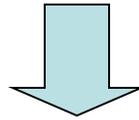


COME FACCIAMO A ISOLARE I GENI E A STUDIARLI?



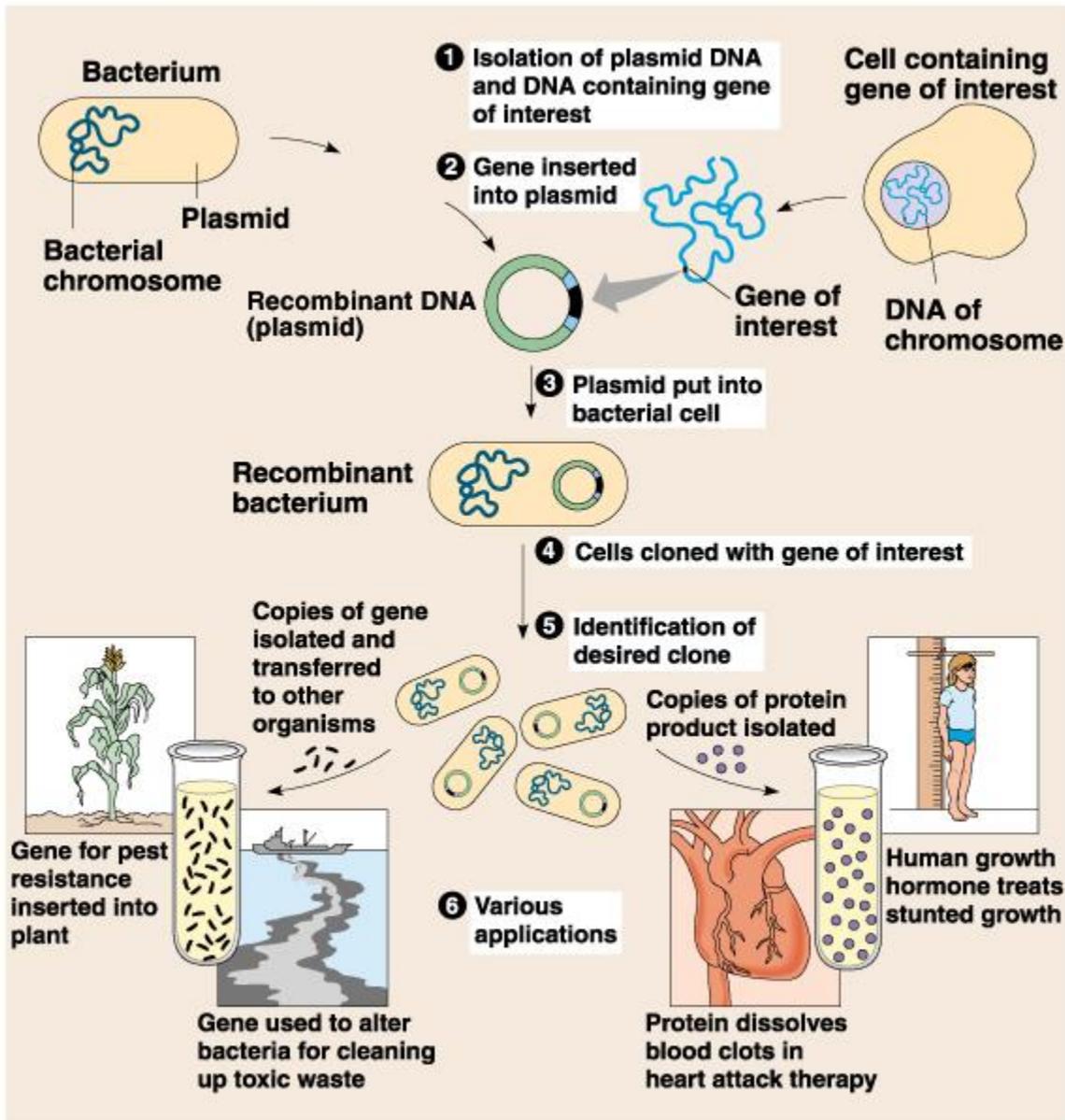
**LA TECNOLOGIA DEL DNA
RICOMBINANTE CI PERMETTE DI
CLONARE I GENI**

LA TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE CI PERMETTE DI CLONARE I GENI E DI FAR ESPRIMERE LE LORO PROTEINE



CLONARE UN TRATTO DI DNA SIGNIFICA: OTTENERE UNA POPOLAZIONE DI DNA IDENTICA ALLA MOLECOLA DI PARTENZA

CLONARE UN ORGANISMO SIGNIFICA: OTTENERE UNA POPOLAZIONE DI ORGANISMI CHE SONO GENETICAMENTE IDENTICI

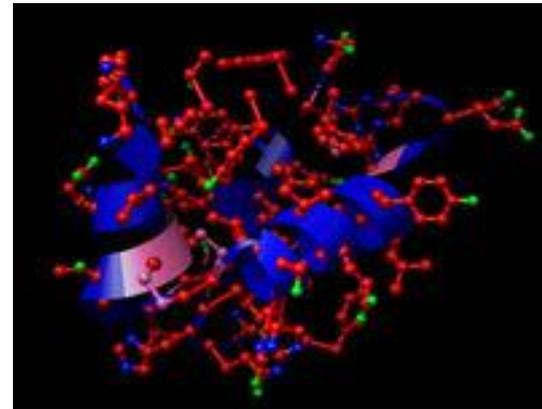


**La tecnica del DNA ricombinante
permette di ottenere proteine
“copiate” da quelle già esistenti
ma anche “nuove proteine”, più
termostabili, meno tossiche etc.**

Si parla di *mutagenesi mirata*

Farmaci biotecnologici

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



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

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

DNA ricombinante



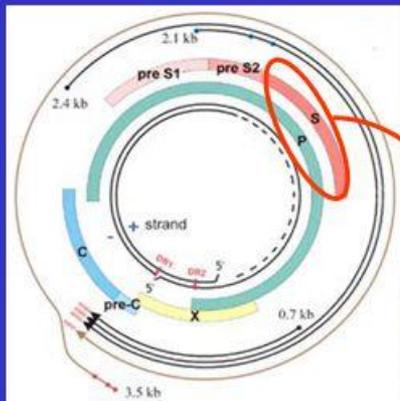
**proteine virali
antigenicamente valide
altamente purificate**



