

TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

La tecnologia del DNA ricombinante mira a:

1. capire come l'informazione genetica è codificata nel DNA rispetto alla sua struttura primaria, quindi rispetto alla sua sequenza in basi
2. capire come l'informazione genetica viene modulata (trascrizione)

I sistemi che analizzeremo saranno quelli cellulari, principalmente eucariotici, ma verranno trattati anche aspetti riguardanti le cellule procariotiche. Una gran parte della tecnologia del DNA ricombinante viene applicata ai sistemi vegetali, che differiscono dalle cellule animali già a livello anatomico per la presenza di una parete cellulare rigida e dei cloroplasti (come i mitocondri residui ancestrali di cellule procarioti).

FUNZIONI DEGLI ACIDI NUCLEICI

1. Info genetica
2. trasporto di energia → i nucleotidi trifosfato (tra cui l'ATP) sono depositari del drive per l'energia cellulare necessaria per far avvenire tutte le reazioni biochimiche
3. attività enzimatica (ribozimi) → capacità catalitica

STRUTTURE E PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE DEGLI ACIDI NUCLEICI

Il DNA deriva dalla polimerizzazione di unità monomeriche dette nucleotidi. Un nucleotide è costituito da:

- desossiribosio (in 2' possiede un H, a differenza dell'OH nel ribosio)
- gruppo fosfato
- base azotata

NUCLEOSIDE = NUCLEOTIDE – GRUPPO P

Gli acidi nucleici sono molecole flessibili, in quanto dotate di una grande libertà rotazionale attorno agli atomi di C. Possono quindi assumere svariate conformazioni, nonostante siano comunque soggetti a certe limitazioni conformazionali.

Il DNA è costituito da una doppia elica. (stampa slide)

NOMENCLATURA IUPAC

Y → pirimidine

R → purine

N → qualsiasi base

NB! la base del DNA 5 metil- citosina può essere diversa dall'originale

PESO DEL DNA

Possiamo calcolare in termini di massa molecolare, quanto pesa il DNA. Disponiamo del peso delle singole basi in Da, ma oltre a ciò sono stati identificati pesi molecolari medi. Gli ultimi sono molto utili per fare una media del peso nel caso di tratti di DNA molto lunghi.

Quanto DNA c'è in una cellula di *Escherichia Coli*?

Contenuto in basi 4.7×10^6 pb: -Adenina 135 Da

-Citosina 111 Da

-Guanina 151 Da

-Timina 126 Da

Massa molecolare media delle basi: 131 Da

Massa molecolare media di un deossinucleoside: 247 Da

Massa molecolare media di un deossinucleotide libero: 327 Da

Massa molecolare media di un deossinucleotide in catena: 309 Da

Massa molecolare media di un paio di deossinucleotidi in catena: 618 Da

Quindi ha una massa di circa 2.9×10^9 Da, corrispondenti a 4.8×10^{-15} g ($1 \text{ Da} \approx 1,661 \times 10^{-27}$ kg)

E in una cellula umana?

Un corredo aploide contiene circa 3.2×10^9 paia di basi, una cellula diploide il doppio, quindi una massa di circa 2.0×10^{12} Da, corrispondenti a circa 3.3×10^{-12} g, a cui andrebbe aggiunta una piccola quantità di DNA mitocondriale.

Essendo il numero stimato di cellule in un adulto dell'ordine di 10^{14} , per la gran parte diploidi, ne consegue un contenuto complessivo di DNA dell'ordine di qualche ettogrammo.

Il DNA è una struttura plastica, interagisce con le proteine e risponde a stimoli ambientali diretti (es cancerogeni che vengono assunti dall'esterno) e indiretti (modifiche che il DNA può subire, inizialmente sono epigenetici e a opera di stimoli ambientali che poi sono decodificati a livello di ormoni e cambiamenti biochimici che si traducono in un suo cambio di espressione).

Questa malleabilità dipende dalla capacità del DNA di cambiare conformazione.

STRUTTURE

Le proteine sono caratterizzate da diverse strutture:

- struttura primaria = sequenza di aa
- struttura secondaria = alfa elica / beta foglietto
- struttura terziaria = random coil, beta foglietto, alfa elica, ponti disolfuro
- struttura quaternaria = eteropolimerica / omopolimerica

Anche gli acidi nucleici (sia a singolo che a doppio filamento) sono caratterizzati da diverse strutture (ovviamente la struttura quaternaria è poco rappresentata nel DNA a singolo filamento, mentre è preponderante nel doppio filamento).

- struttura primaria = sequenza di basi → Gli acidi nucleici, come le proteine, sono costituiti dalla successione di unità monomeriche covalentemente legate in una catena non ramificata,

e come tali sono biosintetizzati. I legami fosfodiesterici conferiscono una polarità definita alla catena del DNA. Per convenzione le sequenze di DNA vengono scritte e lette sempre a partire dalla terminazione 5' → P (da sinistra) verso la terminazione 3' → OH (a destra),

- struttura secondaria = elica → molti dei legami singoli covalenti presenti nel biopolimero consentono una maggiore o minore libertà di rotazione, che richiede energie modeste, non molto più alte di quella termica E' questo il presupposto per cui i monomeri possono assumere spesso più di una "conformazione". Quando tutte le unità monomeriche in una catena o in un segmento di catena assumono una stessa conformazione si genera una struttura secondaria, cioè una struttura che si ripete con regolarità nello spazio. E' data dall'avvolgimento tra loro di due catene poli-nucleotidiche antiparallele collegate da legami idrogeno tra basi complementari (A:T e C:G). I legami H, le forze di Van der Waals e le forze idrofobiche di stacking dovute all'impilamento delle basi disposte sostanzialmente piatte una sull'altra conferiscono la forte stabilità alla doppia elica. *
- struttura terziaria = compattazione elica → Qualora segmenti diversi di uno stesso biopolimero assumono strutture secondarie intervallate da conformazioni irregolari e si orientano in modo definito tra loro tramite ulteriori interazioni si genera una Struttura terziaria.
- struttura quaternaria = assemblamento con proteine → quando più molecole a struttura terziaria formano tra loro complessi stabili si genera una Struttura quaternaria.

*I filamenti del DNA sono antiparalleli perchè altrimenti le coppie non sarebbero isomorfe.

Infatti bisogna rispettare:

1. ISOMORFISMO DELLE BASI
2. INTERAZIONE DI STACKING (che stabilizza la doppia elica) → riguarda l'impilamento tra le basi azotate, che sono idrofobiche. È dovuto al fatto che l'orbitale pi greco più esterno degli atomi delle basi interagisce con l'orbitale pi greco delle basi sopra. Affinchè l'interazione di Stacking possa essere mantenuta in maniera perfetta, è necessaria una rotazione di circa 36° di una coppia di basi, quindi le basi non sono perfettamente parallele

La somma delle forze deboli nel DNA risulta essere forte → il DNA è una molecola molto stabile, tanto che per essere denaturato la temperatura deve essere > 90°.

LA RICERCA SUL DNA

La struttura secondaria è stata il frutto di una serie di ricerche iniziate già nel 1800 ad opera di Misher che aveva identificato un "principio trasformante" che lui aveva chiamato nucleina e che poteva portare info genetica. Poi ci furono altri esperimenti di Griffith, ecc.

Nel King's College erano iniziate le ricerche sul DNA, la componente principale dei cromosomi e quindi dei geni. In poco tempo Rosalind mise a punto una tecnica innovativa che usava diffrazione ai raggi X per fotografare i costituenti di tutti i materiali viventi e non viventi. Il dispositivo consisteva in una microcamera capace di produrre fotografie ad alta definizione dei singoli filamenti di DNA. La Franklin riuscì dunque a fare la prima fotografia dello scheletro del DNA. (Wilkins aveva fotografato la struttura A del DNA → i chimici quando studiano una struttura di una proteina, la disidratano → bisogna cristallizzare il più possibile. Lui aveva usato questo sistema!)

La foto della Franklin, insieme ai dati da lei elaborati, permise a Watson e Crick di pubblicare nel 1953 la dettagliata descrizione della molecola. Nessun riconoscimento fu dato alla Franklin, che morì a causa delle eccessive esposizioni ai raggi X.

Conclusioni: il DNA è una struttura a doppia elica con distinte regolarità e nella struttura secondaria può esistere in varie conformazioni.

TAUTOMERISMO

la doppia elica di DNA può essere perturbata per fenomeni spontanei, es il TAUTOMERISMO, per cui le basi del DNA possono assumere una o più forme alternative tautomere (in cui un atomo di idrogeno risulta spostato in una posizione diversa con riarrangiamento dei doppi legami). :

a) Equilibrio ammino= immino nella citosina;

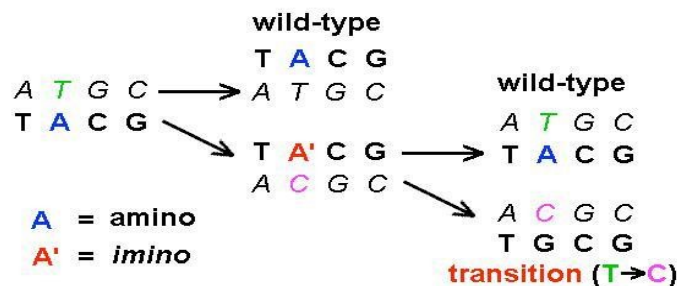
b) equilibrio cheto = enolo nella guanina.

Le forme più stabili amminiche e chetoniche sono quelle prevalenti nella doppia elica.

Tuttavia, la formazione di tautomeri immino-enolo può avvenire a causa di errori durante la sintesi del DNA: anche se le basi sono all'interno e c'è la max repulsione elettrostatica, non sono comunque in una situazione anidra dal momento che il DNA è dentro un mezzo acquoso. In più ci sono i fenomeni di modulazione del DNA (replicazione e trascrizione) in cui le basi sono esposte perché i filamenti si aprono (bisogna tenerne conto).

I sistemi di riparano sorvegliano continuamente il DNA e fanno in modo di riparare appaiamenti errati e distorsioni → se questo non viene fatto perché ci sono continue sollecitazioni ad avere questi cambiamenti o per l'inefficienza dei sistemi di riparo, si possono stabilire mutazioni.

Es:



NB: se cambio una purina con una purina → transizione

se cambio una purina con una pirimidina → transversione

Il tautomerismo è un fenomeno raro ma può avvenire anche a pH fisiologico ed essere causa di mutazioni impedendo il normale appaiamento Watson-Crick .

Alterazioni rilevanti del pH rispetto al valore fisiologico intracellulare (ca. 7) inducono reazioni di protonazione (pH acidi) o deprotonazione (pH basici) delle basi del DNA, con conseguente perdita della normale struttura secondaria a doppia elica.

In particolare pH basici (circa 12) vengono normalmente usati in laboratorio per denaturare il DNA in soluzione, provocando la perdita del protone imminico alle T e alle G e quindi dell'appaiamento Watson-Crick. Il ripristino del pH 7 consente la rinaturazione del DNA con

cinetiche più o meno veloci a seconda dei casi. Più complessi ma meno rilevanti in pratica sono i fenomeni indotti dall'acidificazione.

Attenzione: Il valore di pH=12 denatura il DNA ma non lo degrada (cioè non idrolizza i legami fosfodiesteri). Per contro tale pH degrada l'RNA, che viene quindi facilmente depolimerizzato. Ciò dipende dalla presenza di un intermedio "facile" nell'idrolisi alcalina dell'RNA (per via della presenza del 2'OH), che la struttura del DNA non consente.

NB: IL TAUTOMERISMO è SPONTANEO, NON ENZIMATICO

DEAMINAZIONE E DEPURINAZIONE

Sempre a livello di cambiamenti non enzimatici, gli acidi nucleici possono deaminarsi e depurinarsi spontaneamente.

Le deaminazioni vengono riconosciute come distorsioni e quindi corrette, ma c'è un hot spot, la 5 metil citosina, che diventa timina → non viene riconosciuta al 100%, cioè il sistema di riparo non è precisissimo: non sempre sanno che è stata cambiata, ma sanno che può accadere, quindi statisticamente se trovano una T, mettono una G.

CAMBIO DI CONFORMAZIONE SIN o ANTI

A differenza dei legami peptidici delle proteine che sono planari, i legami fosfodiesteri negli acidi nucleici possono assumere una grande varietà di conformazioni, definite dagli angoli torsionali a, b, e g. Queste conformazioni dipendono da:

1. conformazione endo – eso degli zuccheri (C2'-endo → config. B o C3'-endo → config A)
2. rotazioni attorno ai legami dello scheletro
3. rotazione attorno al legame glicosidico (base – zucchero) in C' → conformazione sin o anti

In configurazione B: Purine → sin o anti

Pirimidine → anti

In altre strutture del DNA questa libertà di rotazione può determinare strutture diverse dalla B e molto stabili.

CONFORMAZIONI DI DNA

a)Configurazione B

-E' quella più rappresentata nella maggior parte degli organismi;

-Ha un diametro di 2 A e 10 bp per ogni giro d'elica;

-Presenta un solco maggiore e minore in cui sono esposti residui delle basi che hanno gruppi (donatori, accettori, neutri) che interagiscono con le proteine.

Solco minore → espone 3 residui

Solco maggiore → espone 5 residui → + interazioni → + informativo → modulazione + accurata

-I parametri della struttura B del DNA a doppia elica, come descritti da Crick e Watson, descrivono una doppia elica molto regolare.

-Nella realtà dei fatti lungo la molecola del DNA ci sono piccole variazioni strutturali locali che in alcuni casi possono influenzare la struttura complessiva della molecola. Un caso ben studiato è quello del DNA intrinsecamente "curvo".

-Due coppie di basi A:T adiacenti hanno una intrinseca tendenza a piegarsi dalla parte del solco minore, mentre due paia G:C hanno una tendenza inversa. Ne risulta che la doppia elica non è perfettamente dritta ma presenta piccoli piegamenti. Questi, essendo la sequenza di nucleotidi eterogenea e casuale, tendono a elidersi a vicenda cosicché nell'insieme la struttura della molecola, pur con qualche deformazione, resta più o meno dritta (FIGURA b) .

Se però un tratto di DNA contiene, per esempio, due o tre paia di basi A:T con una periodicità di circa 10 paia di basi (cioè ripetute ogni giro di elica), i piccoli angoli introdotti si sommeranno tra loro producendo così una apprezzabile curvatura dell'asse della molecola di DNA (Figura c).

Queste curvature intrinseche del DNA si trovano alle volte in punti specifici del genoma, per esempio a monte di vari promotori, e in alcuni casi possono avere una rilevanza funzionale.

-Il motivo per cui il DNA è principalmente in configurazione B dipende dal fatto che a differenza di quanto si pensava, il DNA non ha solo il compito di proteggere l'informazione genetica, ma deve essere una cabina di comando che a partire da una determinata info (che dipende dalla genetica) la deve modulare. La configurazione B permette che si formino solco maggiore e minore e che ci sia un'abilità di modificazione conformazionale del DNA per interazione soprattutto con le proteine.

b)Configurazione A

-11 bp per giro d'elica → passo di 2,9 nm, diametro di 2,5 nm

-RNA/DNA o RNA/RNA

-è una spirale destrorsa (il solco minore è largo ma poco profondo, quello maggiore è più stretto e profondo)

-è presente in condizioni non fisiologiche, quando il DNA viene disidratato.

-è presente in condizioni fisiologiche quando la cellula viene trascritta → le doppie eliche possono essere ibride. La doppia elica di RNA o l'ibrido di DNA con RNA è molto più stabile del duplex di Watson e Crick → per questo durante la trascrizione si forma solo un breve tratto tra DNA nascente e RNA, perché se fosse + lungo bisognerebbe impiegare tantissima energia per separare e liberare il trascritto.

c)Configurazione Z

-elica sinistrorsa

-se si cambia la conformazione da sin a anti nella configurazione B a livello di sequenza secondaria? Si ottiene la configurazione Z → quindi il DNA con queste libertà rotazionali, pur mantenendo la sua struttura primaria, può cambiare struttura secondaria.

tipica delle sequenze che presentano modificazioni chimiche come la metilazione (tratti di DNA ricchi di basi C e G) → regioni ripetute CpG sono regioni che possono adottare una conformazione del DNA Z, ma non necessariamente

d)Tripla elica

-Poly Pu/poly Py/poly Py

NB: tutte queste conformazioni possono coesistere simultaneamente nello stesso cromosoma! **Le transizioni dal DNA B al DNA Z spesso avvengono nel caso di situazioni patologiche e sostengono determinate patologie.**

	Forma A	Forma B	Forma Z
Senso dell'elica	Destrorsa	Destrorsa	Sinistrorsa
Diametro	26 Å	20 Å	18 Å
Coppie basi/giro	11	10.5	12
Distanza fra basi	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Piegamento basi	20°	6°	7°
S. maggiore	stretto,profondo	largo, medio	assente
S. minore	largo,poco prof.	stretto,medio	stretto,profondo
Conformazione	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (Pyr)
Conformazione leg.	Anti	Anti	Syn(Pur) Anti (Pyr)

Le strutture A e B possono sussistere per qualsiasi sequenza di basi purchè vi sia complementarità tra le due catene, la struttura Z solo per sequenze alterne pirimidina-purina in condizioni particolari (alta conc. salina o stress torsionale).

Nel DNA esistono ulteriori curvature, che possono essere + o - accentuate dovute in particolar modo alla ripetizione di basi A-T. Il bending (curvatura del DNA nelle regioni A-T) ha una spiegazione in termini fisiologici pratici: dove ci sono regioni ricche in A-T il DNA ha le sue origini di replicazione → la curvatura introduce l'energia libera sufficiente affinché le proteine possano denaturare localmente la doppia elica.

LEGAMI H DIVERSI DA QUELLI CANONICI

Oltre ai legami H che conosciamo, le basi molto più raramente nel DNA, ma spesso nell'RNA possono stabilire interazioni H diverse da quelle di Watson e Crick (C-G / A-T). alcuni esempi:

- Hoogsteen/ reverse Hoogsteen
- wobble
- reverse watson-crick
- triadi: 3 basi stabiliscono un legame H (di tipo W-C tra 2 e 1 di Hoogsten/reverse hoogsteen)

Concetto fondamentale: apparte alcuni casi nelle quadruple eliche, i legami Watson e Crick rimangono sempre i più forti tra tutti i legami H tra coppie di basi (fatta eccezione l'interazione tra le G).

TRIPLA ELICA o DNA H

-Nel DNA ci sono altre strutture formate da altri legami H diversi dai classici, una delle strutture che viene riconosciuta esistere nel DNA a livello fisiologico è la TRIPLA ELICA: si forma quando un terzo filamento stabilisce un contatto con il duplex tramite precisi appaiamenti canonici precisi = legami H di tipo Hoogsteen o Reverse Hoogsteen quindi si formano le triadi GGC.

Condizioni per cui si può formare una tripla elica di DNA:

1. l'interazione deve avvenire con una regione omopurinica o omopirimidinica
2. ci deve essere un terzo filamento che può essere.
 - omopurinico → si forma una tripla elica purinica
 - pirimidinico → si forma una tripla elica pirimidinica (lo chiedo sempre!!)

La tripla elica purinica e pirimidinica rispondono a precise geometrie di triadi:

- nella tripla elica pirimidinica → le triadi canoniche sono CGC e TAT, i legami H della terza base con quella di W-C sono Hoogsteen
- nella tripla elica purinica → le triadi canoniche sono GGC e AAT, i legami sono reverse Hoogsteen.

3. Si stabilisce per convezione che il terzo filamento ha un orientamento rispetto al filamento omopurinico del duplex



In che orientamento sta il terzo filamento rispetto al duplex?

→ Se si forma una tripla elica di tipo purinico, il terzo filamento è ANTIPARALLELO rispetto al filamento omopurinico del duplex.

→ Se si forma una tripla elica di tipo pirimidinico, il terzo filamento è PARALLELO rispetto al filamento omopurinico del duplex.

-Quando fu scoperta la tripla elica?

Inizialmente la tripla elica era stata studiata negli anni 70 dai chimici, che avevano sintetizzato un filamento di RNA e avevano visto che determinate sequenze formavano regioni a tripla elica. Andando avanti si è scoperto che la tripla elica si può formare anche con filamenti di DNA, quindi si sono studiate le caratteristiche precise della formazione delle strutture che avvengono con la formazione di triadi di tipo canonico (non è che non ci possono essere interazioni del terzo filamento con altre sequenze, MA sono molto meno stabili → non rimangono nella struttura a tripla elica) → affinché si formino triple eliche stabili devono essere rispettate le geometrie e gli appaiamenti.

-**IMPORTANTE: si è scoperto che con la tripla elica si poteva modulare artificialmente l'espressione dei geni per curare situazioni patologiche. La tripla elica viene usata per accendere e spegnere i geni.** Ovviamente se si forma la tripla i geni si spengono e questo può essere causa di alcune patologie ereditarie, per esempio l'ataxia di Friedrich.

-IN VITRO si era visto che le triple eliche di tipo pirimidinico dovevano avere la terza base protonata che interagisce con legami Hoogsteen affinché si formi una triade stabile.

- IN REALTA' le triple eliche di tipo pirimidinico si formano anche in vivo in assenza di protonazione (perché il pH nel nucleo è leggermente più acido del citoplasma, ma è comunque neutro!). Questo accade perché in natura nel nucleo della cellula una serie di policationi (tra cui spemina e spermidina) reagisce con il DNA. Viene riportata la necessità della C protonata per ricordare che la triade più stabile c'è quando si ha pH acido, in alternativa deve venire stabilizzata da condizioni quali l'interazione con policationi.

-La tripla elica si mette nel solco maggiore del duplex del DNA della struttura B → è nel major groove che esiste l'esposizione dei gruppi laterali delle basi che fungono per l'interazione con le proteine → se si mette la tripla elica, le proteine sono escluse da quel punto → ecco perché la tripla elica ha perlopiù la funzione di inibire l'espressione di quel tratto.

-Da dove viene il terzo filamento?

In vitro, quando ci si occupa di accensione o spegnimento dei geni, siamo noi a inserire un terzo filamento endogeno che prende il nome di TFO.

In natura invece, quando c'è l'apertura della doppia elica, il terzo filamento si può formare o dopo la replicazione, prima che il DNA si riavvolga → questo può restare e quindi diventare problema a livello di trascrizione del gene.

A livello del DNA può succedere che una regione si svolga localmente e che 1 dei 2 filamenti di riavvolga sul duplex neoformato → si forma il terzo filamento, conosciuto come tripla elica o struttura H.

TRIPLA ELICA CON MOTIVO GP (tripla elica “mista”)

- dal punto di vista della stabilità, esiste la possibilità di fare una tripla elica mista contenente sia purine che pirimidine, la tripla elica con motivo GP
- In questo caso il terzo filamento può avere orientamento parallelo o antiparallelo rispetto al tratto omopurinic del duplex a seconda della sua ricchezza in G.
 - se è più ricco in pirimidine sarà parallelo,
 - se è più ricco in purine sarà antiparallelo.
- In questo caso gli appaiamenti possono essere misti, quindi di tipo hoogsteen o reverse hoogsteen.

-Inizialmente si pensava che queste strutture potessero essere indotte solo in vitro perché non c'erano dimostrazioni dirette in vivo che la tripla esistesse a livello fisiologico. In realtà queste strutture esistono in vari tratti del nostro DNA.

-Il problema è che UNA TRIPLA ELICA SARA' SEMPRE MENO STABILE DEL DUPEX. La stabilità della tripla elica comunque dipende dalla sua lunghezza: maggiore la lunghezza maggiore la stabilità → Tratti corti in condizioni fisiologiche dopo essersi formati si dissociano → questo la rende difficile da vedere.

-Esistono molti tratti omopirimidinici o omopurinici nel nostro DNA, che sono spesso in prossimità dei promotori dei geni o associati a geni cardine nel controllo del ciclo cellulare.

-La stabilità della tripla elica fa in modo che ci sia un equilibrio sempre spostato verso il duplex → QUINDI LA MODULAZIONE DI ACCENSIONE e SPEGNIMENTO è CONDIZIONATA DALL'EQUILIBRIO CHE C'È TRA LE 2 FORME.

-Anni fa ricercatori hanno ottenuto una foto della tripla elica in un DNA normale dal punto di vista strutturale grazie a una caratterizzazione di struttura in fase gassosa → sono riusciti a congelare le strutture di DNA a tripla elica presenti in quel momento in fase gassosa.

-La tripla elica che normalmente è stata associata a un ruolo di inibizione di trascrizione nei siti in cui si formava, ha anche un ruolo fisiologico nei processi di riparazione nelle rotture del doppio filamento, perchè promuove l'avanzamento della DNA polimerasi (fa sì che non vada in stallo di fronte a rotture) → questo meccanismo è stato trovato in tutti gli organismi viventi.

-la tripla elica è una delle possibili transizioni conformazionali a cui può andare incontro il DNA, e come tutte le transizioni conformazionali, ha ripercussioni sulla trascrizione. Spesso le transizioni sono associate a condizioni di instabilità, e patologie.

La tripla elica ha un ruolo sicuro nell' ATASSIA DI FREIDREICH:

- è dovuta all'espansione della tripletta GAA nel primo introne del gene per l'atassia di Friedreich, che si trova sul cromosoma 9 (normale 8-30; patologico >30 fino a 1000). le regioni ripetitive possono subire fenomeni di slip page: si formano delle anse che vengono oltrepassate dalla DNA polimerasi ma quando quel filamento subirà un'ulteriore replicazione ci sarà un aumento del numero di triplette. (L'espansione delle triplette è alla base di molte malattie genetiche tra le quali la corea di Huntington).
- l'espansione di GAA forma una lunga regione omopurinica, quindi la tripla elica è molto stabilizzata → più è lunga la regione in cui si può trovare la tripla elica, più la tripla elica è stabile e la formazione del DNA H si ha spontaneamente perchè dopo la replicazione, trovando una regione così lunga, si forma la tripla elica localmente. Questa impedisce la trascrizione del gene.
- La gravità è direttamente correlata al numero di espansioni
- si ha l'INIBIZIONE DELLA TRASCRIZIONE DEL GENE della fratassina (proteina mitocondriale) PER LA FORMAZIONE DELLA TRIPLA ELICA
- Prevalenza: 1/30-50.000, eredità autosomica recessiva
- Patogenesi: Atrofia cellulare a T dei gangli spinali, atrofia-degenerazione cordoni post. + degenerazione tratto spino-cerebellare dorsale e ventrale
- Gene: FRDA, mappato su cromosoma 9q13-21, per la fratassina (proteina mitocondriale)
- Clinica: Esordio < 25 aa., progressiva atassia della marcia senza remissione

-avendo capito che la transizione di struttura può avere importanti conseguenze sulla trascrizione del gene, i ricercatori hanno applicato questi principi per una modulazione artificiale a livello di patologie, per esempio per inibire i geni iper espressi.

-Recentemente, la tecnologia antigene (antigene technology, AT) ha attratto notevole interesse per lo sviluppo di nuove strategie basate su **TFO (Triplehelix-Forming Oligonucleotide)**:

- ci sono crescenti evidenze che i TFOs possono essere importanti nella regolazione dell'espressione genica e per la modifica di una regione di un gene specifico, sia in vitro che in vivo.
- la AT può controllare e / o modulare le funzioni cellulari a livello del DNA genomico. È stato dimostrato che un TFO anti – IGF -I può efficacemente sopprimere lo sviluppo di tumori in modelli animali e nelle neoplasie umane.

-Approcci terapeutici basati su TFO sono stati sviluppati per:

1. modulare l'espressione genica,
2. promuovere la mutagenesi sito-specifica

3. modificare quindi specifiche regioni di DNA genomici.

