


Limiti del clonaggio in vettori plasmidici

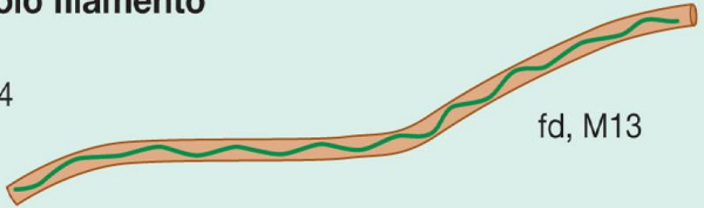
- Bassa efficienza di trasformazione e bassa densita' a cui si possono crescere le colonie
- Limitata capacita' di contenuto

- uso di vettori derivati dal batteriofago λ , particolarmente per l'analisi di librerie genomiche o di cDNA

RNA	singolo filamento  MS2	doppio filamento  phi6
------------	---	---

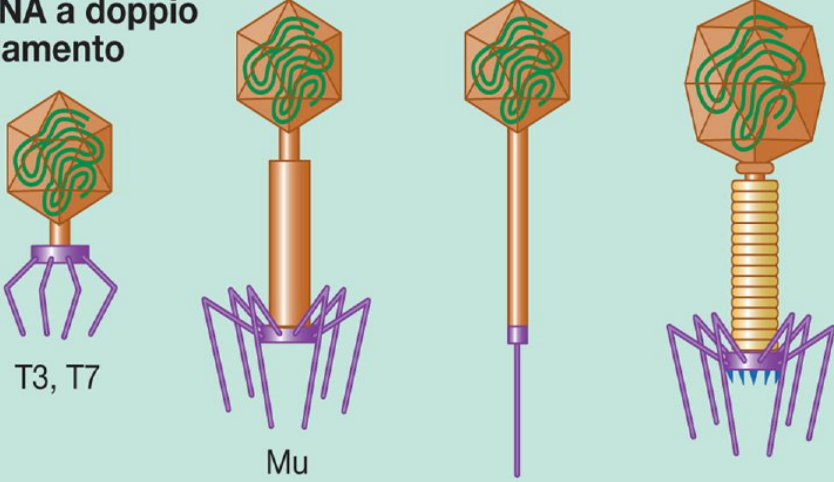
DNA a singolo filamento

 phiX174



fd, M13

DNA a doppio filamento



T3, T7

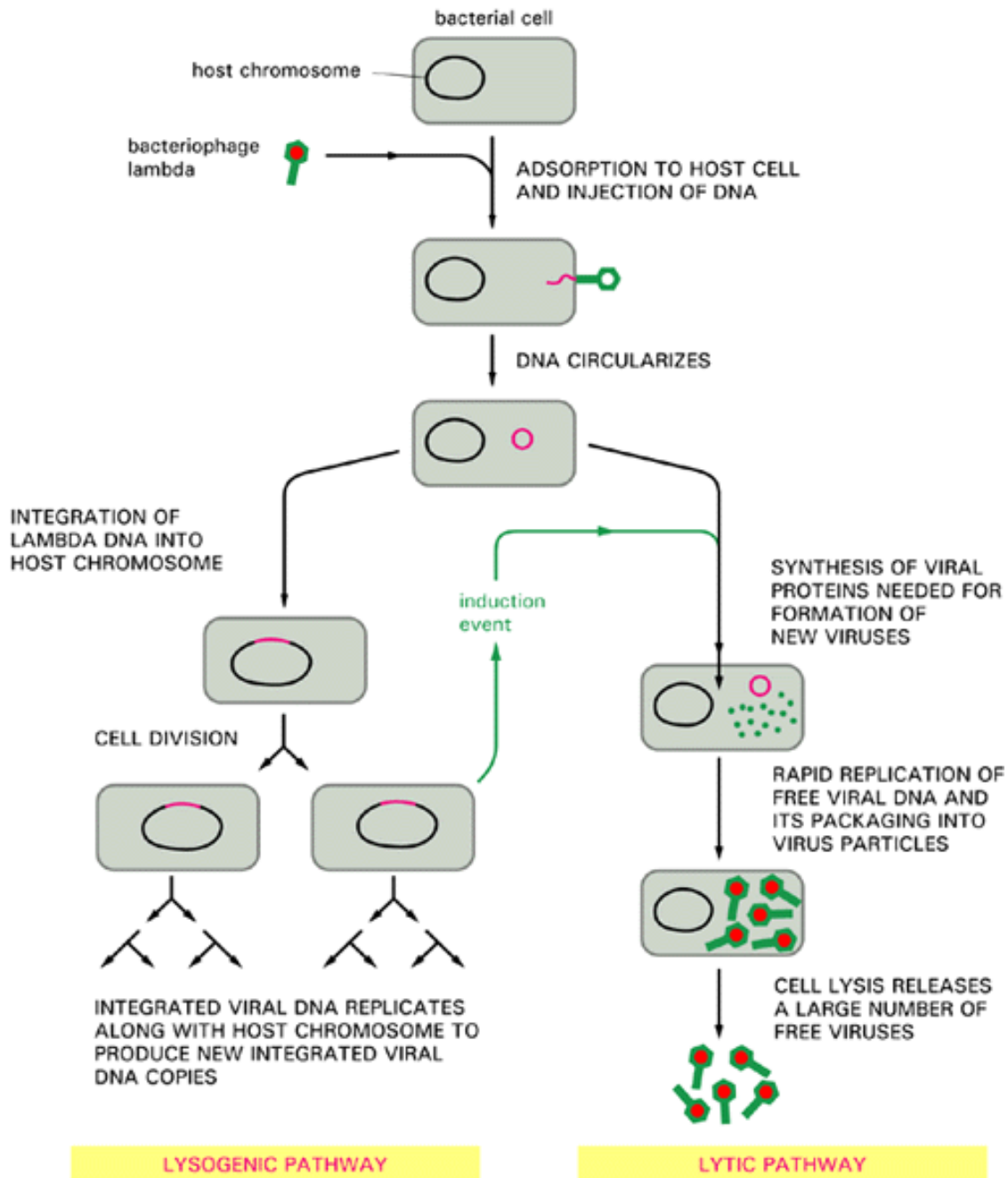
Mu

Lambda

T2, T4

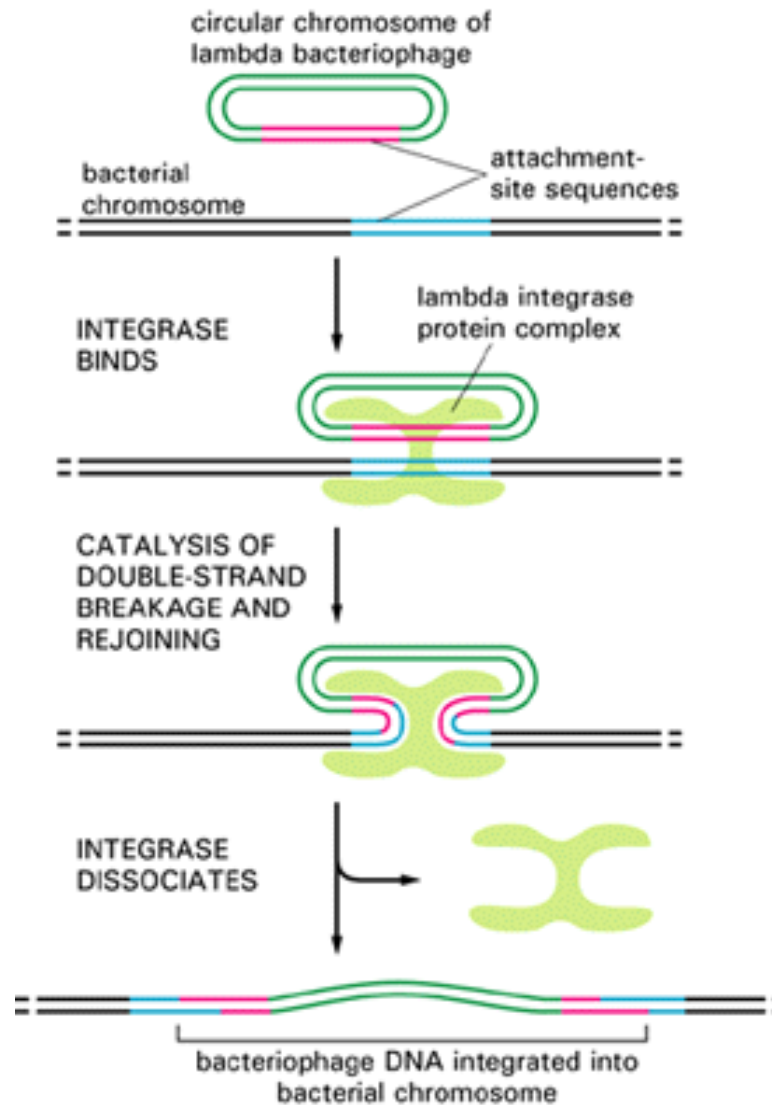


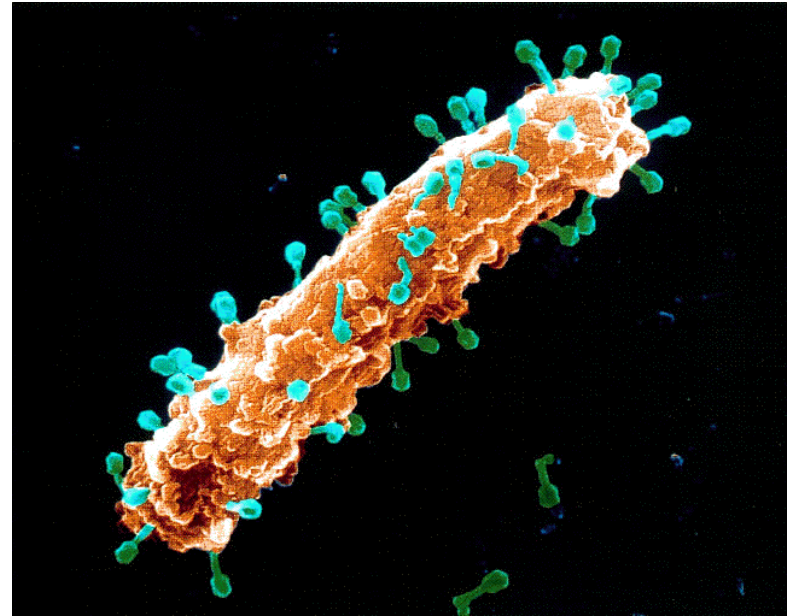
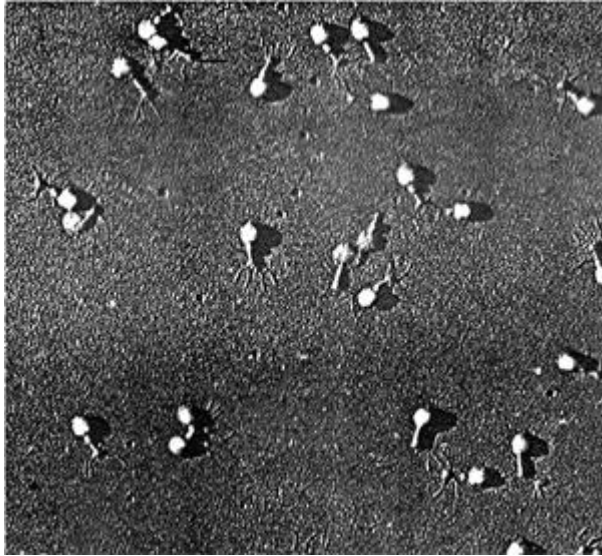
┌
└
100 nm



Il ciclo vitale del fago lambda

Lisogenia





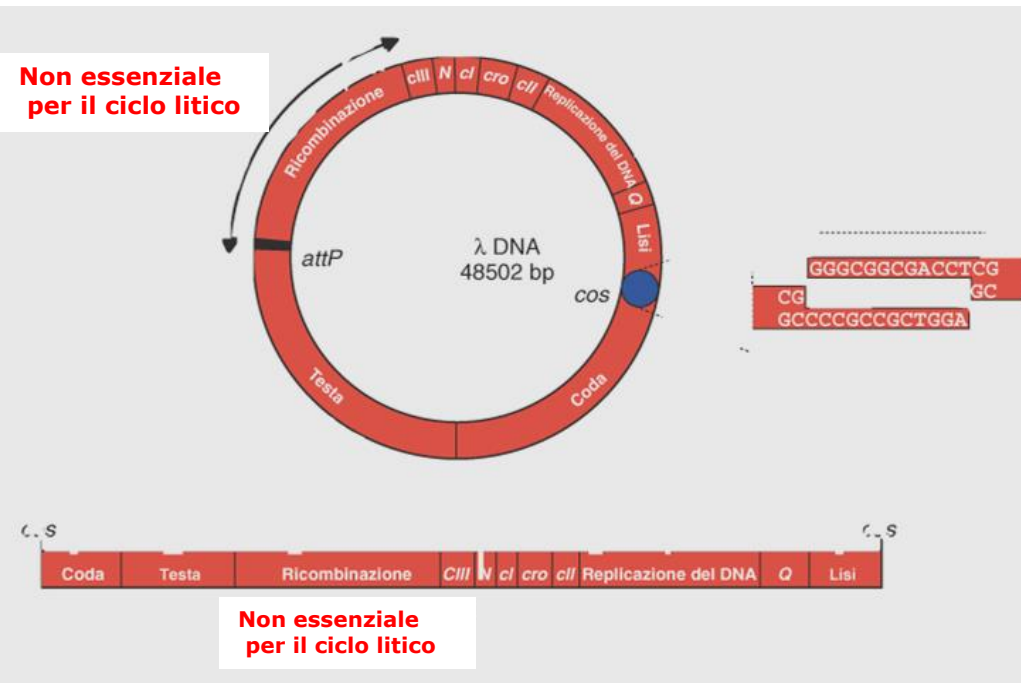
Il numero di particelle fagiche prodotte per ogni particella infettante ("burst size") è caratteristico di ciascun batteriofago. Esso può giungere a 10.000.

Fago lambda

Il genoma di lambda è una molecola lineare a doppio filamento di 48 kbp.

Le estremità 5' e 3' presentano 12 nt a singolo filamento chiamate estremità *cos*, che sono complementari tra loro e permettono la circularizzazione del DNA di λ dopo l'infezione della cellula ospite.

Fago lambda



La mappa genetica del fago λ comprende circa 40 geni che possono essere suddivisi in tre gruppi funzionali:

-a sinistra, comprende i geni che codificano per proteine strutturali della testa e della coda;

-al centro, contiene geni responsabili per la lisogenia, cioè il processo che porta all'integrazione del DNA virale ed altri processi ricombinativi.

Gran parte di questa regione non è essenziale per la crescita litica e può essere eliminata per la costruzione di vettori.

-a destra contiene i geni coinvolti nella replicazione del DNA e nel ciclo litico.

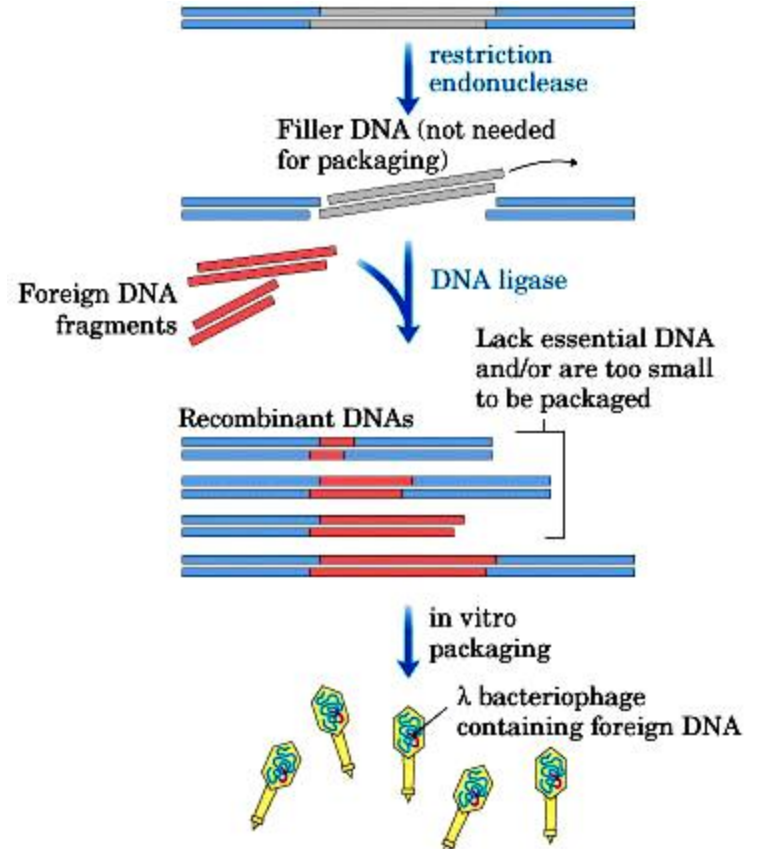
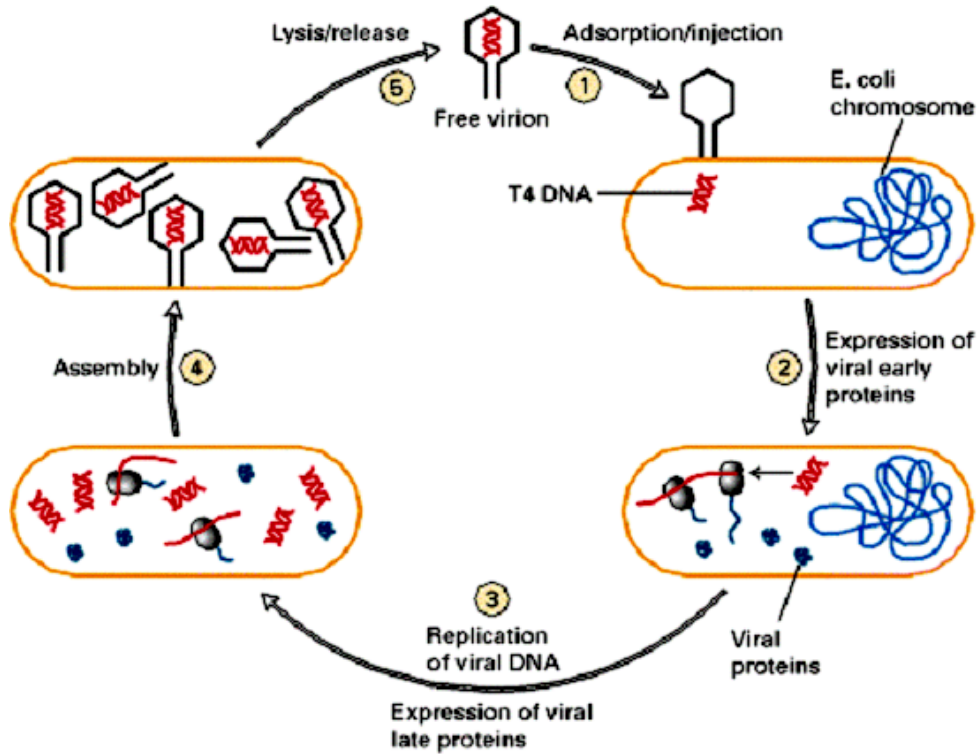
Fago lambda come vettore di clonaggio