VACCINI

Vaccini a subunità prodotti con la tecnica del DNA ricombinante

Il vaccino contro l'epatite B è il primo vaccino a DNA ricombinante autorizzato

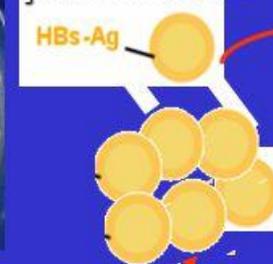


Genoma HBV



Saccaromices cerevisiae

Antigene purificato

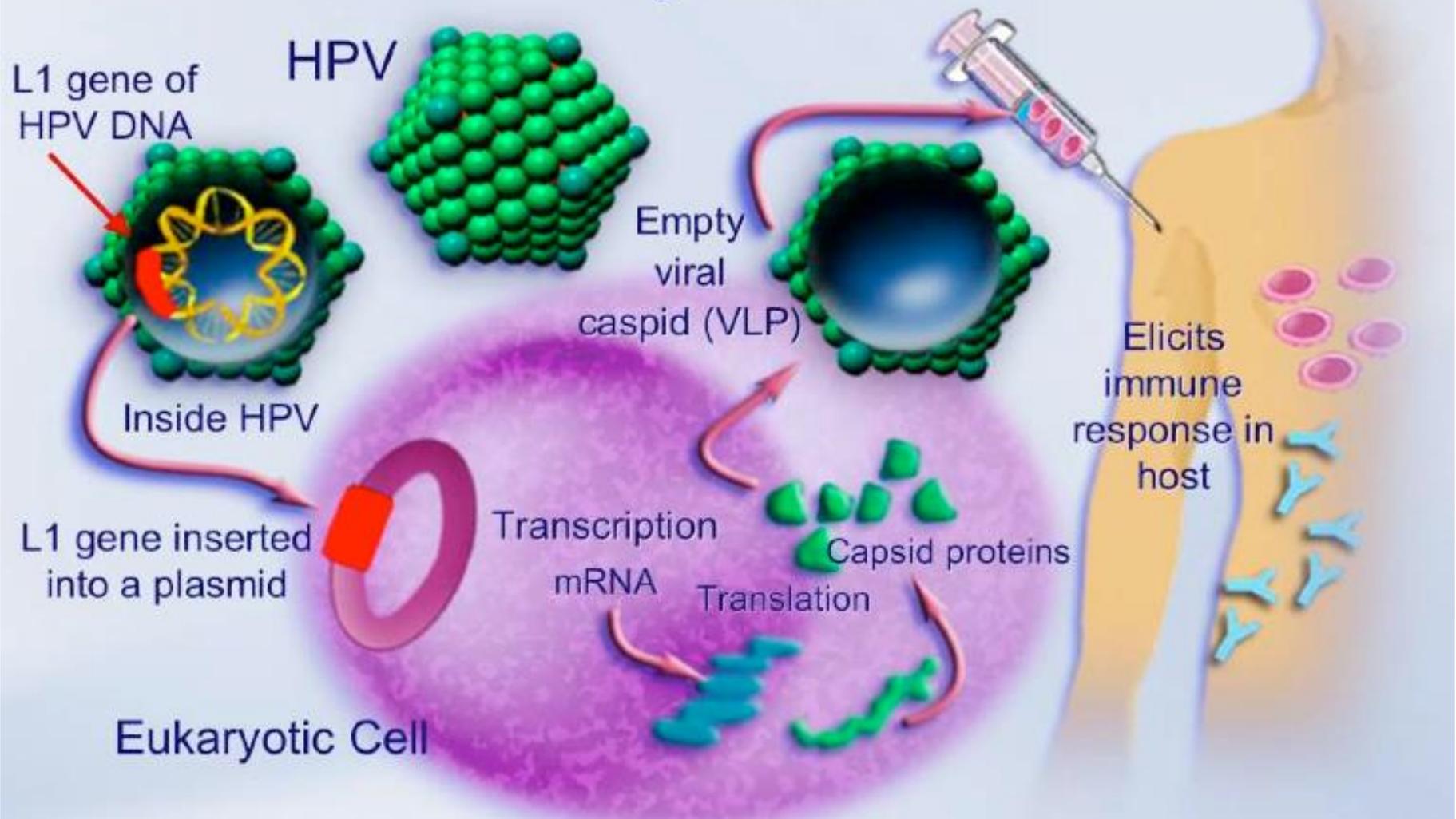


HBsAg rappresenta la molecola di scelta per allestire il vaccino.



Vaccino anti-HBV

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



Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Ormoni Polipeptidici

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

Alcuni sono farmaci salvavita



Ormone della crescita:
Humatrope®

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

Altre categorie di farmaci prodotti mediante la tecnologia del DNA ricombinante

Immunomodulatori e Antitumorali

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



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



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

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

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



PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

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

**PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA
DEL DNA RICOMBINANTE**

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

PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

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

PRINCIPALI FARMACI PRODOTTI CON LA TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE

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

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

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

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

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

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

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

BIOTECNOLOGIA, le applicazioni

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

PER IL CLONAGGIO SERVE:

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

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

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

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

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

Nucleasi

DNA polimerasi

Ligasi

Enzimi che modificano le estremità

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

Terminologia:

DNAasi (DNAases) – agiscono solo sul DNA

RNAasi (RNAases) – agiscono solo sull'RNA

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

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

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

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

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

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

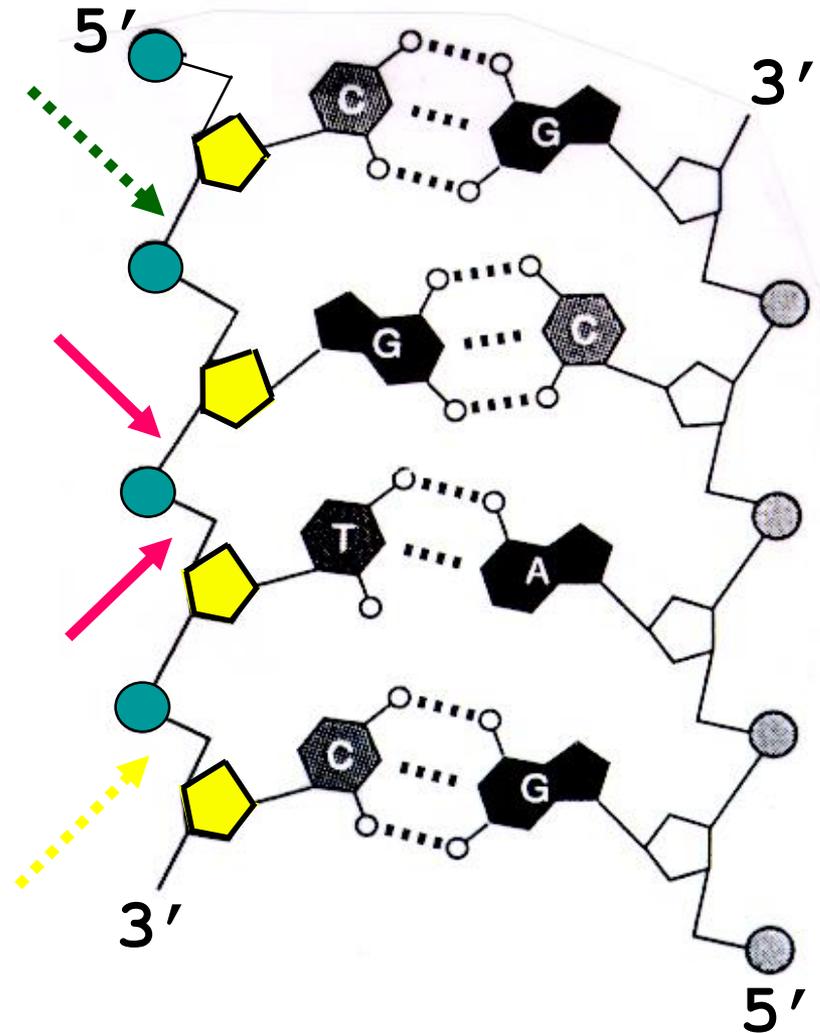
Più spesso il gruppo fosfato viene lasciato al terminale **5'**, ma da alcune al **3'**.