-Alcuni recenti risultati sostengono che il TFO può bloccare il macchinario della trascrizione non solo di bloccando il sito di inizio e/o alterando il riconoscimento del DNA da parte dei fattori di trascrizione, ma anche bloccando/rallentando la strada alla RNA polimerasi mediante stabilizzazione delle coppie di basi nel sito di trascrizione: se si inserisce nella cellula un terzo filamento artificiale (TFO) creato appositamente per andare a formare la tripla elica nella regione del gene IGF1 (insulin growth factor 1), l'espressione di quel gene sarà inibita → questo meccanismo impedisce alla RNA polimerasi di trascrivere.

È possibile:

- usare regioni a livello del promotore del gene per impedire l'assemblaggio dei fattori di trascrizione
- far formare la tripla elica nella regione codificante, bloccando così la RNA polimerasi II.

-Recenti studi sostengono che i miRNA possono esercitare la loro regolazione sulle regioni di promotori attraverso la formazione della tripla elica miRNA –DNA•DNA. Queste strutture a tripla elica sono piuttosto corte, quindi avrebbero vita breve, ma in questo caso la struttura è stabilizzata da proteine AGO che partecipano al meccanismo di trascrizione con i miRNA → questi studi rappresentano un modello plausibile silenziamento genico trascrizionale (TGS) mediato da miRNA.

QUADRUPLA ELICA

- si forma in presenza di regioni molto ricche in G, che possono creare a livello intermolecolare (artificialmente) e intramolecolare (fisiologicamente) delle tetradi che si impilano in maniera precisa tramite interazioni Hoogsteen e si formano prevalentemente a livello telomerico.
- Può essere formata da 1, 2 o 4 filamenti
- È una struttura molto ben organizzata → presente interazioni di stacking anche più forti di quelle canoniche di Watson e Crick → struttura estremamente stabile:
per denaturare alcune quadruple eliche, oltre alla temperatura elevata, è necessario lavorare con forza ionica bassa (così da promuovere la dissociazione dei filamenti) e agenti chimici denaturanti.
- La caratteristica chimica della sua formazione risiede nella capacità della G di stare sia in sin che in anti rispetto al legame beta-glicosidico → per questo esistono vari tipi di quadruple eliche con orientamento parallelo o anti.
- Legami Hoogsteen o reverse Hoogsteen.
- È importante dal punto di vista fisiologico e patologico: una volta si pensava che il ruolo delle quadruple eliche fosse semplicemente quello di stabilizzare i telomeri, in realtà si è visto che queste strutture si possono formare anche in altre regioni del DNA.

Il fatto che la presenza di quadruple eliche in presenza di varie patologie degenerative aumenta, ha permesso di capire che uno dei loro ruoli è inibire l'espressione di geni. Ovviamente se l'inibizione avviene su geni tumor suppressor, le triple eliche saranno reponsabili dell'avanzamento del tumore.

ELICA CRUCIFORME

- è una transizione promossa da regioni palindromiche vicine tra loro. Quando il DNA a monte di queste regioni palindromiche subisce delle modificazioni strutturali, queste subiscono delle rotture e si formano regioni cruciformi.
- Le eliche cruciformi sono strutture molto note perchè costituiscono le giunzioni di Holliday e le regioni di scambio di cromosomi.
- Ciò che permette la formazione di un'elica cruciforme è un cambiamento topologico del DNA: il DNA nel nucleo può avvolgersi attorno al proprio asse grazie ad una spiralizzazione negativa. Se il numero di twist cambia, cambia la topologia del DNA e possono formarsi strutture cruciformi.
- Oggi sappiamo che queste strutture sono anche causa di malattie come il cancro.
- La funzione dell'elica quadrupla è legata allo scambio di materiale cromosomico, quindi quando la sua formazione può essere collegata alla formazione di rotture. Tali rotture sono connesse a patologie tumorali di tipo ematologico in cui ci sono traslocazioni che causano la formazione di nuovi geni (es cromosoma philadelphia).

QUINDI: esistono tante strutture non B che coesistono e in caso di una loro presenza indotta da fattori esterni, possono essere connesse a patologie di tipo degenerativo. Per es la transizione da DNA B a Z è collegata a molte patologie:

- artirite reumatoide
 - sclerosi multipla
 - diabete di tipo I
 - leucemia
 - linfoma
 - alzheimer → •Gravemente affetto – forma Z
 - Moderato – intermedio tra la forma B e Z
 - Normale – forma B
- la proteina beta amiloide o l'alluminio (un fattore eziologico) possono modulare le alterazioni dell'elica in vivo
-ecc

Tutte le strutture diverse da quella B sono bersaglio delle nuove tecnologie in campo biomedico, inoltre si stanno facendo molti studi per tentare di formare queste strutture in zone oncogeniche del DNA.

La tripla elica quando si forma in maniera esogena stimola il sistema di riparo del DNA. Alcuni ricercatori hanno dimostrato la possibile correzione genica con l'uso di una tripla elica per ancorare il filamento corretto nella regione dove deve essere corretto: la regione a tripla elica infatti stimola la riparazione perchè viene riconosciuta come una distorsione.

ANALISI ELETTROFORETICA DEL DNA (per capire quanto è superavvolto)

Il fatto che il DNA possa avere varie strutturazioni dipende dalla possibilità di modularlo in diverse strutture e superstrutture → concetto di TOPOISOMERI: sono molecole di DNA cc di una uguale lunghezza e composizione in basi, ma diverso Lk

I topoisomeri possono essere separati in elettroforesi su gel, pur avendo lo stesso rapporto carica/massa. La diversa mobilità è dovuta al loro diverso grado di compattamento (diverso coefficiente d'attrito). Più la molecola è compatta (DNA superavvolto) più migra velocemente nel gel. Viceversa un cccDNA rilassato migra molto più lentamente di uno fortemente superavvolto.

Il DNA circolare chiuso batterico:

- stato rilassato: numero di Twist = numero di linking → nella corsa elettroforetica è più lento,
- stato superavvolto: c'è un writhe → nella corsa elettroforetica è più veloce

ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DEL DNA – IPERCROMISMO DEL DNA

Quando misuriamo le strutture del DNA in senso termodinamico, facciamo una curva di denaturazione e poi una di rinaturazione.

Denaturazione

- In genere la denaturazione termica del DNA in soluzione è un processo molto rapido.
- Effetto ipercromico: le basi del DNA assorbono la luce UV tra 300 e 230 nm, con massimo di assorbimento attorno a 260 nm.
Bisogna però considerare l'entità dell'assorbimento a parità di concentrazione è maggiore di quasi il 50% per il DNA denaturato rispetto al DNA "nativo", perché le basi si espongono e assorbono di più → → Le basi nella doppia elica hanno coefficiente di assorbimento della luce minore che nello stato a singolo filamento, a causa dello stacking delle basi.
- La differenza di densità ottica tra duplex appaiato e denaturato è di circa 30-40%.
- La stabilità termodinamica del duplex di DNA e sua denaturazione: dipendenza da fattori intrinseci (composizione in basi, peso molecolare) ed estrinseci (temperatura, pH, forza ionica, co-soluti caotropi).
- T di melting

Rinaturazione

- la rinaturazione (riformazione del duplex) in seguito ad abbassamento della temperatura, è un processo la cui velocità (cinetica) può essere estremamente variabile a seconda della natura del DNA all'esame, andando da velocità non molto minori di quelle di denaturazione nel caso di oligonucleotidi, o DNA costituito da sequenze brevi ripetute, a velocità talmente basse da richiedere giorni o addirittura mesi per osservare un grado di rinaturazione apprezzabile
- è più informativa della denaturazione perché le cinetiche di rinaturazione sono funzione della complessità e stabilità delle strutture.
- La formula finale $N = k * C_{bp} * t^{1/2}$ dice che, nota la concentrazione del DNA in termini di paia di basi e nota la costante cinetica, il tempo di semi-rinaturazione fornisce la misura della cosiddetta "complessità" del genoma, cioè la lunghezza totale del DNA (non ripetitivo) che lo costituisce.

Se usiamo questo tipo di studio, viene fuori una curva che sul DNA umano non è sigmoide

(come nei batteri) ma ha una serie di gobbe perchè prima si rinaturano le regioni altamente ripetitive, poi quelle mediamente ripetitive e per ultime quelle non ripetitive (quelle dei geni).

Considerazioni

-Se confronto lo spettro di assorbimento di un singolo filamento di dna con uno di un duplex, vedremo che hanno lo stesso picco ma ampiezze diverse.

-La % di G e C cambia la temperatura di melting. -

Con la spettrofotometria si vedono formazioni tipo

- duplex → aspetto sigmoide
- triplex → doppio sigmoide → questo dimostra che siccome la tripla è meno stabile è quella che si denatura prima, infatti come si stacca aumenta l'assorbimento. Quando si stacca completamente avremo l'effetto plateau, poi inizia a denaturarsi il duplex. Per misurare la forza di una tripla devo vedere che si riformi (se non si riforma vuol dire che la stabilità è veramente bassa).

-La tripla elica nell'elettroforesi è più rallentata.

-Anche le strutture a G delle quadruple si possono studiare in vitro. La quadrupla elica si vede meglio con dicroismo circolare = tecnica spettrofotometrica (UV) con picchi positivi e negativi diversi (no 260 nm).

RNA

- Come il DNA, l'RNA è assemblato come una catena di nucleotidi
- è l'acido nucleico che in un brodo primordiale era capace di dare origine ad un mondo prebiotico grazie alla sua capacità di fare catalisi enzimatica e di autoreplicarsi senza l'intervento di alcuna proteina
- è molto importante dal punto di vista della biotecnologia, che spesso sfrutta proprio la modulazione dell'RNA
- L'appaiamento delle basi dell'RNA non è sempre canonico, dal momento che non è vincolato da una doppia elica. Dunque si possono stabilire altri legami deboli che risultano avere un grosso peso sul mantenimento delle strutture secondarie o terziarie → l'RNA è un un filamento non aperto ma molto strutturato.

Esempi di interazioni: legami H, Hoogsteen, dimerizzazione G, triade, reverse Watson e Crick... RNA a doppia elica può fare solo struttura A, per l'ingombro del 2'OH

- Solco maggiore meno accessibile, quello minore più accessibile
- Mentre per il DNA è facile catalogare le strutture, per l'RNA risulta più difficile perché ha alcune strutturazioni principali riconosciute, altre principali associate alle proteine (es ribosomi). Le strutture più complesse sono risultato anche di interazioni tipo triade.

Strutturazioni di RNA riconosciute a doppia elica (generalmente si formano fra segmenti complementari dello stesso filamento, talvolta anche fra due filamenti):

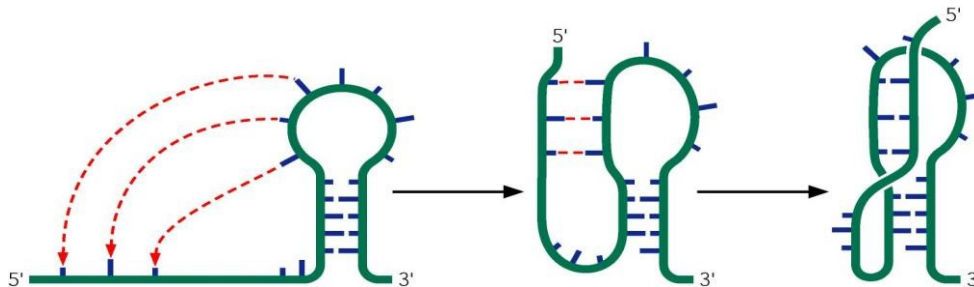
- a) Forcina (hairpin);
- b) Gemma (bulge);
- c) Ansa (loop).

- La TECNOLOGIA SELEX ha permesso di studiare le complessità strutturali dell'RNA. Essa permette di ricostruire tratti di RNA della lunghezza scelta con tutte le combinazioni possibili a partire da un pool di ribonucleotidi (4). Questi si fanno poi interagire con una proteina fissata su una cromatografia di affinità per vedere il comportamento e la struttura dell'RNA → molti RNA sono usati per reazioni particolari di tipo aptamerico = riconoscimento di un particolare ligando (metallo o proteina).
- gli acidi nucleici, con i loro riarrangiamenti sono in grado di esporre, avvicinare e attaccare con azioni di tipo nucleofilo i vari atomi, ovviamente in presenza di acqua. In particolare l'RNA, essendo in grado di ripiegarsi su se stesso per rotazione attorno ai legami fosfodiesterici nei tratti non a doppia elica, forma strutture complesse, soprattutto in presenza di basi non convenzionali. Esempi: interazioni fra 3 basi, fra basi e impalcatura (tRNA), o con proteine che neutralizzano le cariche dei fosfati (ribosomi) → **l'RNA è un singolo filamento ben conformato, in grado di stabilire numerose strutture secondarie e terziarie, che sono alla base delle proprietà catalitiche dell'RNA** (es ribozimi, introni di tipo 1 e 2 che permettono di catalizzare attacco nucleofilo sull'adenina).
- anche nell'RNA si formano tetra-loop molto stabili → più di una struttura coesiste in un RNA, ma i tratti a singolo filamento non sono molti. A volte la stabilità delle strutture a doppia elica dell'RNA è molto maggiore del previsto in termini teorici. Ciò dipende dalle proprietà speciali dei loop, come nel caso di 4 loop di sequenza UUCG (molto comune e molto stabile), in grado di impilarsi fra loro in un certo modo.

RIBOZIMI

Caratteristiche comuni

- sono metallo-enzimi
- sono molecole a RNA catalizzatori di reazioni che li vedono altresì implicati come substrato → **La struttura tridimensionale dell'enzima determina la sua specificità di legami con il substrato a creare il sito catalitico**
- sono naturalmente presenti nelle nostre cellule, in particolare nel nucleo, nei mitocondri e nei cloroplasti degli eucarioti come pure in alcuni virus
- il nucleo attivo della struttura 3D riconosce il bersaglio dando origine a CATALISI o AUTOCATALISI. Questa doppia possibilità è dovuta al fatto che i singoli filamenti di RNA si possono conformare in strutture terziarie e secondarie diverse da quelle canoniche. Nell'ambito di queste strutture, in particolare quelle catalitiche, si riconoscono alcuni motivi ricorrenti, un esempio sono gli pseudonodi → **gli pseudonodi si formano per appaiamento di basi fra sequenze complementari non contigue**. In particolare una forcina e un filamento libero interagiscono, quindi la forcina avvicina le basi che possono stabilire legami H deboli e quindi formare gli pseudonodi.



- Le reazioni catalizzate dai ribozimi riguardano la formazione e rottura di legami covalenti in molecole substrato a RNA
Tali reazioni si basano sullo scambio di protoni, quindi su **ATTACCHI NUCLEOFILI** (con conseguente idrolisi o transesterificazione risultanti nel taglio di legami fosfodiesterici). Questo perché la struttura 3D del ribozima è tale da poter attaccare il sito che deve idrolizzare con una reazione nucleofila. La reazione nucleofila può essere un'idrolisi o una trans-esterificazione e affinché avvenga è sufficiente che ci sia un mezzo acquoso e qualche cofattore di aiuto per i ribozimi.

RIBOZIMI NATURALI

Producono un'estremità 3'OH e 5' P tagliando un substrato di RNA.

Sono raggruppabili in classi in base alla loro struttura e dalle reazioni in cui sono coinvolti

- **RNAsiP**: Ubiquitaria, è responsabile della maturazione dei tRNA nel loro estremo 5'
- **RNAsiHRP**: Replicazione DNA mitocondriale
- **INTRONI tipo I**: Tetrahymena; pre-RNA mitocondriale di lievito; geni di cloroplasti
Lo splicing necessita di un nucleoside guaninico esterno, usato come nucleofilo: il suo -OH in 3' si

lega all'estremità 5' dell'introne con un legame fosfodiesterico 3'-5' al primo nucleoside dell'introne. L'ossidrile in 3' dell'esone precedente agisce da nucleofilo completando la reazione e congiungendo i due esoni.

La loro attività catalitica dipende dalla loro struttura secondaria o terziaria altamente conservata

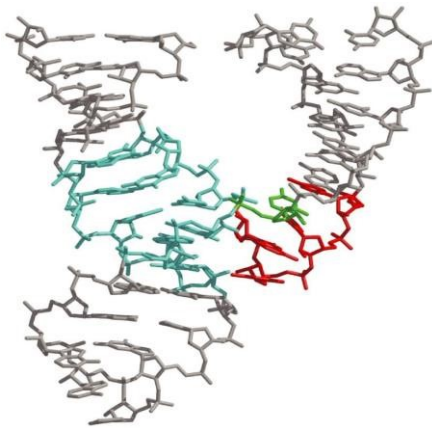
- **INTRONI tipo II:** con meccanismo di splicing conservato (precursori di mRNA in organelli di funghi e piante)
La reazione è simile, ma il primo nucleofilo ad agire non è un nucleoside esterno, bensì un -OH in 2' di un residuo adenilato all'interno dell'introne.

In tutti i ribozimi ci sono domini conservati necessari per svolgere la loro attività catalitica. Se i domini non sono conservati, vuol dire che si possono modificare.

RIBOZIMI ARTIFICIALI

I Ricercatori, capendo che ci sono molti motivi secondari strutturali conservati negli RNA catalitici, hanno sviluppato strutture primarie (quindi sequenze di RNA) che una volta sintetizzate sono in grado di assumere quelle conformazioni secondarie e terziarie, dando origine a ribozimi artificiali. QUINDI i ricercatori sono riusciti a sviluppare ribozimi sintetici che possono catalizzare la loro propria sintesi in particolari condizioni sperimentali. Un esempio importante è il ribozima del RNA polimerasi.

Struttura 3D del ribozima hammerhead



La forma assomiglia a quella di una forcilla, **in verde il sito di taglio.**

La scoperta dei ribozimi ha rivoluzionato la visione dell'evoluzione biologica: la vita primordiale sarebbe stata basata sull'RNA, che funzionava sia da materiale genetico che enzimatico. A favore di questa ipotesi è il fatto che la peptidiltransferasi, il componente ribosomiale responsabile della formazione dei legami peptidici nella sintesi proteica, è una molecola di RNA. I ribozimi sarebbero pertanto una reliquia di questo mondo di enzimi ad RNA.

I ribozimi artificiali sono stati creati per sfruttare le loro AZIONI TERAPEUTICHE, per esempio nel ripristino del controllo della proliferazione cellulare agendo su p53 (ambito delle degenerazioni neoplastiche).

Normalmente i ribozimi naturali sono attivi in cis (sulla stesa molecola) ma artificialmente si possono far lavorare in trans, ad esempio per il riparo di RNA danneggiati o mutati → così riconoscono l'RNA messaggero mutato della p53 e grazie alla loro capacità di unire 2 esoni, si crea un ribozima artificiale che rimuove la parte mutata di p53 e inserisce la sequenza corretta, ripristinando così la funzione della proteina.

TRANS SPLICING:

- permette di cambiare messaggio in un mRNA una volta che è già stato sottoposto al processo di maturazione
- a livello fisiologico è molto raro negli organismi superiori, ma molto rappresentato in organismi che hanno funzione di parassiti poiché una volta entrati nella cellula ospite con il transsplicing possono creare nuove proteine, che per esempio promuovono la loro riparazione.

Esempio: i batteri del genere micoplasma sanno eseguire trans splicing. Il trans splicing può generare nuovi messaggeri che codificano per proteine con funzione oncogenetica → si pensa che molte specie di micoplasmi una volta che sono sostenuti da infezioni croniche riescano a cambiare la tipologia delle cellule infettate, trasformandole in cellule neoplastiche.

Rispetto all'iniziale entusiasmo per queste reazioni di correzione in vitro, per es per p53, si sono riscontrate molte complicazioni a livello di applicazione medica.

RIBOZIMI IN CLINICAL TRIALS-1

1) Ribozima designato per inibire il fattore VEGF per inibire l'angiogenesi. Questo si è rivelato utile nei tumori e in patologie degenerative come la maculopatia della retina (ci sono alcune patologie nella retina che sono legate in minima parte all'ereditarietà, altre legate all'invecchiamento, e portano a cecità poiché sono dovute all'iper proliferazione di cellule endoteliali vascolari che vascolarizzano tantissimo la retina offuscando la visione).

2) Ribozima che lega sequenze altamente conservate del virus dell'epatite C per inibire la resistenza alla HCV drug: il virus dell'epatite C come tutti i retrovirus ha la possibilità di mutare continuamente il patrimonio genetico ad un ritmo sostenuto → si sviluppano ceppi resistenti alle terapie → si è dunque creato un ribozima che lega sequenze conservate (sostanzialmente meno le fregate delle sequenze che si sono create e colpisce le sequenze presenti in TUTTI i virus dell'epatite C!).

[CI SARANNO MOLTE DI QUESTE DOMANDE ALL'ESAME! → si concentra su cose innovative]

3) Applicazioni rispetto all'iperproliferazione delle cellule endoteliali vascolari negli interventi di tipo cardiovascolare in particolare negli STANT. Uno dei maggiori problemi cardiovascolari sono le restenosi (chiusura delle arterie). Uno degli interventi che si fa moltissimo è mettere gli STANT, strutture a rete + o – rigida in grado di aprire l'arteria. Questo sistema dura per un periodo relativo alla risposta dell'organismo. Le cellule endoteliali si piazzano sulla rete e proliferano quindi aver degli inibitori è molto importante. A livello di retina si pratica un'iniezione nell'occhio, una volta applicato lo STANT, il farmaco può essere inserito anche in via locale.

miRNA

- sono piccole molecole endogene di RNA NON CODIFICANTE a singolo filamento di 21-22 nt (nascono come precursori molto lunghi, ma poi la loro parte attiva si riduce)
- Il ruolo biologico dei miRNA è associato al ruolo dei loro mRNA target. I miRNA possono avere due modi diversi d'agire a seconda della complementarità che vi è tra il miRNA e il suo target:
 - Complementarità perfetta: degradazione dell'mRNA.
 - Complementarità imperfetta: inibizione della traduzione/moulazione assetto cromatina (NB! RNA: complementarità perfetta → liberazione mRNA)

- **Sono presenti in tutti gli eucarioti!**

- Sono importanti in quanto sono dei regolatori dell'espressione genica → Tantissimi miRNA sono essenziali al normale sviluppo embriogenetico dell'organismo, alla regolazione del ciclo cellulare tant'è che si riconoscono classi di miRNA che funzionano come protooncogeni e altri che funzionano come tumor suppressor (inibiscono la proliferazione cellulare).
- Riconoscono e si legano a sequenze localizzate nelle regioni 3' non tradotte (3'UTR) di specifici mRNAs ed effettuano un meccanismo di "hetero-silencing" degradando il messaggero target o bloccando la traduzione.
- **Lo stesso miRNA può avere come bersaglio differenti mRNA** (es: lo stesso miRNA in un tessuto promuove la proliferazione, in altri la inibisce!);

Differenti miRNA possono avere come bersaglio lo stesso mRNA.

Il fatto che i miRNA possano avere + bersaglio rende possibile la complementarità imperfetta. Quello che notiamo è che lo stesso miRNA CHE IN alcuni tessuti hanno azione di promuovere la proliferazione, in altri ce l'hanno di inibirla.

- Deregolazione a livello di miRNA causate da mutazioni che li rendono inattivati, oppure mutazioni a livello dei promotori che vengono continuamente espressi possono risultare nello sviluppo di moltissime patologie. Bisogna che avvenga una mutazione che aumenti l'espressione dei protooncogeni che diventano oncogeni e una mutazione che inibisca l'espressione dei tumor suppressor. → I ricercatori sono stati in grado di costruire firme molecolari di patologie cardiovascolari neoplastiche per cui in base alla deregolazione di determinati miRNA si può stabilire prognosi e gravità della malattia.

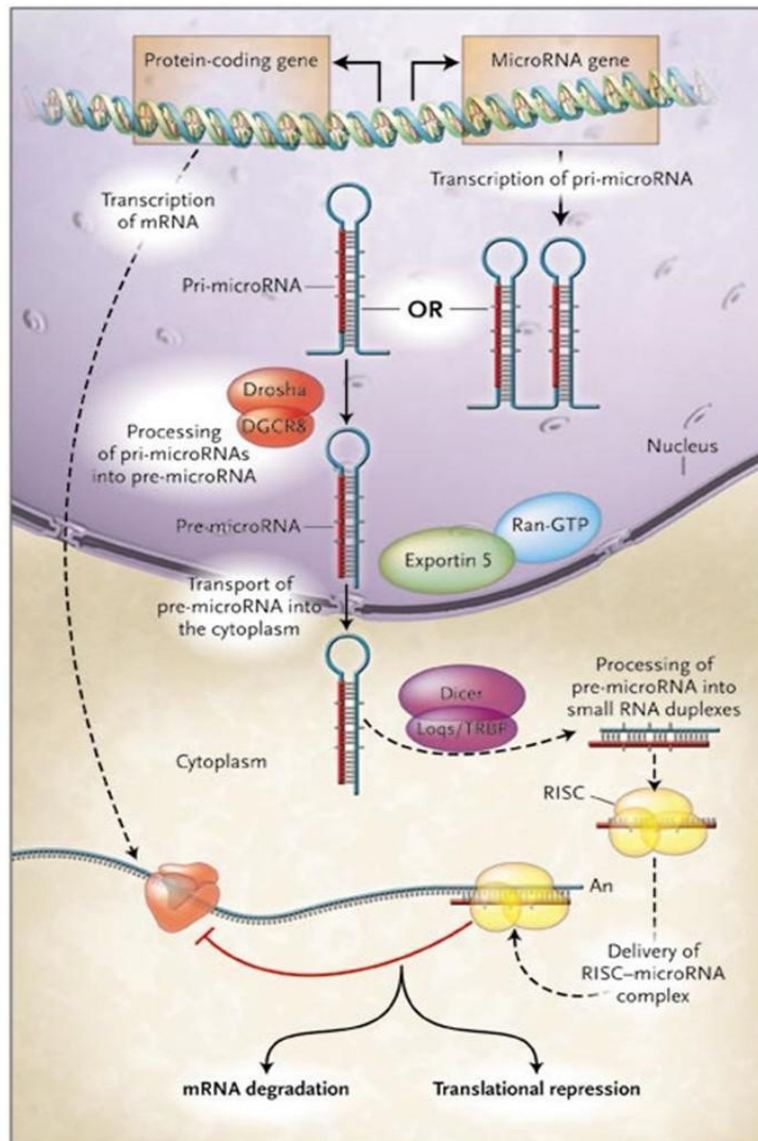
Una parte dell'interesse è stato diretto verso la possibilità di modulare artificialmente (come nel caso dei ribozimi) l'attività dei miRNA, oppure di agire attraverso i miRNA sull'espressione di certi bersagli (per esempio per reprimerli in caso di oncogeni, per portare le cellule al normale funzionamento o alla morte programmata).

1- miRNA CANONICI (TRASCRITTI COME RNA NON CODIFICANTI CON UN LORO PROMOTORE MEDIANTE RNA polimerasi)

Il trascritto è un pre-miRNA di circa 70 nt che forma una struttura stem-loop. La parte attiva è minima, tutto il resto serve per dare la classica strutturazione a stem loop necessaria affinché subiscano un PROCESSO DI MATURAZIONE:

generalmente i geni codificanti per miRNA sono trascritti nel nucleo dalla RNA-polimerasi che dà vita a lunghi trascritti, i pri-miRNA, che presentano il cap e la poliadenilazione. Questi ultimi

vengono processati da un'RNasi III, Drosha, e dal suo cofattore, Pasha. Si ottengono così trascritti di circa 70 nucleotidi, detti pre-miRNA. Successivamente le proteine RAN-GTP ed exportin 5 trasportano i pre-miRNA dal nucleo al citoplasma. A questo punto ci sono 2 destini possibili: normalmente un'altra RNAasi III, Dicer, li processa per generare molecole di RNA duplex di circa 22 nucleotidi. Quindi vengono selezionati un filamento guida e uno passenger, in modo che sulla proteina rimanga solo il filamento antisense rispetto al suo bersaglio → complementarità imperfetta → inibizione traduzione. Alcuni invece possono subire un meccanismo di maturazione indipendente da Dicer che porta a selezionare sempre su una proteina di tipo argonauta la sequenza antisense che andrà a fare complementarità perfetta con il suo bersaglio → l'RNA viene degradato.