Lo sviluppo di vettori di clonaggio di tipo λ è stato possibile perché:

1. La regione centrale non è essenziale e può essere rimossa dal genoma senza alterare il ciclo litico e la formazione delle placche di lisi 14,5 kbp di DNA estraneo ricostituirebbero la lunghezza originale del genoma di λ .
2. Inoltre nei bracci di λ ci sono altre regioni non essenziali che possono essere rimosse 22 Kbp di DNA estraneo inseribile

Per il packaging esiste un limite inferiore, pari al **78%** del genoma di λ (circa 37 Kbp, al di sotto il DNA non viene impaccato e il fago non è vitale) e un limite superiore, pari al **105%** della lunghezza del suo DNA (circa 51Kbp)

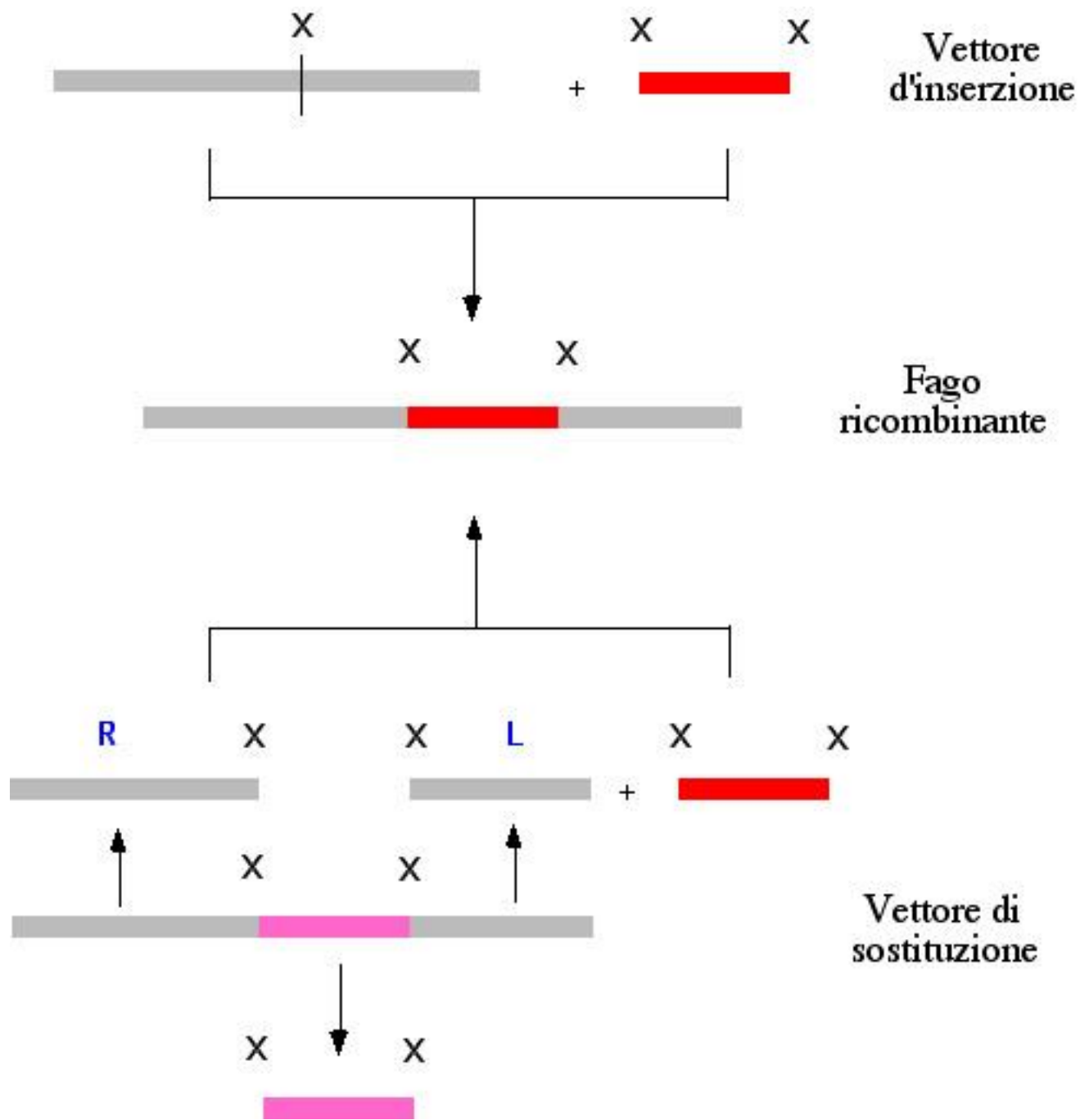
Vettori fagici



Fago lambda come vettore di clonaggio

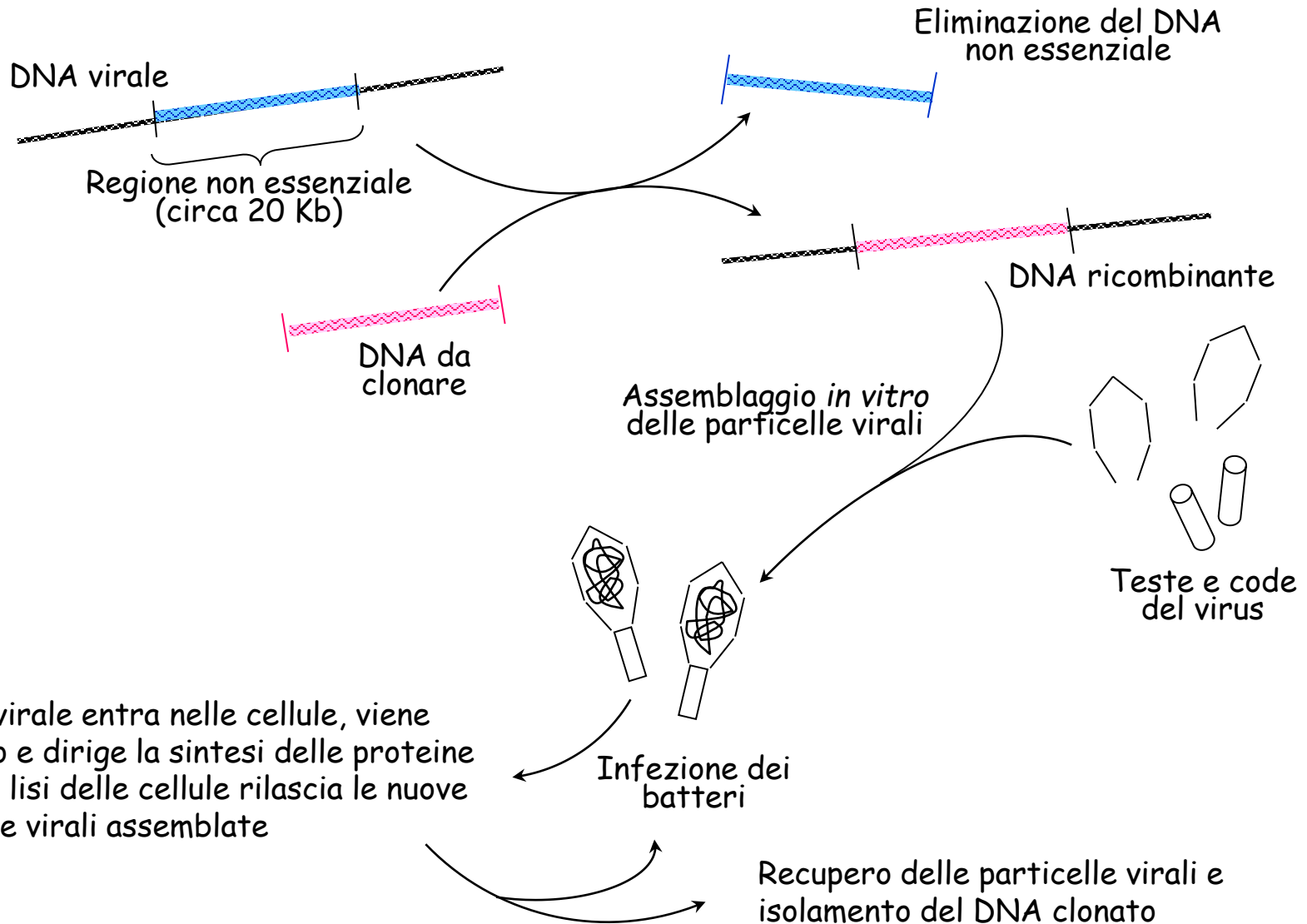
Sono stati sviluppati due tipi di vettori λ :

- **vettori d'inserzione**, in cui il DNA esogeno è inserito in un sito unico di restrizione;
- **vettori di sostituzione**, in cui il DNA esogeno sostituisce un pezzo di DNA del vettore (stuffer).

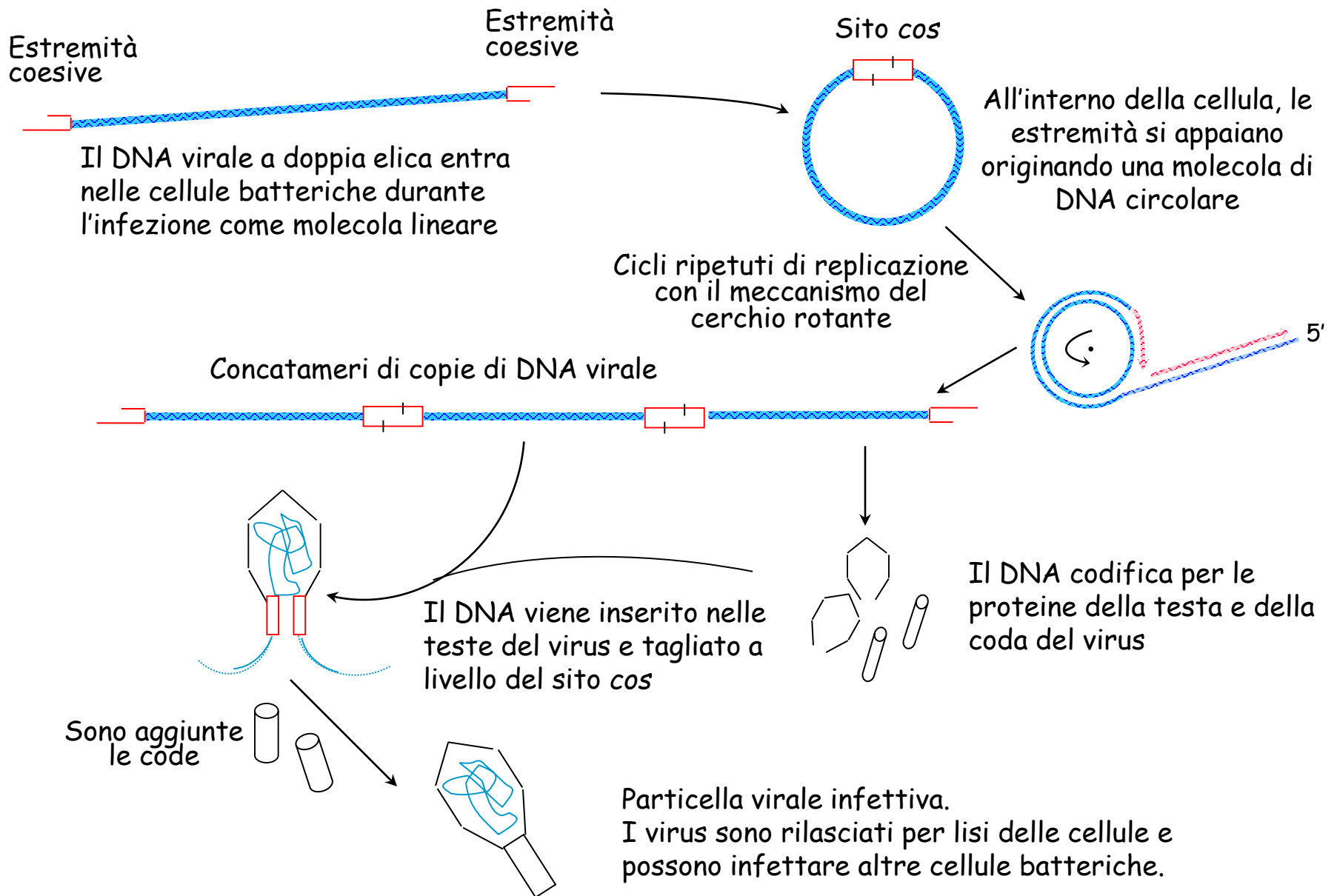


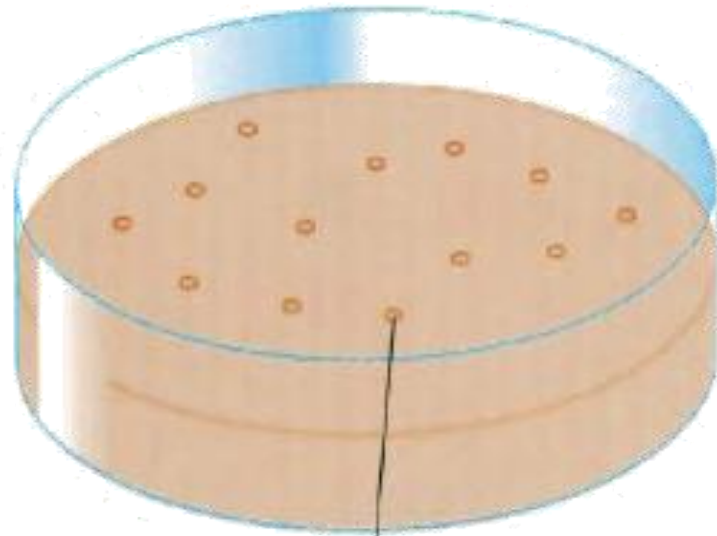
DNA VIRALE come VETTORE DI CLONAGGIO

Un vettore comunemente utilizzato è il **batteriofago λ** , lungo 49 Kb.



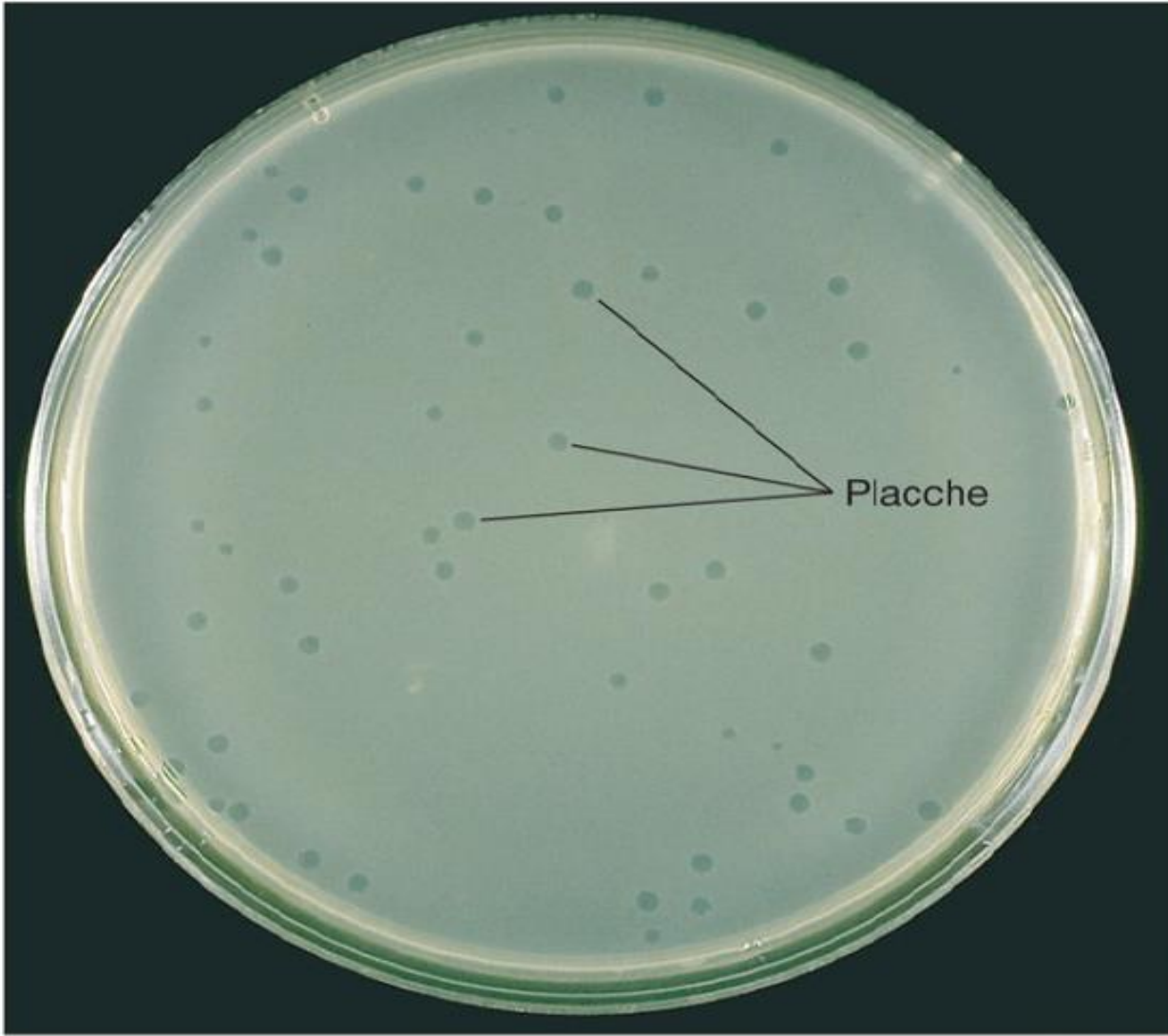
IMPACCHETTAMENTO del DNA VIRALE



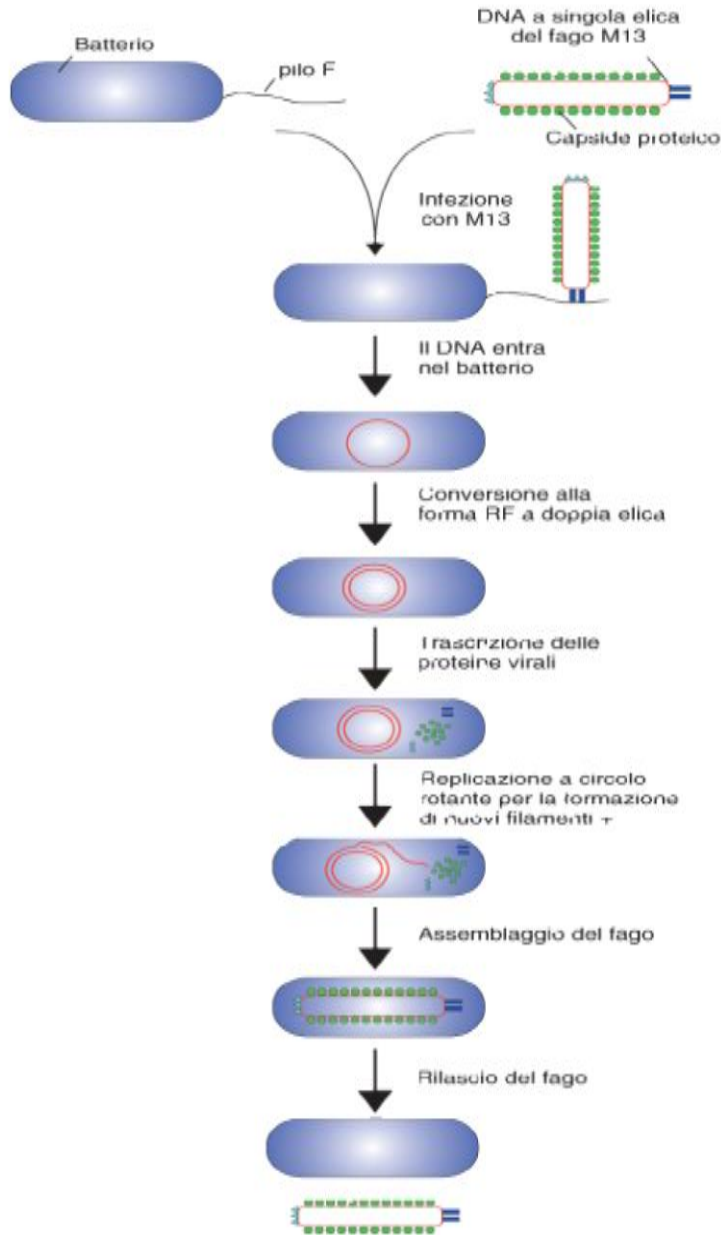


L'infezione è visualizzata
come una placca, una zona
pulita su uno strato
di batteri

Figura 4.23 L'infezione da parte del batteriofago è visualizzata come una placca su uno strato di batteri.