Le nucleasi (idrolasi) idrolizzano i legami fosfodiesterici

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

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

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



Enzimi per manipolare DNA e RNA

1. Enzimi di restrizione (tipo II)

2. DNA polimerasi

A. DNA dipendenti

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

B. RNA dipendenti

- Trascrittasi inversa

C. Indipendenti da stampo

- Terminal transferasi

3. RNA polimerasi

A. DNA dipendenti

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

B. Indipendenti da stampo

- Poly(A) polimerasi

4. Fosfatasi e chinasi

- T4 polinucleotide chinasi
- Fosfatasi alcalina

Enzimi per manipolare DNA e RNA

5. Endonucleasi

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

6. Esonucleasi

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

7. Ribonucleasi

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

8. DNA ligasi

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

9. RNA ligasi

- T4 RNA ligasi

Le nucleasi

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

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

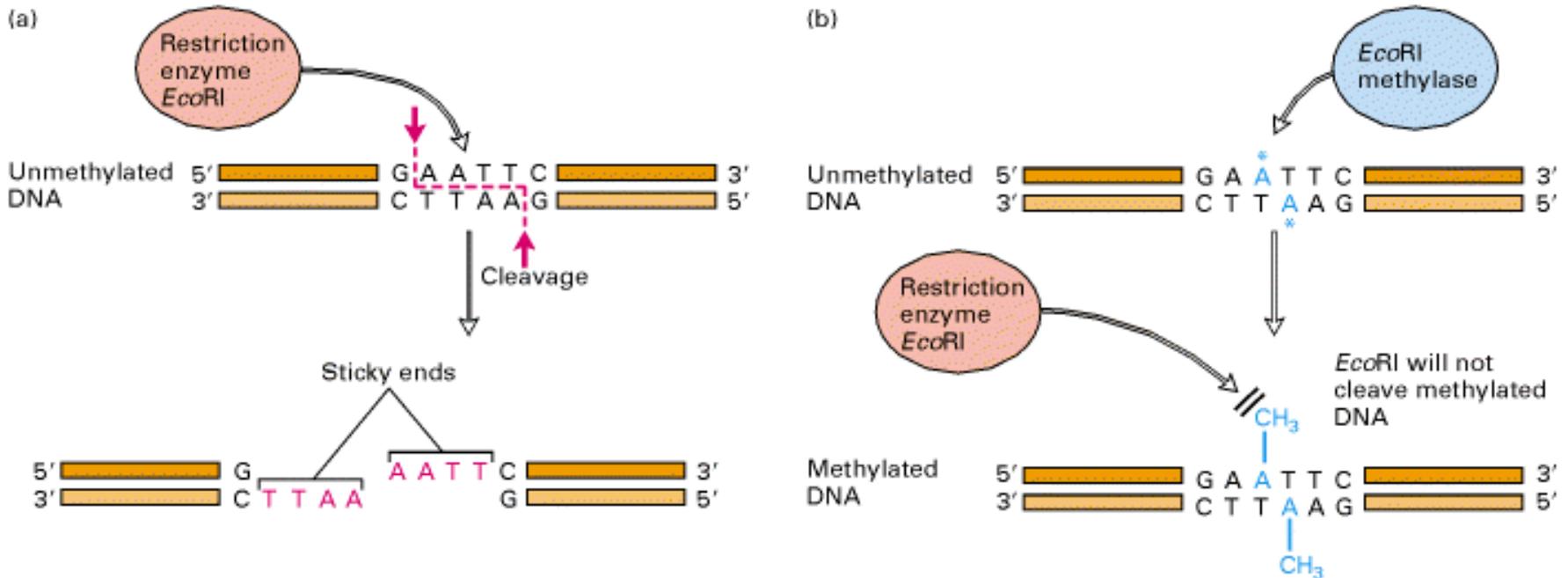
Questi enzimi sono alla base del clonaggio dei geni e di tutti gli altri aspetti della tecnologia del DNA ricombinante

GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

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

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

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



Gli enzimi di restrizione, consentendo di tagliare il DNA in frammenti non casuali, la cui grandezza dipende unicamente dalla sequenza, e dotati di estremità specifiche, costituiscono un formidabile strumento sia per l'analisi che per la manipolazione del DNA.

Sistemi di restrizione-modificazione

Tipo I

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

Tipo II

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

Tipo III

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

Tipo IIs

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

Nomenclatura:

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

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

Endonucleasi di restrizione di tipo II

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

ENDONUCLEASI DI RESTRIZIONE DI TIPO II

-Servono a tagliare il DNA in modo preciso e prevedibile

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

Hae III

5' GGCC 3'

3' CCGG 5'

Eco RI

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

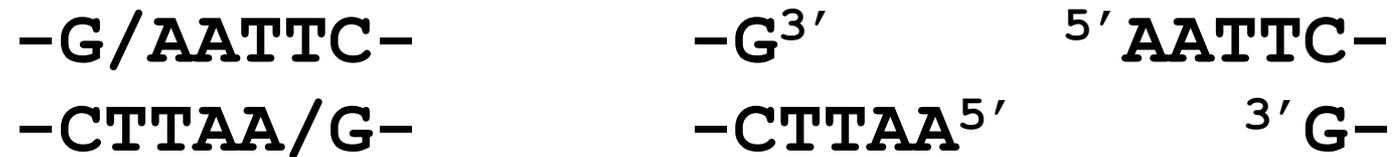
Not I

5' GCGGCCGC 3'

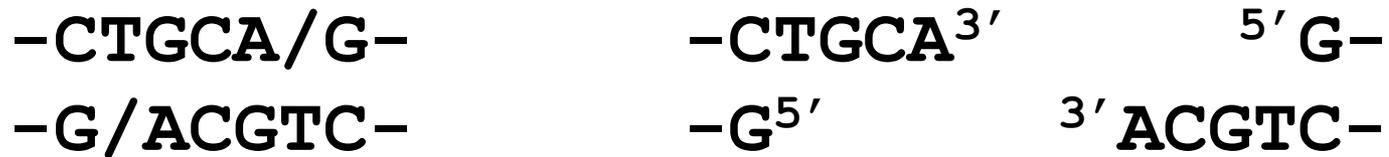
3' CGCCGGCG 5'

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

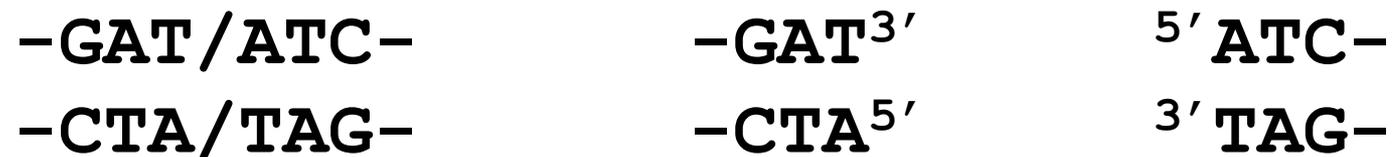
Eco RI= sporgente (protruding) al 5'



Pst I= sporgente (protruding) al 3'



Eco RV= nette (blunt)



QUANTE VOLTE TAGLIA UN ENZIMA DI RESTRIZIONE?

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

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

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

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

**Due enzimi che hanno:
stesso sito di riconoscimento e stesso sito di taglio sono detti
isoschizomeri**

HpaII C/CGG (*Haemophilus parainfluenzae*)
G/GCC
MspI C/CGG (*Moraxella species*)
G/GCC

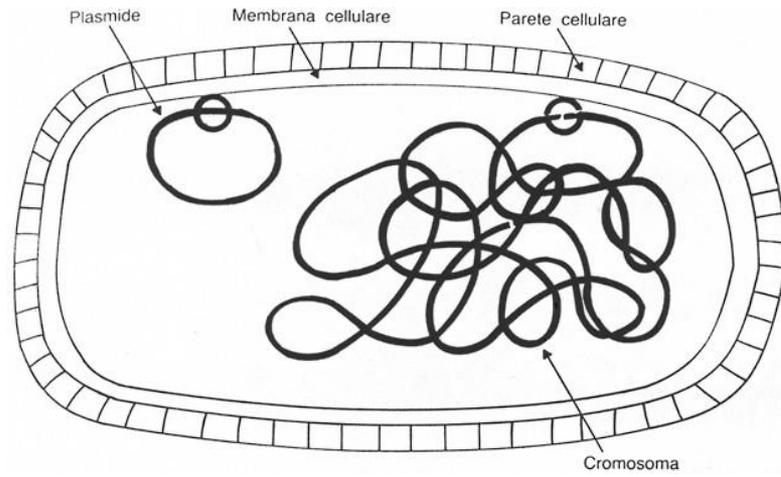
**Due enzimi che hanno:
stesso sito di riconoscimento ma diverso sito di taglio sono
detti neoschizomeri**

SmaI CCC/GGG (*Serratia marcescens*)
GGG/CCC
XmaI C/CCGGG (*Xantomonas malvacearum*)
GGGCC/C

VETTORI

- Plasmidi
- Fagi
- Cosmidi
- Cromosomi artificiali batterici (BAC)
- Cromosomi artificiali di lievito (YAC)

PLASMIDI



I plasmidi

Elementi genetici circolari, extracromosomali, capaci di replicazione autonoma (replicone)

Le dimensioni variano da 1 Kb a 250 Kb e il loro numero varia da 1 a diverse centinaia di copie per cellula ospite

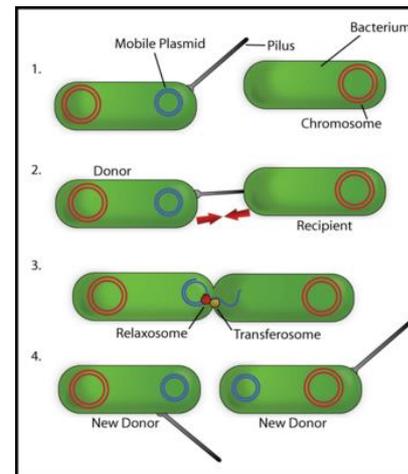
La loro informazione genetica non è essenziale per la cellula ospite ma di solito conferire un vantaggio selettivo in particolari condizioni

Alcuni plasmidi possono esistere sia allo stato libero sia integrato nel cromosoma dell'ospite (**episomi**)

Alcuni plasmidi si mantengono stabilmente all'interno della cellula, altri hanno la capacità di diffondersi attraverso la coniugazione

Plasmidi naturali

- Unità accessorie che si replicano e sono ereditate indipendentemente dal DNA del cromosoma batterico.
- Dipendono dagli enzimi dell'ospite per la loro replicazione e trascrizione.
- Meccanismi molecolari precisi mantengono un numero stabile di copie del plasmide nella cellula ospite e assicurano la loro ripartizione tra le cellule figlie
- I plasmidi **coniugativi** possiedono una dozzina di geni per il trasferimento diretto del DNA ad una cellula ricevente attraverso il pilo (coniugazione).



