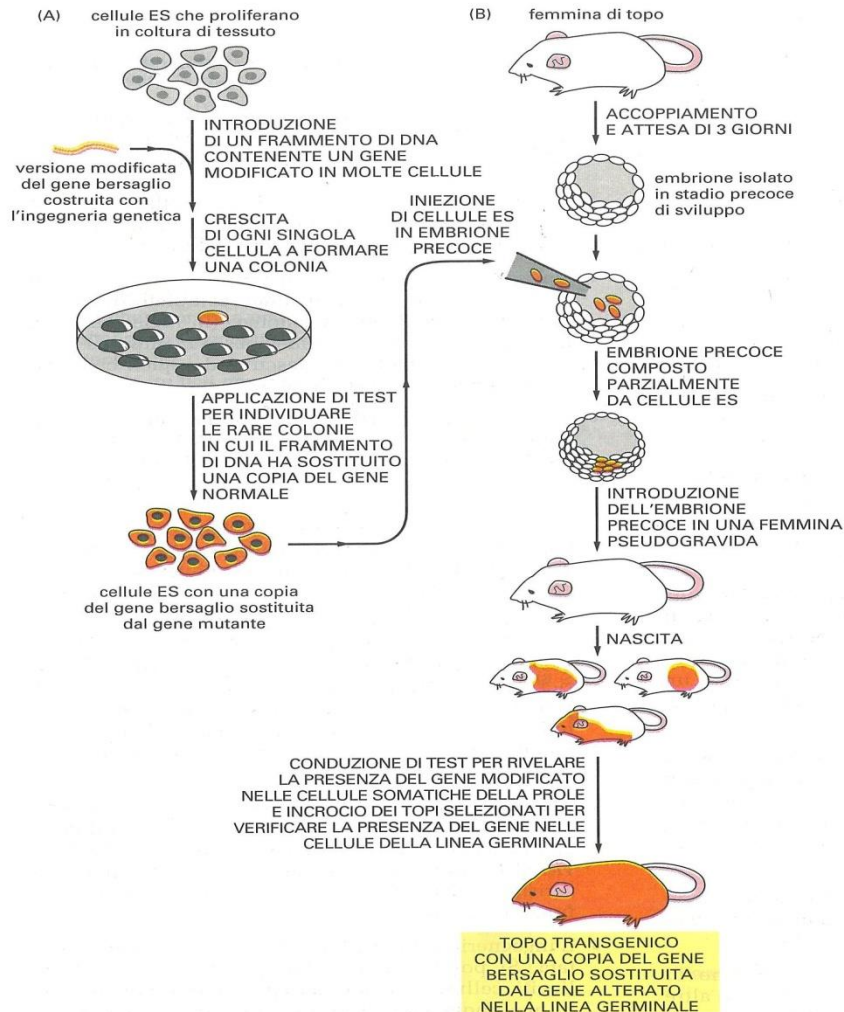
Tecnologia del gene targeting (topi knockout): rilevanza

Studio della funzione di specifici geni (le proteine umane e murine sono estremamente simili)

Identificazione di geni-malattia

Modelli sperimentali per la patologia umana

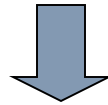
TECNICA KNOCK - OUT



Se l'alterazione genica originale inattiva completamente la funzione genica si avranno allora dei topi ad "eliminazione" (Knock-out) cioè ceppi di topi che hanno un certo gene inattivato definitivamente.

Applicazioni di topi transgenici

È possibile elaborare modelli basati sul topo relativi a malattie genetiche nell'uomo :



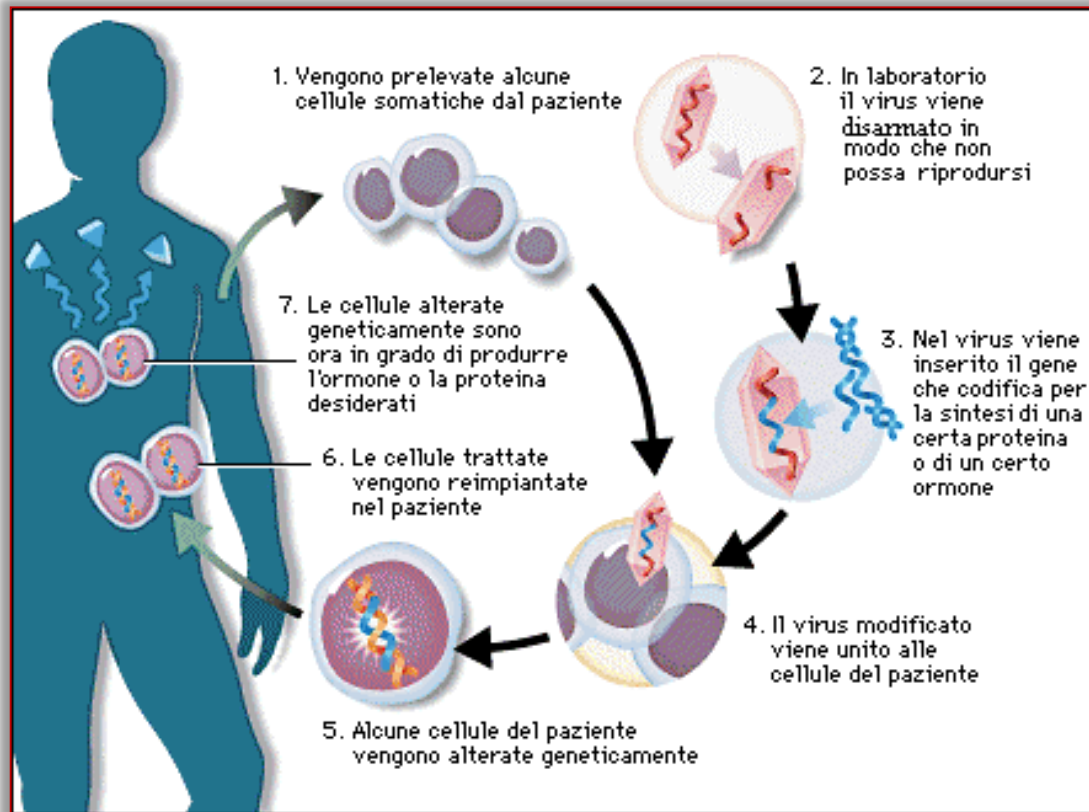
- Morbo di Alzheimer
- artrite reumatoide
- distrofia muscolare
- oncogenesi
- disturbi neurovegetativi