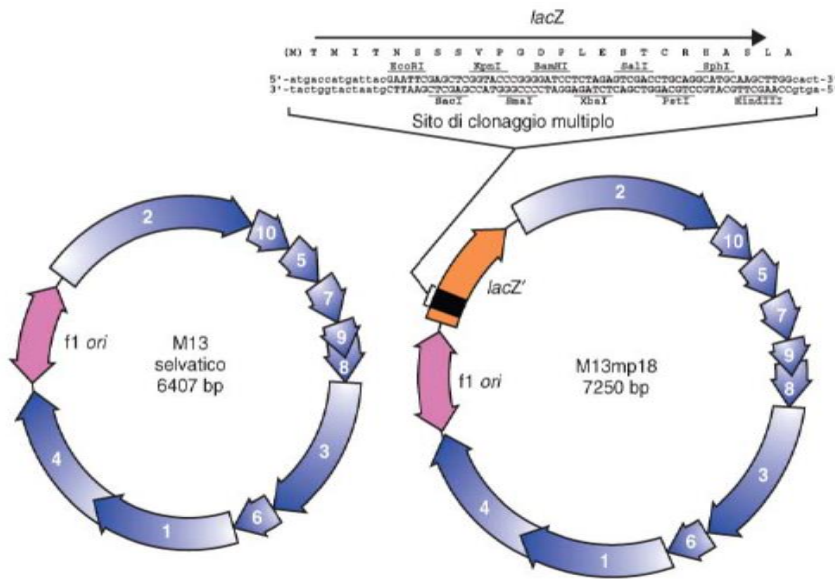
Jack Parker



La biologia del fago M13: il ciclo vitale

- Il genoma del fago M13 è costituito da una molecola di DNA circolare a singola elica, lunga 6407 nt.
- M13 infetta solo ceppi F⁺ poiché entra nella cellula batterica attraverso il pilo codificato dal fattore F.
- Il DNA viene convertito nella forma replicativa intermedia a doppio filamento (RF). Vengono sintetizzate circa 100 copie della forma RF.
- Inizia la replicazione a cerchio rotante di un'unica elica del genoma virale. Vengono sintetizzate circa 1000 copie.
- Il genoma viene assemblato alle proteine per costituire le nuove particelle virali che fuoriescono dalla cellula batterica **SENZA** causarne la lisi.

Il batteriofago M13 come vettore per il clonaggio di DNA a singolo filamento



Il genoma del fago M13, nella sua forma replicativa intermedia RF, viene utilizzato come vettore di clonaggio.

Modificazioni del genoma selvatico per l'ottimizzazione del vettore:

- Aggiunta del gene *lacZ'* come marcatore genetico per la selezione bianco/blu delle placche positive contenenti il genoma ricombinante
- Aggiunta di un polylinker all'interno del gene *lacZ'*
- Eliminazione dei siti di restrizione naturali

Perché si clona DNA a singolo filamento?

- ▶ Per sequenziare l'inserto clonato con il metodo di inserto Sanger
- ▶ Per mutare l'inserto con le tecniche di mutagenesi sito-specifica
- ▶ Per ottenere sonde di ibridazione a singola elica

Vantaggi del vettore M13

- ▶ La forma replicativa RF a doppio filamento può essere manipolata come un normale plasmide

Le genoteche o librerie di DNA

Collezione completa di frammenti di DNA, inseriti singolarmente in un vettore di clonaggio.

Possono essere di DNA genomico o di cDNA.

Le genoteche o librerie di DNA:

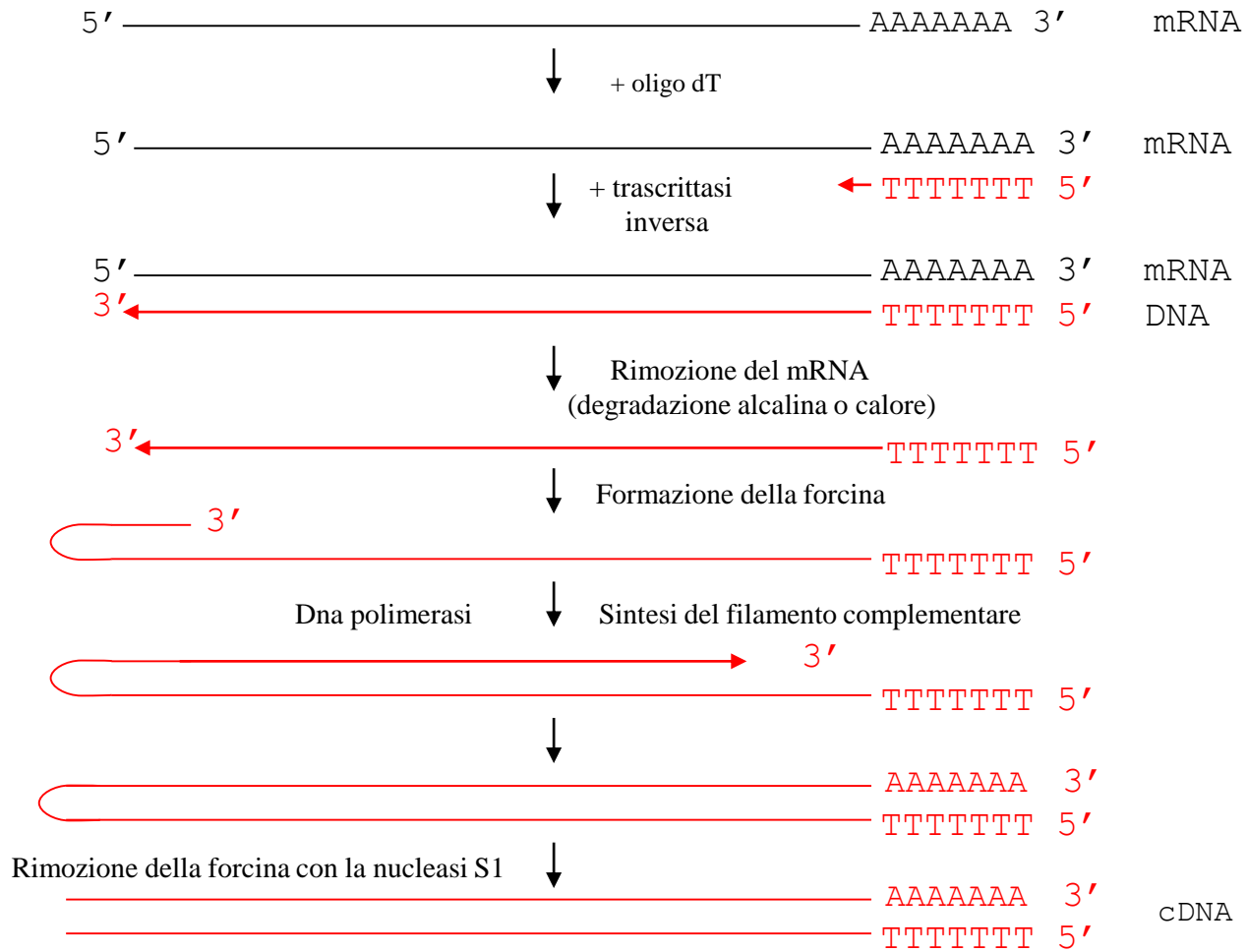
• **Libreria genomica**: collezione di cloni che include tutto il DNA genomico di una certa specie (es. il genoma umano aploide contiene circa 3×10^9 coppie di basi, che possono essere contenute in circa 1.5×10^5 cloni di 20 kb ciascuno)

• **Libreria di cDNA**: collezione di cloni che include tutte le specie di mRNA (copiate in cDNA) espresse in un dato tessuto, incluso quelle piu' rare

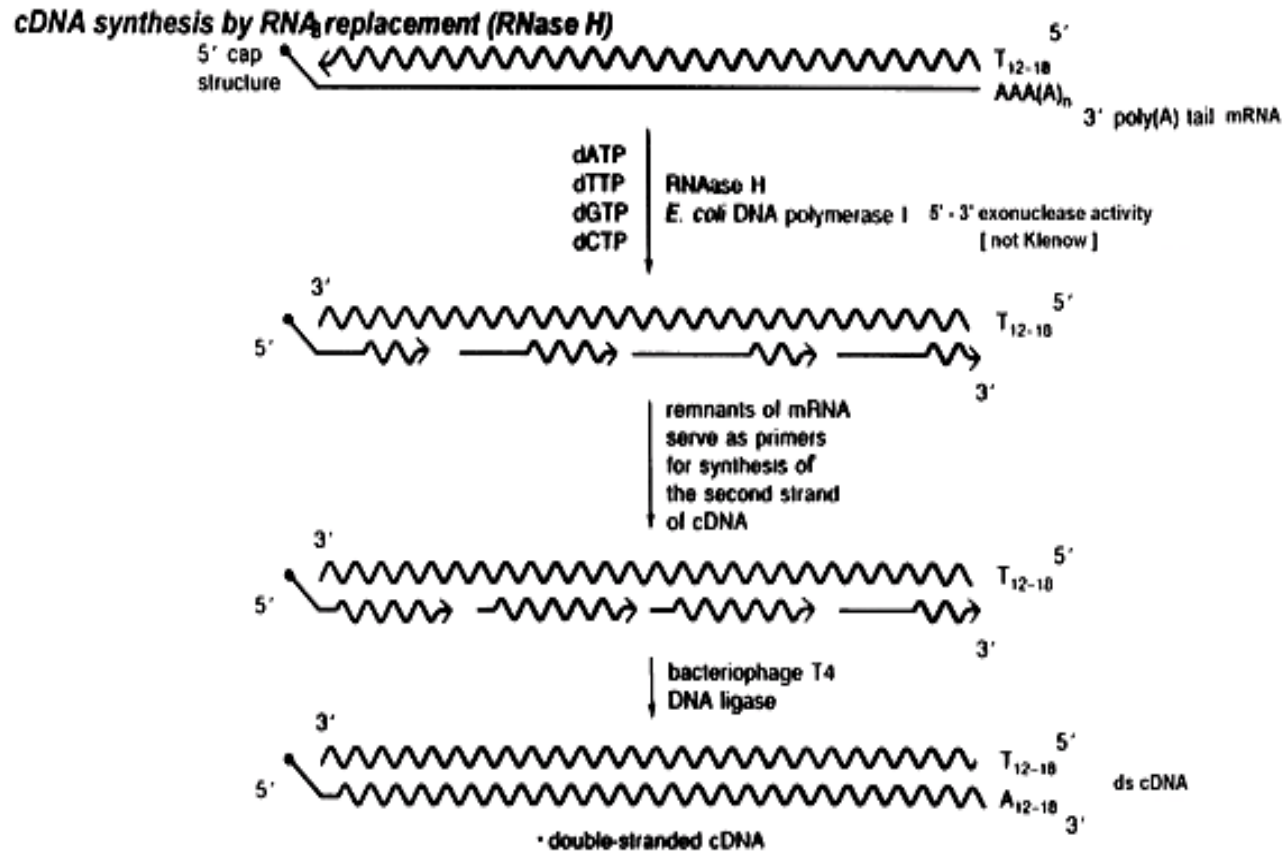
Vantaggi delle librerie di cDNA

- Dalla sequenza dei cloni si puo' derivare direttamente la sequenza della proteina codificata
- Ogni libreria contiene solo quelle specie di mRNA (trascritte in cDNA) che sono espresse in un dato tessuto e in una data condizione

Sintesi del cDNA (1° metodo)



Sintesi del cDNA (2° metodo)

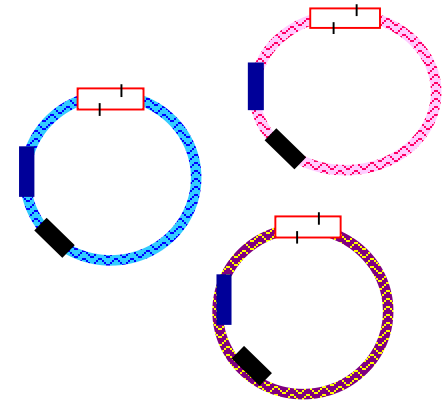


Replacement synthesis of double-stranded cDNA.

COSMIDI

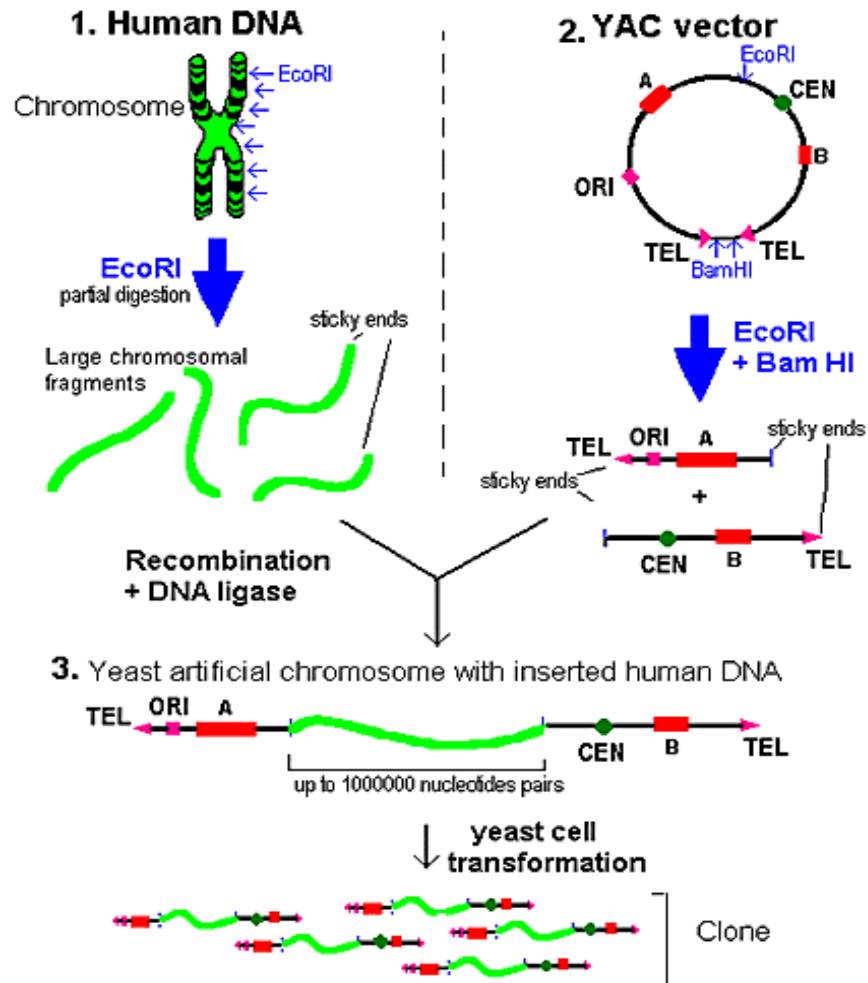
Sono PLASMIDI,
ma contengono, oltre alle caratteristiche
essenziali di un plasmide, anche un

SITO COS



La presenza di questo elemento è determinante per consentire l'inserimento della molecola di DNA ricombinante nella testa del virus che, a sua volta, la inietta in una cellula batterica per infezione.

Infatti utilizzano la capacità del batteriofago lambda di impacchettare lunghi frammenti di DNA lineare all'interno del capsido, di aderire alla superficie delle cellule batteriche e di iniettare il loro contenuto all'interno del batterio.