Plasmidi degli eucarioti

Sono stati identificati anche plasmidi nei lieviti che possono essere circolari e lineari. Quelli circolari sono eccellenti vettori di clonaggio in sistemi eucariotici: sono lunghi da 4 a 6 kb e presenti in 50-100 copie per cellula.

- I plasmidi circolari di lievito hanno una localizzazione nucleare, vengono assemblati nella cromatina con gli istoni presenti nel nucleo e non conferiscono alcun vantaggio selettivo né fenotipo alla cellula ospite. Questi plasmidi circolari hanno una loro origine di replicazione e si replicano una sola volta durante il ciclo cellulare sfruttando il corredo enzimatico dell'ospite.
- I plasmidi lineari sono entità replicative autonome, localizzate nel citoplasma che conferiscono un fenotipo killer ai lieviti che li hanno poiché codificano una tossina che inibisce la crescita di ceppi di lievito sensibili ad essa. Codificano per una loro (DNA) Polimerasi e hanno una loro origine di replicazione che gli permette di replicarsi autonomamente più volte durante il ciclo cellulare



Budding Yeast
Saccharomyces cerevisiae



Fission Yeast
Schizosaccharomyces pombe

Plasmidi naturali dei batteri

Regione *ori* (origine di replicazione): geni per la replicazione

Lo spettro d'ospite di un plasmide è determinato dalla sua regione *ori*

Maggiore è il numero di geni nella regione *ori*, maggiore è la possibilità di replicarsi in ospiti diversi.

Spesso codificano proteine che conferiscono nuove proprietà all'ospite (a volte di grande interesse commerciale o clinico):

- Resistenza ad antibiotici, sostanze tossiche...
- Capacità di produrre antibiotici, tossine, fattori di virulenza...
- Nuove capacità metaboliche (degradazione di composti aromatici, fermentazione di zuccheri, produzione di solfuro di idrogeno...)
- Enzimi di restrizione e modificazione
- Capacità di fare la coniugazione

Altre volte non è possibile associarli a nessun fenotipo: plasmidi **CRIPTICI**

Plasmidi F

Portano dei geni (tra=trasferimento) per promuovere la coniugazione e il trasferimento di plasmidi tra un batterio e l'altro (batterio donatore F+ e batterio ricevente F-)

Plasmidi R

Codificano per enzimi capaci di distruggere o modificare gli antibiotici come ampicillina, cloramfenicolo, tetraciclina, kanamicina ecc.

Alcuni plasmidi portano un'unica resistenza, altri fino a otto. Possono essere anche coniugativi e diffondersi rapidamente.

Plasmidi col

Conferiscono un vantaggio al batterio portatore nei confronti di batteri della stessa specie o specie affini.

Codificano per le batteriocine (colicine, subtilisine, ecc.) capaci di permeabilizzare le membrane o degradare gli acidi nucleici.

Plasmidi di virulenza

Portatori di tossine; rendono il ceppo batterico più patogeno.

Il ceppo di *E. coli* responsabile della "diarrea del viaggiatore" è portatore di un plasmide codificante per una enterotossina.

Plasmidi metabolici

Codificano per enzimi capaci di degradare composti aromatici, pesticidi, zuccheri ecc. In alcuni ceppi di *Rhizobium* portano i geni necessari per la nodulazione nelle leguminose.

Esempi di fenotipi conferiti da plasmidi

- Produzione di antibiotico ▶ SCP1 ▶ *Streptomyces coelicolor*
- Antibiotico-resistenza ▶ RP4 ▶ *Pseudomonas aeruginosa*
- Resistenza al batteriofago ▶ pNP40 ▶ *Lactococcus lactis*
- Produzione di batteriocina ▶ p9B4-6 ▶ *Lactococcus lactis*
- Trasferimento coniugale ▶ F ▶ *Escherichia coli*
- Cristallo proteico insetticida ▶ pHD2 ▶ *Bacillus thuringiensis*
- Competenza ecologica nel suolo ▶ pRtrW14-2c ▶ *Rhizobium leguminosarum*
- Produzione di emolisina ▶ pJH1 ▶ *Enterococcus faecalis*
- Degradazione dell'erbicida ▶ 2,4-D pJP4 ▶ *Alcaligenes eutrophus*
- Fermentazione del lattosio ▶ pLM3601 ▶ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
- Resistenza ai metalli pesanti ▶ pMERPH ▶ *Pseudomonas* sp.
- Fissazione dell'azoto ▶ pIJ1007 ▶ *Rhizobium leguminosarum*
- Nodulazione ▶ pPN1 ▶ *Rhizobium trifoli*
- Degradazione di alcaloidi ▶ pRme41a ▶ *Rhizobium meliloti*
- Formazione di tumori ▶ Ti plasmid ▶ *Agrobacterium*
- Produzione di proteasi ▶ pLM3001 ▶ *Lactococcus lactis*
- Produzione di feromoni ▶ pAD1 ▶ *Enterococcus faecalis*
- Produzione di sideroforo ▶ pDEP10 ▶ *Escherichia coli*
- Tolleranza a NaCl ▶ pRtrW14-2b ▶ *Rhizobium leguminosarum*
- Degradazione del toluene ▶ Tol plasmids ▶ *Pseudomonas putida*

Principali funzioni dei plasmidi di interesse medico

- **Coniugazione** : *Plasmide F*, meccanismo di trasferimento genico
- **Resistenza agli antibiotici**: *Plasmidi R*
- **degradazione enzimatica** (e.g. penicillina)
- **modificazioni enzimatiche** (e.g. cloramfenicolo)
- **alterata permeabilità** (e.g. tetracicline)
- **alterazione del target** (e.g. streptomicine)
- **via metabolica alternativa** (e.g. sulfamidici)

Classificazione

-Plasmidi coniugativi (plasmidi F)

recano l'informazione necessaria per trasferirsi da una cellula all'altra (*geni tra*)

-Plasmidi non-coniugativi

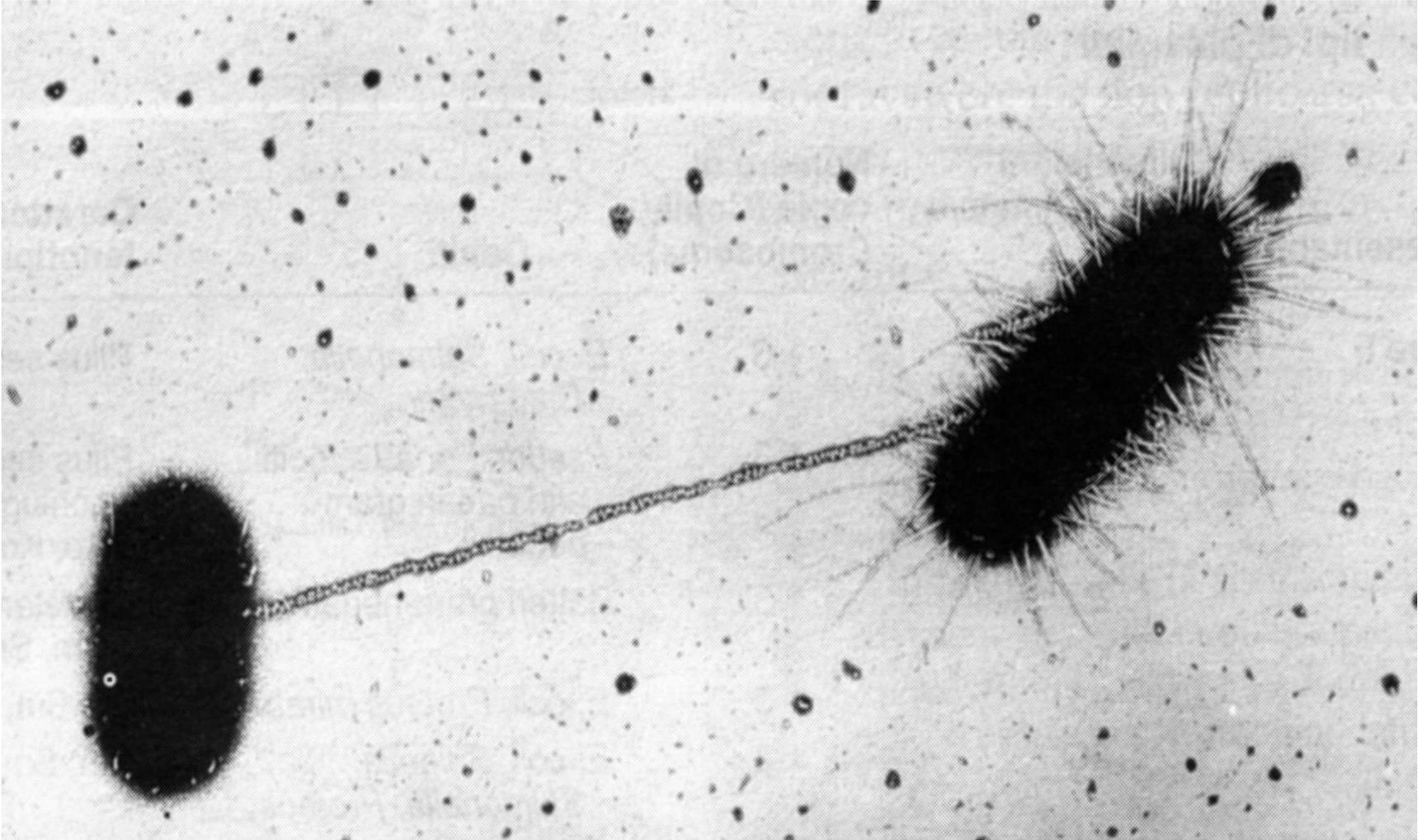
- Plasmidi R: portano geni che conferiscono resistenza a uno o più agenti antibatterici (es: ampicillina, mercurio)
- Plasmidi Col: codificano per colicine (proteine che uccidono altri batteri)
- Plasmidi degradativi: permettono di metabolizzare molecole insolite (es: toluene)
- Plasmidi della virulenza: conferiscono patogenicità (es: plasmidi Ti di *Agrobacterium tumefaciens*)