2- miRNA INTRONICI (PRESENTI ALL'INTERNO DEGLI INTRONI DI UN GENE)

3- miRNA ESONICI → codificanti

CLASSIFICAZIONE miRNA IN BASE ALLA LORO ORIGINE:

1. miRNA INTERGENICI O ESONICI → localizzati tra introni di geni e trascritti dalla RNA pol II o pol III, in forma di pri-miRNA
2. RNA INTRAGENICI O INTRONICI → localizzati entro un introne di un gene per una proteina codificante e trascritti dalla RNA pol II come parte di pre-miRNA ?

I miRNA e pre-miRNA, soprattutto nei precursori, hanno strutture secondarie molto conservate a cui corrispondono regioni di strutture primarie ben conservate (come accade per sequenze consenso a livello dei promotori dei geni, tipo TATA BOX). Questo ha consentito di identificare una gran parte dei possibili miRNA → anche se non sappiamo tutte le funzioni dei miRNA abbiamo identificato moltissimi miRNA nei genomi degli organismi superiori, oltre che in molte altre specie.

Nelle banche dati quindi possiamo trovare:

- sequenze buone candidate per essere trascritte in miRNA
- sequenze cattive candidate per essere trascritte in miRNA, perché presentano molte basi che non corrispondono alle sequenze consenso necessarie per fare strutture secondarie.

Grazie a studi di bioinformatica si sono identificati più di 10'000 miRNA. In 150 specie quasi 2000 miRNA con un n° di bersagli di oltre 34'000. Il numero di miRNA identificati nel 2010 era poco meno di 1000, ora circa 2000.

I miRNA hanno un ruolo in molti punti chiave dello sviluppo degli organismi e nel mantenimento della corretta funzionalità cellulare:

1. differenziazione
2. metabolismo → correlati a mis metaboliche
3. apoptosi
4. ciclo cellulare → poss modulare espressione genica a livello della cromatina inibendo o attivando le acetilasi / deacetilasi, interferendo con l'accessibilità o meno agendo sulle code dell'ottamero istonico del tratto di DNA agli enzimi per la trascrizione
5. cancro: possono agire da oncogeni o da tumor suppressor → se c'è deregolazione sono inibiti i tumor suppressor e iper espressi quelli che funzionano come oncogeni
6.

APPROCCI TERAPEUTICI

Come per i ribozimi, anche per i miRNA si sono valutati i possibili approcci terapeutici, quindi la prima cosa ad essere sviluppata è stata la loro firma molecolare per le patologie.

Avere un approccio terapeutico significa comprendere come funzionano i miRNA in base alla loro struttura, riprodurli artificialmente (sfruttando la loro dimensione ridotta) e inserirli all'interno delle cellule per operare indirettamente una correzione genica.

L'approccio terapeutico può essere di 2 tipi:

1. **terapia di inibizione quando il target miRNA è iper espresso** → è più complesso perché bisogna trovare dei sistemi artificiali che vadano a riconoscere il miRNA iperespresso e ne inducano la degradazione. Si sfrutta un acido nucleico che è un oligonucleotide antisense (sequenza complementare per una parte del miRNA) che ne induce la degradazione attraverso la complementarità.

2. **terapia di supplementazione quando il target miRNA è represso** → è più semplice da effettuare (ad es se mancano i tumor suppressor, noi li inseriamo artificiali in modo da ripristinare il loro ruolo nel controllo della proliferazione cellulare)

siRNA

- acidi nucleici a doppio filamento di 19-22 nt
- funzione: modulare l'espressione genica degradando specifici mRNA bersaglio
- Sono stati identificati i siRNA con funzione di modulazione dell'espressione genica che agiscono inducendo la degradazione del RNA bersaglio. Questi hanno funzioni contro virus e in generale contro organismi che invadono le cellule. fanno parte di sistemi di regolazione di trascrizione antisense endogena
- molto rappresentati nelle piante dove caratterizzano caratteristiche morfogenetiche → tecnologie applicate al campo vegetale per creare specie ad hoc di maturazione colore ecc-
- hanno complementarità perfetta

Sia i miRNA che i siRNA possono essere introdotti artificialmente nelle cellule, ma quando si vuole modulare uno specifico messaggero, si preferiscono i siRNA per via dell'appaiamento perfetto. Anche con i siRNA ci sono molte reazioni non specifiche (off-target), ma con i miRNA ce ne sarebbero molte di più. Questo è dovuto al fatto che i miRNA naturali sono diretti da meccanismi di controllo che ne dirigono la funzione, mentre gli artificiali, visto che li mettiamo dentro noi anche in condizioni non controllate come avverrebbe in vitro, possono dare molti effetti indesiderati → problema delle terapie geniche in generale causati da problemi concentrazione (facendo una reazione enzimatica in eccesso molare si ottengono molte reazioni non specifiche e pochissima reazione specifica, nonostante ci siano tutti gli ingredienti necessari).

piRNA

- funzione di regolazione
- svariati ruoli importanti soprattutto nel controllo di elementi trasponibili nelle cellule germinali → sono essenziali per proteggere la trasmissione dell'info genica, bloccando la trasposizione, con meccanismi diversi dalla maturazione/attivazione → senza di essi saremmo maggiormente soggetti a inattivazioni funzionali / iper attivazione / comparsa di nuove funzionalità non necessariamente positive.
Attuano un controllo anche a livello di regioni ripetute del DNA, per es a livello centromerico
- Hanno un meccanismo indipendente da siRNA e miRNA, non c'è Dicer, argonauta ecc. ma altre proteine specifiche che controllano la maturazione.
- Possono essere anche autorigeneranti grazie a una struttura secondaria con un loop (?) 1.05
Anche i siRNA possono entrare in un loop per autocreazione → certi siRNA per andare a colpire uno specifico messaggero ci mettono max 3 gg, altri 10-12 gg, in base alla

capacità di innescare un meccanismo di autoproduzione, che in rari casi può addirittura diventare permanente nella cellula.

Esistono anche RNA più lunghi, ma sono di difficile sintesi chimica e quindi di scarso interesse tecnologico, dal momento che avrebbero rese piuttosto basse.

MECCANISMO A PING PONG → tipico di miRNA che hanno al 5' una U seguita da DCA. I miRNA sono regioni sottoposte a velocissima pressione evolutiva.

Table 1 Regulatory ncRNAs produced from eukaryotic genomes and their characteristics and functions

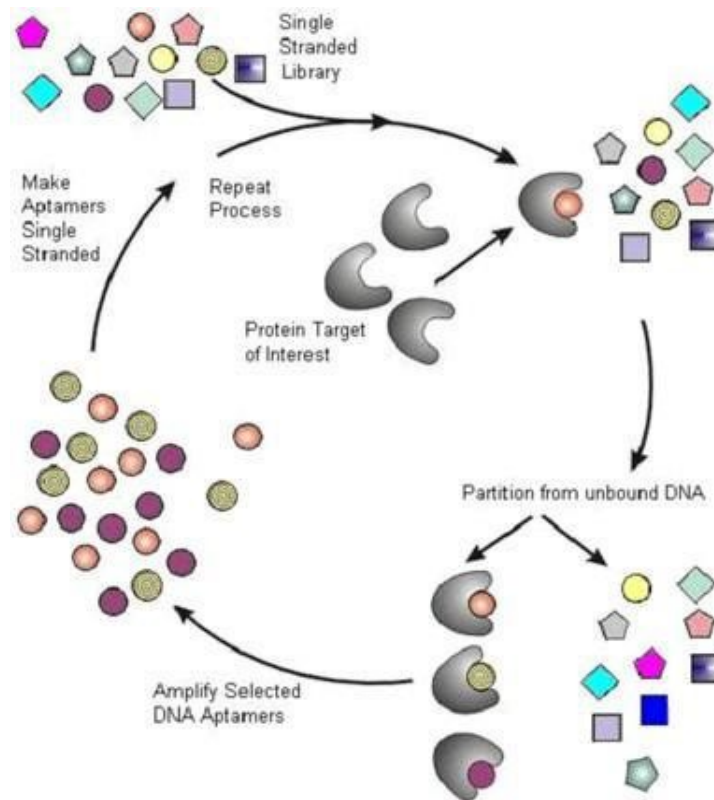
Type	Long name	Length (nt)	Characteristics	Function
miRNA	Micro RNA	20–24	Pri-miRNA produced in the nucleus as capped and polyadenylated ssRNA with a imperfectly paired stem-loop structure Processing by Drosha and Dicer lead to a production of mature dsRNA with exact ends Effector phase occurs primarily in the cytoplasm mediated by Ago proteins	Perfect complementarity: Ago2-mediated cleavage of mRNA Non-perfect complementarity: Suppression of translation or mRNA degradation (deadenylation, decapping, and exonucleolytic degradation) Minor functions in transcriptional silencing and translational activation
piRNA	PIWI-interacting RNA	24–31	Precursor ssRNA, which is modified to contain 3'-terminal 2'-O-methyl Strong preference for uridine at the 5' end	Silencing of transposable elements in the germline
siRNA	Small interfering RNA	20–24	Canonical form long, linear, perfectly base-paired dsRNA Processed by Dicer into mature siRNA with heterogenous end composition Effector functions occur primarily in the cytoplasm supported by Ago proteins	Perfect match: endonucleolytic cleavage Non-perfect match or endonuclease-inactive RISC: translational repression or exonucleolytic degradation Induction of heterochromatin formation Silencing of the same locus from which they are derived
PAR (^a PASR, TSSa-RNA, tiRNA, PROMPT)	Promoter-associated RNA	16–200	Weakly expressed ssRNAs Short half-life Bidirectional expression reflecting PolIII distribution	Partly unknown but indications of transcriptional regulation (example interaction with Polycomb group of proteins)
eRNA	Enhancer RNA	100–9000	ssRNA produced bidirectionally from enhancer regions enriched for H3K4me1, PolIII and coactivators such as p300 Short half-life Evolutionarily conserved sequences Dynamically regulated upon signalling Expression correlates positively with nearby mRNA expression	Mostly unknown but plays a role in transcriptional gene activation
lncRNA	Long non-coding RNA	>200	Precursor ssRNA Many lncRNAs are subject to splicing, polyadenylation, and other post-transcriptional modifications Mostly nuclear RNAs but a subset also located in the cytoplasm Not evolutionary conserved with the exception of large intergenic ncRNAs, lincRNAs (H3K4me3-H3K36me3 signature)	Chromatin remodelling Transcriptional regulation Post-transcriptional regulation (splicing, TF localization) Precursors for siRNAs Component of nuclear organelles (paraspeckles, nuclear speckles)

^aPASR, promoter-associated small RNA; TSSa-RNA, transcription start site-associated RNA; tiRNA, transcription initiation RNA; PROMTs, promoter upstream transcript.

APTAMERI

- casualmente si è identificata la capacità degli acidi nucleici di assumere una struttura 3 D tale da rendere possibile il riconoscimento di qualsiasi molecola con la stessa affinità che avrebbe un anticorpo, quindi estremamente elevata. Questo ha portato alla creazione del SISTEMA SELEX: Si fa una cromatografia di affinità a partire da una libreria di sequenze di lunghezza casuale a singolo filamento di DNA o RNA (ovviamente fornite di una sequenza che verrà riconosciuta dallo specifico primer), al termine della quale la sequenza aptamerica affine si lega alla sequenza bersaglio. La sequenza viene staccata, amplificata e riselezionata. Man mano che si fanno i successivi round di riselezione, si applicano condizioni di cromatografia + stringenti (per esempio si cambiano le condizioni di pozza ionica). Se si è usato un RNA è necessario un passaggio extra perché bisogna costruire oligonucleotidi artificiali.
- Gli aptameri possono essere creati anche per molecole di tipo molto piccolo e non necessariamente proteiche

Meccanismo SELEX:



1. A partire da una "libreria" di sequenze di DNA (schematizzata nell'immagine come tanti poligoni diversi) si fa una prima selezione con la **cromatografia di affinità**: si tratta di una colonna a cui è attaccato il ligando verso il quale si vuole selezionare l'aptamero.
2. Quello che si lega viene tenuto e viene lavato via tutto ciò che non si lega.
3. A questo punto il nostro ligando viene staccato dalla cromatografia di affinità usando il cambio di forza ionica e pH: questo ridurrà l'affinità del ligando per il suo bersaglio.
4. Successivamente gli aptameri selezionati vengono amplificati, in quanto queste sequenze di DNA e RNA hanno una codina tag che contiene una sequenza per l'aggancio dei primer per la PCR. A questo punto però si nota che le sequenze di DNA che si erano attaccate al ligando sono diverse (dall'immagine si vede che i vari cerchi hanno diversi colori).

5. queste vengono sottoposte ad un nuovo round di selezione e così facendo si seleziona l'acido nucleico sempre più affine cambiando le condizioni di legame e rendendole sempre più astringenti.

Gli aptameri trovano applicazione sia nell'ambito del riconoscimento di qualsiasi ligando a livello sperimentale, sia in campo biotecnologico come i **biosensori**. Gli aptameri infatti vengono usati su piastre come biosensori per aumentare la specificità e la rapidità di reazioni di riconoscimento che con il sistema canonico degli anticorpi richiederebbe molto più tempo.

Gli aptameri possono assumere varie strutturazioni, ad esempio: pseudoknot, G-quartet, hairpin, stem loop.

Molti aptameri sono stati studiati come molecole terapeutiche per la loro capacità di riconoscere in maniera specifica delle proteine coinvolte in varie patologie. I vantaggi degli aptameri rispetto agli anticorpi sono:

- il fatto che essi sono **prodotti in maniera più economica e rapida;**
- sono più piccoli quindi hanno una **miglior farmacocinetica;**
- **sono più stabili:** gli anticorpi non si possono liofilizzare per essere mantenuti nel tempo, invece gli aptameri possono essere anche liofilizzati e poi risospesi per essere riutilizzati.
- **non sono immunogenici**, mentre se si vogliono usare gli anticorpi come agenti terapeutici bisogna tener conto che essi scatenano la risposta immunitaria da parte dell'organismo.

Anche gli aptameri hanno limitazioni:

- La principale è che gli aptameri sono sensibili alla degradazione da parte delle nucleasi del siero;
- Se devono essere internalizzati per agire a livello intracellulare hanno bisogno di essere veicolati in maniera opportuna e artificiale. Invece se devono agire sulla superficie cellulare non hanno limitazioni.

Gli aptameri sono stati scoperti in maniera casuale, e attualmente non sono note sequenze di acidi nucleici che possono funzionare da aptameri nei mammiferi. Nei procarioti invece si sa che certe sequenze possono essere considerate degli aptameri naturali a livello della regolazione genica, perchè riconoscono degli effettori che possono attivare un gene.

Quindi queste molecole hanno catturato l'interesse della comunità scientifica per la loro versatilità, in quanto è possibile creare un acido nucleico con la stessa affinità e comportamento di un anticorpo ma con molti vantaggi in più.

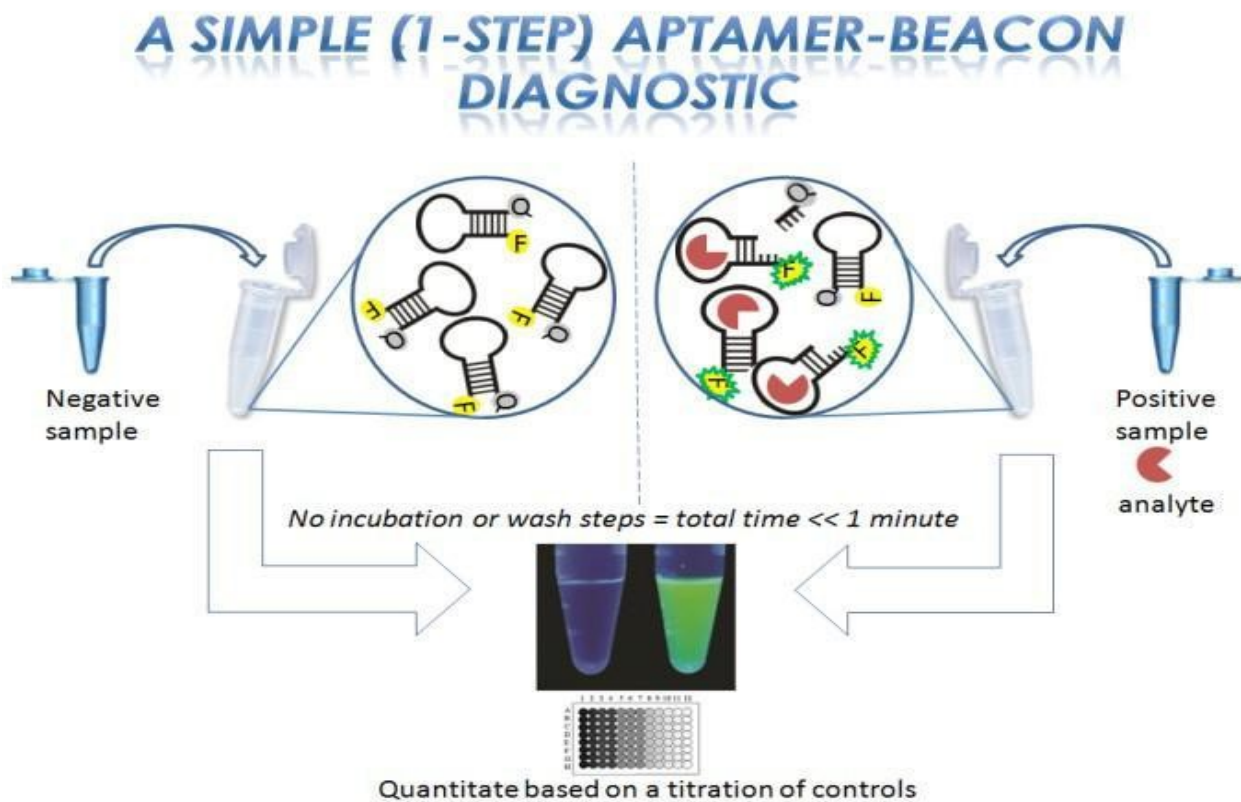
Si è creato anche un database di questi aptameri.

Gli RNA, per via della loro struttura, sono molto più interessanti per quanto riguarda la loro capacità di creare aptameri, che poi possono essere usati nei vari campi di applicazione. Il problema sta nel fatto che l'RNA è sensibile alla degradazione da parte delle nucleasi a causa del gruppo OH al 2'. Ad oggi però è possibile modificare chimicamente gli acidi nucleici e rendere queste molecole resistenti alla degradazione da parte delle nucleasi. Vengono creati infatti degli analoghi con modificazioni chimiche nello scheletro zucchero-fosfato che aumentano la stabilità della molecola, ad esempio: gruppi zolfo al posto del fosforo, aggiunta di metilazioni, aggiunta alle estremità di atomi come il fluoro, oppure è possibile cambiare le basi con isomeri ottici.

APPLICAZIONI degli APTAMERI:

1) Gli aptameri hanno trovato vari sviluppi biotecnologici in coniugazione con altre sequenze di acidi nucleici che svolgono una certa funzione. Sono stati creati gli **Apta-switch**, ovvero aptameri coniugati con la sequenza di un ribozima hammerhead. Questo è stato creato per andare a riconoscere in maniera specifica un bersaglio e svolgere attività catalitica.

2) Un'altra applicazione interessante nei sistemi di biosensori è l'**Apta-beacon**: le molecole beacon assomigliano a delle molecole usate per la quantificazione real time di PCR. Queste strutture sono acidi nucleici a loop che hanno all'estremità 5' e 3' rispettivamente un fluoroforo e un quencher, ovvero una molecola che assorbe la fluorescenza ed impedisce al fluoroforo di emettere il suo segnale. Se noi coniughiamo a questa molecola un sistema di riconoscimento formato da una sequenza aptamerica, possiamo rendere il sistema estremamente rapido per il riconoscimento della fluorescenza: questo perché l'aptamero, agganciandosi al suo bersaglio, fa staccare il quencher e rende possibile la reazione di fluorescenza in maniera molto rapida ($\ll 1$ min).



Esempio di applicazione pratica di Apta-beacon: abbiamo una sequenza aptamerica che va a riconoscere la proteina d'interesse "Tat" del virus dell'HIV. Succede che la proteina prende contatto con il suo bersaglio, si lega anche l'aptamero e si forma così un complesso terziario che stabilizza la reazione e porta il fluoroforo lontano dal quencher (perché c'è un cambiamento conformazionale) e quindi è resa possibile l'emissione di fluorescenza.

3) Applicazione in campo medico

Uno dei grandi problemi negli interventi in soggetti con patologie cardio-vascolari è che bisogna tenere sotto controllo la coagulazione sanguigna. Infatti c'è bisogno di un anticoagulante durante l'operazione, mentre in seguito all'operazione bisogna ristabilire l'adeguata coagulazione sanguigna. Il problema sta nel fatto che non si riescono a controllare i tempi, nel senso che dopo aver dato l'anticoagulante si danno al paziente molecole per favorire la coagulazione MA il tempo di risposta

dell'organismo può essere variabile. Casualmente è stata scoperta una sequenza di ssDNA in grado di assumere una struttura particolare che funge da potente agente anticoagulante (anti-trombina). Sulla base di questa scoperta poi sono state create altre molecole con forti poteri anticoagulanti nei confronti di altri fattori della coagulazione (es il fattore Ixa che è implicato nell'emofilia o il fattore VIIa). In particolare l'anti-trombina, siccome è ricca in G, ha la capacità di formare strutture quadruple in cui ci sono interazioni di stacking tra le basi planari delle G.

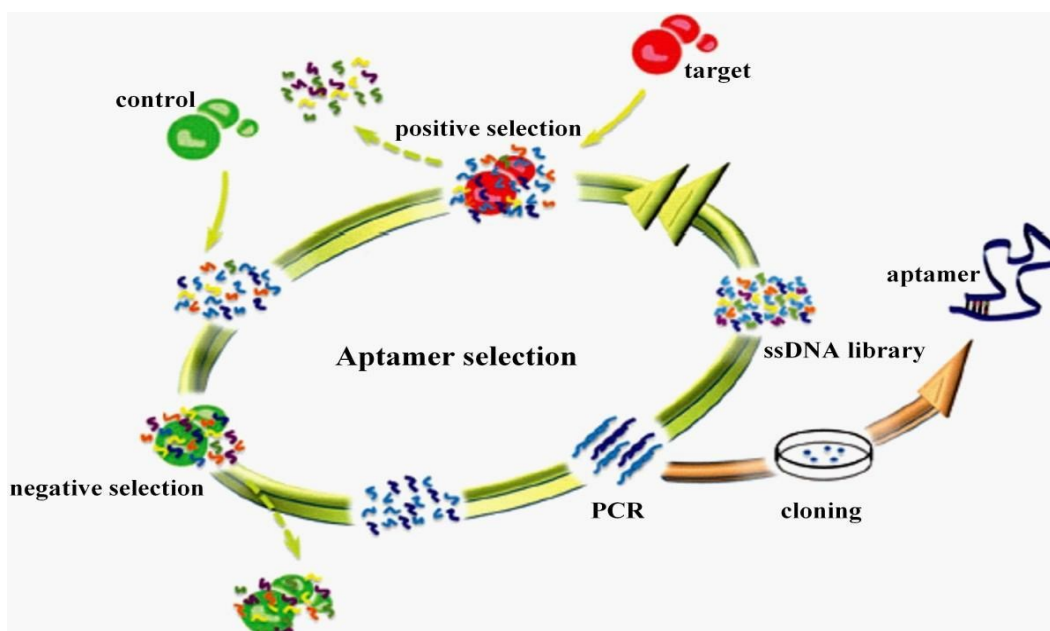
Dopo aver scoperto che grazie agli aptameri era possibile controllare la coagulazione del sangue, è stato semplice creare anche un **antidoto**, ovvero una sequenza complementare ad una regione dell'aptamero. Quando i due creano interazioni watson e crick, l'aptamero viene destrutturato e perde la sua funzione anticoagulante. **Siccome l'antidoto agisce istantaneamente, può riportare l'attività di coagulazione a livelli normali.**

4) Sempre dal punto di vista terapeutico gli aptameri possono essere usati per riconoscere un biomarcatore sulla superficie di una cellula tumorale. Questo permette sia di fare una diagnosi, ma anche di veicolare in maniera specifica un farmaco solo alla cellula tumorale (cosa che non potrei fare con l'anticorpo).

Come si fa a trovare aptameri che legano solo la cellula patologica? La tecnologia CELL-SELEX permette di trovare aptameri che riconoscono cellule patologiche anche se non sappiamo quale sia il ligando, ovvero la proteina superficiale che è diversa rispetto alla cellula normale.



1. si parte da una libreria di ssDNA e si fa una prima selezione usando le cellule patologiche per legare le molecole di DNA sulla loro superficie (come se fosse una cromatografia di affinità);
2. poi si stacca dalle cellule patologiche quello che si è attaccato e si fa una selezione negativa con le cellule normali. Tutte le sequenze presenti che vengono catturate dalle cellule normali non mi interessano, mentre quelle che non si sono legate mi interessano perchè sono quelle che legano solo le cellule malate.
3. Si fa più di un round di selezione in modo da selezionare solo le molecole di DNA più affini che ora posso studiare sequenziandole e amplificandole --> si otterrà così l'aptamero che riconoscerà solo le cellule malate.



Un aptamero già disponibile in commercio va a riconoscere il VEGF (fattore di crescita endoteliale delle cellule vascolari) e lo inibisce perchè potrebbe portare ad opacità oculare. Quindi viene usato per curare la degenerazione maculare della retina di tipo senile.

L'impiego degli aptameri come sistemi per la veicolazione specifica del farmaco alle cellule tumorali è un campo di ricerca in via di sviluppo. Uno dei problemi più grandi è dovuto al fatto che ci sono molecole anti-tumorali poco specifiche che vanno ad aggredire anche le cellule normali. Gli aptameri forniscono la possibilità di veicolare il farmaco solo alle cellule interessate poiché sono piccoli possiamo coniugarli con molecole anti-tumorali.

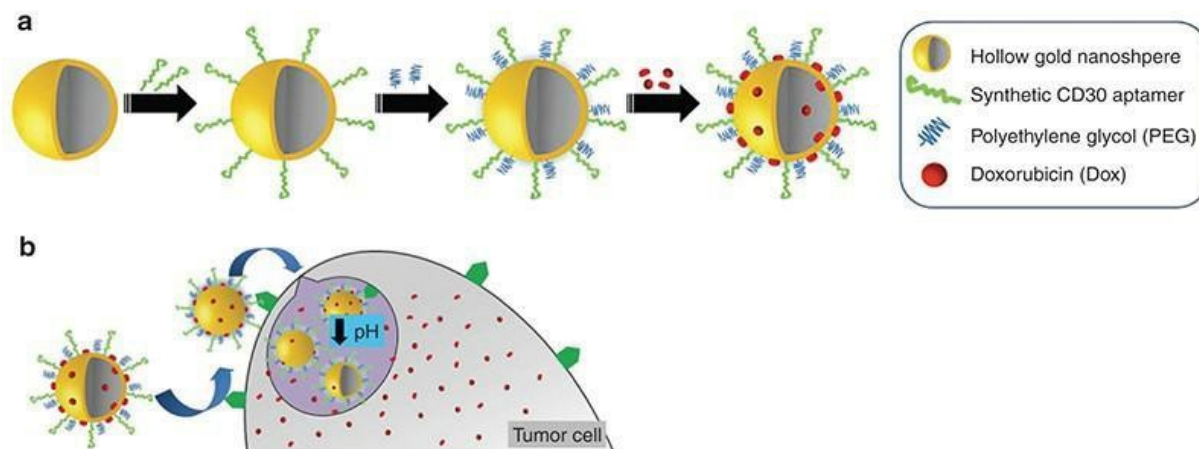
5) Gli aptameri sono anche utilizzati in sistemi complessi di nanotecnologia basati sullo stesso principio visto prima, ovvero l'interazione dell'aptamero con la molecola terapeutica.