Cloning into a Yeast Artificial Chromosome (YAC)

Vettori a confronto

Vettore	Dimensioni inserto	Propagazione	Introduzione nei batteri
Plasmidi	5-10 kb	Replicazione del plasmide	Trasformazione
Fago λ	5-23 kb	Riproduzione del fago	Infezione fagica
Cosmidi	35-45 kb	Replicazione del plasmide	Infezione fagica
Fago P1	85-100 kb	Replicazione del plasmide Riproduzione del fago	Infezione fagica
BAC	≤ 300 kb	Replicazione del Fattore F	Trasformazione/ Elettroporazione

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.**

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

Molte proteine ricombinanti di interesse medico sono espresse in microorganismi

Insulina umana

Ormone della crescita umano

Vaccino per l'epatite B

Interferone α

Attivatore del plasminogeno tissutale

Eritropoietina

Interferone γ

Fattore stimolante la crescita delle
colonie di macrofagi e granulociti

Fattore stimolante la crescita
di colonie di granulociti

Interleuchina-2 umana

Fattore VIII

DNasi umana

Glucocerebrosidasi

Interferone β

Fattore IX

Interferone consenso

PGF

PDGF- β

Recettore FNT

Glucagone

Diabete

Nanismo ipofisario

Prevenzione dell'epatite B

Tricoleucemia

Infarto miocardico acuto

Anemia associata ad insufficienza renale cronica

Granulomatosi cronica

Trapianto di midollo osseo

Neutropenia causata da chemioterapia

Carcinoma del rene

Emofilia A

Fibrosa cistica

Morbo di Gaucher

Sclerosi multipla

Emofilia B

Infezione cronica da HCV

Trombocitopenia indotta da chemioterapia

Ulcerazione arti inferiori da diabete

Artrite reumatoide

Ipoglicemia

Principali proteine ricombinanti prodotte in Bioreattori

Animali transgenici

Topo	(latte)	β -lattoglobulina di pecora Attivatore del plasminogeno tissutale umano Urochinasi umana Ormone della crescita umano Fibrinogeno umano Seta di ragno
Coniglio	(latte)	Eritropoietina umana
Pecora	(latte)	Anti-tripsina umana
Capra	(latte)	Attivatore del plasminogeno tissutale umano
Coniglio	(sangue)	Anti-tripsina umana
Maiale	(sangue)	Anticorpi umani
Topo	(urina)	Ormone della crescita umano
Topo	(sperma)	Ormone della crescita umano

Piante trasgeniche

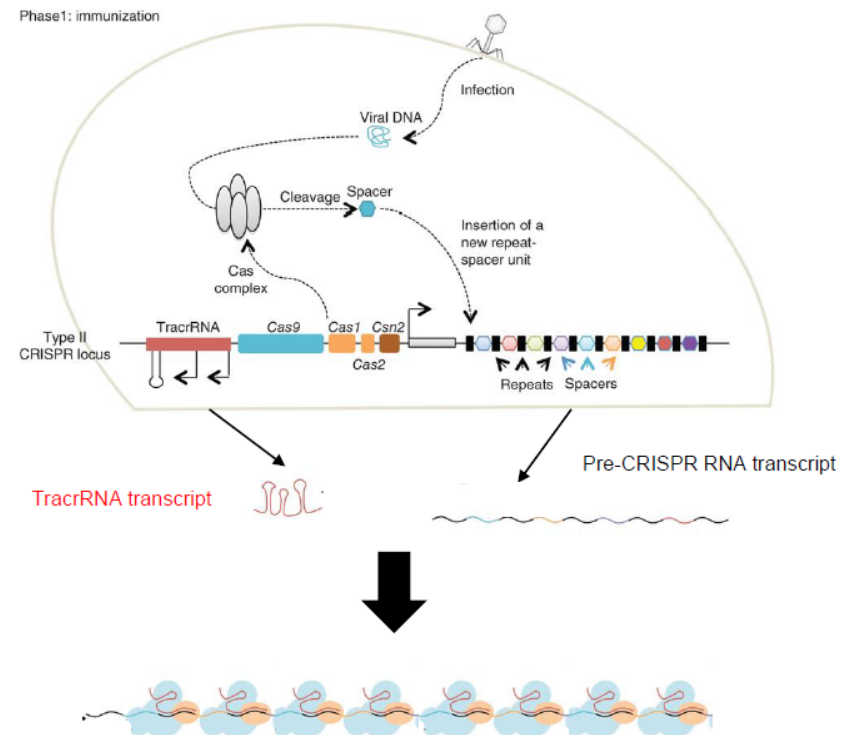
Tabacco	Ormone della crescita umano
Tabacco	Albumina serica
Tabacco	Fattore di crescita dell'epidermide
Riso	α -Interferone
Tabacco	Anticorpi
Tabacco	Emoglobina

Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

Nel **2005**, tre gruppi di ricerca indipendenti dimostrarono che **gli *spacer* (spaziatori) sono frammenti di DNA derivati da virus** che, in precedenza, avevano cercato di infettare la cellula e che venivano inseriti tra sequenza di DNA ripetute, chiamate ***repeats***.

Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier hanno scoperto che **il batterio reagisce alle successive infezioni virali trascrivendo questi *spacer* e i repeat di DNA adiacenti in una unica lunga molecola di RNA pre-CRISPR**.

Questa molecola **si associa** ad altri trascritti del cluster ***TracrRNA*** e alla ***cas9*** (sempre codificata dallo stesso cluster genico), **per essere tagliata poi in singole unità** (ciascun contenente un unico ***spacer***).



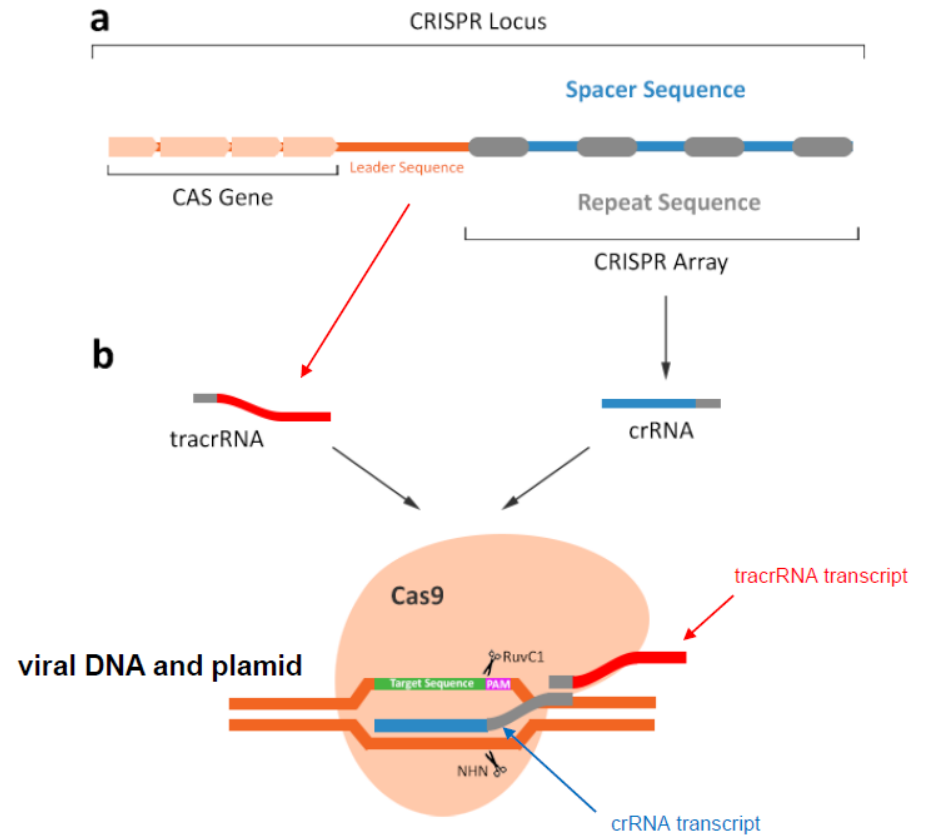
CRISPR locus

Il complesso molecolare CRISPR/Cas9:

- Riconosce mediante la sequenza *spacer* (crRNA) le sequenze di un virus infettante complementari, funzionando da «guida» e dirigendo il complesso CRISPR/Cas9 sul DNA target
- poi l'attività nucleasica della Cas9 taglia il DNA bersaglio.

L'associazione CRISPR/Cas costituisce un sistema immunitario procariotico che conferisce resistenza al batterio nei confronti di elementi genetici estranei (plasmidi e fagi).

Koonin e colleghi proposero che funzionassero come il sistema chiamato *RNA interference* usato nelle cellule eucariote per lo spegnimento genico, anche questo è un sistema diretto verso sequenze bersaglio di acidi nucleici.



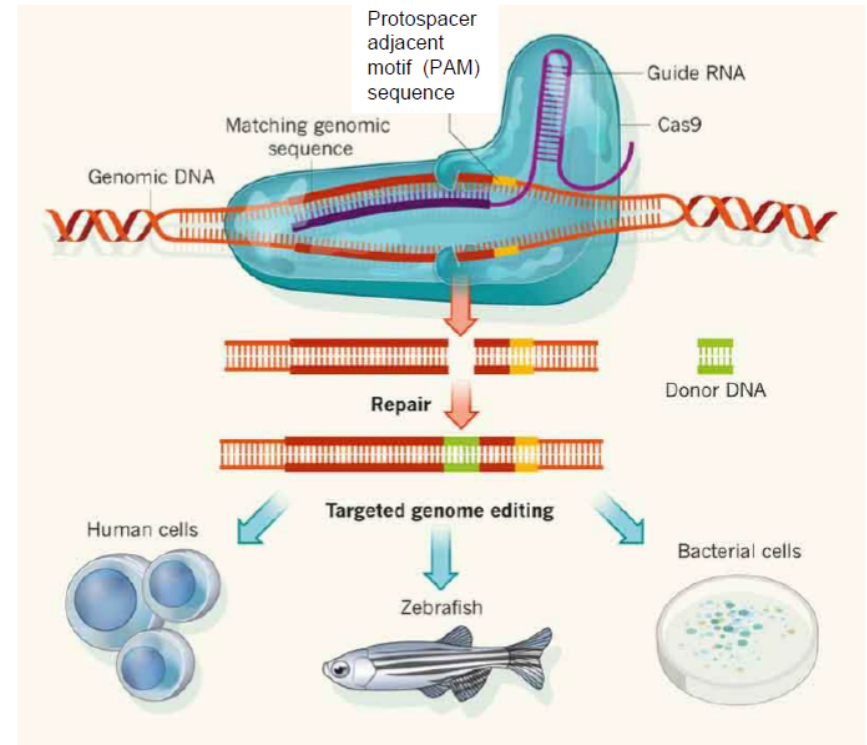
Clustered regularly-interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

Per queste sue caratteristiche, il sistema **CRISPR/Cas** è usato nell'ingegneria genetica (rimuovendo, aggiungendo o modificando la sequenza di geni specifici) in molte specie.

Introducendo la proteina Cas9 e gli appropriati RNA guida (gRNA) nelle cellule, il genoma può essere tagliato in qualsiasi punto in maniera estremamente precisa e con una tecnica semplice.

CRISPR apre la strada all'alterazione del codice genetico, con numerose applicazioni nella manipolazione del genoma di piante nell'agricoltura, del bestiame da allevamento, ma anche umano.

Ovviamente le prospettive potenziali di questo metodo sollevano importanti questioni etiche.



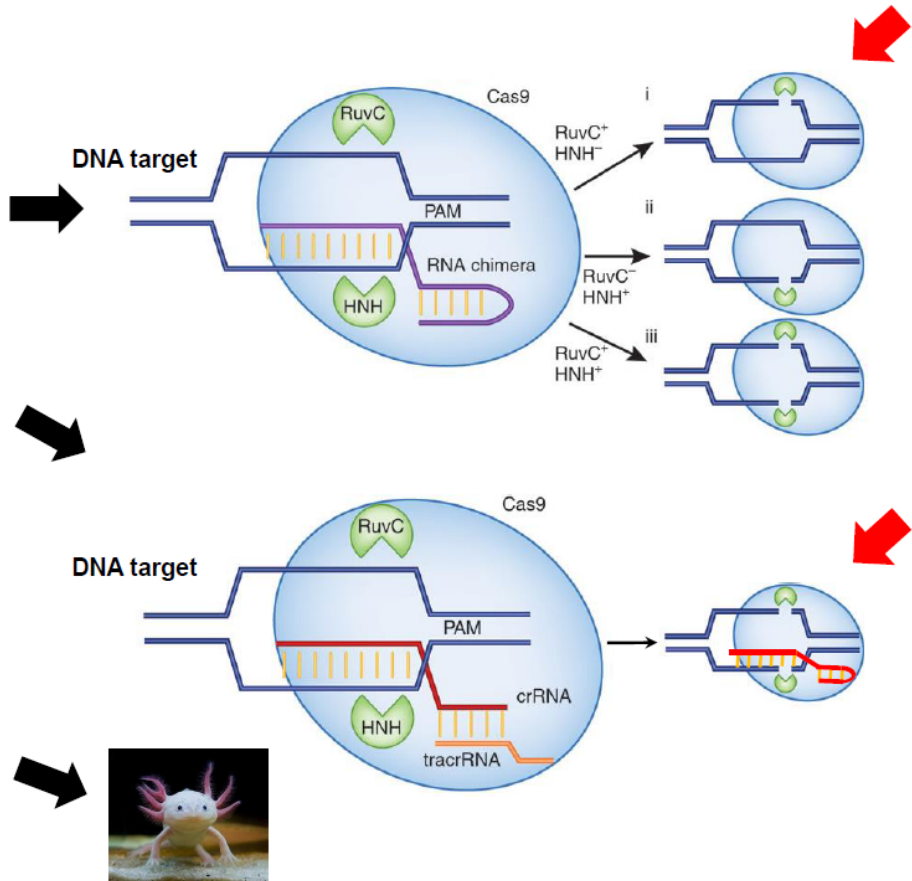
CRISPR/Cas system e gene editing

Cas9 è una nucleasi specializzata nel taglio del DNA: ha due siti di taglio attivi (HNH and RuvC), uno per ciascun filamento della doppia elica di DNA.

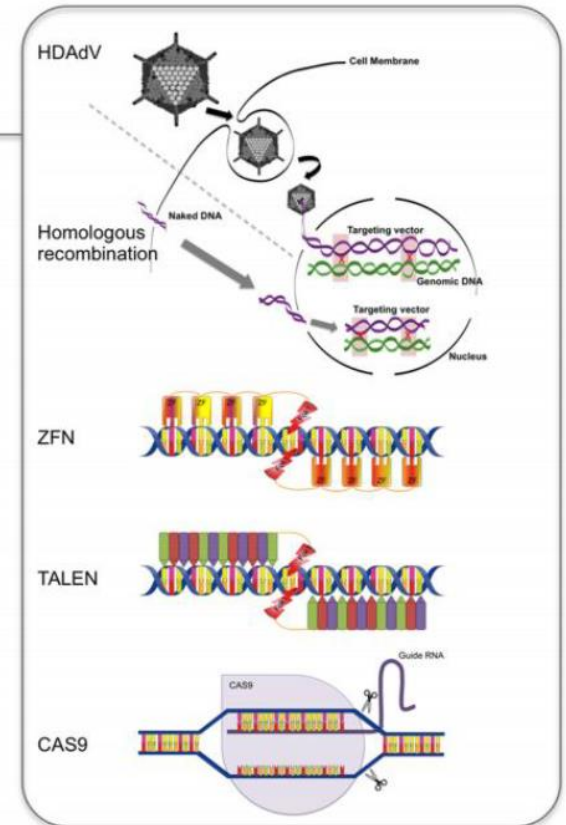
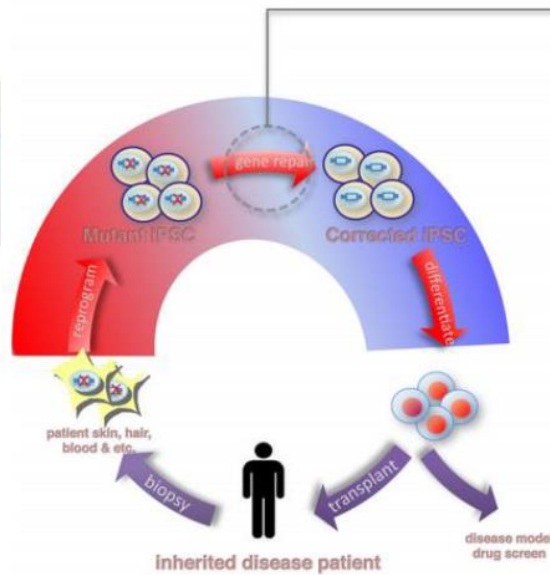
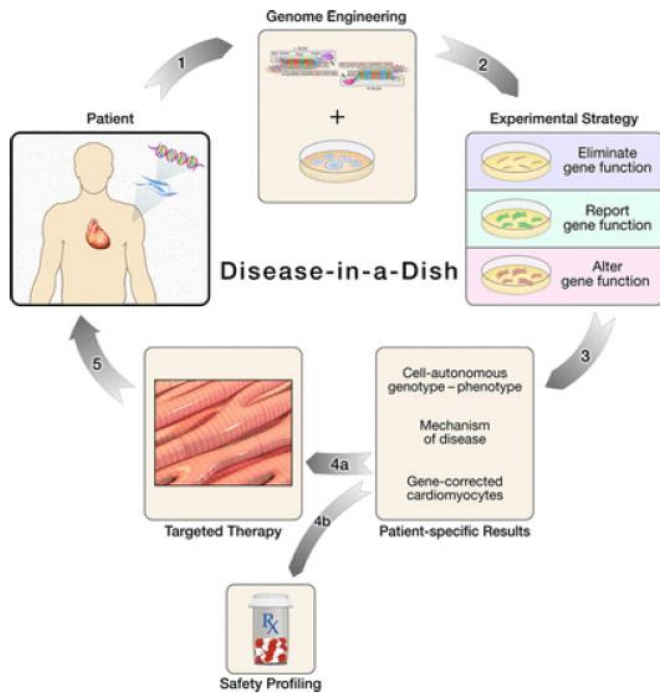
Il team di Doudna e Charpentier ha dimostrato che **è possibile disabilitare uno o entrambi i siti**, preservando la capacità della Cas9 di legare il suo DNA target.

Nel **2012 Jinek M** ha combinato **tracrRNA e RNA spaziatore in una singola molecola di "RNA a guida"** che, unita a Cas9, riusciva a riconoscere e tagliare i corretti DNA bersaglio. Jinek et al hanno proposto l'uso di questi **RNA guida sintetici per l'editing genetico**.