Oppure

-Plasmidi ad alto numero di copie (rilassati)

-Plasmidi a basso numero di copie (stringenti)

Coniugazione



Pili sessuali: presenti in numero di 1-10 per cellula, sono spessi 9-10 nm

Replicazione plasmidica

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 una **origine di replicazione**, chiamata *ori* (nel caso dei plasmidi *oriV*, per “*ori* vector”)

I plasmidi si replicano per **replicazione θ** (uni o bi-direzionale) o per **circolo rotante**

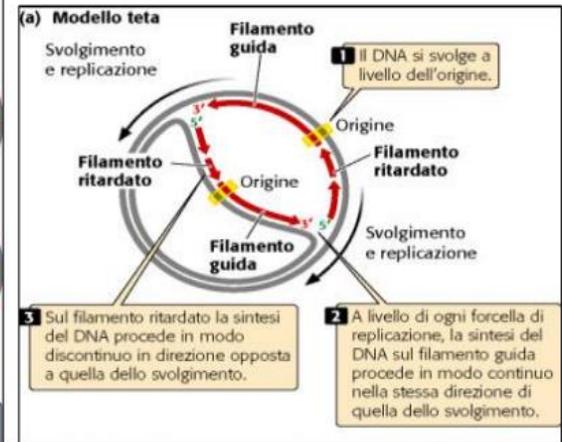
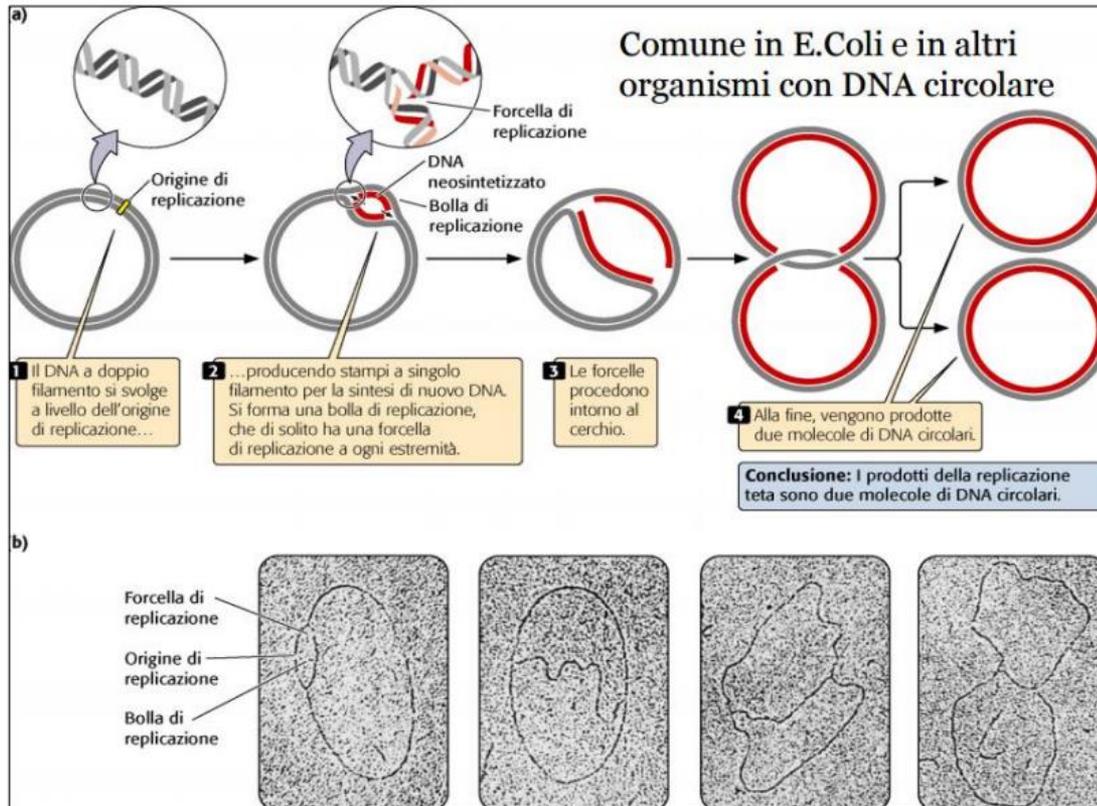
Richiedono proteine plasmidiche e/o dell'ospite batterico

Funzioni dell'origine di replicazione

Oltre ad essere essenziale per la replicazione, l'origine di replicazione controlla:

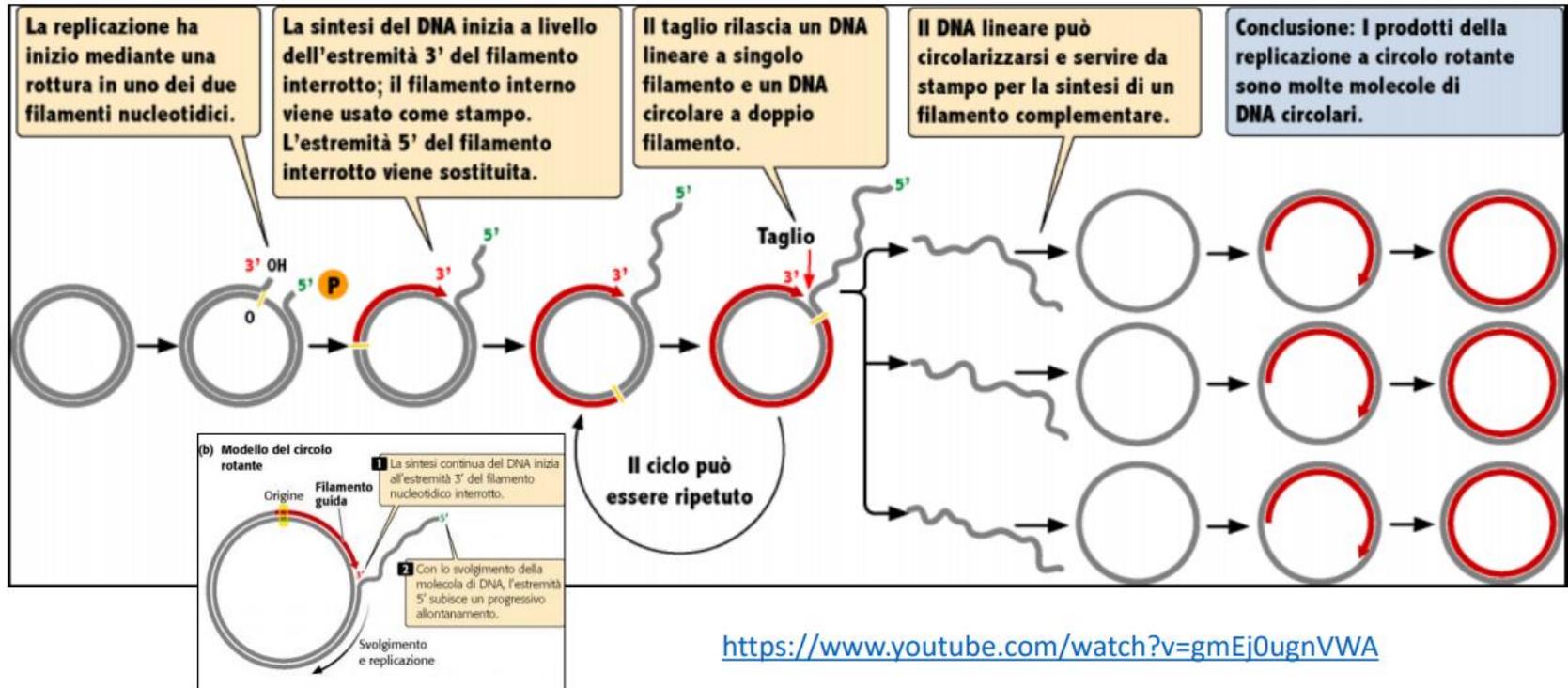
- Il numero di copie
- La specificità d'ospite
- I gruppi di incompatibilità