Esempio 1: sfere d'oro per il trasporto di doxorubicina rivestite con:

- l'aptamero contro il CD30, ovvero una proteina di superficie presente nelle cellule di un lipoma.
- il polyethylene glycol per migliorare la farmacocinetica e farmacodinamica del sistema nanotecnologico. Esso permette al sistema di rimanere in circolo per un tempo sufficiente a trovare il bersaglio, sennò queste molecole vengono subito escrete dal sistema renale e catturate dal sistema reticolo endoteliale.
- Il farmaco classico (doxorubicina) che è molto tossico



In un sistema nanobiotecnologico PERO' succede che la **particella d'oro si ferma esclusivamente alle cellule tumorali**, ovvero su quelle che esprimono il CD30 (riconosciuto dall'aptamero) sulla superficie.



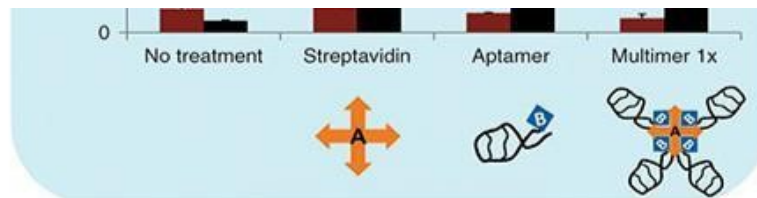
Come è stato selezionato l'aptamero contro le cellule che esprimono il CD30:

prima c'è stata una selezione tipo cell-selex, e poi un'ulteriore selezione con cromatografia di affinità (con CD30 attaccato alla colonnina). In questo caso si è ottenuta una sequenza molto specifica per quel tipo di molecola.

Esempio 2: è sempre lo stesso sistema nanotech di prima ma il farmaco utilizzato è la siRNA. Si tratta di un RNA capace di silenziare un gene (che codifica una chinasi) coinvolto nel mantenimento della vitalità e della proliferazione delle cellule malate.

6) Esistono recettori che quando arriva il segnale dimerizzano o formano multimeri per innescare la risposta intracellulare e un loro malfunzionamento può essere la causa dell'iperproliferazione cellulare in varie patologie. Si è scoperto che per fermare questo processo devono essere bloccati entrambi i recettori e non uno solo:

a molecole come la streptavidina possiamo legare un'aptamero coniugato alla biotina, e quindi far formare un complesso multimerico di aptameri. Questo può riconoscere più recettori dimerizzati o multimerizzati e quindi creare un meccanismo efficace per l'inibizione di queste cellule.



7) Gli aptameri consentono di creare molecole resistenti alla degradazione da parte di enzimi degradativi perchè non sempre le modifiche alle basi o alla struttura zucchero-fosfato consentono di mantenere l'affinità per il substrato. Per questo sono stati creati aptameri in conformazione a specchio (spiegelmer) rispetto a quelli naturali: come? (slide 137)

(in natura le proteine sono in conformazione L mentre gli acidi nucleici sono in conformazione D)

1. si crea l'isomero ottico D della proteina;
2. faccio la selezione degli aptameri (all'interno di una libreria di D-RNA) contro l'isomero ottico D della proteina;
3. una volta trovata la sequenza aptamerica più affine all'isomero ottico D della proteina naturale, sintetizzo la stessa sequenza aptamerica in conformazione L --> questa riconoscerà la proteina naturale in conformazione L.

[Quindi uso l'isomero della proteina per selezionare l'aptamero, trovo la sequenza e poi faccio l'isomero della sequenza aptamerica che andrà a riconoscere la proteina nella sua forma naturale]

Il problema in campo medico è che si è limitati dal sistema di veicolazione di queste molecole, per cui il futuro degli aptameri sarà quello di utilizzarli come molecole per riconoscere in maniera specifica le cellule ammalate.

TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE

La tecnologia del DNA ricombinante classica si basa sulla **possibilità di clonare un pezzo di DNA** all'interno di un vettore ed usarlo sia per ottenere numerose copie di quel DNA, sia per farlo esprimere, sia per creare nuove proteine. Impulsi che hanno permesso di arrivarci:

- La scoperta degli enzimi di restrizione che danno la possibilità di scegliere in maniera specifica dove effettuare il taglio sul DNA.
- La messa a punto di tecniche di sequenziamento del DNA, che permetteva una conoscenza dettagliata a livello molecolare del DNA manipolato.
- La possibilità di sintetizzare chimicamente il DNA (es i siRNA per andare a silenziare determinati geni) che permetteva la costruzione ex novo di frammenti di DNA a sequenza desiderata da utilizzare nelle ricombinazioni.

Le applicazioni del clonaggio sono diverse:

- preparare sonde (ovvero sequenza di DNA) per riconoscere determinati geni o sequenze geniche oppure i loro trascritti tramite ibridazione --> tecnica del southern blot o northern blot
- ottenere la sequenza dei geni umani, ovvero costruire una genoteca allo scopo di isolare un gene o un cDNA
- Per trascrivere un gene e ottenere quantità elevate del relativo mRNA
- Per trascrivere e tradurre un gene per ottenere quantità elevate della relativa proteina
- Per sequenziare una molecola di DNA
- Per mutare un gene creando nuove proteine (pensare ad OGM)
- Per studiare la funzione di un elemento regolativo (es.: promotore, enhancer, silencer)

I problemi etici che si sono scatenati a riguardo interessavano la modificazione di proteine e il loro inserimento in alcune specie viventi. La mutagenesi, però, ha anche permesso di creare nuove proteine che, grazie alla loro mutazione, avevano migliorato la loro funzionalità. Ad esempio proteine termostabili, meno tossiche etc --> **si parla di mutagenesi mirata**.

Il clonaggio prevede il taglio in maniera specifica del DNA con enzimi di restrizione dal genoma della cellula dal quale lo abbiamo estratto; poi lo si inserisce nel vettore (es plasmidi), e successivamente si inserisce il plasmide contenente il DNA nell'ospite (più spesso i procarioti) e da qui è possibile ottenere numerose copie oppure far esprimere il DNA clonato.

Le proteine ricombinate hanno trovato numerose applicazioni sia nel settore medico, che agrario, che chimico ad esempio creando microrganismi che digeriscono il petrolio o altre sostanze per noi dannose in ambito ambientale. L'ingegneria genetica non è sicura al 100% ma il passo avanti che ha permesso di fare è innegabile. I farmaci biotecnologici sono il 20% di tutti i farmaci. Grazie alla tecnologia del DNA ricombinante il campo biomedico si è arricchito di farmaci biotecnologici:

- antitumorali (ad esempio le interleuchine)

Tutti i farmaci conosciuti come MAB (anticorpi) sono ricombinanti, ad esempio trastuzumab, trastuzumab etc... Il trastuzumab è usato per curare il cancro alla mammella che è HER2 neopositivo. Le donne che sviluppano questo cancro hanno un'iperespressione di HER2, ovvero una proteina di superficie, che possono essere bersagliate e bloccate da questo anticorpo ricombinante --> le cellule così non hanno più segnali proliferativi e vanno più facilmente in apoptosi.

- anticoagulanti --> una volta il fattore di anticoagulazione veniva estratto dalle trasfusioni di donatori ma così facendo si aumentava il rischio di contaminazioni (es AIDS).
- farmaci antinfettivi;
- ormoni polipeptidici (es ormone della crescita, insulina, eritropoietina);

Il primo farmaco ottenuto ingegnerizzando un sistema vivente (batterico) è stato l'insulina, approvato dalla FDA nel 1982. Una volta era estratta dai maiali ma dopo un tot d'anni dava problemi di reazione immunologica e quindi di rigetto, per cui bisognava sospendere il trattamento. Sintetizzare l'insulina con questa tecnologia ha portato a risolvere questo problema e ha permesso di fare piccole modifiche alla proteina, aggiungendo altre triplete al terminale della catena (che codificano per altri aminoacidi), e questo ha permesso di creare due forme di molecola: quella ad azione rapida e quella ad effetto ritardato.

- **vaccini** e immunodolutori.

Una delle applicazioni più interessanti è la creazione di **vaccini biotecnologici**, creati clonando in una cellula procariota o eucariota il gene del microrganismo che codifica per la principale proteina immunogena, cioè quella proteina che nell'ospite porta alla produzione di anticorpi in grande quantità. Nei vaccini virali si tratta di una proteina del capsido o dell'envelope; nei vaccini batterici si tratta di proteine di adesione (antigeni delle fimbrie) o specifiche tossine modificate (anatossine).

Il primo vaccino biotecnologico creato è stato il vaccino dell'epatite B approvato nel 1986. L'epatite B rappresenta un grosso problema sanitario: il virus responsabile (HBV), oltre che causare la cirrosi epatica è anche un agente cancerogeno (cancro al fegato). Il gene virale che codifica per l'antigene di superficie è stato clonato in un vettore e quindi trasferito ed espresso in un lievito (*S. Cerevisiae*) --> l'antigene prodotto dal lievito presenta tutte le caratteristiche della proteina (antigene) nativa (glicosilazioni e altre modifiche post-traduzionali).

Nell'ambito dello sviluppo dei vaccini biotech, non si pensa solo a produrre gli antigeni ricombinanti, MA si possono creare **vaccini vivi ricombinanti**. Si tratta di batteri o virus all'interno dei quali sono stati modificati o deleti i geni che ne determinano la virulenza. Dopo ingegnerizzazione fungono da vettori di geni esogeni, esprimono cioè le proteine immunogene dell'agente patogeno verso cui si vuole proteggere l'individuo. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che possono essere utilizzati anche negli animali. La scelta di questo virus "vettore" sta nella sua resistenza: un vaccino così allestito non deve essere refrigerato e può venire liofilizzato e somministrato mediante scarificazione cutanea.

Uno dei vaccini vivi è il *vaccino contro il virus del papilloma*, in particolare contro i ceppi tumorigenici del papilloma. Esso può causare tumore alla cervice uterina nelle donne o al pene negli uomini, oppure causa di verruche ano-genitali. Questa scoperta è stata importante in primis perchè è stato il primo vaccino contro un tumore; in secundis perchè coloro che lo hanno creato hanno anche clonato una delle proteine più rappresentate nel capsido virale. Dopo averla fatta esprimere si sono accorti che quando mettevano le proteine ricombinanti in una determinata concentrazione, queste automaticamente ricostruivano il capsido del virus. Questo è un sistema che mima l'infezione naturale ma che non causa nessuna malattia perchè dentro il capsido non c'è il DNA, è vuoto!

Il futuro dell'applicazione dei vaccini biotech è di creare **vaccini edibili**, ovvero che agiscono tramite le cellule immunitarie che abbiamo nell'intestino.

È facile riuscire a clonare la proteina che sta alla base del vaccino a partire dalle piante: si estrae la proteina d'interesse dalla foglia, la si clona e si ottiene un germoglio. Poi tutta la pianta avrà quel gene.

Altre applicazioni della tecnologia del DNA ricombinante in vari ambiti:

- Nella medicina: produzione di farmaci e vaccini, diagnosi e terapie di malattie infettive, produzione di farmaci da animali e produzione di animali transgenici per il trapianto di organi (maiali).
- Nel settore zootecnico: farmaci e vaccini per animali (es mucca sembra aver sviluppato resistenza alla TBC), diagnosi e terapia di malattie infettive e parassitarie, animali transgenici e clonati.
- Nell'agricoltura: piante transgeniche resistenti: al gelo, a marcescenza, a malattie, a erbicidi, a terreni poveri; piante transgeniche per varietà florovivaistiche o per la produzione di fitofarmaci e vaccini.
- Nell'ambito chimico: sono stati clonati enzimi fermentativi che producono più etanolo o metano, oppure enzimi industriali per industrie tessili, lattiero-casearie, conciarie...

Per il clonaggio serve:

- Un metodo per tagliare il DNA in punti precisi --> tramite **enzimi di restrizione**
- Un metodo per unire covalentemente due frammenti di DNA
- Un **vettore** capace di autoreplicarsi per ottenere molte copie del DNA clonato. Tipi di vettore:
 - plasmide è quello più semplice;
 - vettori virali derivano dai virus che infettano i batteri per quanto riguarda i procarioti o da virus che infettano gli animali (vettori adenovirali --> permettono di ottenere farmaci dagli animali);
 - vettori retrovirali che consentono di inserire il DNA virale all'interno del genoma della cellula eucariotica (questi permettono di ottenere animali transgenici).
- Una **cellula ospite** per permettere al vettore di replicarsi: più spesso è una cellula batterica, ma è possibile clonare in ospiti quali il lievito o le piante.
- Un metodo di selezione delle cellule ospiti che hanno il vettore con il DNA da clonare.

La base della tecnologia del DNA ricombinante sta nella capacità di manipolare il DNA in provetta. Ciò, a sua volta, dipende dalla disponibilità di enzimi purificati. Gli enzimi a disposizione dai biologi molecolari si dividono in 4 categorie: nucleasi, DNA polimerasi, ligasi, enzimi che modificano le estremità.

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

DNAasi – agiscono solo sul DNA

RNAasi – agiscono solo sull'RNA

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

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

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

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

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

*Alcune sono in grado di agire sia su singolo che su doppio filamento, nel caso in cui si ha un'eccesso di enzima.

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

Enzimi per manipolare DNA e RNA:

1-DNA polimerasi

A) DNA dipendenti --> nella tecnologia del DNA dipendente derivano da batteri o fagi:

E. coli DNA polimerasi I (oloenzima, Klenow)

DNA polimerasi fagiche (T4,

T7) *Taq* DNA polimerasi

B) RNA dipendenti

Trascrittasi inversa (ha RNA come stampo)

C) Indipendenti da stampo

Terminal transferasi --> possono aggiungere nucleotidi indipendentemente da uno stampo.

2-RNA polimerasi

A) DNA dipendenti --> derivano tutti da procarioti

E. coli RNA polimerasi

RNA polimerasi fagiche (SP6, T3, T7)

B) Indipendenti da stampo

Poly(A) polimerasi

3-Fosfatasi e chinasi

• T4 polinucleotide chinasi --> aggiungono fosfati al 5'

• Fosfatasi alcalina --> tolgono fosfati al 5'

5. Endonucleasi

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

6. Esonucleasi

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

7. Ribonucleasi → nuclasi che tagliano l'RNA

- Ribonucleasi A (RNasi A)(endoribonucleasi, taglia dopo C e U)
- **Ribonucleasi H** (RNasi H): endoribonucleasi, taglia gli RNA nei duplex ibridi DNA/RNA--> negli ibridi DNA-RNA riconosce e degrada l'RNA: quest'attività è connessa con la trascrittasi inversa nella retrotrascrizione, per creare il filamento di DNA copia che è importante per il clonaggio.
- Ribonucleasi T1 (RNasi T1)(endoribonucleasi, taglia dopo G)

8. DNA ligasi

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

9. RNA ligasi

- T4 RNA ligasi

È stato possibile anche avere enzimi creati artificialmente:

- la **DNA polimerasi I** --> enzima che dirige l'inizio della replicazione nei procarioti, e che quando trova un filamento con un gap, è in grado di sintetizzare i nucleotidi mancanti. Visto che ha attività esonucleasica nella stessa direzione della polimerizzazione può togliere i nucleotidi davanti al gap e sostituirli con nucleotidi nuovi.
- Il **frammento di Klenow**, è una DNA polimerasi I privata dei 300 nucleotidi responsabili dell'attività esonucleasica 5'-->3'. In questo modo questa polimerasi può solo aggiungere e non togliere nucleotidi. Viene mantenuta l'attività di proofreading 3'-->5'. Applicazioni:
 - marcatura del DNA
 - riempire le estremità 5' sporgenti (fill-in) --> le sticky-end possono essere rese blunt

NB: Le nuclasi viste fin'ora hanno specificità di riconoscimento per un substrato a DNA, RNA, a singolo o doppio filamento MA non sono abbastanza precise per gli scopi del DNA ricombinante, in quanto hanno un ampio spettro di attività.

Al contrario, gli **ENZIMI DI RESTRIZIONE** sono in grado di tagliare la doppia elica di DNA in corrispondenza di specifiche sequenze palindromiche lunghe 4-8 pb, per questo sono anche dette

endonucleasi di restrizione. Esse, consentendo di tagliare il DNA in frammenti non casuali, costituiscono un formidabile strumento sia per l'analisi che per la manipolazione del DNA.

Questi sono **enzimi di restrizione di tipo II**: **enzimi che riconoscono la stessa sequenza palindromica e agiscono al suo interno**. Esistono però anche altri tipi di enzimi di restrizione (di tipo I o III) che riconoscono specifiche sequenze ma tagliano lontano da esse. Questo taglio non è molto preciso quindi non sono utili nella tecnica del DNA ricombinante.

Gli enzimi di restrizione derivano da procarioti e sono un modo con cui i batteri si difendono dall'introduzione di molecole di DNA esogeno (virale): gli enzimi di restrizione tagliano il DNA estraneo mentre il DNA batterico non viene toccato perchè è metilato sulle A. Questi enzimi esistono come sistemi di modificazione (perchè hanno metilasi associate) e restrizione (perchè hanno attività endonucleasica specifica).

NB: la palindrome è quella sequenza che letta in una direzione o nell'altra è sempre uguale. Esempio --> palindrome da 6: GAATTC e CTTAAG [NB: all'esame può chiedere di scrivere una palindrome].

Nomenclatura enzimi di restrizione:

Deriva dall'organismo di provenienza.

1. Le prime tre lettere, scritte in corsivo, sono prese da genere e specie del batterio di origine (*Escherichia coli* -> *Eco*)
2. Sierotipi (ceppi) differenti dello stesso organismo possono essere identificati da una quarta lettera minuscola (es: *Haemophilus influenzae* -> c, d, f -> *Hind*, *Hinf*).
3. Può seguire una lettera maiuscola o un numero, che identifica un ceppo particolare di quel batterio.
4. Un numero romano indica l'ordine di scoperta, qualora dallo stesso batterio vengano isolati enzimi diversi (*Haemophilus influenzae* -> *Hinf I*, *Hinc II*, *Hind III*)

Molti di questi enzimi possono avere la stessa funzione e quindi tagliare la stessa palindrome.

Le endonucleasi di restrizione riconoscono specifiche sequenze palindromiche e tagliano all'interno di esse in maniera simmetrica o asimmetrica. Nel primo caso si avranno estremità nette (blunt end), nel secondo caso si produrranno estremità coesive o sticky ends, che possono essere estremità 3' protuding o 5' protuding.

ENZIMI DI RESTRIZIONE

Enzima	Organismo di origine	Sito di riconoscimento in DNA a doppio filamento	Struttura dei prodotti del taglio
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		

Questi enzimi riconoscono più di 130 diverse sequenze nucleotidiche: sequenze palindromiche lunghe 4, 6 o 8 nucleotidi.

Quante volte taglia un enzima di restrizione?

Dipende da quanto è grande una palindrome: più è grande e più tagli l'enzima produrrà.

Se assumiamo che i 4 nucleotidi siano distribuiti a caso nelle molecole di DNA:

- per enzimi che riconoscono palindromi di 4 nt si avrà in media un taglio ogni 256 nt (4^4) --> 256 è il numero delle possibili combinazioni per dare origine alla palindrome a partire da 4 nt → si producono frammenti più piccoli;
- per enzimi che riconoscono palindromi di 6 nucleotidi avremo in media un taglio ogni 4096 nt (4^6) → si produrranno frammenti più grandi

QUINDI La probabilità di una palindrome da 4 presente in un genoma sarà molto più grande di quella di una palindrome da 8, in quanto le possibili combinazioni delle 4 basi per dar origine ad una palindrome di 8 ovviamente è minore.

(possibile domanda esame: quante volte taglia un enzima di restrizione che riconosce una palindrome da 4, 6 o da 8 nucleotidi)

Così facendo ci si può già fare un'idea che se si vuole tagliare un genoma da 10000 kb e si usa un enzima di restrizione che riconosce palindromi da 4 nucleotidi avrà tanti più frammenti e tanto più piccoli; invece se si usa un enzima che riconosce palindromi da 6, si avrà meno frammenti e saranno più grandi.

Se si vuole sapere esattamente quante volte quell'enzima di restrizione taglia un genoma bisogna misurarlo sperimentalmente. Normalmente per i nostri scopi è sufficiente avere un'idea della **lunghezza attesa dei frammenti**. Questo è molto importante perché se clono frammenti troppo

piccoli posso aver problemi nel riconoscimento dei ricombinanti: frammenti piccoli infatti sono difficili da identificarsi come vettori ricombinanti una volta che sono inseriti nel vettore appropriato.

Ci sono tanti siti dove possiamo andare a vedere gli enzimi di restrizione in varie banche dati online, nelle quali troviamo anche sia gli isoschizomeri che i neoschizomeri.

Gli **isoschizomeri** sono enzimi di restrizione che riconoscono la stessa palindrome e tagliano allo stesso modo. Gli **neoschizomeri** sono enzimi di restrizione che riconoscono la stessa palindrome ma effettuano un taglio diverso.

Gli enzimi di restrizione hanno un optimum di attività enzimatica che avviene ad una temperatura, forza ionica e pH determinati. Normalmente gli enzimi di restrizione vanno usati con il loro buffer specifico e contiene una forza ionica e un pH tali da permettere all'enzima di tagliare in maniera specifica (ovviamente anche la temperatura deve essere rispettata dallo sperimentatore). Se facciamo lavorare questi enzimi in condizioni non ottimali otterremo tagli non specifici. Anche le quantità di substrato e enzima da usare sono molto importanti per il risultato finale: siccome gli enzimi vengono forniti con un'attività espressa in unità di DNA tagliato, se alteriamo questa concentrazione otterremo attività non specifiche (o *attività star*).

Quello che si ottiene con gli enzimi di restrizione, è una serie di frammenti tagliati in maniera specifica che se si fanno correre in elettroforesi su gel di agarosio, formeranno tante bande in base in base alla loro grandezza.

Lavorando con gli enzimi di restrizione abbiamo la possibilità di effettuare tagli della sequenza di DNA in punti ben precisi --> una **mappa di restrizione** mostra la posizione di questi punti in una sequenza di DNA.

Ai primordi della biologia molecolare, le sequenze del DNA erano spesso sconosciute, infatti i biologi avevano il problema di costruire mappe di restrizione senza conoscere le sequenze del DNA. Dal momento che tali enzimi di restrizione sono molto specifici nelle loro caratteristiche e modalità di taglio, questo tipo di mappa può essere predetta sulla base della sequenza di un frammento noto di DNA.

VETTORI:

Un VETTORE è una sequenza di DNA in cui verrà inserito un gene oppure una sequenza genica (vettore che poi verrà inserito in un organismo). Sono di diversi tipi:

Sono disponibili vari tipi di vettori di clonaggio			
Vettore	Caratteristiche	Isolamento del DNA	Contenuto massimo di DNA
Plasmide	Alto numero di copie	Fisico	10 kb
Fago	Infetta batteri	Attraverso l'impacchettamento nel fago	20 kb
Cosmide	Alto numero di copie	Attraverso l'impacchettamento nel fago	48 kb
BAC	Basato sul plasmide F	Fisico	300 kb
YAC	Origine + centromero + telomero	Fisico	>1 Mb

www.3dedit.it - Zinghetti editore S.p.A. Copyright © 2016

I primi due sono di origine naturale (plasmidi e fagi), gli altri (più complessi) sono derivati dalla costruzione artificiale da parte dei ricercatori, grazie alla tecnologia del DNA ricombinante.

Perché costruirne altri di artificiali? Innanzitutto per il limite del clonaggio con i primi due vettori naturali: con un plasmide non posso clonare più di 10 kb di DNA e con un fago non più di 20 kb -- > infatti se in un plasmide inserisco troppo DNA, non riuscirà più a replicarsi (più i plasmidi sono grandi e più hanno difficoltà ad essere replicati); il limite dei fagi è che all'interno della loro testa può starci solo una certa quantità di DNA. Creando dei vettori artificiali invece riusciamo ad ottenere dei clonaggi di quantità maggiori di basi. Ad esempio:

YAC = cromosomi artificiali dei lieviti, consentono di clonare fino a quantità superiori ad una megabase di DNA.

BAC --> cromosoma artificiale derivante dal fago P1, consente di clonare fino a 300 kb

Perché c'è la necessità di clonare pezzi così grandi?

- La necessità deriva soprattutto dalla volontà di sequenziare i genomi degli organismi: se lo faccio con pezzi più piccoli mi porta via più tempo e posso ricostruire con più difficoltà le posizioni delle varie sequenze anche se c'è la mappa di restrizione. Mentre se si fa un sequenziamento con pezzi più grandi, si è facilitati in termini di tempo e di ricostruzione di come le varie sequenze si susseguono in natura.
- Inoltre mi dà la possibilità di clonare geni piuttosto grandi per poterne studiare il funzionamento e riprodurre proteine ricombinanti
- posso usarli per andare a modificare organismi inserendo cromosomi artificiali

I vettori derivanti dai fagi possono essere di **inserzione o sostituzione**:

- i primi sono vettori che contengono un sito di restrizione unico per l'inserzione di DNA estraneo;
- i secondi sono vettori con due siti di taglio, in cui la parte centrale del DNA può essere rimossa e sostituita con un frammento di DNA estraneo.

1. VETTORI PLASMIDICI

Il più semplice vettore di clonaggio e il più versatile come resa di clonaggio è il **PLASMIDE**: si tratta di un elemento genetico circolare, extracromosomale (NB: esistono plasmidi che invece possono integrarsi nel DNA dell'ospite e diventare episomi --> quelli che servono come vettori di clonaggio NON devono mai integrarsi nel cromosoma dell'ospite).

I plasmidi sono più piccoli del cromosoma batterico, e hanno grandezze diverse (da 1 kb a 250 kb). Essi portano un vantaggio nel battere: resistenza agli antibiotici; codificano per colicine batteriche, ovvero sostanze che uccidono altri batteri (per sopravvivenza); possono conferire ai batteri la capacità di metabolizzare determinate sostanze, comprese quelle tossiche per la nostra salute. Quando non si sa quale sia il vantaggio che i plasmidi possono apportare, si dice che siamo in presenza di plasmidi criptici.

Sono unità accessorie che replicano e sono ereditate indipendentemente dal DNA del cromosoma batterico.

I plasmidi naturali dipendono dagli enzimi dell'ospite per la loro replicazione e trascrizione. In particolare, la replicazione può essere sotto controllo più o meno stretto da parte dell'ospite: se i plasmidi hanno un ciclo replicativo poco controllato può succedere che replichino più volte in maniera non totalmente dipendente dalla riproduzione dell'ospite e si ritroveranno in numerose copie al suo interno.

Ci sono dei meccanismi molecolari precisi che mantengono un numero stabile di copie del plasmide nella cellula ospite e assicurano la loro ripartizione tra le cellule figlie.