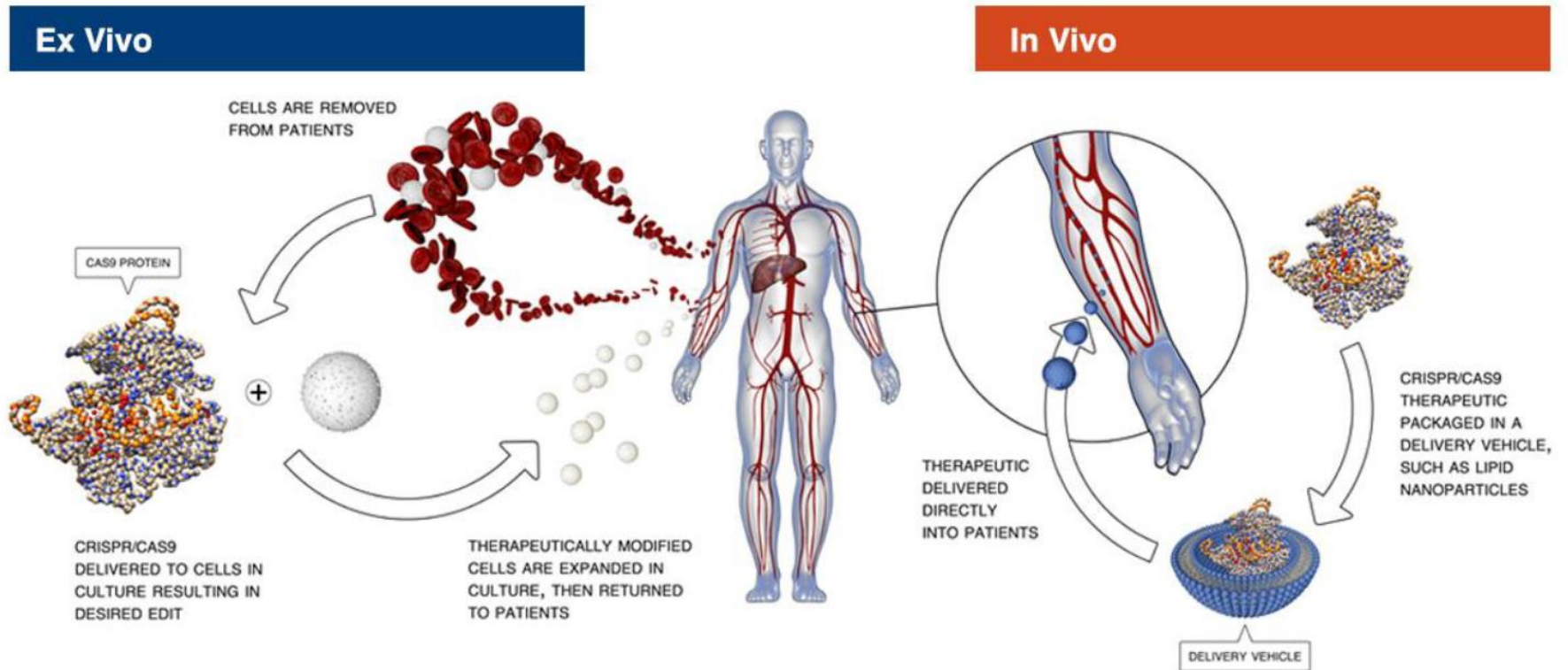
Nel **2015** si è avuta la prima prova che CRISPR potesse essere usato per ingegneria genetica e **l'editing del genoma** in colture cellulari umane. Da allora è stato impiegato in un ampio spettro di organismi tra cui il lievito di birra (*Saccharomyces cerevisiae*), pesce zebra (*Danio rerio*), moscerino della frutta (*Drosophila melanogaster*), axolotl (*A. mexicanum*), nematodi (*Caenorhabditis elegans*), piante, topi scimmie, embrioni umani non vitali, e altri organismi viventi.



Targeted Genome Editing Technologies

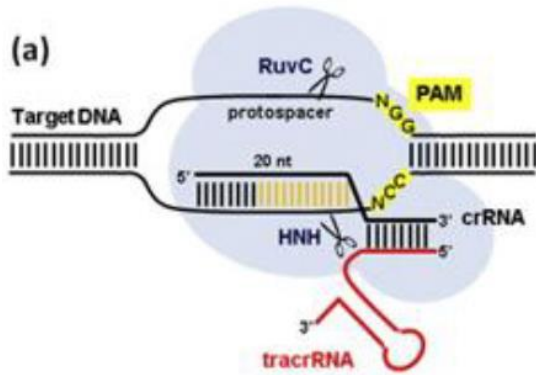


Ex vivo and in vivo opportunities for gene therapy



Gene editing e CRISPR/Cas9

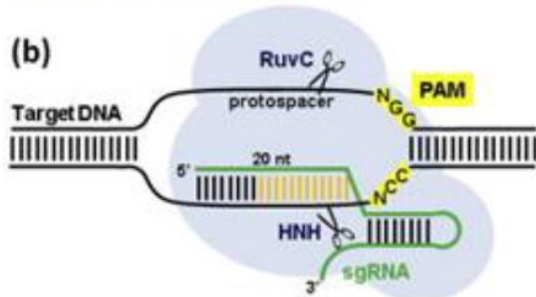
normal crRNA and tracrRNA



In bacterial type 2 CRISPR cas system, the site specificity is defined by complementary base pairing of a small CRISPR RNA (crRNA)

➤ After annealing to a transactivating CRISPR RNA (tracrRNA) the crRNA directly guides the cas9 endonuclease to cleave the targeted DNA sequence.

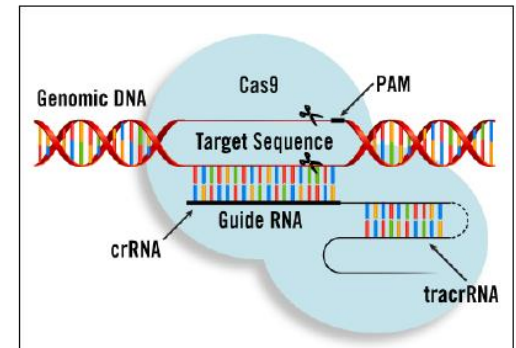
chimeric RNA (sgRNA)



➤ The crRNA-tracrRNA heteroduplex could be replaced by one chimeric RNA (so-called guide RNA (gRNA)) and the gRNA could be programmed to target specific sites.

Oltre a nucleasi (FokI) associato a ZFN o a TALEN il sistema CRISPR/Cas9 sta diventando uno strumento di primo piano nel campo della modifica del genoma.

Sia la nucleasi le ZFN, che le TALEN, richiedono tuttavia l'ingegnerizzazione e la sintesi di proteine personalizzate per ogni sequenza target di DNA, un processo più complesso e lungo rispetto alla sintesi degli RNA guida. Mentre i CRISPRs sono molto più facili da progettare perché richiedono solo una breve sequenza di RNA da associare a Cas9 e alla sequenza target del DNA.



Gene editing e CRISPR/Cas9

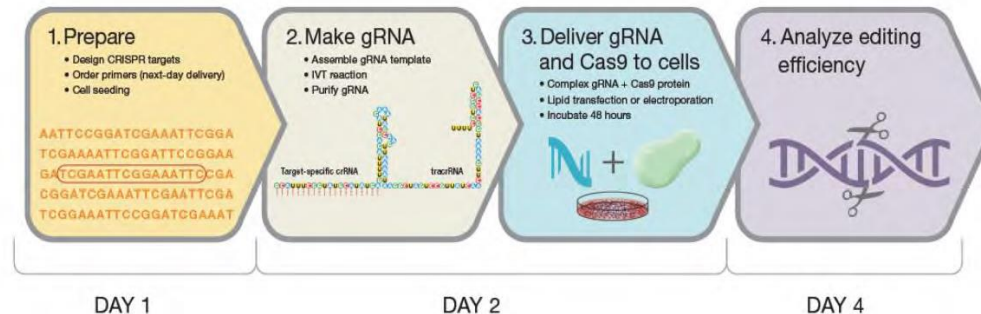
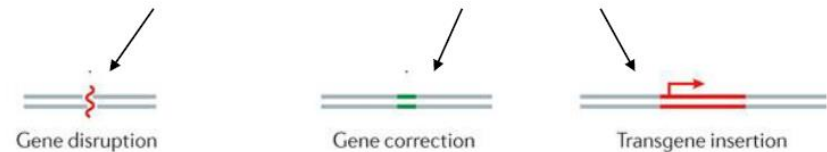
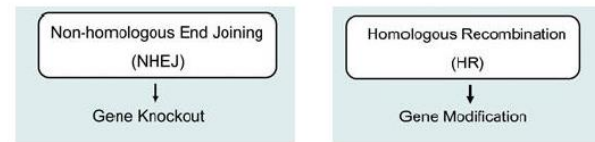
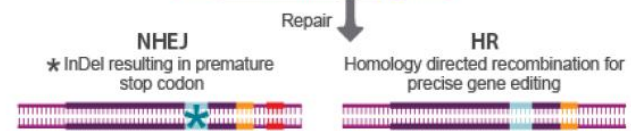
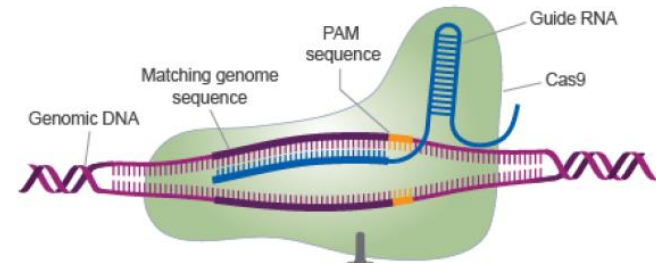
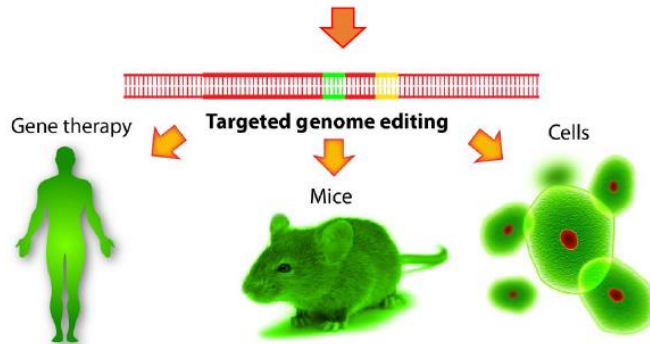
Il **genome editing** è una tecnica che consente di:

- **Introdurre,**
- **Eliminare,**
- **o Alterare sequenze di DNA all'interno del genoma in una posizione specifica.**

Questa tecnica si basa sull'utilizzo di particolari **endonucleasi ingegnerizzate**.

Questi enzimi possono essere costruiti in modo da tagliare sequenze di DNA stabilite dallo sperimentatore.

Sono disponibili librerie di decine di migliaia di RNA guida.



Company	Disease	Disrupt/Correct	<i>In vivo/Ex vivo</i>
CRISPR Therapeutics/Vertex	Beta-thalassemia	Disrupt	<i>Ex vivo</i>
CRISPR Therapeutics/Vertex	Sickle cell disease	Disrupt	<i>Ex vivo</i>
Editas	Hereditary blindness	Disrupt	<i>In vivo</i>
Editas	Hereditary deafness and blindness	Disrupt	<i>In vivo</i>
Editas/Juno	Engineered T-cells	Disrupt	<i>Ex vivo</i>
Intellia/Regeneron	Transthyretin amyloidosis	Disrupt	<i>In vivo</i>
Intellia/Novartis	Engineered T-cells	Disrupt/insert	<i>Ex vivo</i>

An international team of researchers has used CRISPR–Cas9 gene editing — a technique that allows scientists to make [precise changes to genomes with relative ease](#) — to correct a disease-causing mutation in dozens of viable human embryos.

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:

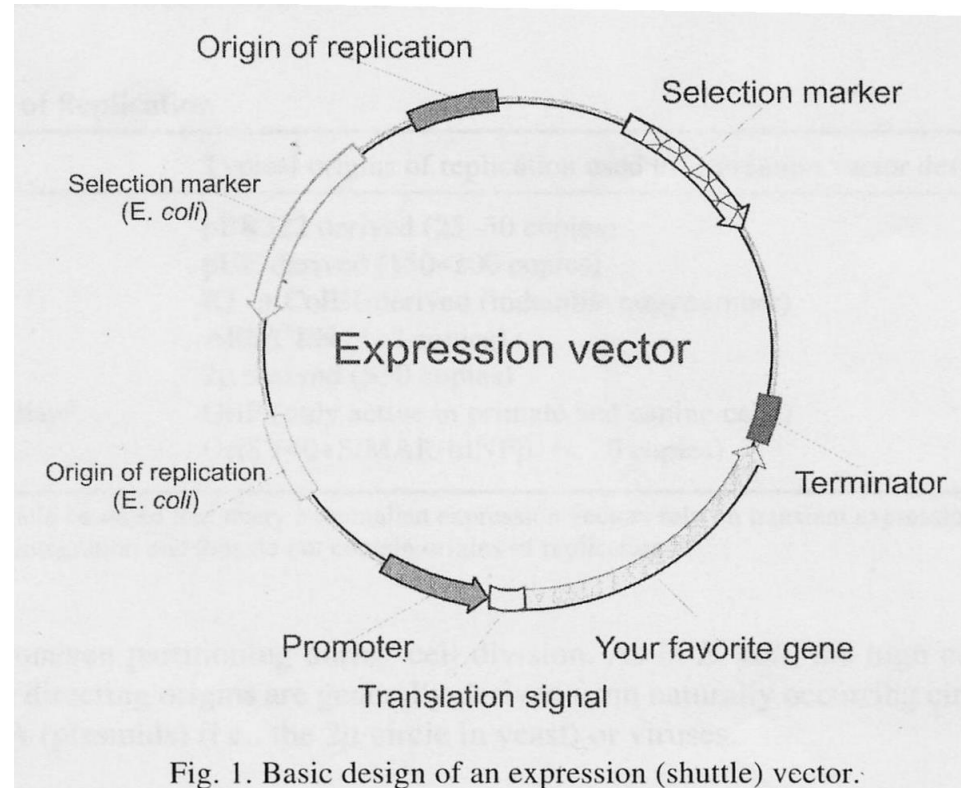
- *Formazione di corpi inclusi insolubili (proteine inattive biologicamente)*
- *Tossicità di alcune proteine esogene per i batteri che le producono*
- *Mancanza degli enzimi responsabili delle modifiche post-traduzionali necessarie per ottenere proteine ricombinanti biologicamente attive (maturazione proteolitica, metilazione, fosforilazione, glicosilazione, etc.)*

VETTORI 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.

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 rappresenta un primo strumento di verifica dei 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)**

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 ottengono comunque 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**

SEGNALI PER MIGLIORARE LA TRADUZIONE

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 piccola 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.

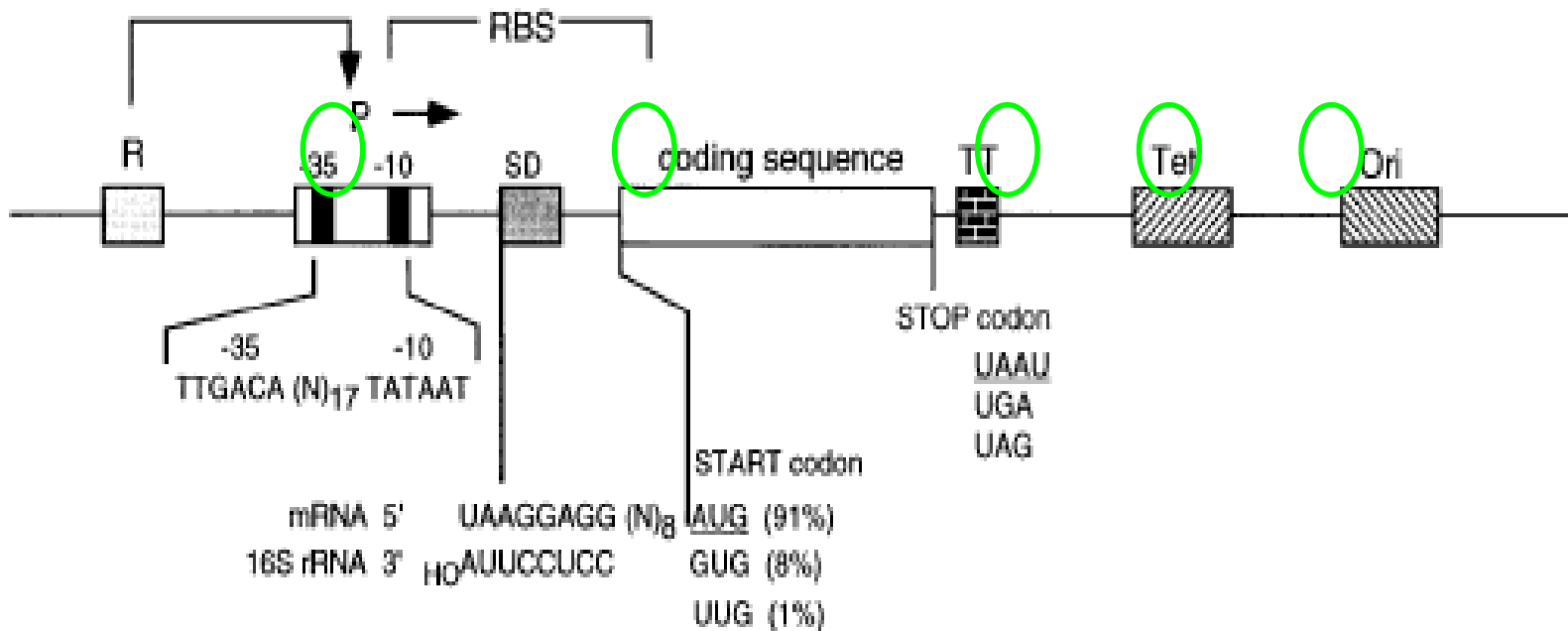
MANIPOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI PROCARIOTI

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**

☺ Scelta del vettore

Configurazione di un'efficiente vettore di espressione nei procarioti



- P** Promotore
R Gene regolatore
SD Regione Shine-Dalgarno
TT Terminatore della trascrizione
Tet 1 o più geni che conferiscono resistenza ad antibiotici
Ori origine della replicazione

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

Body inclusion:

Cosa sono?

- **Aggregati insolubili che si formano in seguito ad overespressione di proteina in E. coli.**
- **Opache al microscopio**
- **Diametro 1µm**
- **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

Proteine native

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

La maggior parte dei vettori d'espressione per proteine native hanno un sito di restrizione unico per *NcoI* posizionato a valle del promotore.