Terapia genica

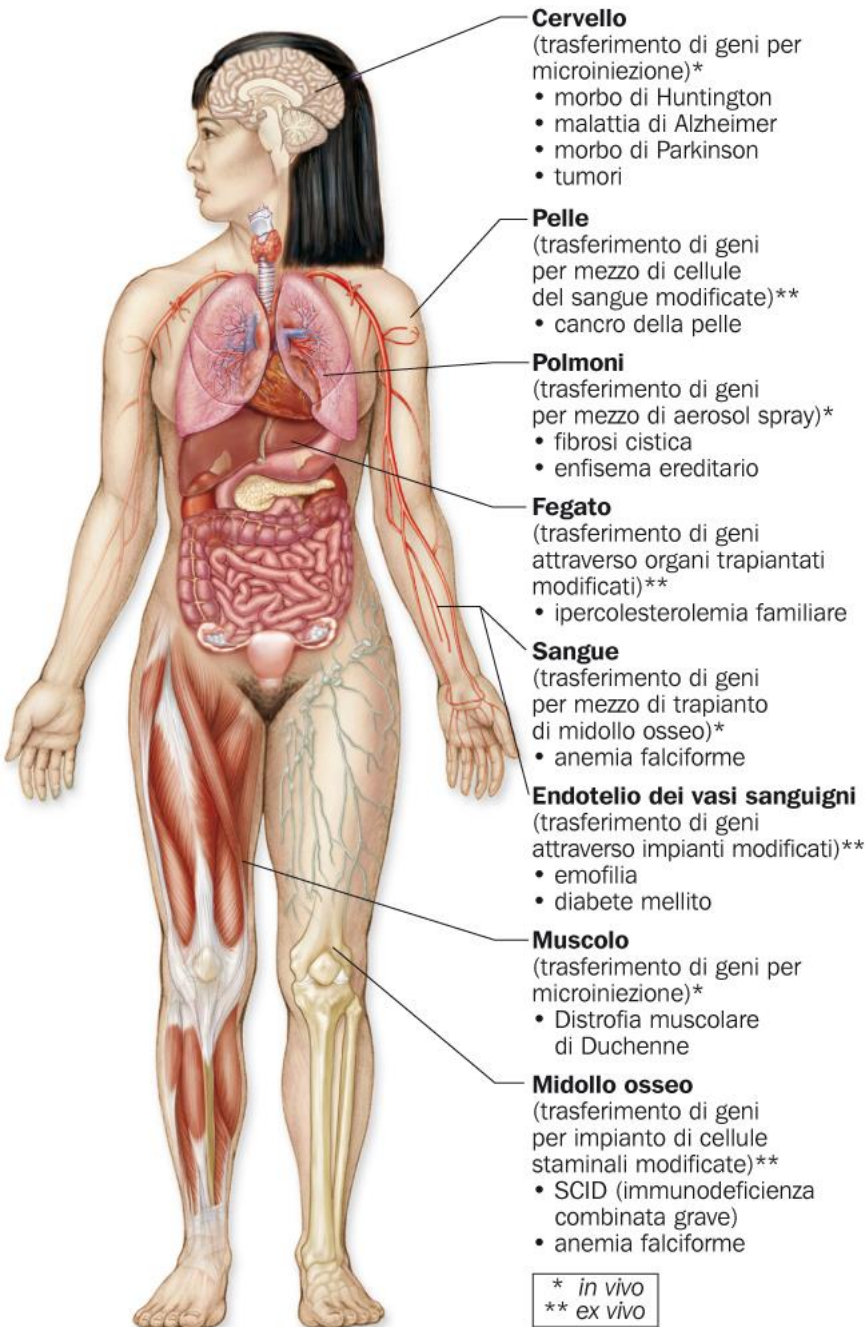
Uno dei più grandi obiettivi della medicina genetica è quella di curare malattie genetiche, provocate da alterazioni di uno o più geni o da malattie ereditarie, come la talassemia, la distrofia muscolare di Duchenne e la fibrosi cistica.

Una volta individuato il gene difettoso, si disattiva e si sostituisce con quello funzionante (Immunizzazione genica).

Questa operazione viene effettuata su cellule somatiche ma potrebbe essere effettuata anche su quelle germinali modificando il patrimonio genetico dei discendenti.



La terapia genica umana offre nuove prospettive di cura



Il DNA della nostra specie è stato sequenziato con il **Progetto Genoma Umano (PGU)**. Grazie al PGU oggi conosciamo l'ordine dei circa **tre miliardi di basi** del nostro DNA.

La **terapia genica** consente di inserire un gene «sano», ma estraneo, in cellule di pazienti affetti da malattie genetiche. La terapia genica può essere ***in vivo*** se il gene viene direttamente iniettato nel paziente, o ***ex vivo*** se si usa un virus vettore.