I plasmidi coniugativi sono plasmidi che contengono geni di trasferimento (*tra*) che permettono ai batteri capaci di formare il pilo sessuale di trasferire il plasmide ad un altro ospite. È questa la motivazione per cui si possono creare batteri molto resistenti.

I plasmidi normalmente esistono nei procarioti, ma possono esistere anche nei lieviti in forma lineare o circolare. I plasmidi lineari possono conferire al lievito il vantaggio di produrre tossine che eliminano altri lieviti.

Esistono plasmidi che possono essere presenti solo in una specie di procarioti e altri che possono passare da un procariote all'altro senza specificità (questi ultimi sono i più temibili). *Da cosa dipende dal fatto che possono andare in specie diverse?*

Dipende dal numero di geni che si trova nella regione di origine di replicazione (*ori*): **maggiore è il numero di geni nella regione *ori* e maggiore è la possibilità di replicarsi in ospiti diversi** --> se è più grande infatti, è più probabile che ci siano sequenze consenso riconosciute da più specie; se invece *ori* è piccola avrà 1-2 sequenze consenso che possono essere riconosciute solo da una specie specifica.

Se si dividono i plasmidi per le capacità di conferire un vantaggio, allora troveremo:

- **plasmidi F** che sono in grado di creare il trasferimento (tramite i geni *tra*) da un batterio donatore ad uno ricevente;

- **plasmidi R**: portano geni per la resistenza agli antibiotici --> per di più geni che inattivano l'antibiotico o trovano un escape metabolico per superare il problema dell'antibiotico. Alcuni plasmidi hanno anche resistenze diverse, e tra questi ce ne sono anche di coniugativi.
- **Plasmidi col**: producono tossine batteriche che eliminano i concorrenti batterici
- **plasmidi di virulenza**: sono portatori di tossine che rendono il ceppo batterico più patogeno (codificano per enterotossine)
- **plasmidi metabolici**: conferiscono vantaggio metabolico: il più famoso è quello che conferisce alle leguminose la capacità di fissare l'azoto.

I plasmidi di interesse medico sono quelli della resistenza agli antibiotici (R), interessanti anche per il clonaggio: è proprio la resistenza che questi plasmidi portano che sarà una delle caratteristiche con le quali potremmo selezionare i cloni ricombinanti.

Un altro tipo di classificazione dei plasmidi che possiamo fare è in base alle loro capacità:

- **plasmidi coniugativi** (plasmidi F)
- **plasmidi non coniugativi**
- **plasmidi ad alto numero di copie** --> detti anche rilassati perchè la loro replicazione non è sotto controllo stringente dell'ospite e possono essere presenti in elevato numero di copie nell'ospite. I plasmidi piccoli sono più "rilassati" di quelli grandi.
- **plasmidi a basso numero di copie** --> detti anche stringenti, di solito sono i plasmidi di grandi dimensioni.
NB: un plasmide di dimensioni medie può essere o rilassato o stringente a seconda della composizione della sua origine di replicazione. Sicuramente non troveremo plasmidi rilassati in plasmidi grandi!

I plasmidi coniugativi sono un problema per lo sviluppo di farmacoresistenze. Tramite la tecnologia del DNA ricombinante possiamo creare più specie diverse ma bisogna prestare attenzione a non immettere nell'aria batteri ingegnerizzati che siano nocivi nei confronti di altre specie. Per questo motivo **i plasmidi usati come vettori ricombinanti non hanno i geni per poter essere trasferiti da un organismo ad un altro.**

C'è la possibilità anche che i plasmidi siano incompatibili tra di loro, quindi che non possano esistere all'interno dello stesso ospite. L'**incompatibilità** si osserva quando un plasmide entra in una cellula dove è già presente un plasmide simile: il nuovo plasmide non può essere mantenuto e viene perso nei successivi cicli di divisione batterica. Questo fenomeno è controllato dai geni coinvolti nella regolazione della replicazione plasmidica. I plasmidi che condividono lo stesso sistema di replicazione appartengono allo stesso gruppo di incompatibilità (Inc) e sono tra loro incompatibili. Perchè un batterio possa contenere diversi tipi di plasmidi, questi non devono essere strettamente correlati.

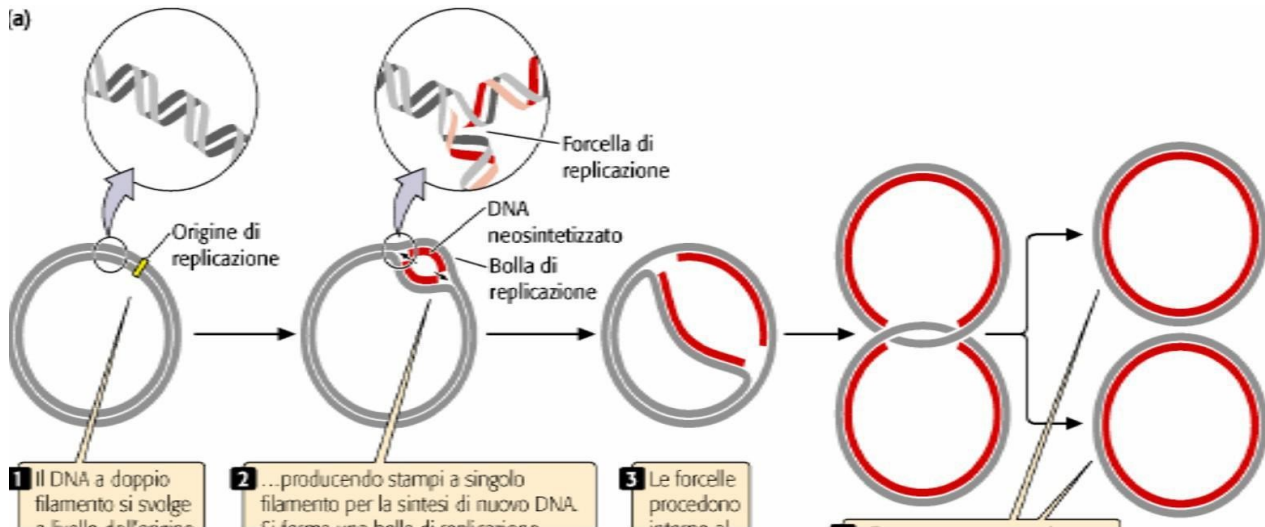
Replicazione plasmidica: (domanda che sempre che c'è sempre nell'esame)

La caratteristica più importante dei plasmidi è quella di essere dei "**repliconi**", cioè molecole capaci di replicazione autonoma, che è conferita loro dalla presenza di un'origine di replicazione (*ori*). La replicazione dei plasmidi può essere unidirezionale o bidirezionale siccome sono piccoli. Può essere

una replicazione teta o per circolo rotante. Quest'ultima è importante perchè i plasmidi che la utilizzano sono capaci di produrre singoli frammenti di DNA utili per il sequenziamento genico!

L'origine di replicazione è molto importante perchè controlla: il numero di copie; la specificità dell'ospite (con la possibilità di avere più o meno sequenze per il riconoscimento di proteine che iniziano la replicazione); la possibilità di avere i geni di incompatibilità.

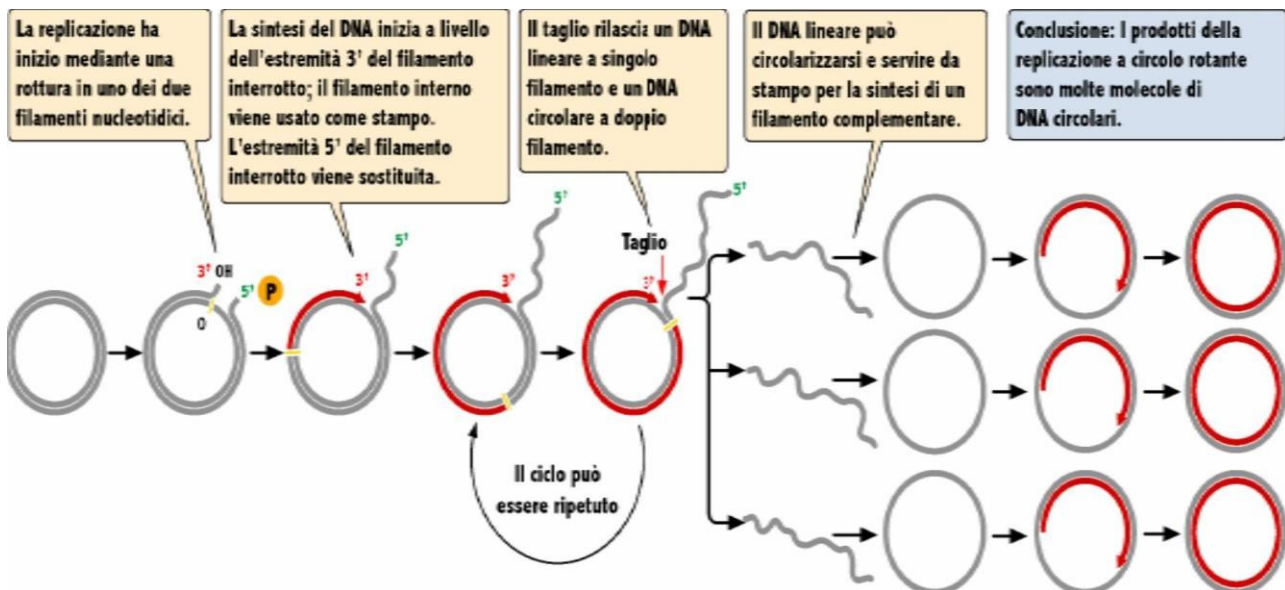
La replicazione teta:



è quella classica bidirezionale: alla fine si formano i concatameri anche nel batterio ospite, che vengono risolti dalla topisomerasi di tipo II.

In questo caso la duplicazione avviene a seguito dell'apertura dei due filamenti di DNA che compongono il plasmide in corrispondenza di una zona precisa (origine di replicazione ori); successivamente vengono sintetizzati due primer di RNA, ciascuno complementare ad uno dei due filamenti di DNA. A questo punto la DNA polimerasi comincia la sintesi del DNA che sarà continua in un filamento e discontinua nell'altro. I primer di RNA vengono sostituiti da frammenti di DNA e vengono uniti tutti i frammenti neo sintetizzati in modo da formare una copia esatta del plasmide di origine. --> alla fine si otterranno due molecole di DNA circolari.

Replicazione a circolo rotante:



La replicazione è importante nella tecnologia del DNA ricombinante perchè dovremmo disporre di un gran numero di copie del plasmide. Infatti i plasmidi vengono estratti dai batteri dopo averli fatti replicare. Esistono sistemi (kit) che permettono di separare il piccolo plasmide rispetto al grande cromosoma del batterio. Attenzione --> alcuni batteri possono perdere la capacità di deconcatenare i plasmidi, PER CUI quando abbiamo purificato il plasmide dobbiamo fare la corsa in gel di agarosio per verificare che sia tutto apposto: infatti spesso capitano delle bande che hanno peso molecolare non atteso, e si tratta appunto di concatameri.

Una volta replicati i plasmidi, il batterio si divide: *come sono ripartiti i plasmidi nelle cellule figlie?*

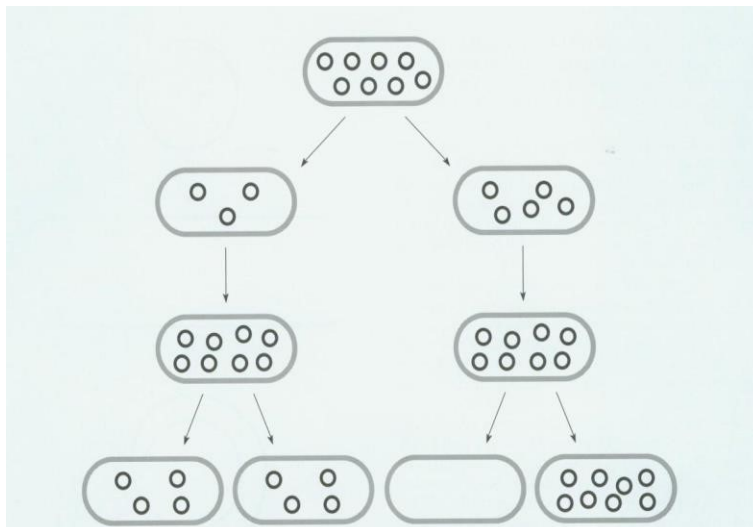
- la presenza dei **geni par** (di ripartizione/di segregazione) fa sì che dopo la divisione un plasmide va in una cellula e uno nell'altra --> è fondamentale per i plasmidi a basso numero di copie.
- la mancanza di questa regione può portare ad una incorretta ripartizione durante la divisione cellulare fino alla perdita del plasmide in condizioni di stress (vale anche per plasmidi ad alto numero di copie). Infatti può accadere che i plasmidi vadano tutti in una cellula figlia, in questo modo l'altra ne rimane priva.

Se i due plasmidi contengono la stessa regione par e utilizzano lo stesso meccanismo di replicazione allora sono incompatibili.

QUINDI quando lavoriamo con plasmidi possiamo avere due situazioni:

- 1) nel primo caso il plasmide è segregativo, quindi quando la cellula ospite si replica i plasmidi si ripartiscono nelle due cellule figlie;
- 2) in un altro caso può accadere che dopo la replicazione la ripartizione sia casuale: alcuni avranno vantaggi derivati dalla presenza dei plasmidi e altri no.

I plasmidi vengono mantenuti nell'ospite solo se viene mantenuta la pressione selettiva. Ciò significa che se ho un batterio con un plasmide per la resistenza all'ampicillina, il batterio mantiene il plasmide solo fin quando io metto nel terreno l'ampicillina; se la tolgo dal terreno, quando farò l'estrazione del plasmide mi ritroverò con poco prodotto, proprio perchè una volta che è stata persa la pressione selettiva il batterio non ha più necessità di mantenere quel plasmide. Il plasmide quindi si diluisce alle cellule figlie fino a farlo scomparire definitivamente --> la perdita del plasmide è detta **CURING**.



MECCANISMO DEL CLONAGGIO:

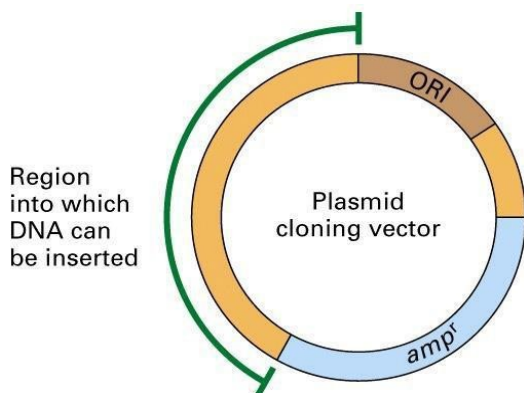
- 1) **DIGESTIONE:** taglio del DNA che ci interessa dal genoma dell'organismo e taglio del vettore di clonaggio tramite gli stessi enzimi di restrizione.
- 2) **LIGAZIONE:** unione del DNA tagliato e del vettore.
- 3) **TRASFORMAZIONE:** inserimento del vettore ricombinante (= contenente il DNA da clonare) nella cellula ospite (batterio, lievito..). -> "trasformazione" è il termine usato se si usano i plasmidi come vettori.
- 4) **PIASTRAMENTO:** replicazione dei cloni nel terreno di coltura, in modo che producano numerose copie del DNA d'interesse. La crescita può avvenire sia in terreno liquido che solido
- 5) **SELEZIONE:** riconoscimento dei batteri che contengono il vettore ricombinante. Questo passaggio è fatto perchè se dal punto di vista teorico queste operazioni sono impeccabili, dal punto di vista pratico non lo sono al 100%. Può succedere infatti che alla fine ci troviamo con ospiti che hanno integrato il vettore ricombinate, altri che hanno integrato il vettore e basta e altri che non hanno integrato nulla -> quindi bisogna discriminare solo quelli che contengono il vettore ricombinante.

Digestione e ligazione

Il passaggio più semplice è il taglio del DNA con un enzima di restrizione, e con lo stesso enzima taglio anche il vettore. L'enzima produce estremità sticky ends complementari quindi mescolando il DNA con il vettore si formerà il vettore ricombinante.*La ligazione dunque è quel processo mediante il quale la ligasi forma il legame fosfodiesterico tra l'estremità 3'OH e 5'-P di molecole di DNA adiacenti.

Usando 2 enzimi di restrizione si avrà un inserimento unidirezionale, perchè una sola combinazione sarà possibile. Usando un enzima solo invece, il frammento di DNA si può inserire all'interno del vettore in un orientamento o nell'orientamento antiparallelo. L'inserimento unidirezionale è importante quando costruiamo vettori per l'espressione di proteine, perchè l'inserito deve mettersi nel modo corretto rispetto al promotore, in modo che accanto al promotore compaia alla distanza corretta la ORF che conterrà la tripletta d'inizio (ATG).

Caratteristiche del vettore plasmidico:



gli elementi essenziali del vettore plasmidico sono:

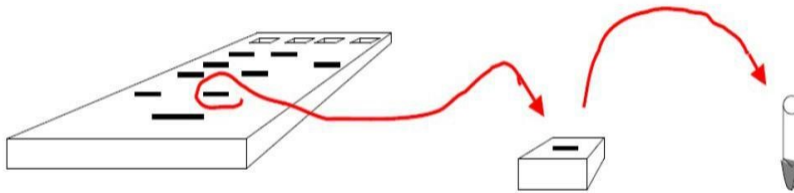
- 1- una regione in cui è possibile inserire il DNA da clonare (**sito multiplo di clonaggio** o poly-linker) (MCS);
- 2- un'**origine di replicazione (ORI)**;
- 3- una regione che porta un **marcatore di selezione** dei cloni ricombinanti (di solito sono 2 marker).

La regione all'interno della quale viene clonato il DNA è piccola e si chiama sito multiplo di clonaggio = **regione all'interno della quale ci sono i siti di restrizione UNICI per diversi enzimi di restrizione.**

Questo perchè se ci fossero più siti di restrizione all'interno del sito di clonaggio per un certo enzima di restrizione, non si saprà con esattezza dove il DNA è inserito --> invece, siccome quando faccio il clonaggio devo aver chiaro dove si sia inserito il DNA, i siti devono essere UNICI.

Quando prepariamo i plasmidi bisogna controllare la loro qualità: deve essere superavvolto e non deve essere danneggiato nelle fasi di estrazione. La forma superavvolta in un'elettroforesi si vede perchè è quella che corre più velocemente; la forma linearizzata invece è più lenta ed è seguita dalla forma circolare aperta (dopo aver introdotto un nick, infatti, il plasmide non è più in grado di rimanere superavvolto).

***NB:** prima della ligazione occorre far effettuare una corsa elettroforetica al DNA digerito, in modo che posso purificare solo il frammento di grandezza desiderata che corrisponde al pezzo di DNA d'interesse. Dopo aver fatto l'elettroforesi excido dal gel, con un bisturi, specifiche bande corrispondenti a geni o porzioni di DNA di nostro interesse. Oggi ci sono gel di agarosio low melting che possono essere attaccati dall'enzima agarasi che permettono di rendere più semplice la purificazione del frammento: prendo il pezzetto di gel con sopra il DNA, lo metto in una provetta e lo scaldo ad una temperatura tra i 37°- 40°, centrifugo, butto via l'agarosio e rimane il DNA purificato sul fondo della provetta.



Inserimento del vettore plasmidico nella cellula ospite

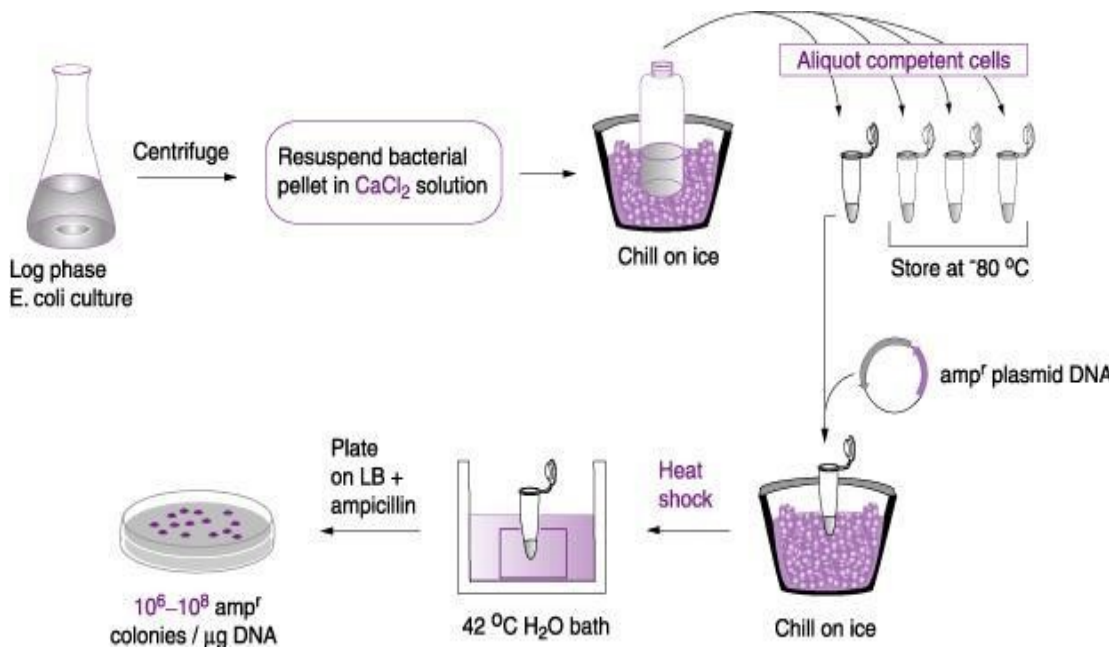
Si utilizzano sistemi di tipo chimico fisico che prevedono uno shock osmolare e uno shock termico, oppure in alternativa ci sono sistemi elettrici (es elettroporazione) che prevedono la formazione di pori transienti all'interno della membrana batterica mediante scariche elettriche. Tutti i sistemi hanno come principio quello di creare buchi sulla membrana batterica in modo che il vettore ricombinante possa entrare.

L'introduzione di DNA estraneo all'interno dei batteri è detto TRASFORMAZIONE, che è diverso dall'inserimento di DNA estraneo mediato da un fago, chiamato TRASDUZIONE, diverso ancora dal trasferimento di DNA da un batterio all'altro mediante la produzione del pilus, detto CONIUGAZIONE.

È indispensabile usare **batteri con certe caratteristiche:**

- non devono avere gli enzimi di restrizione con i quali eseguo il clonaggio, perchè senò taglierebbero il clone che ho aggiunto;
- non devono contenere plasmidi senò non posso fare un'accurata selezione;
- devono essere negativi per la ricombinazione per evitare l'integrazione dell'inserito.

Meccanismo di trasformazione e piastramento:



1. I batteri, per dare un buon risultato e resistere alle varie fasi, devono essere ben nutriti e devono essere raccolti quando sono in fase logaritmica. Si sottopongono quindi ad uno shock chimico mettendoli in una soluzione di cloruro di calcio a contatto con ghiaccio;
2. A questo punto sono divisi in aliquote e vengono messi a -80° (si dice che "*ho fatto le aliquote delle cellule competenti a ricevere il plasmide*").
3. Quando si deve clonare, si scongela un'aliquota mettendola in ghiaccio e si aggiunge il vettore ricombinante.
4. Dopo si dà uno shock termico portando la soluzione a 42°: ciò permette di far entrare il plasmide all'interno dell'ospite.
5. Poi i batteri vengono piastrati, mettendoli a crescere su terreno liquido insieme all'antibiotico (marcatore di selezione del vettore) --> i batteri che crescono sono quelli resistenti all'antibiotico e quindi quelli che hanno incorporato il plasmide. (vedi parte successiva per capire)

Selezione

La trasformazione batterica prevede poi la selezione dei batteri che hanno incorporato i plasmidi da quelli che non li hanno incorporati : solo una piccola percentuale (inferiore allo 0,01%) di batteri viene efficientemente trasformata. Questo non è un problema, in quanto i batteri crescono molto velocemente, quindi è possibile far replicare quei pochi batteri trasformati molto rapidamente.

Il **marcatore di selezione** è indispensabile per questa fase: normalmente è un gene per la resistenza ad un antibiotico. Quindi quando si aggiunge un antibiotico (es ampicillina) al terreno di crescita, gli unici batteri che continueranno a moltiplicarsi saranno quelli resistenti, ovvero quelli che hanno il marcatore e quindi il vettore.

Poi, i batteri cresciuti vengono sottoposti ad una seconda selezione per distinguere quelli che hanno il plasmide da quelli che hanno il plasmide ricombinato. A questo scopo è indispensabile il secondo marcatore.

Ligazione (più specifica)

La ligazione è un processo molto preciso, quindi c'è bisogno che ci sia una complementarità perfetta tra le basi e ci sia un'asse nel fosfato 5' e nel 3'OH tale da permettere il legame fosfodiesterico. Il limite e il vantaggio della ligasi è che i frammenti che si giustappongono devono essere perfettamente complementari. Per il clonaggio non si usa la ligasi dei mammiferi ma si usa quella dei fagi --> la ligasi che si usa per i plasmidi proviene da un batteriofago.

Solo frammenti con estremità coesive compatibili possono essere facilmente legati covalentemente dalla ligasi.

Se, invece, bisogna legare estremità "blunt", la ligazione è più difficile e si effettua a bassa temperatura e a più elevata concentrazione di enzima e di frammenti da legare per favorire l'incontro delle molecole --> è molto meno efficiente di un clonaggio con estremità sticky.

La ligazione va ottimizzata rispetto a:

- concentrazione del DNA: totale, dell'inserito e del vettore:
 - Bassa concentrazione di DNA totale favorisce le reazioni di primo ordine (intramolecolari) come la ricircolarizzazione del vettore.
 - Alta concentrazione di DNA totale favorisce il legame intermolecolare (insetto-vettore). La concentrazione dipende dalla grandezza del DNA da clonare.
- Temperatura e tempo di reazione: si contrappongono due aspetti opposti: la stabilizzazione dell'appaiamento tra estremità coesive, ottimale a basse temperature, e l'attività enzimatica della ligasi, massima a 37°. si utilizza spesso una temperatura di 16° per 12 h.

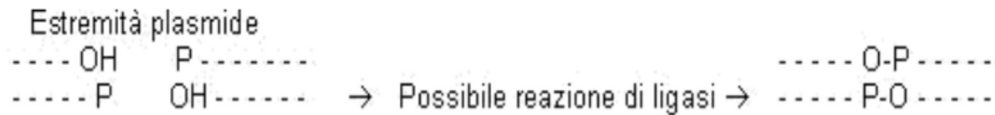
Può succedere che, anche se abbiamo adottato tutte le precauzioni del caso, una parte di vettore può richiudersi su se stesso senza legarsi all'inserito -> Problema:

più un vettore è piccolo e più ha probabilità che entri meglio nel battere e che i batteri siano più veloci nel replicarlo. Ciò significa che un vettore che non contiene l'inserito viene favorito nell'ambito della trasformazione! Per cui devo evitare il più possibile di avere anche solo poche copie di vettore che si richiude su se stesso durante il clonaggio, senno' questo rischia di essere troppo poco efficiente.

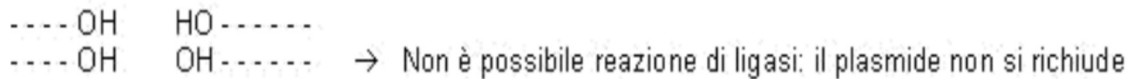
A tal proposito i ricercatori hanno pensato di **togliere il fosfato al 5' dal vettore** prima di aggiungere l'inserito --> questo si fa **con la fosfatasi alcalina**. Quindi subito dopo aver tagliato il vettore con gli enzimi di restrizione, lo si fa reagire con la fosfatasi alcalina e POI si aggiunge l'inserito.