Proteine di fusione

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

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

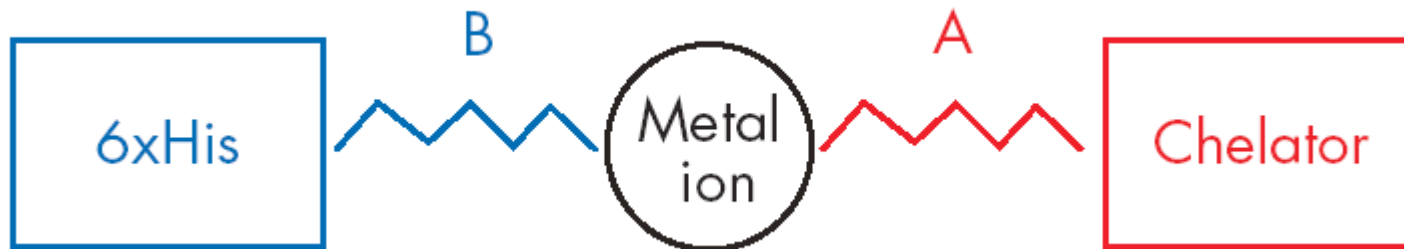
- **Calmodulin binding peptide (CBP)**
- **6xHis**
- **Proteina A (IgG binding domain)**
- **Chitin binding domain (CBD)**
- **Glutathione S-transferasi (GST)**
- **MBP (Maltose binding protein)**
- **Strep tag (Streptavidin binding tag)**

Semplificazione nei processi di purificazione

His Tag

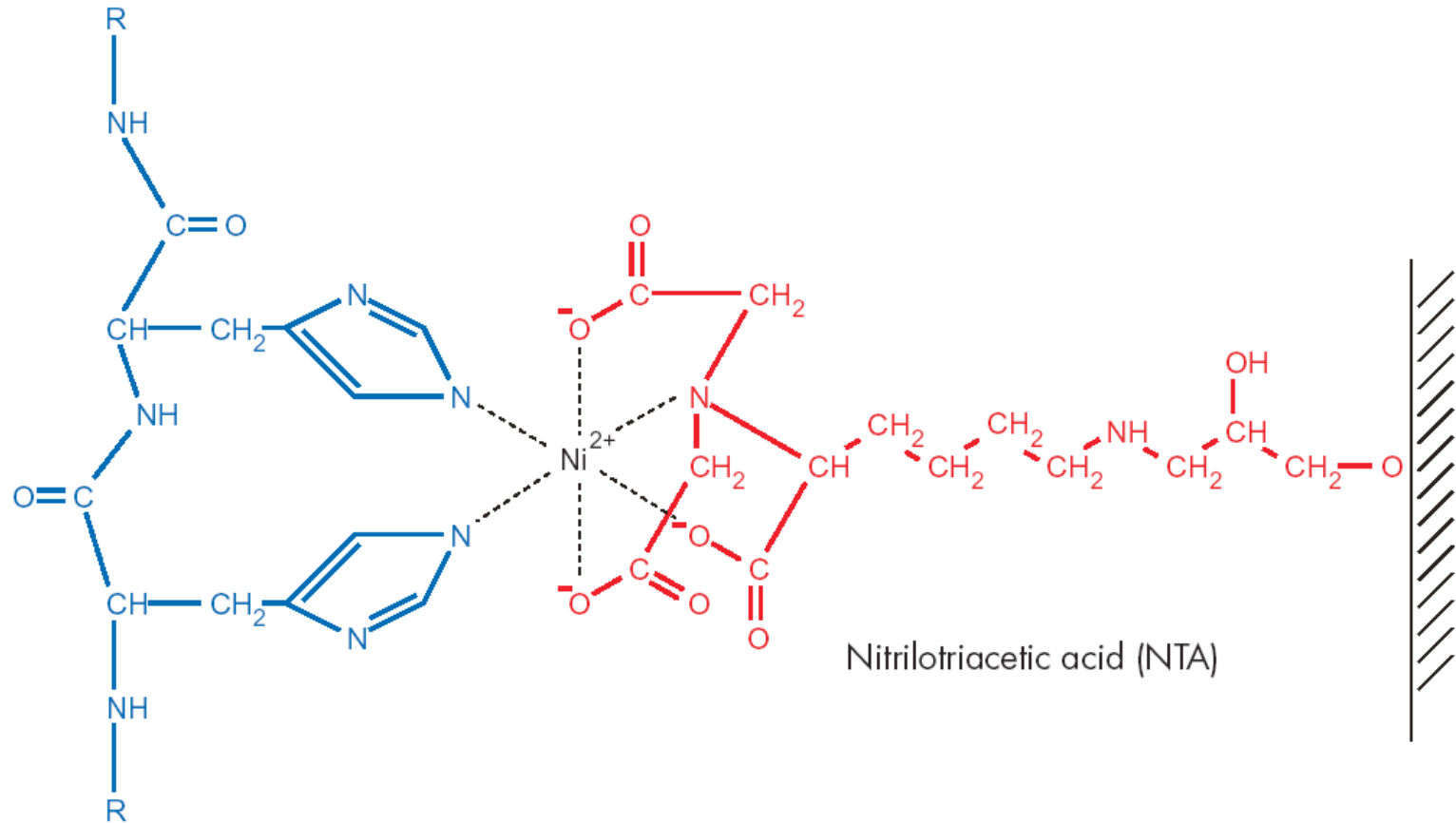


Cromatografia di affinità mediante chelazione di metalli



Matrice di Agarosio

Sfere magnetiche rivestire di agarosio



Eluizione

Diminuzione di PH a 5

Tampone imidazolo

Guanidina

PROTEINE DI INTERESSE TERAPEUTICO IN PROCARIOTI:

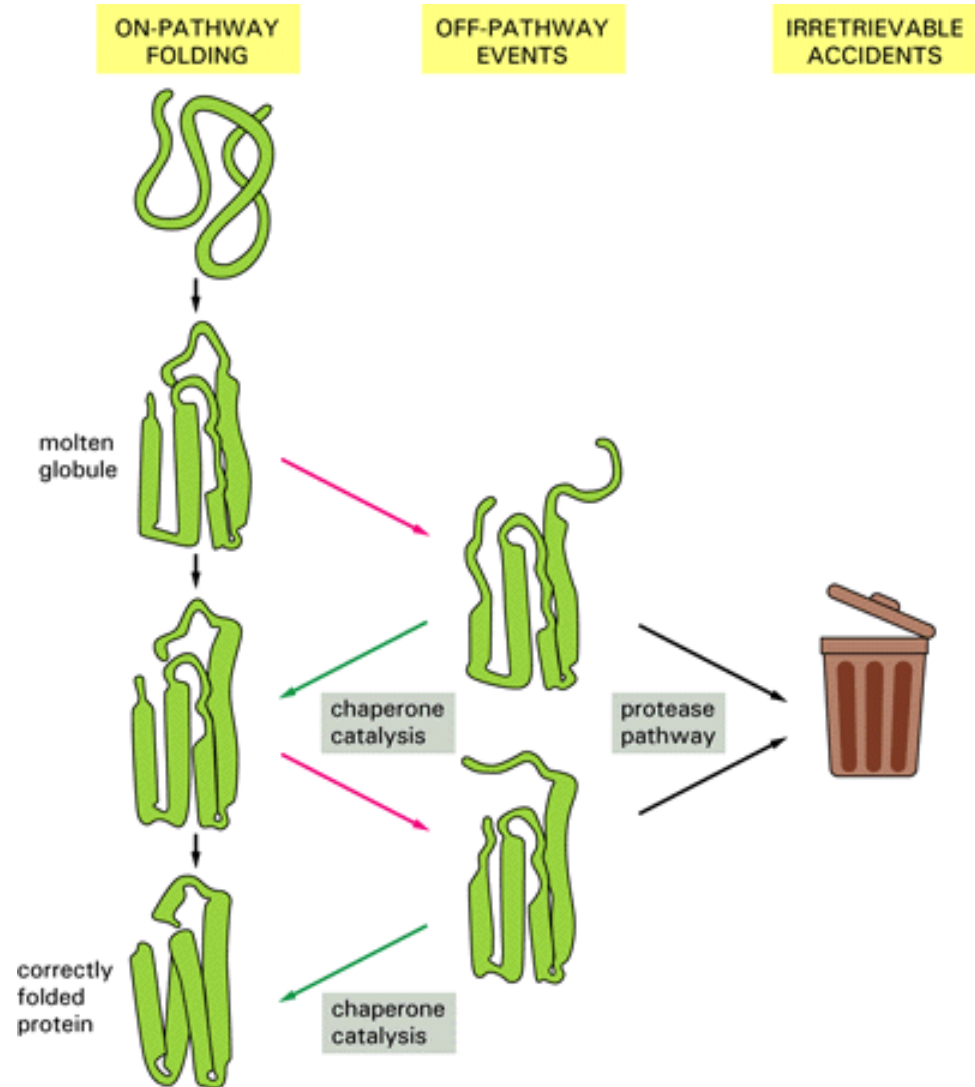
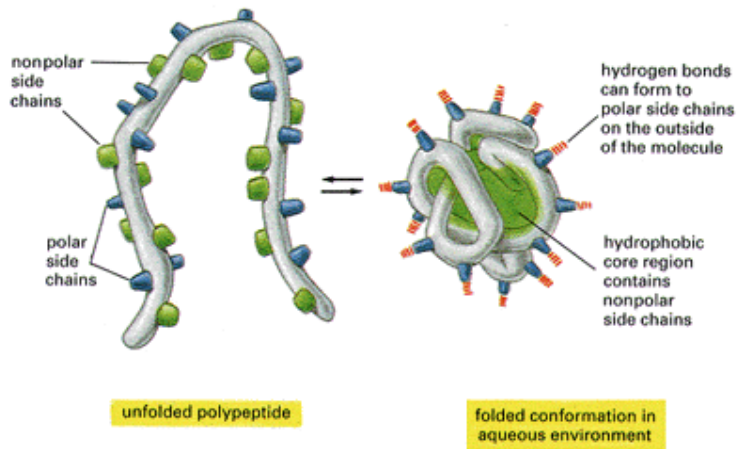
Vantaggi

- 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'



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

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.)

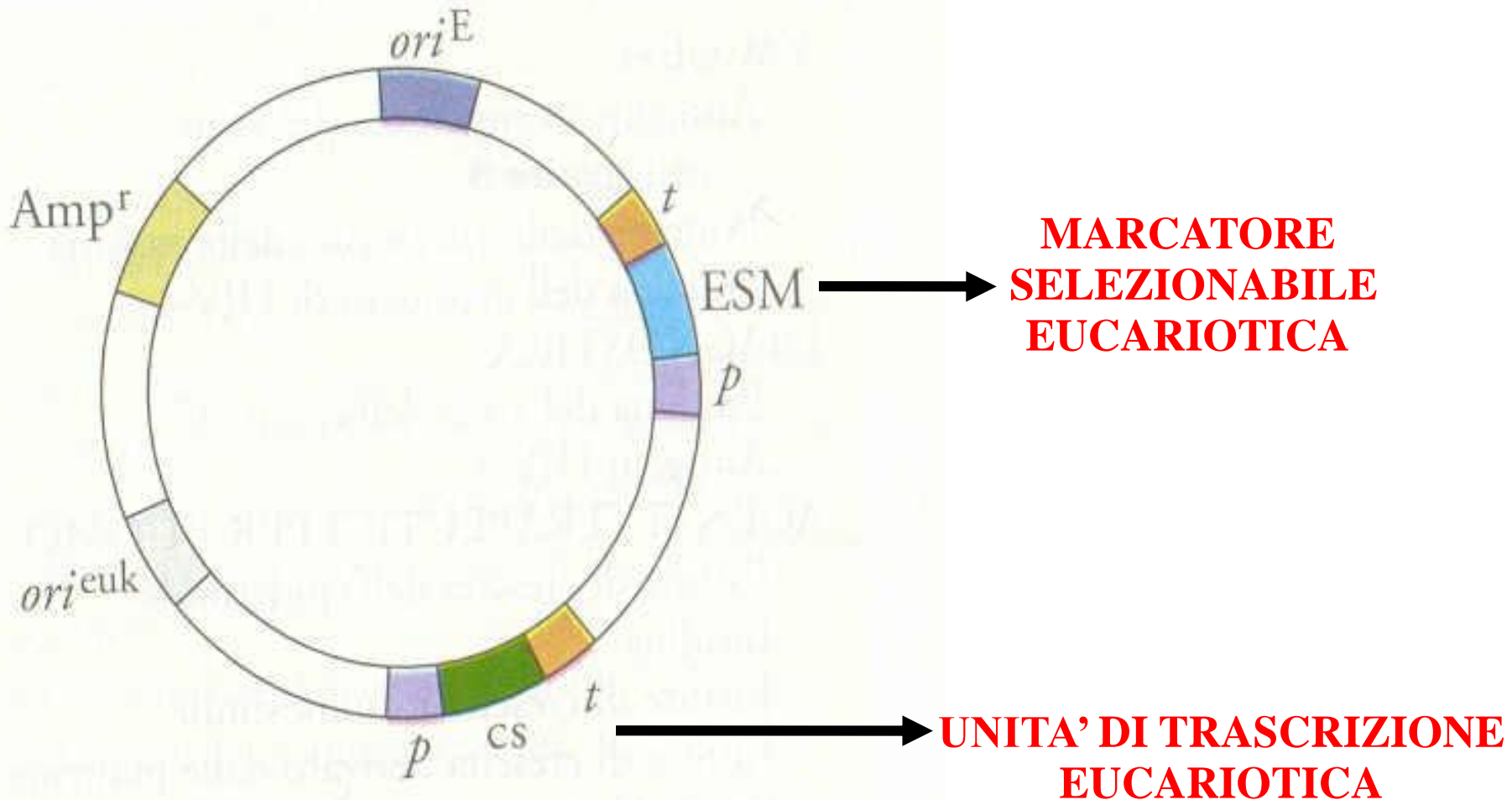
Svantaggi:

Elevata complessità cellulare

Elevato tempo di replicazione

Maggiori costi

GENERICO VETTORE DI ESPRESSIONE EUCARIOTICO: CARATTERISTICHE PRINCIPALI



Introduzione di DNA nelle cellule di lievito

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

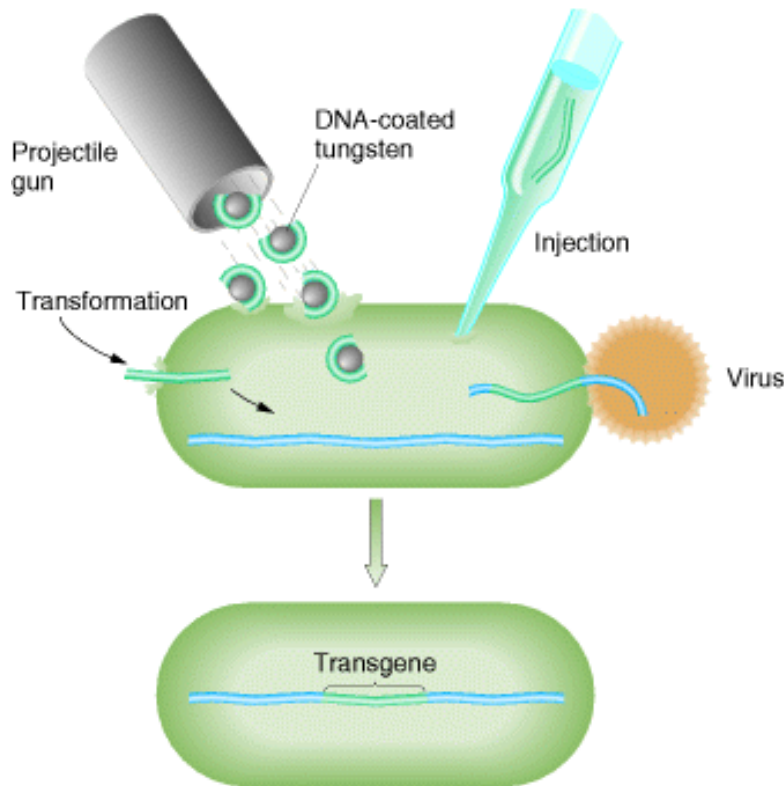
Marcatore genici di selezione

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

Il ceppo di lievito utilizzato nella trasfezione deve essere difettivo per la via biosintetica in questione.

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.

Sistemi di trasferimento genico



- Trasformazione (microorganismi)
- Trasfezione (eucarioti)
- Infezione (se il vettore è un virus)

Tecniche

- Uso di sostanze permeabilizzanti
- Elettroporazione
- Sistemi liposomici
- Bombardamento con microparticelle
- Microiniezione

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

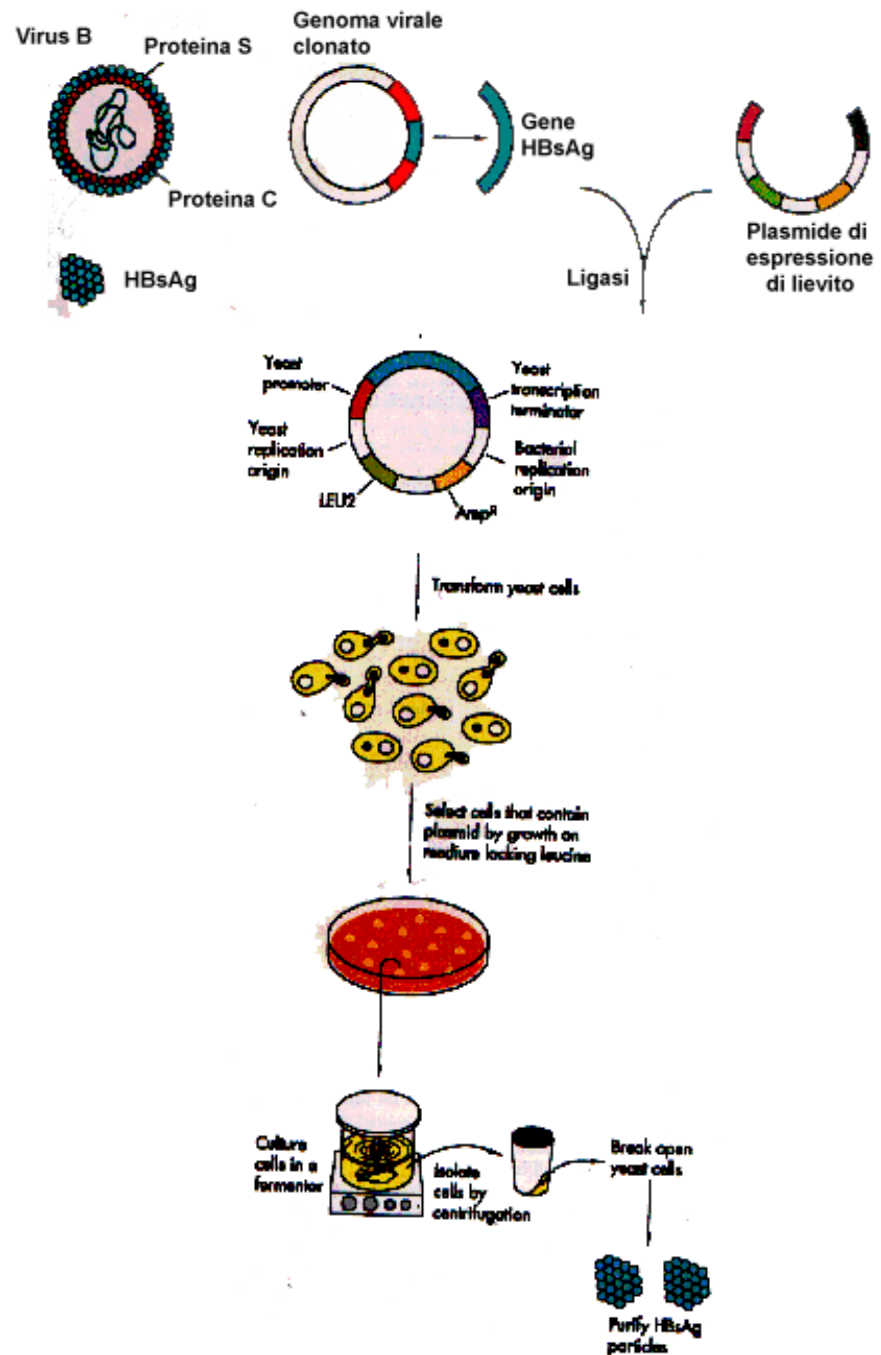
-TENTATIVI DI PRODURRE ANTIGENE DI SUPERFICIE DI VIRUS EPATITE B (HBsAg) IN E. Coli FALLIRONO