La replicazione teta



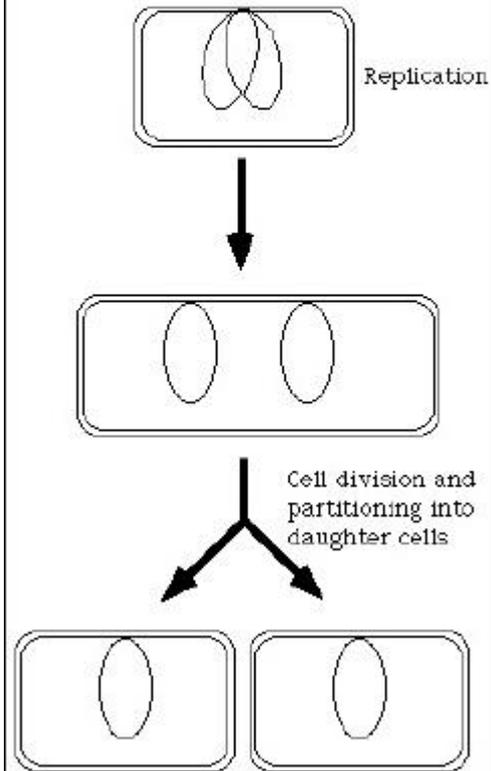
<https://www.youtube.com/watch?v=2THQtKHKnhQ>

La replicazione a circolo rotante

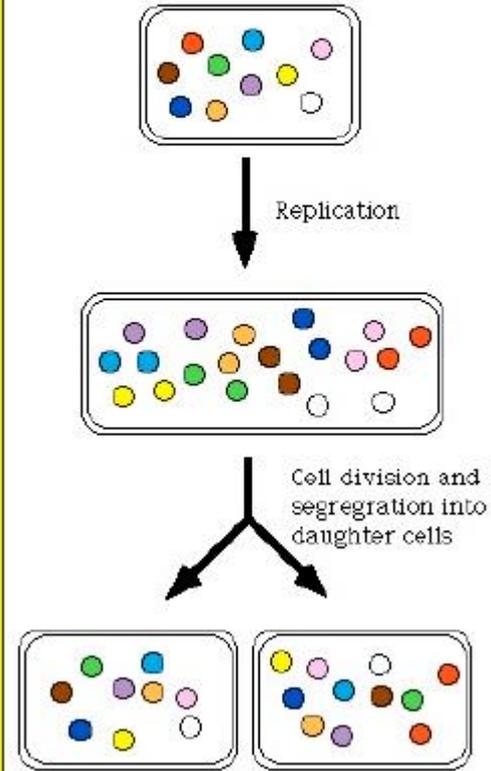


PLASMID PARTITIONING AND SEGREGATION

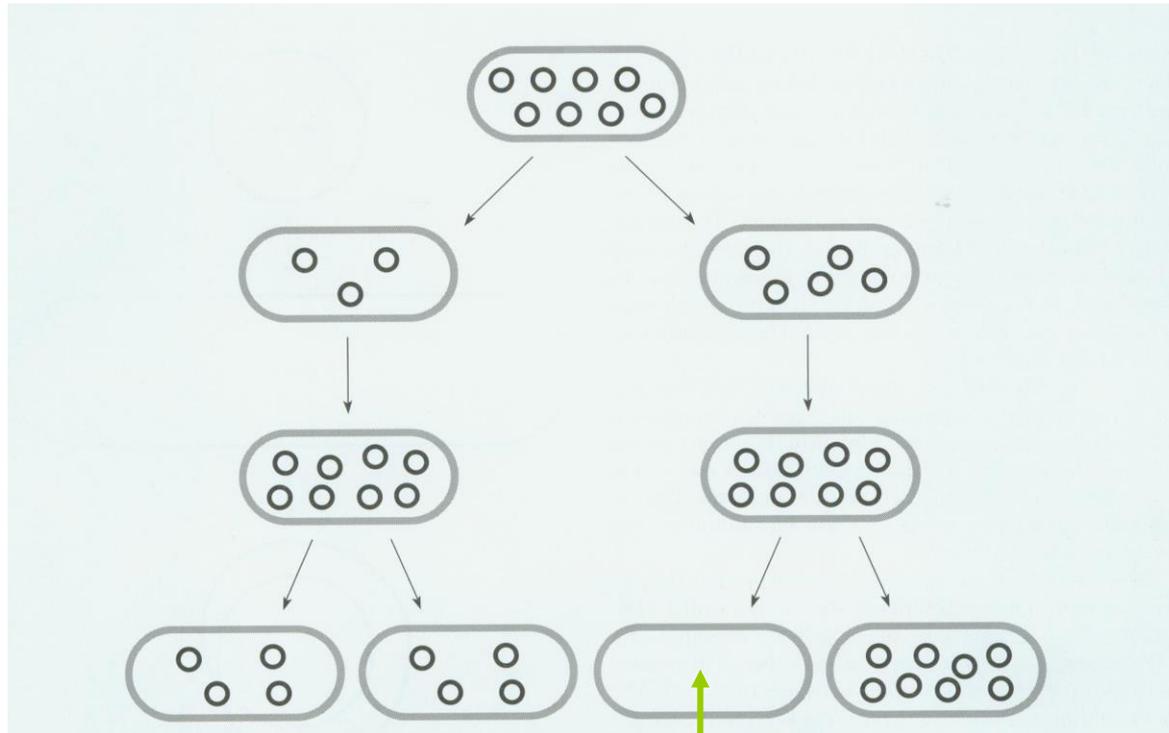
(A) Low copy number plasmids
(replication coordinated with
chromosome)