Questo non dà la garanzia al 100%, anche perchè gli errori possono esserci in ogni passaggio, ma favorisce sicuramente la buona riuscita del clonaggio.

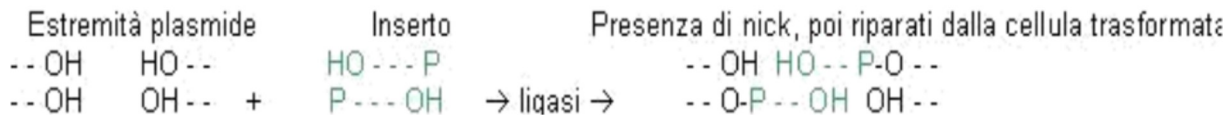
Nel momento in cui inserisco il DNA, una parte verrà legata dalla ligasi, ma l'altra parte (quella dove ci dovrebbe essere stato il 5' fosfato del vettore) non viene legata dalla ligasi perchè le estremità non combaciano --> si crea un nick. Per cui, **il vettore ricombinato quando viene trasferito ha 2 nick**, i quali verranno successivamente riparati dagli enzimi dell'ospite.



Con l'uso della fosfatasi alcalina:



... ma con l'inserto (che possiede i fosfati in 5'):



Questo è quello che avviene clonando con sticky ends MA ci sono alcuni enzimi di restrizione che producono estremità nette (blunt):

le estremità nette prodotte da un enzima possono essere legate ad altre estremità nette prodotte da qualsiasi altro enzima, senza limitazioni imposte dalla complementarità delle basi delle codine appiccicose. Svantaggi:

- una ligasi che produce estremità blunt è meno efficiente perchè non ha appaiamento tra codine a singolo filamento;
- la sequenza ibrida che si forma non è riconosciuta da nessuno dei due enzimi di restrizione.

Quando facciamo avvenire una reazione le concentrazioni devono essere precise

Calcolo del rapporto Inserto (I) /Vettore (V) per il clonaggio: (rec 1h15)

[DNA Tot] ≥ 10-20 ng/µl

Rapporti molari I:V --> da 3:1 a 1:1

Vol. fin. = 10-20 µl.

Calcolo delle moli di DNA: si considera il PM medio di una coppia di basi pari a 660

Dalton: moli = g/660 x bp

Esempio : Vogliamo ligare 50 ng di un vettore di 10 Kb con un inserto di 1 Kb, in due separate reazioni, utilizzando due rapporti molari: I/V 1:1 e I/V 3:1.

--> Rapporto I/V = 1:1

50 ng/10 kb = x ng/1 kb

x ng = 50/10 x = 5ng

--> Rapporto I/V = 3:1 x = 15 ng

1°ESEMPIO:

Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con estremità sticky 5' protuding --> si fa il **filling in**: poiché il mio inserto è tagliato blunt io riempio le sticky del vettore usando un enzima chiamato frammento di Klenow, ovvero una DNA polimerasi I batterica modificata, in quanto priva dell'attività 5'-3' esonucleasica. A questo punto ho reso blunt le estremità del vettore.

2°ESEMPIO:

Clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con un'estremità sticky 3' protuding --> si fa il **flimming**: non posso adoperare le klenow, quindi uso un'attività esonucleasica per togliere l'estremità 3' protuding.

3° ESEMPIO:

clonaggio di un frammento con estremità blunt in un vettore con estremità sticky, oppure con estremità blunt. Siccome l'efficienza delle ligazioni "blunt" è abbastanza più bassa di quella di ligazioni con estremità sticky, è possibile usare dei **linkers** per creare estremità sticky a partire da estremità blunt. I linkers sono corti duplex che contengono la palindrome desiderata per l'enzima di restrizione che voglio. Allora prendo il mio inserto, lo metto in presenza di un'elevata concentrazione di linker e metto la ligasi.

Nonostante l'aggiunta di un linker implichi una ligazione blunt end, utilizzando elevate concentrazioni molari di linker, si migliora notevolmente l'efficienza di ligazione.

4° ESEMPIO:

clonaggio di un frammento con estremità sticky di un enzima in un vettore che ha un altro sito per un altro tipo di sticky ends. In altre parole ho potuto tagliare il frammento con un enzima di restrizione che mi dà sticky ends, ma non trovo nel sito multiplo di clonaggio del vettore la palindrome per creare quelle stesse sticky. Quindi aggiungo degli **adapters**, ovvero coppie di brevi oligonucleotidi sintetici che hanno complementarità parziale e si appaiano tra loro creando un frammento a doppia elica con estremità coesive differenti.

Questi adapter contengono nella parte centrale (duplex) la palindrome con la quale potrò clonare all'interno del vettore, mentre nella parte a singolo filamento sono complementari con le sticky ends prodotte con il taglio del frammento.

5° ESEMPIO: CODA OMOPOLIMERICA

Un'ulteriore strategia per aggiungere estremità coesive a molecole di DNA consiste nell'utilizzare la **terminal deossinucleotide transferasi** (terminal transferasi). Questo enzima catalizza l'aggiunta, stampo indipendente, di nucleotidi trifosfati all'OH in posizione 3'. Quando incubato in presenza di un singolo deossiribonucleotide trifosfato (es dCTP), quest'enzima catalizza l'aggiunta di una coda omopolimerica di questo deossiribonucleotide all'estremità 3' terminale. Sottoponendo il vettore e l'inserto a trattamento con terminal transferasi con due deossiribonucleotidi diversi (dCTP e dGTP), le due molecole diventano complementari tra loro e possono essere ligate.

In altre parole la terminal transferasi sintetizzerà una coda omopolimerica di G che si aggancierà al 3'OH del vettore, e una coda omopolimerica di C che si aggancierà al 3'OH dell'inserto. In questo modo i due diventeranno complementari e si legheranno.

Selezione (più specifica)

Come è stato detto prima, le selezioni che si eseguono sono due:

- la prima si fa per discriminare i batteri vuoti da quelli che hanno il plasmide -> si fa grazie ad un marcatore sul polylinker, ovvero un gene per la resistenza ad un antibiotico.
- la seconda si fa per discriminare i batteri contenenti il plasmide da quelli contenenti il plasmide ricombinante.



Questa seconda selezione avviene grazie ad un **secondo marcatore di selezione, all'interno del quale c'è il sito multiplo di clonaggio.**

Una volta questo secondo marcatore era la resistenza per un altro antibiotico:

- prima si coltivano i batteri in ampicillina in modo che crescano tutti quelli che hanno il vettore;
- poi si mettono in tetraciclina in modo che crescano solo quelli che possono esprimere la tetraciclina e che quindi NON sono ricombinanti:

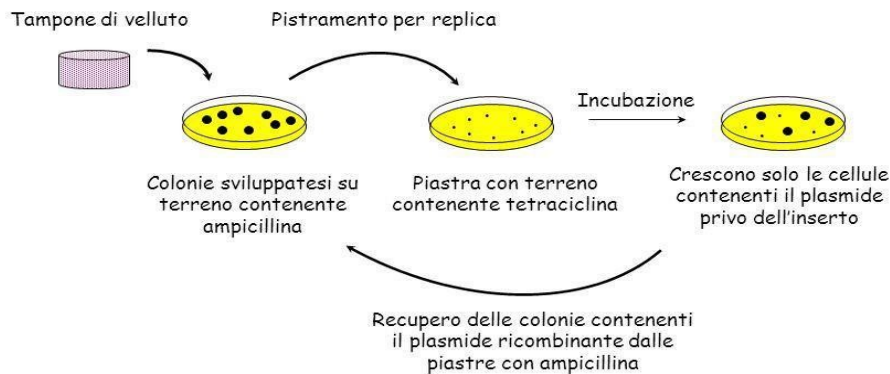
questo avviene perchè se il DNA da clonare è stato inserito all'interno del sito multiplo di clonaggio, allora il gene per la resistenza alla tetraciclina è stato distrutto, quindi i batteri ricombinanti sono quelli morti.



piastramento per replica:

ANALISI dei PLASMIDI RICOMBINANTI

PIASTRAMENTO PER REPLICA



- si fanno crescere i batteri su piastre di terreno solido (con tanto di segni per la direzionalità) contenente ampicillina in modo che si formassero delle colonie;
- si appoggia una specie di tampone di velluto della grandezza della piastra in modo che veniva prelevato un pezzetto di ogni colonia e lo si fa appoggiare su un'altra piastra (nello stesso orientamento dell'altra) contenente tetraciclina.
- Dopo incubazione crescono solo le cellule contenenti il plasmide privo dell'inserto e che quindi non sono ricombinanti.
- A questo punto si recuperano le colonie contenenti il plasmide ricombinante dalle piastre

con ampicillina (dal confronto tra le due piastre possiamo sapere quali sono le colonie ricombinanti, visto che avevamo rispettato la direzionalità).

QUINDI le colonie di batteri che ospitano il DNA ricombinante sono ampicillina-resistenti e tetraciclina-sensibili.



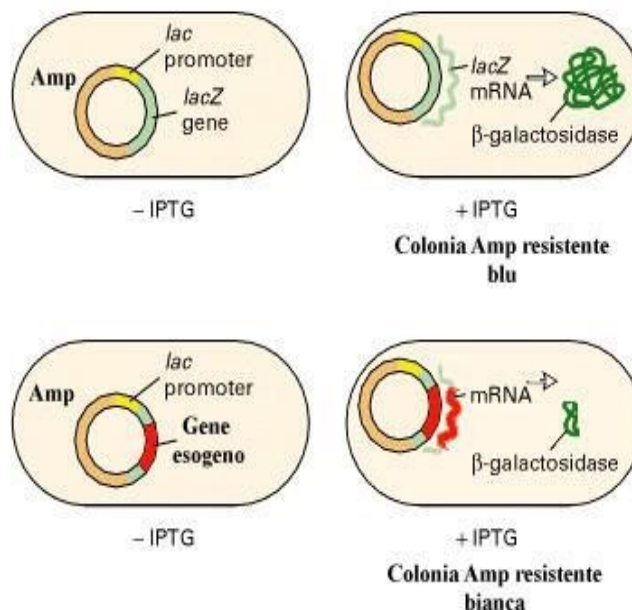
Il fatto di avere un secondo marcatore all'interno del quale c'è il MCS, determina l'**inattivazione inserzionale**, in quanto l'inserimento del DNA che voglio clonare inattiva un certo gene.

Sebbene lo schema di questi esperimenti rimanga concettualmente valido, questo tipo di selezione dei cloni ricombinanti non è più in uso, perché la selezione in due passaggi implica che bisogna attendere un giorno in più per conoscere i risultati finali della clonazione. Oggi quindi si usa un'altra tecnica per fare la seconda selezione, che prevede l'utilizzo dell'enzima beta-galattosidasi: il MCS si trova all'interno del gene *lacZ'* che codifica per un alfa-peptide funzionale della beta-galattosidasi, ovvero uno degli enzimi che fa parte del promotore del lattosio (*lac operon* batterico), che consente di metabolizzare il lattosio. L'alfa-peptide è solo una delle componenti della beta-galattosidasi, le altre componenti deve avercele il batterio. Si usano dunque ospiti batterici che hanno nel *lac operon* la beta-galattosidasi difettiva dell'alfa-peptide, quindi che non possono formare una beta-galattosidasi funzionale.

La beta-galattosidasi, oltre al lattosio, può metabolizzare anche un substrato cromogenico (**X gal**) funzionale che da incolore, dopo essere stato metabolizzato, precipita sottoforma di colore blu:

- se i batteri hanno il plasmide ricombinante, l'alfa-peptide non può essere prodotto, la beta galattosidasi non funziona e le colonie batteriche, dopo aver fornito il substrato, rimangono bianche.
- se invece il plasmide non contiene l'inserito, il gene *lacZ'* è in grado di codificare l'alfa-peptide, il quale permetterà il normale funzionamento della beta-galattosidasi, la quale in presenza del substrato lo metabolizzerà e la colonia diventerà blu.

NB: Siccome il *lac operon* è inducibile, al momento dell'induzione si dà l'induttore, ovvero la sostanza in grado di stimolare la trascrizione: si tratta dell'**isopropiltio-beta-D-galattoside (IPTG)**.



Bisogna tuttavia notare che:

- Il saggio può dare un certo numero di falsi negativi, cioè colonie blu che in realtà sono ricombinanti. Questo si verifica spesso con inserti piccoli di DNA (<500 bp)
- Il saggio può dare falsi positivi, cioè colonie bianche che in realtà non sono ricombinanti. Questo si può verificare se il ceppo accumula mutazioni nei geni lacZ, oppure pur portando l'inserto da clonare questo non altera la cornice di lettura (ad es. perché è molto piccolo).

Limiti di clonaggio in vettori plasmidici:

- bassa efficienza di trasformazione e bassa densità a cui si possono crescere le colonie
- limitata capacità di contenuto (5-10 kb)
- difficile usarli per il sequenziamento del DNA perché i frammenti prodotti sono troppo piccoli

2. VETTORI FAGICI

Sono vettori naturali basati sui fagi che infettano batteri, animali o piante; sono più grandi di quelli plasmidici: possono contenere circa 20 kb di DNA.

I virus usati per il clonaggio sono più spesso batteriofagi che portano il loro DNA sottoforma di doppio filamento (es: fago lambda). Clonare con batteriofagi significa avere un'**efficienza di clonaggio nell'ospite che è quasi del 100%**:

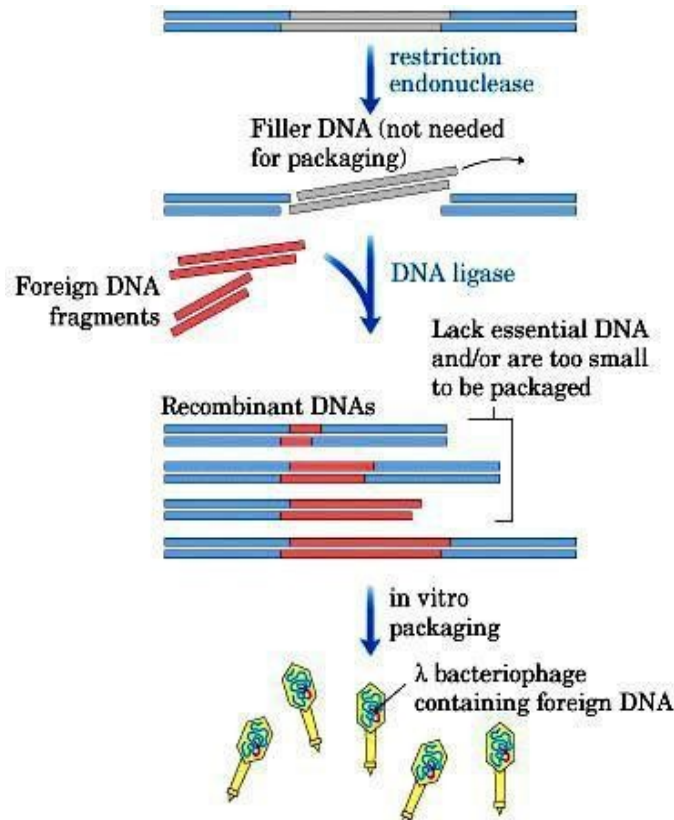
si infettano infatti i batteri con dei batteriofagi ricombinanti, ovvero che contengono nel loro DNA il frammento che intendiamo clonare. Loro poi lo iniettano nel battere come se fosse il loro DNA (non occorre sottoporre il battere a elettroporazione) --> TRASDUZIONE.

I batteriofagi possono eseguire due tipi di ciclo: ciclo litico e lisogenico. Nel primo si replicano e poi uccidono il batterio. Nel secondo integrano il loro DNA nel cromosoma dell'ospite (sottoforma di profago), dal quale usciranno per fare il ciclo litico.

NB: Il virus quando infetta un batterio e le condizioni sono buone farà il ciclo lisogenico, e uscirà quando le condizioni non sono più ottimali. Dal punto di vista concettuale il batteriofago avrà i geni per l'integrazione del DNA, tutti i geni per la replicazione, e i geni per uscire dall'integrazione. Ad esempio quando si cambia la temperatura ad un batteriofago temperato questo esce subito dal batterio.

I vettori fagici sono usati togliendo dal DNA dei fagi ciò che non ci interessa: **il cromosoma fagico NON deve assolutamente integrarsi nel DNA dell'ospite -> quindi i vettori su base fagica sono stati resi difettivi di tutti i geni della lisogenia**: al posto di essi viene inserito il DNA da clonare.

Come si effettua il clonaggio:



1. la preparazione del vettore e dell'inserto tramite digestione con endonucleasi di restrizione è la stessa vista nei plasmidi.
2. Il vettore fagico e il frammento di DNA esogeno vengono uniti mediante DNA ligasi. Le condizioni scelte permettono la formazione di molecole di DNA di lunghezza tale da poter essere inserito nella particella fagica mediante impacchettamento (la testa dei fagi permette l'entrata solo di una certa quantità di DNA di certe dimensioni).
3. Nel frattempo, dei batteri infettati da dei batteriofagi (resi difettivi per quanto riguarda i geni della lisogenia) sono stati indotti a produrre teste e code fagiche. Il vettore ricombinante viene messo a contatto con esse, e grazie a degli enzimi sulla testa del fago, viene introdotto al loro interno.
4. Questi fagi ora possono infettare i batteri.

Esempio generale: Fago Lambda

Il genoma di Lambda è una molecola lineare a doppio filamento di 48 kb. Le estremità 5' e 3' presentano 12 nt a singolo filamento chiamate estremità *cos*, che sono complementari tra loro e permettono la circolarizzazione del DNA di Lambda dopo l'infezione della cellula ospite.

La mappa genetica del fago 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.

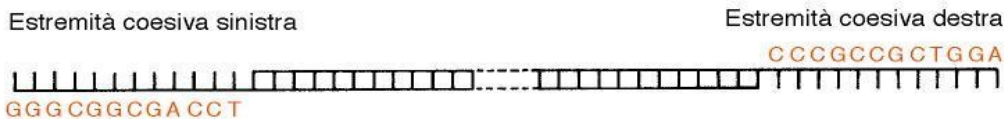
- a destra contiene i geni coinvolti nella replicazione del DNA e nel ciclo litico.

In una normale infezione litica, il DNA di è introdotto, sotto forma di DNA lineare all'interno della cellula batterica.

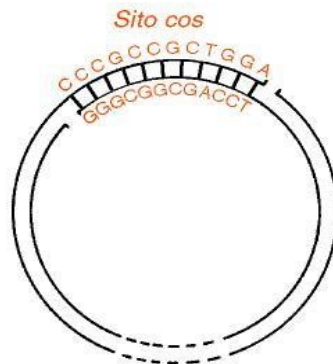
Qui il DNA fagico ri-circularizza, sfruttando le sue estremità coesive *cos*, e viene inizialmente replicato come i plasmidi (replicazione theta) e successivamente si replica con la modalità del circolo rotante producendo lunghi concatenameri di singoli genomi fagici.

Contemporaneamente sono espressi i geni strutturali che portano all'assemblaggio delle teste "vuote", dove si inseriscono singole unità di generate tagliando i concatenameri ai siti *cos*.

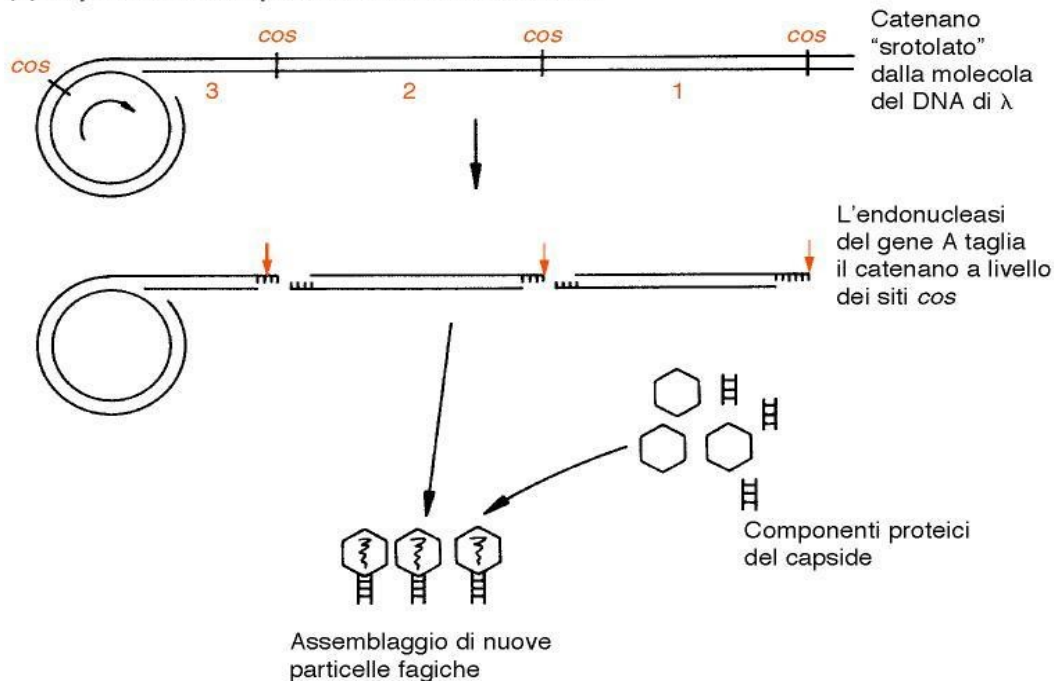
(a) La forma lineare della molecola di DNA di λ



(b) La forma circolare della molecola di DNA di λ



(c) Replicazione e impacchettamento di DNA di λ



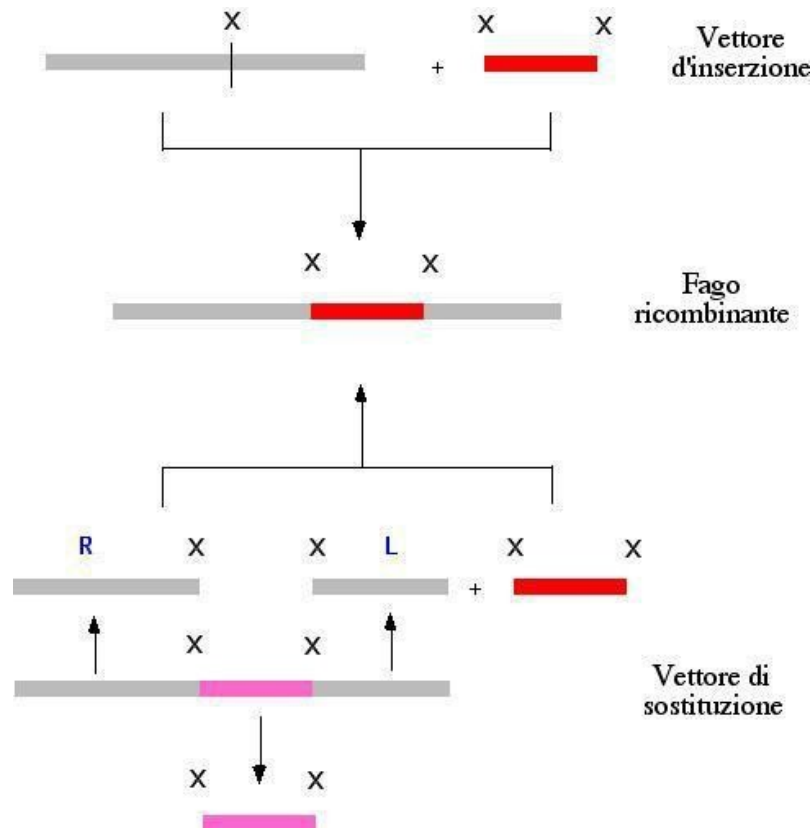
Lo sviluppo di vettori di clonaggio di tipo λ è stato possibile perché:

- 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)
- Inoltre i bracci di hanno altre regioni non essenziali che possono essere rimosse -> 22 Kbp di DNA estraneo inseribile (contro il limite di 10 Kbp del plasmide)

I siti di restrizione naturali presenti nel genoma possono essere eliminati senza causare perdita delle funzioni geniche e ciò ha permesso di sviluppare vettori contenenti siti unici per il clonaggio del DNA esogeno.

Sono stati sviluppati due tipi di vettori lambda:

- **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).



Strategie disponibili per l'identificazione dei ricombinanti

Se si usano vettori d'inserzione:

1. Se l'inserimento del DNA avviene all'interno dei geni che permettono al fago di compiere il ciclo lisogeno, allora il fago non sarà più in grado di compiere quel ciclo (inattivazione inserzionale). Per cui i fagi con l'inserzione daranno placche chiare (placche litiche) e la colonia non sarà bianca, bensì troveremo dei piccoli buchi con del liquido; i fagi senza inserzioni, invece, avranno colonie torbide (miscela di fagi lisogeni e litici).

2. Se il sito multiplo di clonaggio è all'interno del gene lacZ (alfa-peptide della beta-galattosidasi) i cloni ricombinanti sono identificabili attraverso lo screening bianco-blu (bianco-ricombinante, blu-non ricombinante)

Se si usano vettori di sostituzione:

nei vettori di sostituzione ci sono i siti polylinker ai lati di due bracci (dx e sx) e all'interno di questi due bracci viene inserito il DNA da clonare.

Si effettua una digestione genomica parziale e si purifica una popolazione intorno a i 15 kb. Si digerisce quindi un vettore di sostituzione, e si ligano insieme i bracci destro, sinistro e la popolazione di digesti parziali di circa 15 Kb: questo è reso possibile perchè i vettori di sostituzione generano una serie di concatameri che sono individuati dalle estremità *cos*.

Dopo che faccio il packaging in vitro, ovvero la preparazione delle particelle fagiche infettive, solamente quelle ricombinanti daranno le placche di lisi (perchè quelle vuote o quelle difettive non daranno nulla).

NB: i frammenti privi di inserto e di stuffer sono troppo piccoli per essere impacchettati e dare particelle virali

Solo i fagi ricombinanti sono infettivi.

Fago M13

M13 è un batteriofago filamentoso con un **genoma di DNA circolare a singolo filamento**. Si replica senza uccidere il suo ospite, ma semplicemente rallentandone la crescita. La presenza di singolo filamento di DNA è utile per sequenziare il DNA utilizzando la metodica di Sanger. Inoltre, il DNA a singolo filamento è molto utile come sonda per individuare altre sequenze di DNA, come in esperimenti di ibridazione dopo trasferimento tipo Southern, ed M13 permette di produrre facilmente sonde a singolo filamento.

La maggior parte del genoma del fago M13 "wildtype" contiene l'informazione genetica essenziale per la replicazione virale. Esiste tuttavia una piccola regione, denominata sequenza intergenica, che può essere utilizzata come sito di clonaggio.

Nel corso dell'infezione fagica il DNA fagico passa attraverso un intermedio a doppio filamento (RF): la forma replicativa presente nelle cellule ospiti.

-> La capacità di questo fago di non causare la morte del batterio ma specialmente la capacità di passare da una forma a doppio filamento (RF) ad una a singolo filamento (+) ha sviluppato forte interesse per questo batteriofago che ha portato allo sviluppo di una famiglia di vettori derivati da M13 e caratterizzati dalla proprietà di poter accumulare grandi quantità di DNA a singolo filamento.

Una modificazione del vettore consiste nell'introduzione del gene lacZ, quindi, le cellule infettate possono essere facilmente identificate grazie al colore che assumono in piastre con un indicatore: M13 ricombinanti --> placche bianche

M13 non ricombinanti (non contengono l'inserto) --> placche blu

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

Con i fagi siamo riusciti a creare librerie di cDNA (= librerie di espressione) e di DNA (= librerie del patrimonio genetico di un organismo), visto che permettono il clonaggio di frammenti più grandi di DNA.