-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

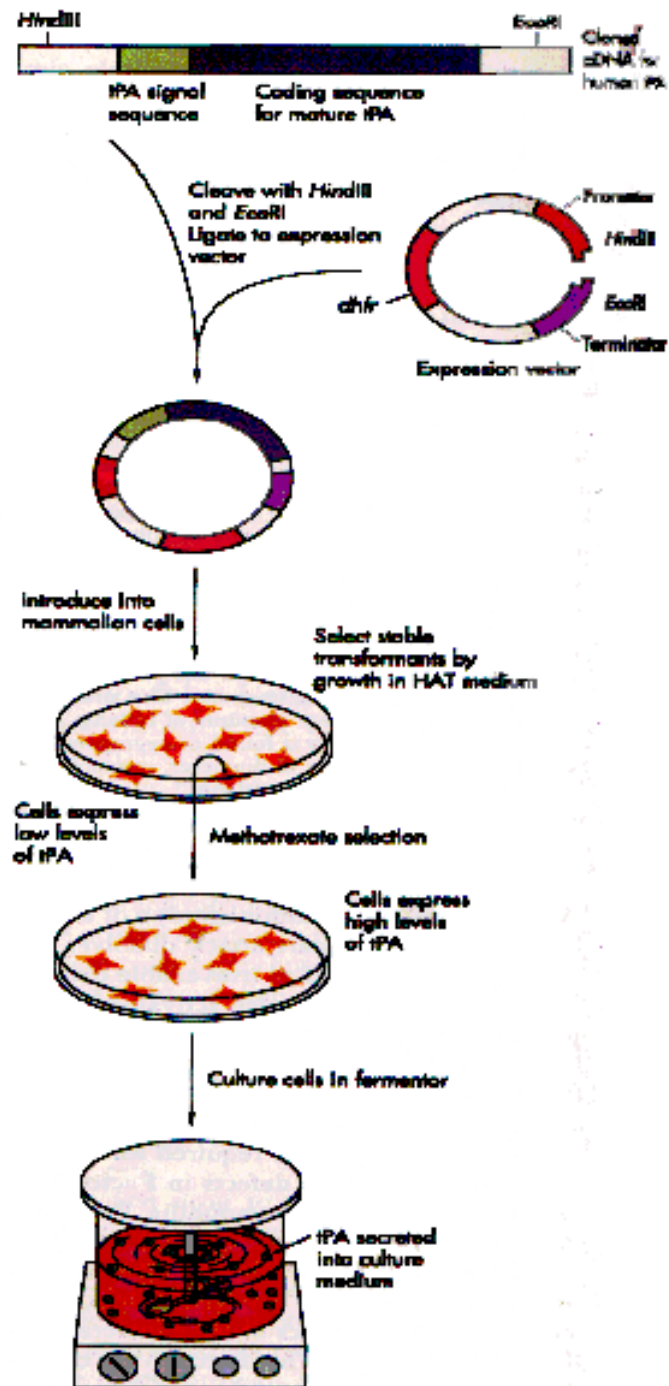


ATTIVATORE PLASMINOGENO TISSUTALE (t-PA) e INTERFERON BETA-1 α

**- 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- $\beta 1\alpha$



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

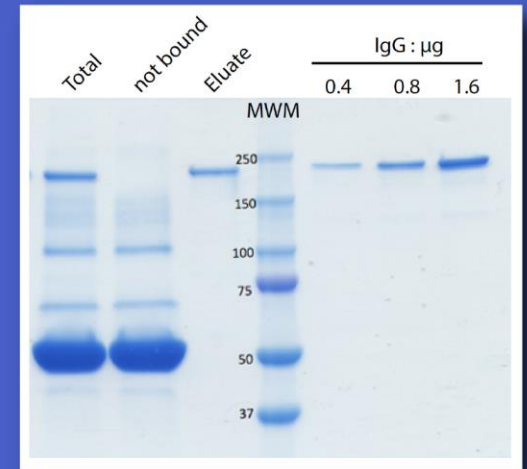
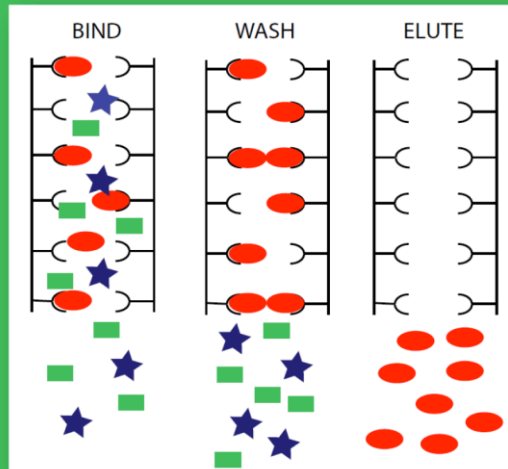
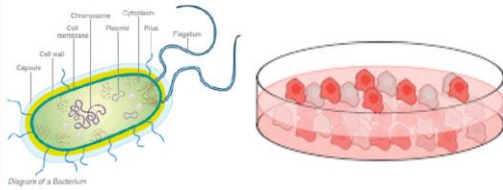
Proinsulina

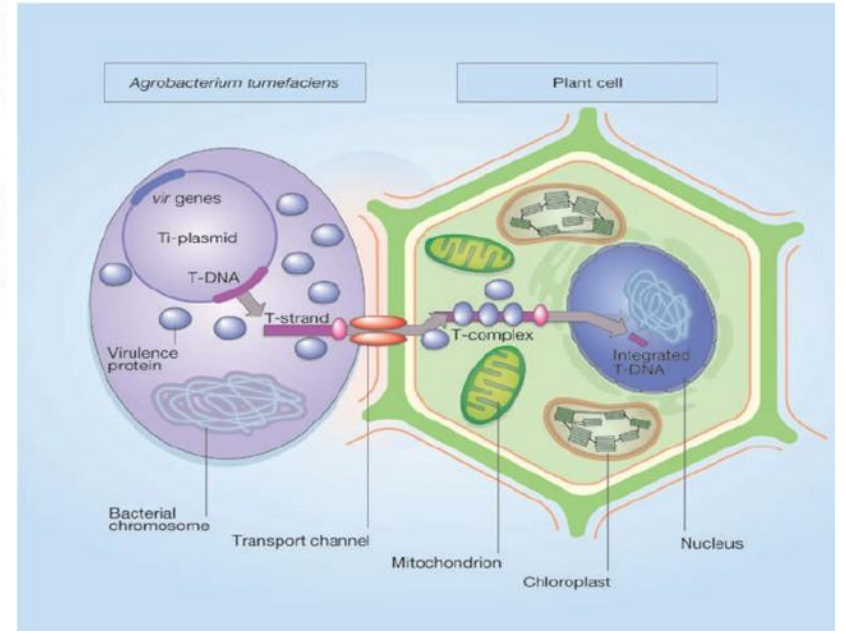
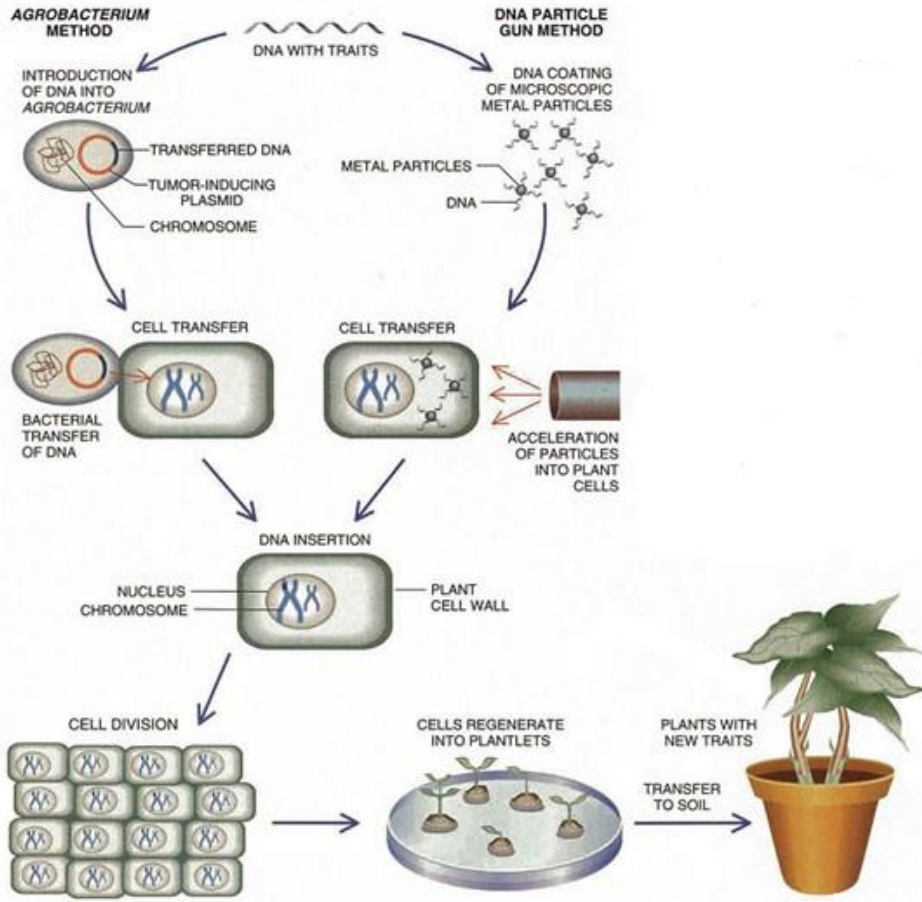
Fattore di crescita dei fibroblasti

Fattore di stimolazione delle colonie di
granulociti e macrofagi

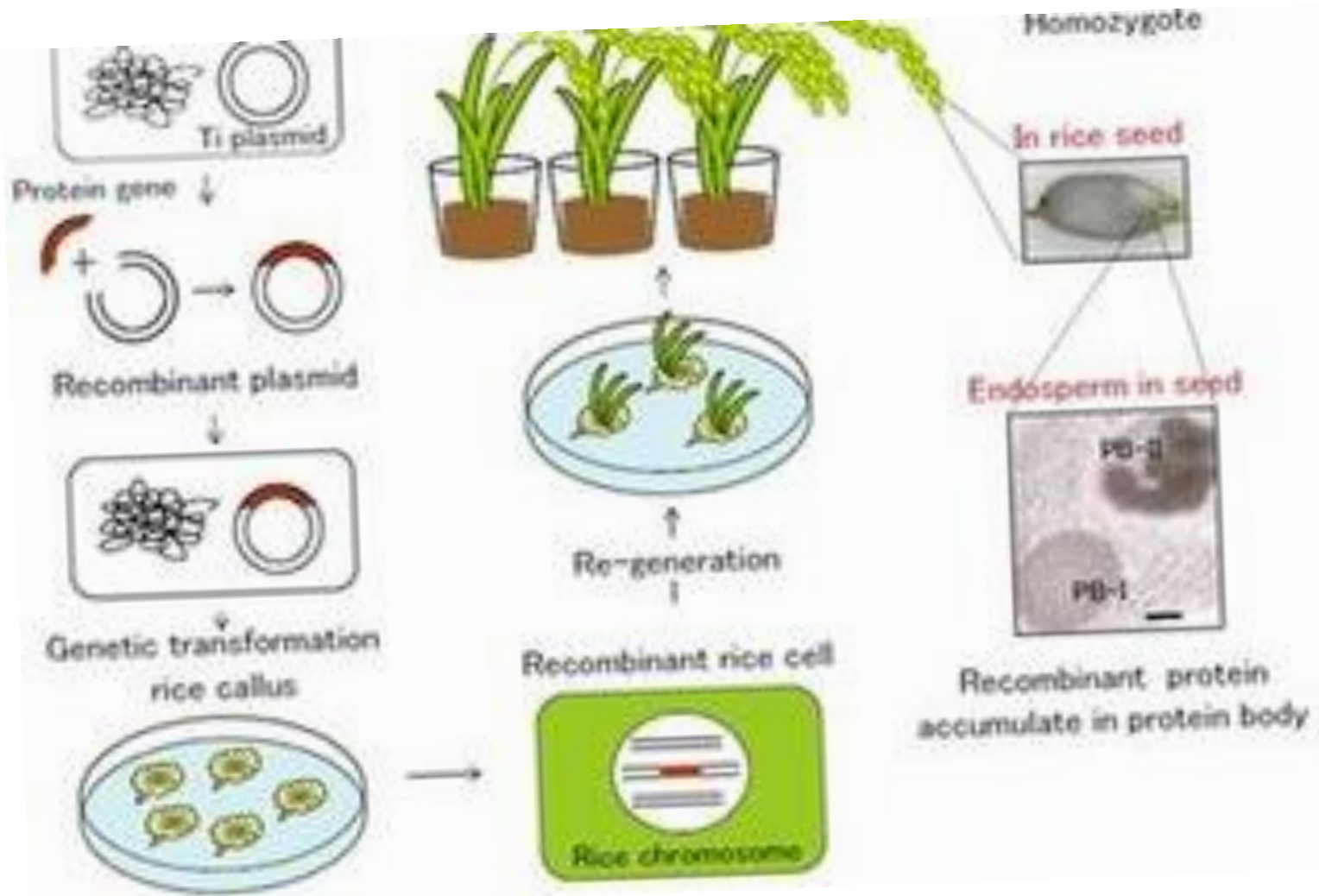
Antitripsina α_1

Fattore di coagulazione del sangue XIIIa





OryzHiExp expression platform for Recombinant Protein Service

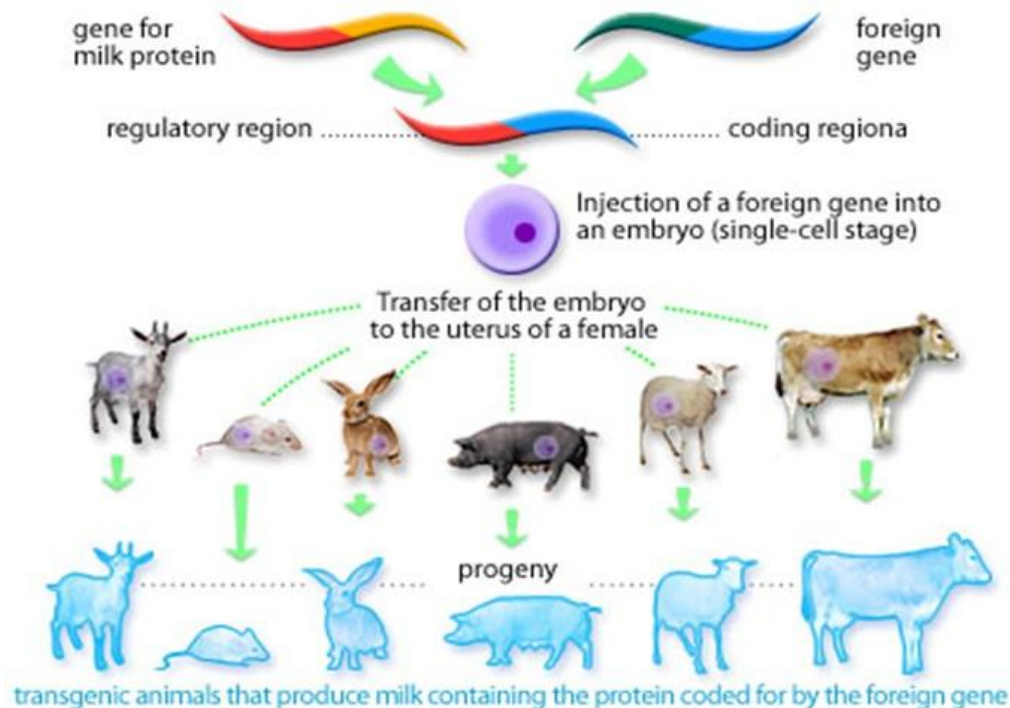


Scelta del modello di espressione

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

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.



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.