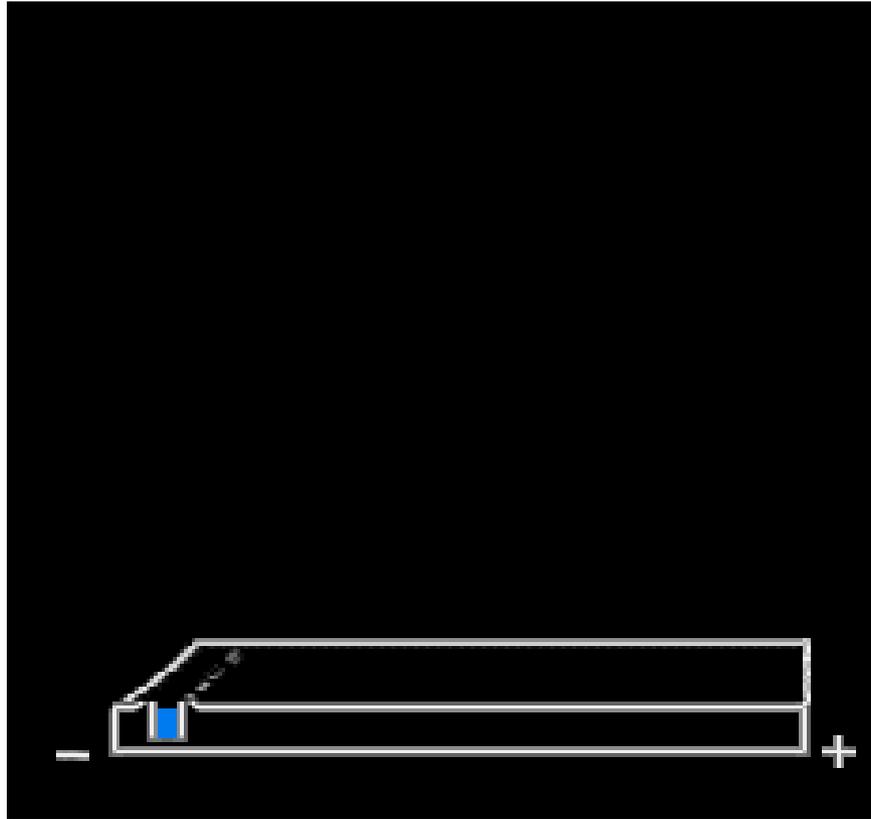
(B) High copy number plasmids
(random partitioning)



La distribuzione casuale dei plasmidi può portare alla loro perdita in assenza di pressione selettiva

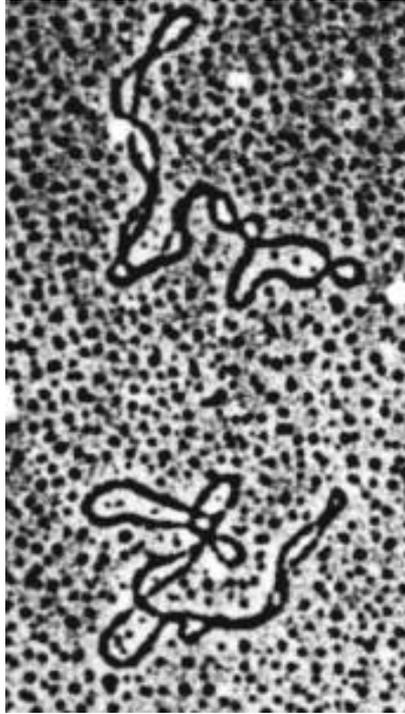


Perdita del plasmide

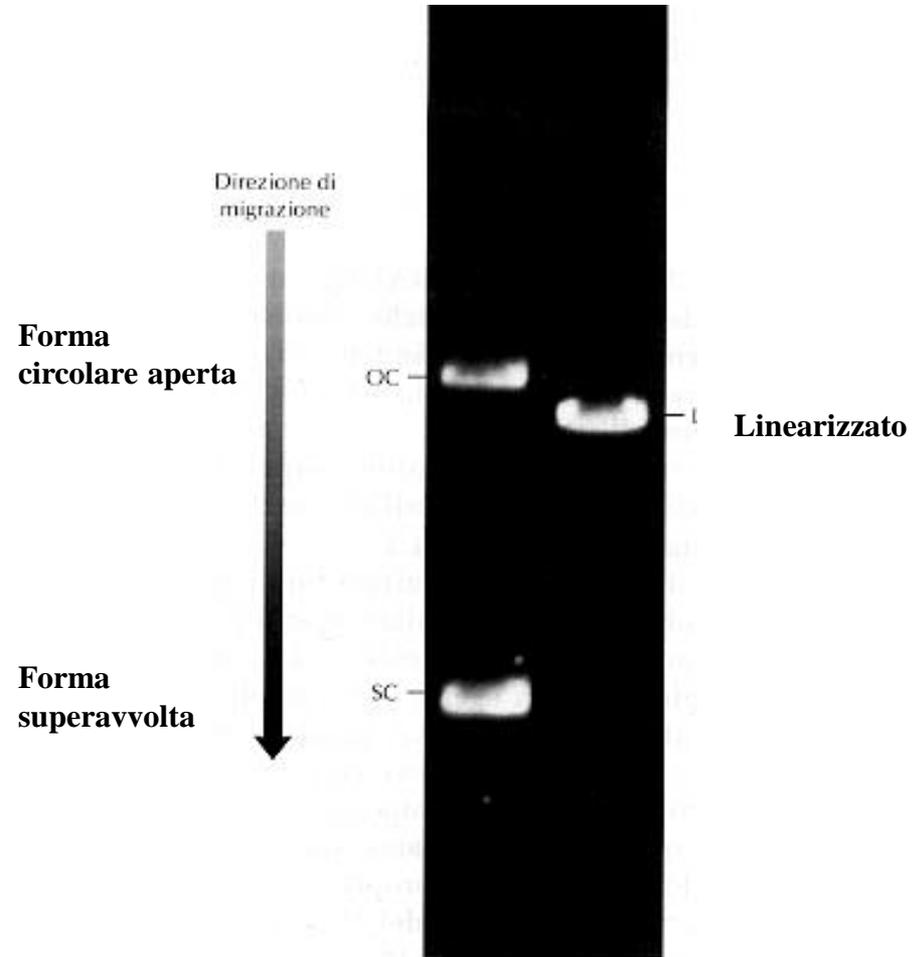


Plasmidi naturali

Molecole circolari di dsDNA (1.5-3000 kb),
extracromosomiali e capaci di autoreplicazione



Supercoiled Plasmid DNA



CLONAGGIO in PLASMIDE

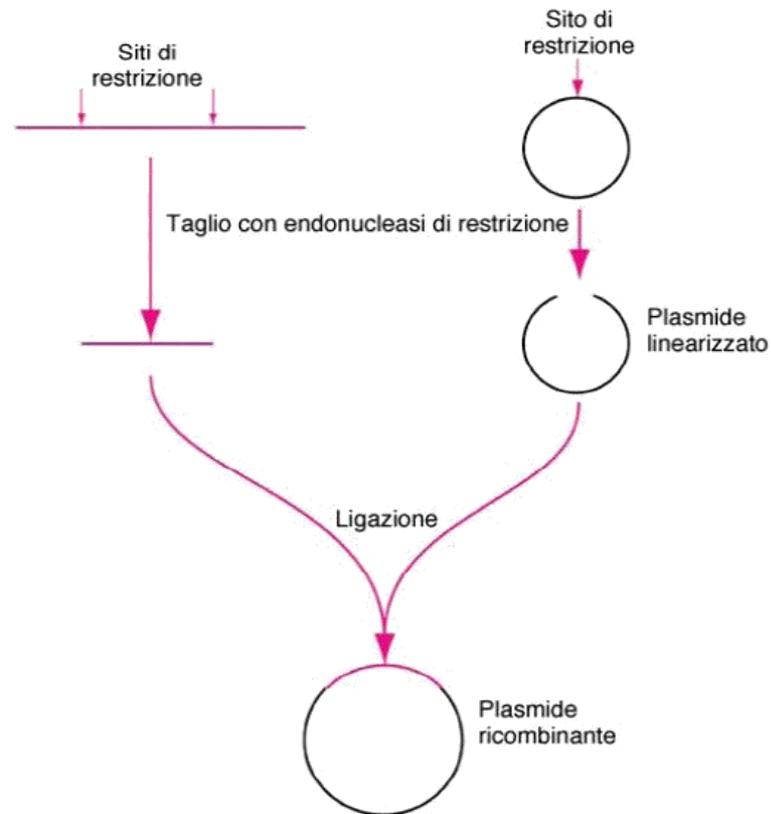
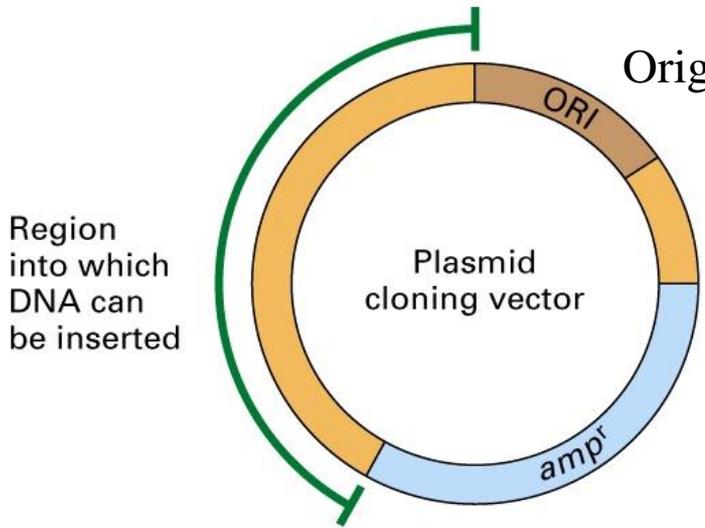