- **Libreria genomica:** collezione di cloni che include tutto il DNA genomico di una certa specie.
- **Libreria di cDNA:** collezione di cloni che include tutte le specie di mRNA (copiate in cDNA) espresse in una determinata fase di vita.

I vantaggi di avere una libreria cDNA sono:

- che possiamo avere la fotografia di ciò che viene espresso in determinate condizioni;
- il fatto che quando dobbiamo studiare una proteina possiamo prendere un clone e farla esprimere

Un problema che si presenta quando si clonano grossi frammenti di DNA in vettori plasmidici è che, se riesce, la trasformazione avviene con una bassissima efficienza in quanto le molecole di DNA sono molto grandi. Tale problema è stato risolto con tramite l'impiego dei vettori cosmici.

3. VETTORI ARTIFICIALI

COSMIDI

Sono vettori di clonaggio creati dall'uomo che uniscono alcune proprietà dei plasmidi e dei fagi. Possono contenere circa 40kb di DNA.

È simile ad un vettore fagico perchè può essere costruito in vitro, in modo da avere la più alta efficienza di trasduzione e quindi di clonazione negli ospiti. Il vettore una volta inserito nell'ospite si comporta e replica come un plasmide.

In particolare, del plasmide possiede:

- funzione replicativa
- polylinker
- marcatori che ne permettono la selezione

Del fago lambda possiede:

- le estremità coesive *cos*
- circa 250 bp che assicurano la giunzione *cos* (sequenze necessarie per il legame e per il taglio della terminasi)

La selezione dei batteri ricombinanti si fa con le colonie bianche/blu in terreno contenente ampicillina e X-Gal

Vantaggi dei vettori cosmidici

- clonaggio di inserti di dimensioni comprese tra le 32 e le 47 kb
- migliore efficienza di trasferimento del vettore ricombinante nelle cellule batteriche
- sono utili ai fini della creazione di una genoteca poichè gli inserti di dimensioni maggiori permettono lo screening di un numero più ridotto di cloni.



SISTEMI DI VETTORI BATTERICI A INSERTO MOLTO GRANDE (>100kb) FACILITANO L'ANALISI DEI GENOMI EUCARIOTICI COMPLESSI. SONO INDISPENSABILI PER:

- ▶ MAPPATURA GENOMA UMANO
- ▶ SCOPERTA DI GENI UMANI

Altri vettori artificiali:

Vettori BAC: (Bacterial Artificial Chromosome) derivano dal fattore sessuale F e sono introdotti nelle cellule con trasformazione. Quello che contengono in più rispetto agli altri vettori è che contengono i geni per la ricombinazione e la ripartizione, perchè essendo molto grandi devono essere mantenuti in poche copie per cellula sennò le cellule muoiono.

Vettori PAC sono simili ai BAC, possono avere inserti fino a 300 kb, ma la dimensione più usata e meglio gestita dal vettore è di 150 kb.

Cromosomi artificiali eucariotici: Vettori YAC permettono il clonaggio di grandi quantità di DNA all'interno di ospiti eucariotici (lieviti). Il vettore contiene: un centromero; una sequenza di replicazione autonoma che permette la replicazione autonoma rispetto alle origini di replicazione cromosomiche; telomeri necessari per la replicazione e il mantenimento dei cromosomi; marcatori di selezione in lievito; origine di replicazione (oriC) e un marcatore selettivo per la propagazione in E.Coli prima del clonaggio; un marcatore selettivo dove si inserisce il DNA da clonare.

L'inattivazione inserzionale a livello dei lieviti non è più basata sulla complementazione di un gene dell'operone ma è basata sulla possibilità di ripristinare una condizione mutata, ovvero la capacità di metabolizzare in assenza di triptofano. Esistono lieviti con delle mutazioni "*ochre*" che portano alla formazione di colonie rosse. Quando questo gene integro subisce una mutazione non-senso le colonie diventano bianche. Se noi abbiamo l'inserto all'interno del gene le colonie saranno rosse, se non lo abbiamo le colonie saranno bianche.

LA DIFFERENZA TRA PLASMIDI E FAGI, OLTRE NELLA GRANDEZZA DEL DNA CHE È POSSIBILE TRASFERIRE, STA NELL'EFFICIENZA DI TRASFERIRE IL VETTORE RICOMBINANTE NELL'OSPITE (NEI FAGI È 100%, NEI PLASMIDI È INEFFICIENTE).

[NB: CHIEDE SEMPRE: differenze tra fagi e plasmidi, inattivazione inserzionale e la selezione. Poco niente dei cosmidi]

Clonare = ottenere numerose copie identiche di un certo frammento di DNA.

Clonare in un vettore di espressione = ottenere discrete quantità di prodotto proteico codificato dal gene di interesse.

Il DNA ricombinante non serve solo per studiare i geni, ma anche per la produzione di proteine per mezzo dell'ingegneria genetica:

- proteine di interesse terapeutico
- proteine di interesse commerciale (enzimi)
- proteine da usare come antigeni nella produzione di anticorpi policlonali e monoclonali
- reagenti per la ricerca di base e applicata

Il clonaggio tramite PCR inoltre permette di effettuare mutagenesi direzionale sito-specifica: si inseriscono mutazioni all'interno del gene, ad esempio per studiare l'effetto che esse hanno sulla funzionalità della proteina oppure per creare proteine nuove.

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.

Anche l'espressione dei sistemi biotecnologici per quanto riguarda le proteine si basa sull'impiego di sistemi eterologhi: possibilmente sarebbe da esprimere le proteine in ospiti molto diversi. Di fatto sarebbe possibile anche far esprimere la proteina in un sistema in vitro cell-free, ma è molto costoso e poco efficiente, anche perché spesso c'è bisogno di trattare proteine di cellule eucarioti superiori che necessitano di modifiche post traduzionali necessarie per fargli svolgere il loro ruolo funzionale.

Gli ospiti in cui può essere inserito il vettore di espressione possono essere:

- Batteri (es. E.coli) → 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.
- Lieviti
- Insetti → sfruttando sistemi virali
- Cellule vegetali
- cellule di mammifero in coltura

L'espressione è detta eterologa in quanto la proteina che si vuole esprimere NON deve MAI essere quella dell'ospite. Infatti se la proteina da far esprimere è quella dell'ospite, l'espressione è veramente poco efficiente perché sarà la proteina endogena ad essere trascritta e tradotta. Questo succede anche quando c'è alta omologia tra mammiferi e procarioti: è difficile far esprimere la

proteina di mammifero al procarote perchè gli stessi fattori di trascrizione competono per la proteina dell'ospite e non trascrivono la proteina ricombinante (che ha il suo promotore nel vettore).

Le proteine ricombinanti non vengono prodotte unicamente in sistemi cellulari in maniera eterologa, ma vengono espresse anche in bioreattori viventi, ad esempio:

☐ animali transgenici → l'organo + gettonato per la proteina del latte è la mammella femminile

☐ piante transgeniche → il tabacco è la pianta maggiormente studiata, dal momento che non ha molta competizione riguardo la sua potenzialità nutritiva come i cereali (→ fare un transgenico di un cereale implica moltissimi controlli per verificare che la pianta transgenica non sostituisca le coltivazioni di cereali autoctone (la pianta del tabacco invece è edibile e non presenta questa problematica))

VETTORI DI ESPRESSIONE

Caratteristiche 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, si cerca di ottimizzare la stabilità dei prodotti di espressione, sia a livello trascrizionale che traduzionale.

Quali sono le linee guida per la scelta dell'ospite?

Esistono diversi organismi sia Procariotici che Eucariotici per esprimere geni eterologhi. Ciascuno di questi sistemi offre dei VANTAGGI ma anche degli SVANTAGGI. Per quanto possibile, si tenta di clonare i sistemi più semplici possibili, ovvero quelli dei procarioti.

ESPRESSIONE IN SISTEMI PROCARIOTICI

Svantaggi:

•**Formazione di corpi inclusi insolubili** (proteine inattive biologicamente) → i corpi insolubili sono aggregati opachi al microscopio che si formano per vari motivi:

☐ 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-traduzionali (proteine eucariote) portano a prodotti meno stabili

Questo è uno svantaggio per l'espressione delle proteine ricombinanti dal momento che la precipitazione interferisce con la funzionalità. L'unico caso in cui ciò non rappresenta un problema è quando si vuole produrre una proteina ricombinante con un antigene con cui stimolare la risposta immunitaria. Se le proteine non sono troppo complesse, si possono recuperare tramite denaturazione e rinaturazione chimica in vitro.

- 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.)

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

ESPRESSIONE IN SISTEMI EUCARIOTI

Svantaggi: clonaggio costoso, difficile da fare e da controllare.

Nell'arco della biotecnologia sono stati creati sistemi eterologhi per gli eucarioti più vantaggiosi rispetto agli originari, in particolare sono state create cellule di insetto (EUK) utili per produzione e espressione di proteine ricombinanti

Quali sono le caratteristiche dei vettori di espressione?

Oltre alle normali caratteristiche di un vettore di clonaggio deve avere:

- ☐ origine di replicazione
- ☐ marker di selezione
- ☐ promotore
- ☐ terminatori di trascrizione
- ☐ segnali per ottimizzare l'mRNA
- ☐ codoni di terminazione della traduzione

- ☐ elementi genetici specifici per diverse applicazioni: molecole di fusione, sequenze segnale per secrezione, ecc
- ☐ sequenza shine-dalgarno

Avvertenze:

- ☐ utilizzare il cDNA
- ☐ clonare il cDNA nella corretta cornice di lettura → non si può effettuare un clonaggio con un solo enzima di restrizione perché se non si ha solo il 50% di possibilità che il DNA sia inserito nell'orientamento corretto.

Considerazioni: i batteri non sono in grado di eseguire modifiche post traduzionali

PROMOTORI

-La scelta del promotore dipende dal tipo di proteina e dagli scopi

-le proteine che vengono fatte esprimere in maniera eterologa nei diversi ospiti possono anche essere tossiche → tutti i vettori di espressione avranno sempre un promotore INDUCIBILE. Anche nel caso in cui la proteina non sia tossica per l'ospite, avere un promotore inducibile è comunque un grosso vantaggio per far crescere gli ospiti nelle migliori condizioni senza spendere energia per trascrivere e tradurre la proteina inserita con il vettore. Al momento opportuno si inserisce l'induttore e i batteri producono quantità di proteina superiori a quello che avrebbero fatto se il promotore non fosse inducibile. Inoltre il fatto di avere promotore inducibile è importante per evitare la perdita del plasmide: infatti se faccio continuamente trascrivere il plasmide, il batterio deve impiegare le sue risorse energetiche per trascrizione e traduzione della proteina, quindi tenderà ad eliminare il plasmide .

-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. Sono stati isolati e 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 è molto avanzato, sono stati elaborati anche promotori in parte o totalmente sintetici sulla base delle sequenze consensus ottimali.

-Un promotore procariotico tipico è 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 e 17 bp. Quella tra -10 e ATG è di 9 bp.

-il promotore è a monte del sito multiplo di clonaggio dove inserisco il mio DNA da far esprimere. Nei sistemi procariotici dopo il promotore è necessaria la sequenza di Shine Dalgarno, che permette la traduzione.

-molto spesso si usano promotori di virale: questo perché i virus, essendo parassiti endogeni, hanno promotori molto forti per la necessità di produrre velocemente moltissime delle loro proteine per costituire gli elementi del virione che daranno origine al virus completo

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

-Ci sono messaggeri che, una volta clonati, hanno un tempo di vita troppo breve, che ha come conseguenza una produzione troppo scarsa.

-Per un'ottimale assemblamento, partenza e terminazione della macchina ribosomiale 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 ribosomiale 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 -galattosidasi sono state sistematicamente cambiate le basi P
P
P 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.

-Si possono introdurre sequenze segnale per la secrezione della proteina nello spazio periplasmico dei batteri per:

P
P
P evitare formazione corpi di inclusione

P
P
P perchè è più semplice purificare quelle proteine da tutte le altre del batterio

Si possono anche aggiungere segnali per costruire le proteine di fusione, che permetteranno di seguire il livello di espressione della proteina ricombinante nell'ospite e di purificare queste proteina in modo molto rapido e specifico con cromatografia di affinità.

PERCHE' L'ESPRESSIONE DEI PROMOTORI E' (QUASI) SEMPRE REGOLATA?

L'espressione dei promotori è regolata per ottenere il max della resa a livello di espressione della proteina ricombinante.

- FO
ET 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.
- FO
ET 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. Di fatto però è raro, e si considera un buon livello di espressione il 25% di proteine ricombinanti sul totale delle proteine dell'ospite.

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)

MANIPOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI BATTERI:

Fattori da considerare:

- FO
ET promotore
- FO
ET sequenze legate ai ribosomi (shine dalgarno)
- FO
ET numero copie del gene clonato
- FO
ET localizzazione finale della proteina
- FO
ET stabilità proteina in cellula ospite

CLONAGGIO DI ESPRESSIONE NEI BATTERI

- FO
ET Maggior parte di proteine espresse in E. coli sono intracellulari
- FO
ET Produzione fino al 25% del totale delle proteine del batterio
- FO
ET Impiego di ceppi carenti di proteasi: E. coli possiede almeno 25 proteasi, molte delle quali indispensabili per la vitalità delle cellule.
- FO
ET 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

Geni in procarioti possono avere:

- espressione costitutiva
- espressione regolata

Nella produzione di proteine eterologhe in batteri vengono usati spesso promotori forti e regolabili. Un produzione continua provoca:

- inibizione funzioni cellula
- perdita energia
- perdita plasmide

NB: nel caso di clonaggi di geni degli euk, viene clonato il cDNA (parte del gene senza introni). Qualche volta viene mantenuto una parte della sequenza dei primi introni perchè in alcuni casi la presenza di un introne può evitare interventi di splicing nel momento in cui facciamo esprimere la proteina in sistemi eucarioti.

I promotori fagici danno livelli di espressione molto alti, i promotori endogeni es quello del lattosio danno livelli tendenzialmente bassi o appena sufficienti del livello di espressione della proteina.

OTTIMIZZAZIONE DELLA STABILITA'

Finora abbiamo parlato della stabilità dell'RNA messaggero, ma è importante anche la stabilità della proteina nella cellula ospite → la resa di un prodotto di espressione dipende, in larga misura, dalla stabilità della proteina.

Cosa rende stabile la proteina?

1. **Stabilità estrinseca dipendente da proteasi nell'ospite:** gli ospiti che usiamo come per il clonaggio sono modificati per ottimizzare l'espressione delle prote ricomb. In particolare sono batteri che hanno geni modificati per produrre scarse quantità di proteasi.

Esistono delle SEQUENZE PEST: (PROLINA, GLUTAMMICO, SERINA, TREONINA) → spesso fiancheggiate da gruppi di aminoacidi positivi, sono target 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


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 *E.coli* mutanti che risultano difettivi in una o più di queste proteasi, come ad esempio *omp T*

2. **Stabilità intrinseca:** 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.

-----o-----

è necessario considerare la differenza tra:

 **PROTEINE NATIVE:** (cDNA così come sta)

 **PROTEINE DI FUSIONE:** sempre più usate per la loro maggiore stabilità, gli alti livelli di espressione e la relativa facilità con cui si purificano possono essere utili per:

1-seguire la produzione della proteina attraverso un anticorpo

2-avere un tag per consentire una purificazione rapida e efficiente della proteina dalle altre dell'ospite : il tag serve a trattenere la proteina in una colonna di affinità, mentre il resto viene lavato via.

Alcune tag sono piccole proteine come GST che può avere doppia funzione di seguire la proteina nella sua formazione tramite anticorpo anti-GST, ma anche di permettere una cromatografia di affinità, dal momento che lega GSSG nei sistemi redox. (In più è facile staccarla dalla colonna perché è sufficiente cambiare pH).

Ci sono in casi in cui chiaramente si vuole lavorare con proteine pure enza ulteriori aggiunte artificiali, per es in campo biomedico, è richiesta l'insulina per ciò che è. Quindi tra le proteine con cui la nostra proteina viene fusa ci possono essere brevissime sequenze bersaglio di proteasi specifiche, in modo che se ci serve, possiamo togliere i pezzi aggiuntivi senza compromettere la funzionalità della proteina.

Nelle proteine di fusione è FONDAMENTALE assicurarsi che il nostro DNA sia inserito correttamente, per non alterare la cornice di lettura.

VANTAGGI DEL TAG

1-Semplificazione nei processi di purificazione: → Cromatografia di affinità

2-Semplificazione nei processi di rivelazione: → Western Blotting

3-Studio d'interazione proteina-proteina: → Cromatografia di pseudo affinità

→ Immunoprecipitazione

4-Solubilizzazione e localizzazione cellulare

Ci sono anche tag con la streptavidina che legandosi in maniera specifica con la biotina, ci consente di ottenere delle risposte quando si studia questa proteina.

L'istidina si lega a dei metalli quindi la cromatografia è fatta con chelanti dei metalli. 6 istidine si legano ad un metallo collegato ad una cromatografia di affinità.

Gli **svantaggi** riguardano le modifiche post-traduzionali che non possono essere fatte sulle proteine di origine eucariotica che cloniamo in vettori per farli esprimere nei batteri. Il problema del folding è rilevante perché se la proteina non ha le corrette modifiche post-traduzionali non avrà il giusto ripiegamento e quindi la giusta funzione. Si può cercare di evitare di fare clonaggi in sistemi eucariotici, quindi si può cercare di far avvenire l'espressione della proteina ricombinante in presenza di un altro vettore che codifica una chaperonina, nel caso in cui ci sia bisogno di una semplice assistenza al folding. Nel caso invece in cui bisogna avere modifiche post-traduzionali più complesse questo non può funzionare.

È possibile creare una proteina di fusione che assiste alla formazione di ponti disolfuro se questo è l'unico requisito richiesto dalla proteina per poter funzionare: ad esempio l'insulina, che è composta da due peptidi uniti da un ponte disolfuro.

Un altro problema può essere che la proteina sia poco solubile, quindi è possibile farla fondere con peptidi che ne aumentano la solubilità.

QUINDI gli scopi delle modifiche post-traduzionali dell'N-terminale della proteina ricombinante sono essenzialmente:

- la sua esportazione nello spazio periplasmico
- risolvere il problema del folding
- aumentarne la solubilità

l'insulina è stata inizialmente prodotta con clonaggio facendo esprimere in due sistemi diversi le due catene polipeptidiche e poi mettendole insieme facendo formare chimicamente in vitro i ponti disolfuro. Oggi non si fa più così: si effettua il clonaggio del precursore completo che poi viene assistito nella formazione del ponte disolfuro da una tag specifica e poi viene tagliato in vitro ad opera di nucleasi specifiche.

L'altro esempio di proteina ricombinante è l'ormone della crescita: è stato un successo perché una proteina abbastanza piccola.

MANIPOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE EUCARIOTICHE

Se non possiamo avere una proteina biologicamente attiva in sistemi procariotici, è ovvio che bisogna passare a sistemi eucariotici.

Il sistema eucariotico per eccellenza è quello del lievito.

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

Il vettore di espressione eucariotico deve avere:

- un **macatore di selezione specifico per gli eucarioti**: normalmente sono geni implicati nella sintesi di uno specifico nutriente, in genere un aminoacido. 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.
- Ad esempio lieviti che non sono in grado di esprimere la leucina vivono in un terreno privo di leucina solo se hanno incorporato il vettore, il quale avrà il gene per la produzione della leucina.
- un'**unità di trascrizione eucariotica**

Il trasferimento dei vettori ricombinanti è detto **TRASFEZIONE** e avviene in vari modi:

- con la formazione di protoplasti: i lieviti vengono resi privi della parete in modo che assumano una forma sferica, in cui ci sono maggiori probabilità di inserire il vettore;
- si fanno trasformazione con composti chimici (es acetato di litio);
- con sistemi fisici tipo l'elettroporazione.

Esempio di produzione di proteine ricombinanti in lieviti: produzione del vaccino contro l'epatite B --> è fatto in un vettore eucariotico di lievito, con marcatore per la leucina; fattore di crescita dell'epidermide; insulina ... etc

Limiti dell'espressione di proteine ricombinanti in lievito:

- iperglicosilazione della proteina eterologa, che può causare alterazione dell'attività biologica e può portare ad un cattivo clonaggio;
- il fatto che magari non si riesce a far secernere la proteina nel terreno di coltura;
- il fatto che i lieviti perdono facilmente il plasmide e non c'è un modo per evitare che accada.

Se la proteina eucariotica non ha successo di essere prodotta in cellule di lievito, bisogna ricorrere a cellule animali oppure a cellule di insetto, a cellule vegetali, a funghi

Se dobbiamo introdurre un vettore di espressione in **cellule eucariotiche superiori**, ci sono vari metodi:

- far precipitare il vettore sopra le cellule come DNA, e in questo modo un certo numero di cellule incorporeranno al loro interno il loro vettore, mentre altre moriranno;
- elettroporazione: creare pori transienti con la corrente;
- incorporazione mediante liposomi, ovvero sistemi di veicolazione lipidici cationici che contengono il vettore --> si fondono con le membrane cellulari;

Nella creazione dei liposomi bisogna fare attenzione al bilanciamento delle cariche, questo perchè se diamo alla cellula troppe cariche positive la uccidiamo (sono tossiche) --> quindi bisogna trovare il giusto rapporto tra polianione e policatione in modo che la carica netta sia positiva ma non sia troppo elevata da danneggiare le cellule.

si può veicolare il DNA tramite cellule virali.

I vettori virali sono usati per creare mutanti di espressione stabili per gli studi, oppure sono usati per la correzione genica ovvero l'inserimento del gene corretto in cellule con difetti genici di tipo ereditario.

La TRASFEZIONE può essere:

- stabile:** si fa in modo che il DNA esogeno che viene trasferito si integri stabilmente all'interno della cellula eucariotica --> le cellule vengono trasfettate e messe sotto selezione (arricchimento delle cellule che hanno incorporato stabilmente la modificazione genetica)
- transiente:** il sistema funziona finchè il plasmide è all'interno della cellula ed esprime la proteina ricombinante --> cellule vengono trasfettate ma non vengono selezionate

Esempio di produzione di una proteina ricombinante in cellule eucariotiche superiori (di mammifero): produzione dell'interferone 1-alfa, prodotto in cellule di criceto.

Altri modelli di espressione

1) Per quanto riguarda la produzione di proteine ricombinanti **mediante le cellule di insetti**:

si sfrutta maggiormente il sistema di espressione di Baculovirus, ovvero un virus che infetta le cellule di insetto (--> farfalle notturne come *Autographa californica*). Il baculovirus si deposita nelle foglie sottoforma di piccoli cristalli, quindi viene mangiato dal bruco e nello stomaco, durante la digestione, i cristalli si sciolgono --> i virioni vengono liberati e iniziano a riprodursi alla ricerca dell'intestino del bruco --> il virus fa un ciclo replicativo di circa 4-5 giorni e poi il bruco muore --> prima che il bruco muoia i virus vengono escreti sottoforma di cristalli su altre foglie --> il ciclo continua.

La produzione del cristallo è basata sulla presenza del gene che codifica per la poliedrina, la sostanza che lo costituisce. Questo gene ha un promotore molto forte che viene sfruttato:

si prende il virus, gli si toglie il gene per la poliedrina ma si mantiene il loro promotore -> visto che è molto forte farà esprimere in grandi quantità il nostro inserto.

Questi costrutti non sono semplici, in quanto è necessaria un'assistenza affinché si ricombinino per avere il costrutto del Baculovirus con all'interno il DNA che faremo trascrivere e tradurre. Per clonare all'interno di Baculovirus si usa un altro plasmide che porterà il cDNA d'interesse e si usano un plasmide e un vettore particolari che hanno regioni per la ricombinazione: deve avvenire lo scambio del cDNA da un vettore e l'altro.

2) Per far **esprimere proteine all'interno di cellule vegetali** si usa l'*A. Tumefaciens*, ovvero un batterio che vive nel suolo, capace di trasferire alcuni geni del proprio plasmide, denominato Tumor Inducing o *plasmide Ti*, alle piante. Quando questi geni si integrano nel genoma della pianta provocano la formazione di un tumore. C'è anche in questo caso il vantaggio che il promotore di questa proteina che causa il tumore è molto forte: noi togliamo dal plasmide di questo batterio il gene per la formazione del tumore e al suo posto ci cloniamo il cDNA per la proteina ricombinante. In questo modo si può far esprimere un gene di interesse in un ospite vegetale senza causare la formazione di tumori.

PRODUZIONE DI ANIMALI TRANSGENICI

Per animali transgenici si intende:

- 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.

Sono creati per:

- far esprimere una proteina ricombinate, ad esempio nel latte di varie specie.
- la creazione di organi per i trapianti (es maiali)
- scopi di ricerca per il miglioramento della specie
- fare animali knock-out per studiare la funzione di una proteina: si toglie il gene che codifica per la proteina d'interesse dal DNA di un animale e si vede quale è l'effetto ottenuto: nel caso in cui l'inattivazione sia letale per l'embrione, l'embrione non si sviluppa.
- La creazione di questi organismi ha anche la funzione di creare modelli animali di malattie umane da usare per studi di terapia.
- Fare animali knockin: si fa iperesprimere un gene per vedere cosa succede

Il primo animale transgenico è stato un maiale, poi c'è stata la pecora Dolly e sono seguiti altri casi (es crescita di un orecchio umano in un topo)

Come si fanno?

O si usano le cellule germinali o le cellule somatiche (nel caso della Dolly è stata usata una cellula somatica di mammella). Nella maggior parte dei casi viene usata una cellula uovo fecondata, privata del nucleo che viene sostituito con il nucleo contenente il gene che ci interessa. Se l'animale sopravvive si crea un CLONE.

Si usa molto anche fare la manipolazione degli animali con le cellule embrionali staminali totipotenti:

facciamo sviluppare 4-8 cellule --> si prende una di queste --> viene manipolata in vitro e reinserita in una femmina pseudogravida (cioè fatta accoppiare con un maschio basectomizzato) → si svilupperà un animale tra la progenie che sarà una CHIMERA (mosaico di cellule con patrimoni genetici diversi)--> dopo si incrocia la chimera con un organismo normale per ottenere un certo numero di eterozigoti --> poi si incrociano gli eterozigoti tra loro per ottenere l'animale transgenico omozigote.

Per riconoscere le chimere si mette all'interno del vettore dei geni che fanno sì che il pelo dell'animale risulti screziato.

Da un punto di vista tecnico le operazioni di sostituzione del nucleo si fanno sotto un microscopio: con una micropipetta si tiene fermo l'ovocita e con un catetere di vetro si inietta il gene nella cellula uovo.

TECNICHE PER LO STUDIO DEI GENI E DELLA LORO ESPRESSIONE

- Separazioni molecolari: elettroforesi su gel
- Cromatografia
- Traccianti marcati: sonde e ibridazione di acidi nucleici
- Blotting
- Ibridazione diretta ed inversa
- Amplificazione di bersagli, sonde e segnali
- Fingerprint
- EMSA e Footprinting
- Sequenziamento DNA

Ibridizzazione degli acidi nucleici

Il DNA a doppio filamento ha la proprietà di dissociarsi, in seguito a riscaldamento, nei singoli filamenti che lo compongono e di rinaturare in seguito all'abbassamento della temperatura, ovvero di riassociare le due sequenze nucleotidiche complementari di partenza (duplex) che erano state separate dalla denaturazione.


Questa proprietà può essere utilizzata anche per riassociare due filamenti di acido nucleico complementari di diversa origine a formare duplex stabili. In questo caso la reazione prende il nome di **ibridizzazione (ibridazione)**. Il filamento utilizzato per l'ibridizzazione di un DNA bersaglio può essere un oligonucleotide o un polinucleotide che prende il nome di sonda (probe) ed in genere è marcato in modo da essere evidenziato. Oppure può essere un innescò (primer) necessario per iniziare una reazione enzimatica di polimerizzazione (amplificazione).