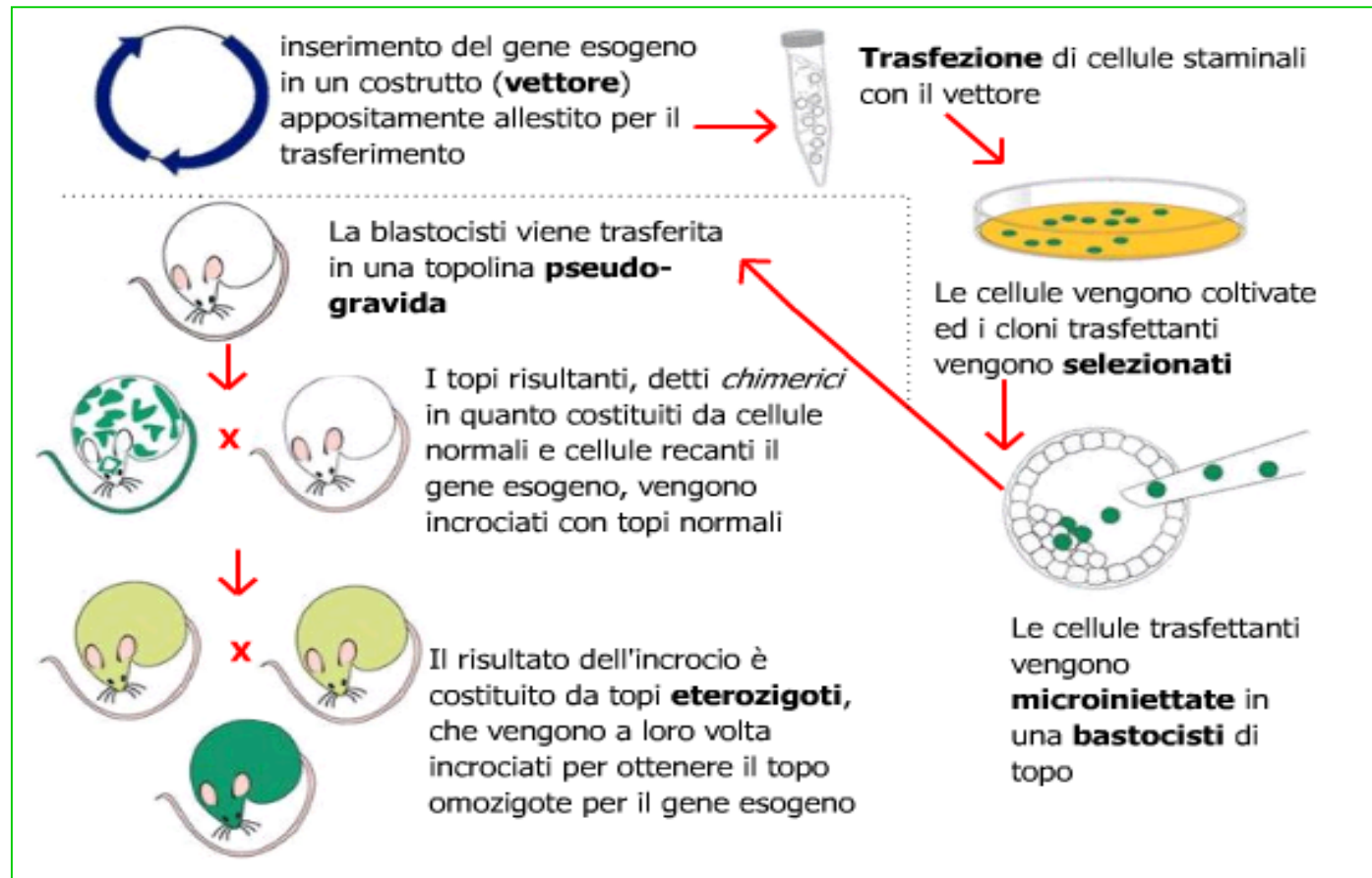


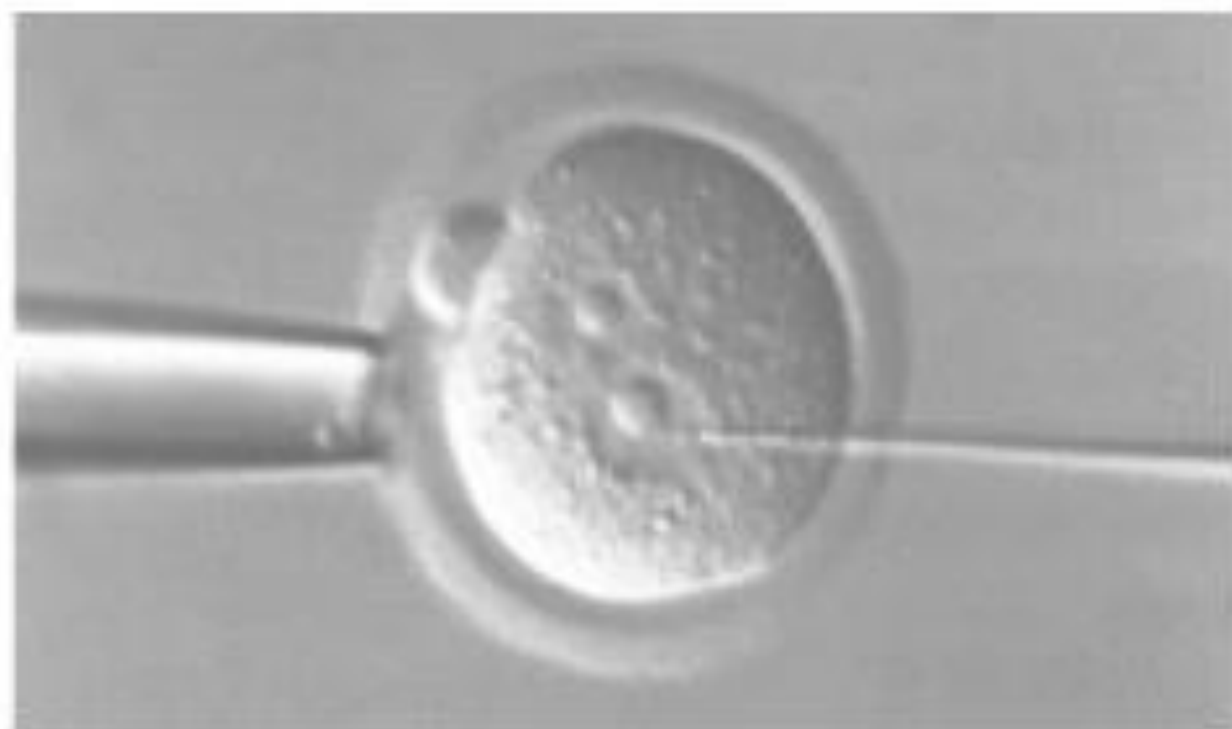
Polly è un clone transgenico di pecora Poll Dorset, portatrice del gene per una proteina umana (fattore IX della coagulazione).

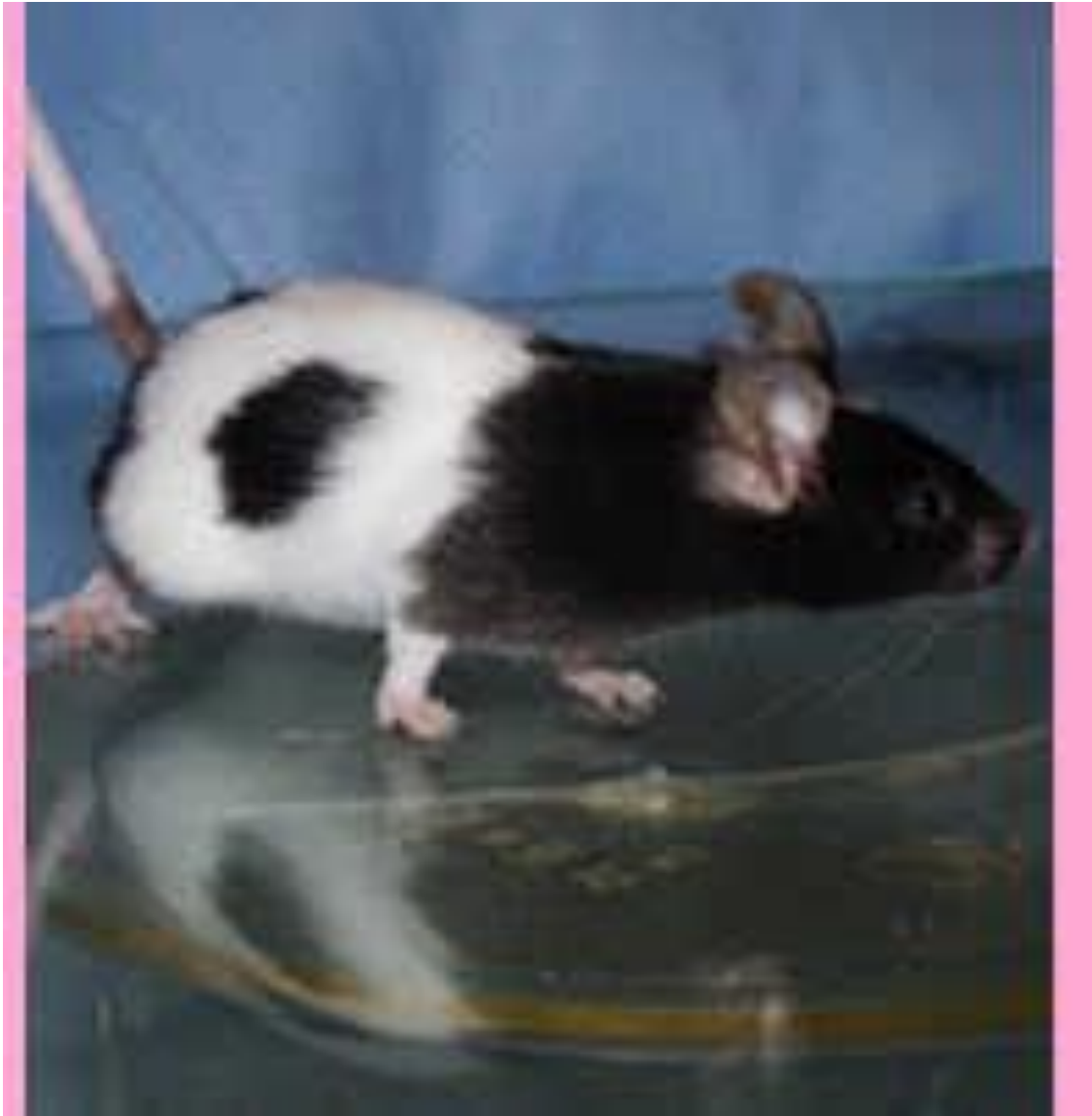
L'interesse degli animali transgenici è indirizzato, inoltre, a produrre linee genetiche controllate di animali che producano alimenti migliori e in maggiori quantità. Ad esempio sono stati prodotti *suini transgenici* che crescono più rapidamente, utilizzando meglio l'alimento e producendo una carne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



PRODUZIONE DI TOPI TRANSGENICI







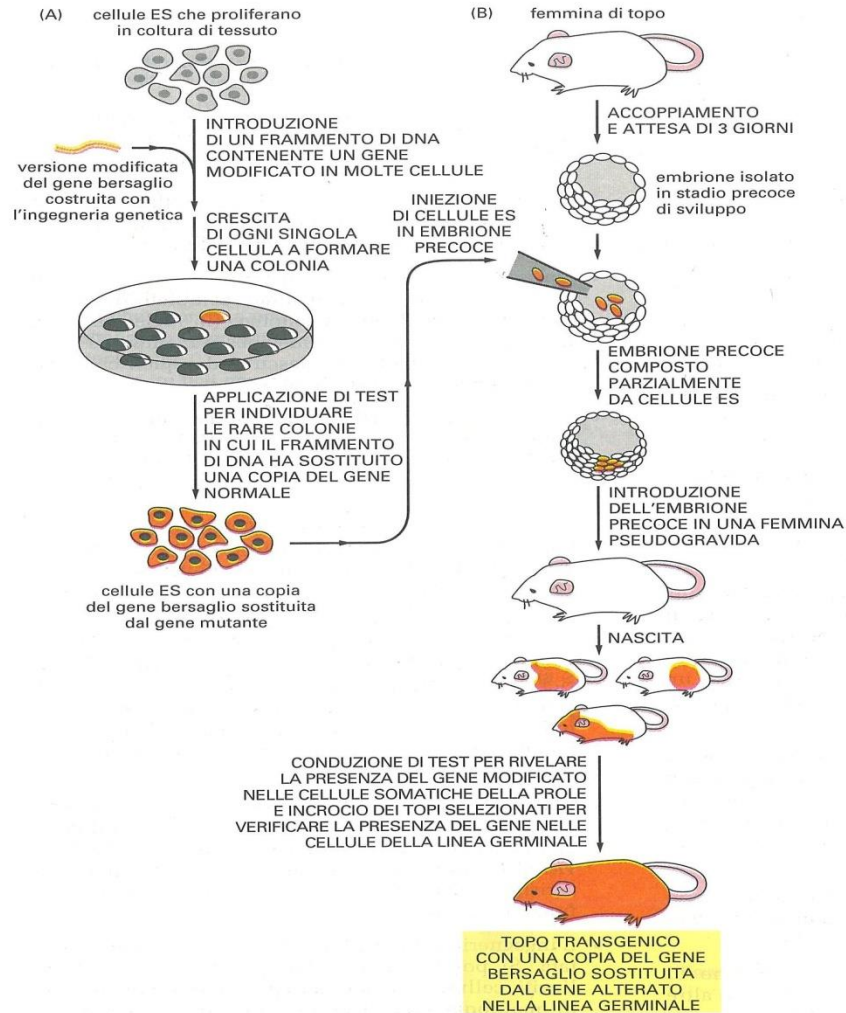




Alba, il coniglio transgenico creato da Eduardo Kac



TECNICA KNOCK - OUT

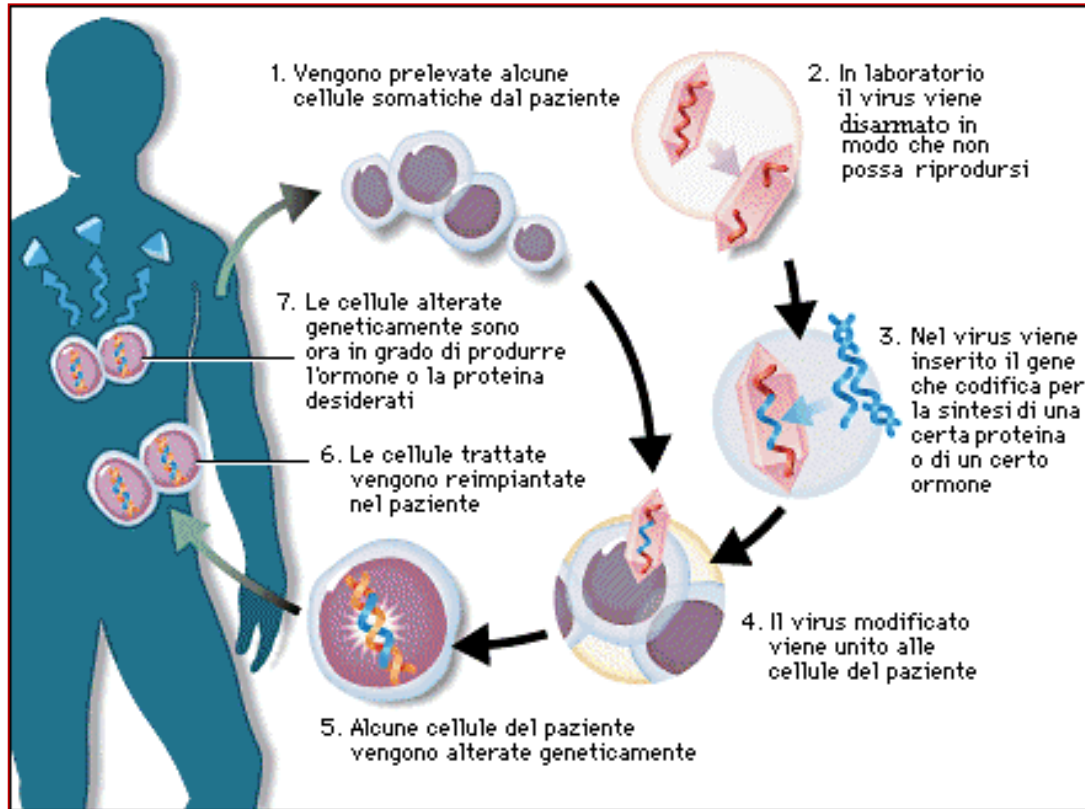


Terapia genica

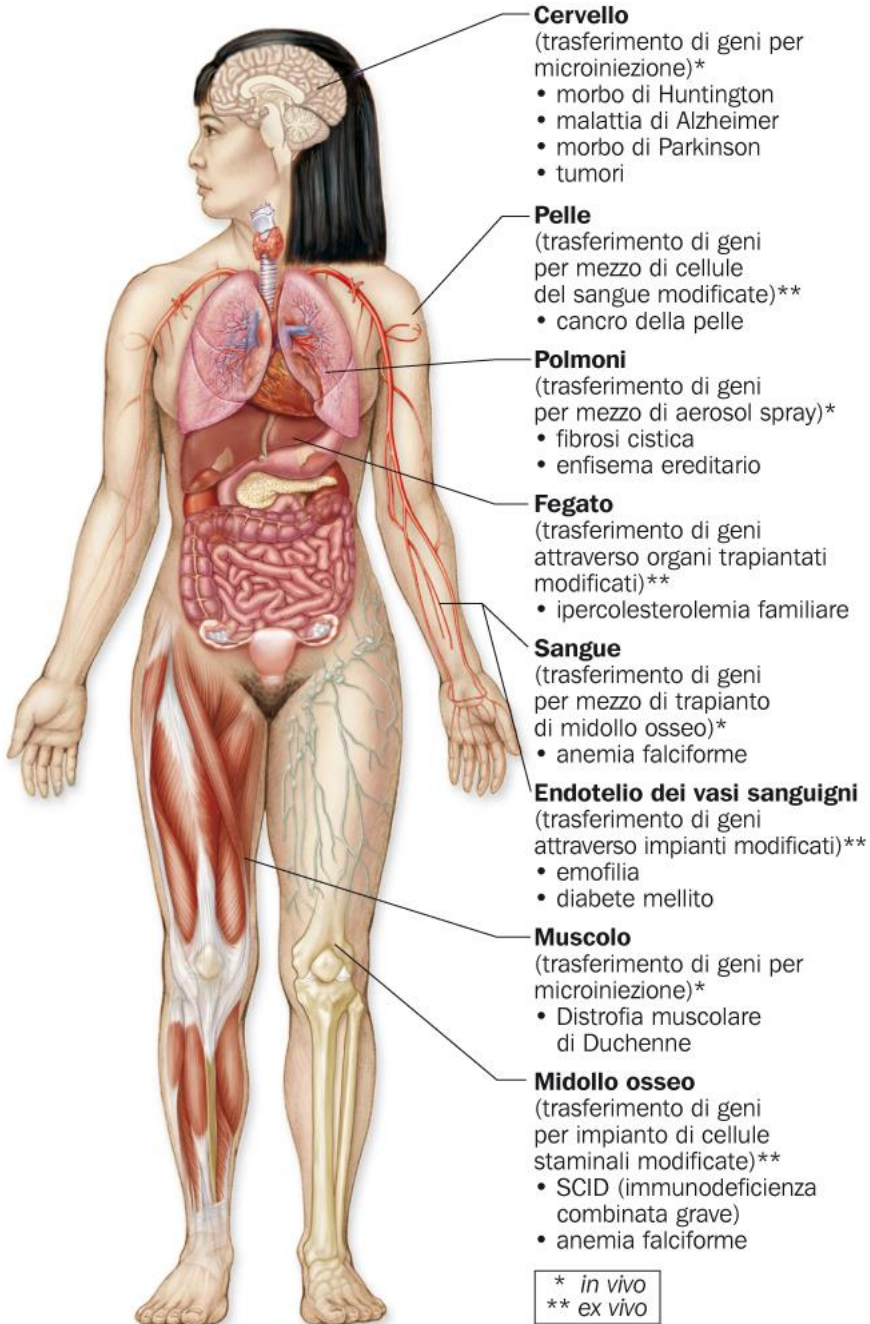
Uno dei più grandi obiettivi della medicina genetica è quella di curare malattie genetiche, provocate da alterazioni di uno o più geni o da malattie ereditarie, come la talassemia, la distrofia muscolare di Duchenne e la fibrosi cistica.

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.