Metodi di marcatura degli acidi nucleici

SONDE

- le sonde genetiche sono filamenti a singola elica di DNA o di RNA
- le sonde genetiche ibridizzano (si uniscono) un filamento bersaglio di DNA o di RNA
- la sonda ed il bersaglio devono essere complementari, ma a seconda delle condizioni la loro complementarità può non essere assoluta (cioè < 100 %)
- le sonde genetiche devono essere marcate altrimenti l'ibridizzazione non può essere rilevata
- le sonde genetiche possono essere utilizzate in vari esperimenti di *blotting* ed in tecniche *in situ* per identificare particolari sequenze nucleotidiche. Ad esempio in medicina possono aiutare l'identificazione di microrganismi o la diagnosi di particolari patologie

Sonde radioattive

Le sonde genetiche possono essere marcate usando isotopi radioattivi come **³²P**, **³⁵S**, **¹²⁵I** e **³H**. Il rilevamento viene effettuato con autoradiografia (l'esposizione diretta di una pellicola alle particelle beta o ai raggi gamma) o contatori Geiger. Le sonde radiomarcate sono i più comuni metodi di marcatura, anche se sono i meno popolari a causa della loro scarsa sicurezza. Il loro uso dipende dalla loro elevata sensibilità, ossia dalla capacità di rilevare anche minime concentrazioni del complesso sonda-target (una singola coppia di geni g di DNA).  0.5

Il 5' delle sonde ha i 3 P (alfa, beta, gamma): se voglio ottenere una marcatura posso marcare o i P i alfa o in gamma. **Se marchiamo il fosforo in gamma possiamo fare solo la marcatura terminale, se voglio una marcatura interna devo marcare il fosforo in alfa.**

--> Nella marcatura interna si hanno più punti di marcatura radioattiva lungo la sonda, mentre in quella terminale la sonda è marcata solo all'estremità 5' quindi è meno sensibile.

Questo principio si estende anche alle marcature non radioattive, soprattutto quelle che danno chemiluminescenza. [chiede sempre all'esame]

Il sistema con marcatura radioattiva richiede molte accortezze per cui vengono preferiti altri metodi.

Sonde non radioattive

Le marcature non radioattive sono più sicure ma meno sensibili e non richiedono stanze dedicate particolari apparecchiature e personale specializzato, ma sono in genere molto meno sensibili.

Esempi:

- **Biotina:** questa sostanza può essere evidenziata usando avidina o streptavidina che possiede una alta affinità per la biotina

- **Enzimi:** l'enzima viene legato alla sonda e la sua presenza viene rilevata da una reazione con un substrato che cambia colore. Esempi di enzimi sono la fosfatasi alcalina e le perossidasi
- **Chemiluminescenza:** In questo metodo si ancorano alla sonda molecole chemiluminescenti che si rilevano dalla loro emissione di luce usando un luminometro
- **Fluorescenza:** vengono ancorate alla sonda molecole che danno fluorescenza alla luce UV. Questo tipo di marcatura è specialmente utile per l'esame diretto di reperti microbiologici o citologici al microscopio; tale metodica è nota come ibridazione per fluorescenza in situ.
- **Anticorpi:** un antigene è accoppiato alla sonda e la sua presenza è rilevata da uno specifico anticorpo. Particolarmente utile per rilevare complessi DNA-RNA.

Nelle marcature non radioattive, uno dei sistemi più utilizzati, soprattutto per rilevamenti in cui non c'è bisogno di una particolare sensibilità, è quello che si basa sull'inserimento della digossigenina, che viene riconosciuta da un anticorpo specifico. Si tratta di una marcatura terminale, inserita artificialmente tramite uno spaziatore. In questo caso è possibile ottenere un'amplificazione del segnale:

l'oligonucleotide può essere marcato con la digossigenina e riconosciuto dal suo specifico anticorpo, ma può anche essere marcato con la biotina alla quale possiamo aggiungere la streptavidina, alla quale potremmo aggiungere nuovamente la biotina da far riconoscere ad anticorpi anti-biotina per amplificare il segnale.

Altri marcatori non radioattivi sono i fluorofori come la fluoresceina: ad esempio se vogliamo vedere se una certa sequenza, una volta inserita nella cellula, va a finire nel nucleo o nel citoplasma si usa una marcatura al terminale con fluoresceina o un qualche altro fluoroforo.

Chemiluminescenza

- ☐ è un sistema rapido e sensibile
- ☐ la luce è prodotta rapidamente dopo pochi minuti ma non è stabile --> il rilevamento va fatto subito
- ☐ è spesso usato l'enzima perossidasi: quando si aggiunge il substrato (luminolo), la reazione produce un fotone che emette luce a 425 nm durante la sua decomposizione allo stato fondamentale.
- ☐ si può misurare su pellicola autoradiografica oppure con il luminometro, quindi in fase liquida.
- ☐ La sensibilità è molto vicina a quella del radioattivo --> non avremo problemi di controllo, di sicurezza e di sistemi preventivi portati dal lavoro con i radioisotopi.
- ☐ Le sonde marcate con fluorofori possono essere utilizzate per vedere la presenza di due o più alleli su dei cromosomi e viene usata per vedere la presenza di amplificazioni di alcuni geni come accade in alcune patologie (es nel carcinoma alla mammella c'è l'iperpressione di HER2).

Come si marca una sonda? (chiede sempre all'esame)

Si può marcare a livello interno sul fosfato alfa o al terminale 5' sul fosfato gamma.

I **metodi di marcatura interna** sono 2: (vedi immagine slide 19)

- Primer extension o random priming
- Nick translation

La differenza è che nella prima ottengo un'unica sonda continua che avrà tante marcature all'interno; nell'altra avrò tanti frammenti (quindi la sonda non è unica ma è fatta di più frammenti) che conterranno più di una marcatura al loro interno.

Nick translation

Tale metodo consta dei seguenti passaggi:

1. sono introdotte delle rotture della doppia elica di DNA utilizzando l'enzima DNAasi I che produce frammentazioni casuali nelle eliche
2. Questo danno viene quindi riparato sfruttando l'enzima DNA polimerasi I in presenza di nucleotidi liberi marcati in alfa con fosforo³². Visto che è una reazione polimerasica i fosfati gamma e beta vengono liberati sotto forma di pirofosfati, mentre l'unico che resta è P alfa ---> ecco perchè vengono marcati lì.
3. Tali nucleotidi sono incorporati nel DNA che risulta così marcato

Il numero di nucleotidi marcati incorporati è proporzionale al tempo nel quale la reazione viene proseguita.

Primer extension

Tale metodo contempla i seguenti steps:

1. Il DNA di interesse (sonda) è denaturato a dare filamenti a singola elica
2. Sono aggiunte sequenze primer --> i primer sono esanucleotidi di tutte le combinazioni possibili delle 4 basi, che andranno a mettersi "a caso" nelle due eliche del DNA, ovviamente a livello delle loro sequenze complementari.
3. Si aggiunge il frammento di Klenow, ovvero l'enzima DNA polimerasi I privata di circa 300 amminoacidi in modo che non abbia attività esonucleasica 5'--> 3', insieme ad un pool di con nucleotidi liberi marcati.
4. Vengono sintetizzate eliche complementari di DNA, inglobando anche nucleotidi marcati
5. Il DNA viene nuovamente denaturato per rilasciare la sonda genetica marcata.

(spesso chiede la differenza tra random priming e nick translation --> vedi su internet perchè si è capito poco niente).

2) Metodi di marcatura terminale:

- **Marcatura al 5'** --> Si fa usando nucleotidi trifosfati marcati in gamma. Si usa l'enzima **polinucleotide chinasi** che scambia il fosfato di un ATP marcato in gamma con il fosfato al 5' del mio DNA.
- **Marcatura al 3'** --> bisogna prima far tagliare ad un enzima di restrizione le estremità, in modo che crei delle sticky ends con 3'OH liberi per legarci nucleotidi marcati --> si usano **enzimi di restrizione che danno 5' protuding ends (sono quelli che forniscono l'innescò al 3' per le polimerasi).**

Come si usano le sonde? (domanda esame)

Si usano in:

- **saggi di ibridazione standard:** il bersaglio non è marcato ed legato ad un supporto solido, e la sonda è marcata in soluzione (dot-blot, southern-blot, northern blot, ibridazione in situ su tessuti o cromosomi)
- **saggi di ibridazione inversi:** la sonda non è marcata ed è legata a supporto solido, il bersaglio è marcato in soluzione (microarray)

La sequenza target e la sonda possono essere mescolate:

- **Su supporto solido (Dot blot)** La sequenza target è legata ad un supporto solido come un filtro da membrana e la sonda è aggiunta in soluzione: dopo lavaggio per rimuovere la sonda libera l'ibridazione viene rilevata sul supporto solido utilizzando il metodo più appropriato a seconda della marcatura.

Il dot blot si differenzia dagli altri perchè non separo gli acidi nucleici, che voglio analizzare in elettroforesi, ma metto una goccia di DNA che o estratto in un supporto solido e lo metto a contatto con una sonda. Questi sono utilizzati nella diagnostica (tecnologie ASO), per identificare gruppi sanguigni o mutazioni puntiformi dell'anemia falciforme.

- **In soluzione** Sia il target che la sonda sono liberi di muoversi così da massimizzare le opportunità di reazione: in tale modo la velocità di reazione è massima.
- **In situ** Con questo metodo la sonda in soluzione è aggiunta ad un preparato microbiologico o citologico che viene esaminato al microscopio. La sonda produce una variazione visibile nel campione se il target viene ibridizzato. La sensibilità è bassa, è utile per la ricerca di microrganismi in un campione.

Prima dell'ibridazione occorre che gli acidi nucleici vengano denaturati:

Le condizioni che possono destabilizzare la doppia elica provocando la denaturazione sono:

- alte temperature
- pH alcalino estremo (>13)
- bassa forza ionica
- presenza in soluzione di sostanze che rompono i ponti a idrogeno (urea, formammide)

Condizioni dell'ibridazione: quali sono le condizioni che aumentano la specificità del legame tra le due porzioni a singola elica degli acidi nucleici?

Nei saggi di ibridazione la cosa più importante per ottenere un buon risultato sono le **condizioni di stringenza**: esse sono i fattori che condizionano il riconoscimento tra sonda e bersaglio per dare una specificità assoluta di riconoscimento (nessun mismatch presente), oppure dare qualche grado di libertà nella formazione di mismatch. Se la sonda è un oligonucleotide di 50 nt, devo adottare alte condizioni di stringenza; per sonde molto lunghe invece posso usare condizioni di stringenza più basse.

Il fattore principale che determina la specificità è la capacità di formare legami a idrogeno, che a sua volta dipende da 4 fattori esterni:

- la **temperatura** --> più alta è e più favorisco appaiamenti corretti. Dei 4 fattori è quello che può essere modificato con maggiore facilità e viene usato per saggiare la specificità di una sonda
- il **pH**
- la **forza salina** (in laboratorio infatti abbiamo lavato in condizioni di forza ionica decrescente) --> più alta è la forza ionica e più favorisco appaiamenti non corretti, perchè diminuisco la forza di repulsione tra gli scheletri zuccherofosfato
- la **presenza di denaturanti**: la loro presenza rende le condizioni più astringenti

La discesa graduale della temperatura e la permanenza delle molecole per un certo tempo pochi gradi al di sotto della temperatura di denaturazione sono fondamentali affinché ci possa essere ibridazione, processo dipendente dai moti di agitazione termica. Se dopo la denaturazione la soluzione viene portata a bassa temperatura non si ha ibridazione, ma stabilizzazione della struttura secondaria delle singole catene.

Per mezzo dell'ibridazione si possono formare delle doppie eliche di DNA-DNA, DNA-RNA o RNA-RNA. La condizione fondamentale perché ciò avvenga è che in soluzione si mettano molecole con sequenza complementare (antiparallele). L'ibridazione è una forma di riconoscimento molecolare estremamente specifica.

--> Le sonde più lunghe sono quelle più specifiche. Le sonde più corte sono più versatili ma permettono un controllo più difficile della stringenza e danno problemi per quanto riguarda la specificità della reazione.

APPLICAZIONI DELL'IBRIDAZIONE

Può essere usata:

- nell'identificazione di mutazioni in sequenze nucleotidiche: la ricerca di tali mutazioni può essere utilizzata per diagnosticare malattie ereditarie, anche se molto spesso una malattia può essere indotta da più di una patologia. Per questo è necessario utilizzare sonde con bassa specificità o più sonde contemporaneamente. Tra le patologie diagnosticabili ricordiamo: fibrosi cistica, distrofia muscolare, fenilchetonuria e anemia.
- nell'identificazione dell'impronta genica: insieme alla PCR può essere utilizzata per determinare l'identità di una persona e viene usata nelle ricerche giudiziarie per confermare i sospetti su una persona o nei test di paternità

SAGGI DI IBRIDAZIONE STANDARD

Southern Blot

Metodo per il frazionamento del DNA:

- Il DNA genomico è frammentato con opportuni enzimi di restrizione.
- I frammenti di restrizione di diversa lunghezza sono separati su gel di agarosio.
- I frammenti sono denaturati in filamenti singoli e trasferiti per capillarità su una membrana (blot), un supporto solido.
- I frammenti di DNA legati alla membrana sono incubati con una sonda marcate.
- La sonda ibridizza con specifici frammenti di DNA di sequenza ad essa complementare.
- L'ibrido molecolare viene riconosciuto tramite le proprietà di marcatura della sonda (es. tramite esposizione autoradiografica)

Il southern blot si può usare nella diagnosi di alcune patologie dove le mutazioni cambiano un sito di restrizione: il DNA patologico quindi sarà più alto di quello normale.

Tecnica utilizzata laddove variazioni della sequenza nucleotidica determinano una differenza della lunghezza dei frammenti di restrizione, i quali possono essere messi in evidenza ibridizzandoli con sonde specifiche. Esempi:

- Parziale o totale delezione di geni

- Variazioni della sequenza di un gene (polimorfismi e mutazioni)

- Variazioni del numero di copie di geni, riarrangiamenti dei geni (traslocazioni)

Northern Blot

- Con il Northern blot si fraziona l'RNA. Con la sonda si vede l'espressione di un messaggero confrontata con l'espressione di un messaggero di normalizzazione (di riferimento).

- Non è una tecnica particolarmente sensibile

- L'uso di mRNA purificato elimina anche la possibilità di ibridazione non-specifica con l'rRNA

- Può essere applicata per:

- la misurazione dell'espressione di un singolo gene;
- valutare il peso molecolare dei trascritti e di caratterizzare varie isoforme alternative

- L'RNA deve essere il più integro possibile --> anche solo una rottura per molecola di mRNA determina una forte riduzione del segnale specifico.

Ibridazione in situ

• Questa metodica si basa sull'ibridazione di sonde marcate direttamente su cellule o tessuti. Si può ibridare su sezioni istologiche o su materiale non sezionato (in quest'ultimo caso si parla whole-mount).

• E' l'unica tecnica che permette di localizzare l'espressione di un dato mRNA a livello delle singole cellule.

• Ideale per studiare i geni espressi in un gruppo ristretto di cellule all'interno di un tessuto, o i geni la cui espressione è modulata nel tempo e nello spazio (estremamente utilizzata negli studi di biologia dello sviluppo).

Dot Blot

Il dot blot è un sistema molto rapido per la diagnosi di anemia falciforme:

si mette la goccia di sangue su un supporto di nylon: una striscetta di sangue la ibridizziamo con una sonda per il gene normale e un'altra con una sonda che contiene il gene mutato. Siccome si tratta di una mutazione mutiforme le condizioni di stringenza saranno altissime. In base al risultato avrò la discriminazione tra le cellule eterozigoti portatrici (sane) e omozigoti malate.

Western blot

Tecnica per l'identificazione di proteine (frazionate) con l'uso di anticorpi.

☐ Innanzitutto è necessario eseguire l'SDS-PAGE in modo che le proteine vengano separate in base alla grandezza molecolare

☐ poi, con l'electroblotting le proteine separate si trasferiscono dal gel di poliacrilammide su un supporto solido perchè il gel ha maglie troppo strette e se lo faccio un trasferimento per capillarità ci vorrebbe troppo tempo.

☐ Poi si passa al riconoscimento vero e proprio della proteina tramite anticorpo.

Il western posso farlo anche in vivo con l'immunofluorescenza.

Esistono anche **altri blot** per valutare reazioni tra proteine:

Il **Farwestern blot** diretto o indiretto riguarda lo studio di proteine immobilizzate su un supporto solido (in seguito al western) che vengono saggate per la loro interazione con altre proteine. Questo è rilevabile in maniera indiretta tramite anticorpi o diretta tramite altre proteine che interagiscono con la proteina interagente.

Il **Southwestern blot** permette di studiare le interazioni proteine-DNA. È un blotting di proteine fatto seguire dall'ibridazione con una sonda. Ad esempio si fa per vedere se ci sono proteine che riconoscono sequenze consensus di promotori.

Nell'ambito delle interazioni proteina-proteina e proteina-acidi nucleici, una delle applicazioni più importanti è la **separazione elettroforetica di tipo bidimensionale**: mi dà alla fine una separazione unica delle proteine. Tecnica:

- prima separo le proteine secondo il loro punto isoelettrico su un gel di poliacrilammide sul quale c'è un gradiente di pH: dove trova il suo punto isoelettrico la proteina non si muove più.
- poi metto queste proteine in un gel verticale di poliacrilammide per separarle secondo il loro peso molecolare.

SAGGI DI IBRIDAZIONE INVERSA o ARRAY

Hanno come principio il fatto che **sono marcati i bersagli e non le sonde**.

Sia i macroarrays che i microarrays sono stati sviluppati per soddisfare l'esigenza di misurare contemporaneamente l'espressione di più geni: con i microarray in cui possiamo analizzare più geni contemporaneamente, con i macro si è più limitati. Entrambi si basano sullo stesso principio:

1. Come sonda si usano oligonucleotidi o molecole di cDNA non marcati, immobilizzati in posizioni precise di un supporto solido
2. L'array viene ibridizzato con una miscela complessa di molecole marcate rappresentative dell'mRNA espresso dalle cellule in esame

Oggi esistono sistemi di ibridazione automatizzata di questo tipo che garantiscono una stringenza ottimale e una risposta sicura rispetto all'espressione differenziale di determinati geni.

Queste tecnologie consentono di verificare l'espressione genica con più sonde contemporaneamente, e avere un'elaborazione dei dati con un software con un algoritmo molto accreditato.

Principio su cui si basano:

Noi ibridizziamo contemporaneamente centinaia di sonde ad una medesima condizione, quindi non può essere che la stringenza di una sonda sia esattamente identica a quella di tutte le altre.

Quindi una volta gli array servivano per tirar fuori il dato iniziale: ad esempio c'è una deregolazione dell'espressione di certi geni; poi questi geni venivano studiati singolarmente con le tecniche tipo il northern blot; poi si andava a fare gli array dei geni selezionati --> questa è la base di array che sono attualmente in uso in commercio per valutare l'espressione genica di determinate patologie e predire se il paziente sarà a rischio o meno di recidività.

Esistono addirittura kit che valutano l'espressione di alcuni geni nell'ambito della farmacogenomica e della tossicogenomica per predire se un soggetto sarà responder o non-responder ad un determinato farmaco. Importante per la cura di pazienti affetti da depressione o da malattie cardiovascolari --> richiedono un cura SPECIFICA che può essere diversa da un paziente all'altro.

Tecnica:

1. Su un supporto (matrice silicea o di grafite) e in maniera computerizzata, vengono inserite le sonde;
2. si prende il campione A (quello di riferimento/ normale) e si estrae il suo RNA;
3. estraiamo l'RNA anche dal campione B (quello da studiare);
4. si trasforma l'RNA in cDNA con la trascrittasi inversa: il primer che usa la trascrittasi può essere marcato con fluorofori --> i fluorofori del campione di controllo possono essere marcati in rosso, mentre il campione da analizzare sono marcati in verde.
5. I cDNA dei due campioni vengono mescolati insieme e li si mette sul supporto contenente le varie sonde: ovviamente tutti i cDNA competeranno tra loro per ibridizzarsi con le sonde.



se nel patologico un gene si esprime molto, ovviamente prevarrà il verde: vuol dire che quei geni sono iper-espressi nel soggetto patologico; se invece il soggetto patologico non esprime quel gene viene fuori la macchia rossa (perchè tutto il cDNA marcato con il rosso va ad

ibridizzare con le sonde); se il gene è espresso allo stesso modo sia nel campione di controllo che in quello da analizzare allora c'è un 50 % di probabilità: in parte si attaccano i cDNA rossi e in parte quelli verdi --> ottengo il giallo.

Ovviamente tra il verde, il rosso e il giallo c'è tutta una gamma di variazioni di colore che il software registra e mi comunica --> queste differenze di colore corrispondono alle differenze di espressione tra il campione sano e quello da analizzare.

Altre tecniche di studio della biologia molecolare:

METODI DI AMPLIFICAZIONE

Esistono:

- l'amplificazione della sequenza bersaglio, ovvero la PCR;
- L'amplificazione del segnale;
- l'amplificazione della sonda.

La PCR ce la spiegherà in laboratorio --> leggere slide

Amplificazione della sonda

1) La tecnica per eccellenza per l'amplificazione della sonda è la **ligase chain reaction**:

Tecnica di amplificazione che permette il rivelamento di sequenze specifiche di DNA bersaglio tramite l'amplificazione di sonde complementari alla sequenza bersaglio che vengono unite da una **DNA ligasi termostabile**. Essa unisce tra loro due coppie di oligo se questi si appaiano a regioni contigue. Durante i cicli successivi il DNA bersaglio è costituito dal DNA originale e dalle coppie di primers uniti dalla ligasi. Ad ogni ciclo l'acido nucleico bersaglio risulterà raddoppiato.

Le sonde vengono identificate perchè hanno dei fluorocromi alle loro estremità.

La LCR permette l'amplificazione specifica di bersagli di DNA con sensibilità e specificità simili alla PCR.

Impieghi:

Utilizzato sia per identificare geni bersaglio, sia per l'analisi di mutazioni geniche perchè anche un solo mismatch è sufficiente per evitare che la ligasi forsi il legame fosfodiesterico, interrompendo l'amplificazione.

Limiti:

Elevato rischio di contaminazione del campione (come tutte le tecniche di amplificazione).
Necessita per l'analisi di disporre di campioni di DNA di elevata purezza data la sensibilità delle ligasi alla composizione del mezzo.

Amplificazione del segnale

La tecnica usata è la **Branched DNA Detection**:

si basa su una serie di ibridazioni a cascata, l'ultima delle quali è l'ibridazione con una sonda accoppiata ad un sistema di rilevazione o colorimetrico o chemiluminescente.

Si chiama così perché c'è una sonda iniziale ancorata al fondo di un pozzetto che viene riconosciuta dal bersaglio, il quale a sua volta è riconosciuto da un'altra sonda, che a sua volta è riconosciuta da un'altra sonda, che a sua volta riconosce altre sonde che si legano come i rami di un albero ed infine le ultime che servono per la rilevazione del segnale.

Perché si fa l'amplificazione del segnale? Perché in ogni amplificazione del bersaglio rischiamo di introdurre delle alterazioni che derivano dall'amplificazione di DNA esogeno che rimane nell'ambiente, quindi avere una tecnica di amplificazione che amplifica i sistemi di rilevamento è isotermica e permette di evitare il problema detto prima.

Amplificazione del bersaglio

La tecnica usata è la **NASBA** (nucleic acid sequence based amplification) O **TMA** (transcription mediated amplification) --> sono la stessa cosa, cambiano solo gli enzimi utilizzati

Sono tecniche per l'amplificazione di RNA, che differiscono dalla PCR.

L'RNA di solito viene quantificato per amplificazione o ibridazione: in questi sistemi però c'è il passaggio dell'RNA in cDNA --> problema perché potremmo introdurre cDNA esogeni che potrebbero falsare il risultato.

I vantaggi di queste tecniche sono:

- che l'amplificazione è isotermica;
- non necessita di enzimi termostabili;
- avviene in un unico passaggio;
- ha un grado di sensibilità pari alla RT-PCR.

Impieghi:

Esistono farmaci molto costosi (es quelli contro l'infezione dell'HCV o HIV) che possono essere somministrati SOLO in determinate fasi della malattia, per cui bisogna quantificare esattamente quanta è l'espressione di HCV in quel momento. Per avere una quantificazione corretta sono state create queste tecniche.

Si usano 3 enzimi (la RNA polimerasi (del fago T7), la trascrittasi inversa e la RNasi H) e due primer specifici (**uno dei due primer della NASBA contiene la sequenza del promotore T7**)

Si basa sullo schema di trasferimento dell'informazione genica caratteristico del meccanismo di replicazione dei genomi dei retrovirus: da RNA a DNA e, di nuovo, RNA.

A partire dal primer avviene la retrotrascrizione, la RNasi H degrada l'RNA, la trascrittasi inversa fa l'altro filamento. Quello che è stato creato è un dsDNA che contiene il promotore per la RNA polimerasi virale T7. Viene aggiunta la RNA polimerasi T7, per ottenere numerose copie di RNA.

Questo avviene come un ciclo, perchè poi quell'RNA diventerà nuovamente bersaglio dei due primer, verrà retrotrascritto, si crea il cDNA con il promotore etc etc...

La NASBA oggi è accoppiata ai metodi di quantificazione real time PCR, quindi può fungere non solo da sistema di amplificazione dell'RNA messaggero ma anche da sistema per rilevamento anche solo di poche copie di RNA.

SEQUENZIAMENTO DEL DNA

C'è quello chimico di Maxam-Gilbert e quello **enzimatico di Sanger**. Quest'ultimo è stato accoppiato con la PCR per fare un sequenziamento automatizzato utilizzando dei primer marcati. Si basa sull'uso di didesossi-nucleotidi, che possono essere incorporati nella catena nascente ma la bloccano.

Tale metodo si basa sulla ricostruzione dell'elica complementare a quella che si vuole sequenziare, utilizzando il frammento di Klenow ed un opportuno primer. La reazione viene realizzata in presenza di deossiribonucleotidi marcati ed in 4 provette ciascuna delle quali contiene un tipo di dideossiribonucleotide che viene incorporato durante la sintesi del DNA, bloccandone la prosecuzione della stessa. Ciascuna provetta conterrà frammenti di varia lunghezza terminanti con lo stesso nucleotide. I frammenti così ottenuti vengono separati con elettroforesi e autoradiografia in modo del tutto analogo al precedente e l'elaborazione dei risultati avviene in modo del tutto identico.

Inoltre si possono usare dei Dye Terminator: ogni didesossi-nucleotide trifosfato aggiunto viene marcato con un fluoroforo diverso, in questo modo è possibile determinare se c'è una fine con una base piuttosto che con un'altra.

Metodi alternativi di sequenziamento: **sequenziamento epigenetico (Bisulfite Sequencing)**

è una tecnica usata per determinare la metilazione del DNA:

si basa sul fatto che bisulfite deamina la citosina trasformandola in uracile, mentre la 5-metil citosina deaminata resta citosina. Quindi:

viene trattata la sequenza da verificare con il bisolfite e se c'erano C normali queste vengono trasformate in U; se invece c'erano 5-metil citosine (che sono i marcatori epigenetici) rimangono C (non cambiano). Le sequenze trattate e non trattate vengono confrontate dal software che mi dà l'esatta mappa di dove era metilata originariamente la sequenza. È un'analisi indiretta ma molto precisa e specifica.