Figura 3.3 Taglio e unione del DNA

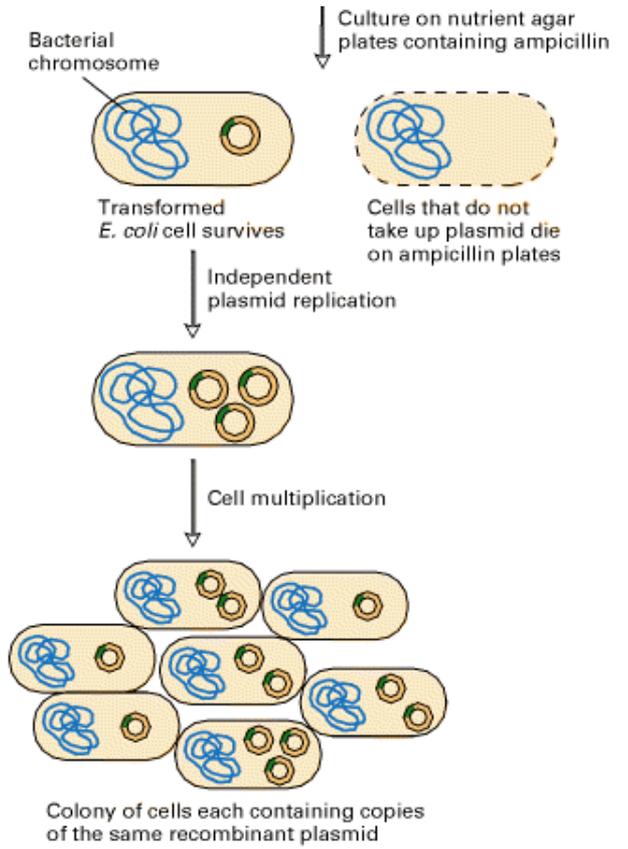
Elementi di un vettore plasmidico

1. Origine di replicazione
2. Marcatore di selezione
3. Sito di restrizione unico

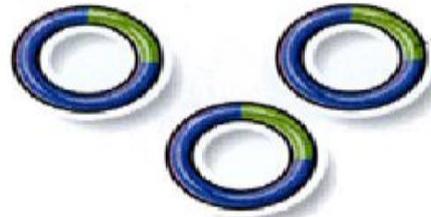
Origine di replicazione in E. Coli



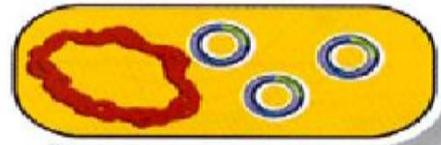
Marcatore di selezione che permette ai batteri trasformati di crescere su terreno selettivo



Il DNA dei plasmidi è circolare.



Gene di resistenza all'ampicillina.



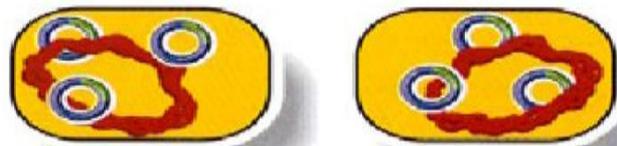
I batteri e i loro plasmidi si dividono in due ogni mezz'ora.



Il batterio prepara la propria divisione: duplica il suo cromosoma e il DNA dei plasmidi.



Scissione.



Si ottengono due batteri identici.

In 12 ore di coltura, un batterio dà origine a 168 milioni di batteri.

Resistenza agli antibiotici:



Solo i batteri che hanno integrato un plasmide codificante il gene per la resistenza possono crescere su agar nutritivo in presenza di antibiotico

Il clonaggio di un frammento di DNA richiede varie fasi

Scelta e preparazione del vettore

- Preparazione dei frammenti di DNA da clonare

Giunzione del DNA da clonare al vettore

Introduzione nella cellula ospite

Selezione

Analisi dei prodotti

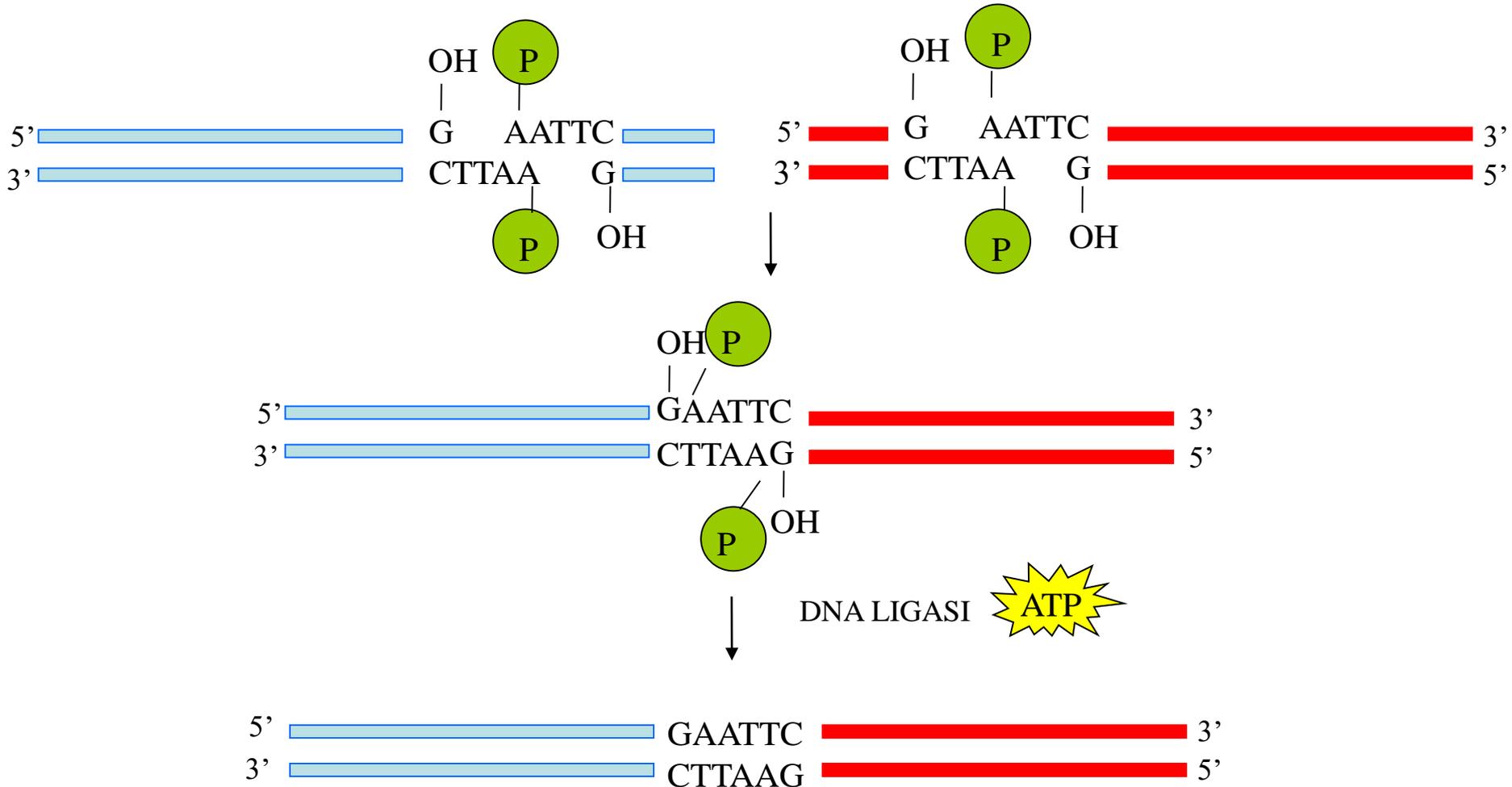
Le estremità coesive prodotte da uno stesso enzima possono appaiarsi.

————— G
————— CTTAA

AATTC —————
G —————

————— GAATTC —————
————— CTTAAG —————

Infine la DNA ligasi viene utilizzata per legare covalentemente le due molecole di DNA

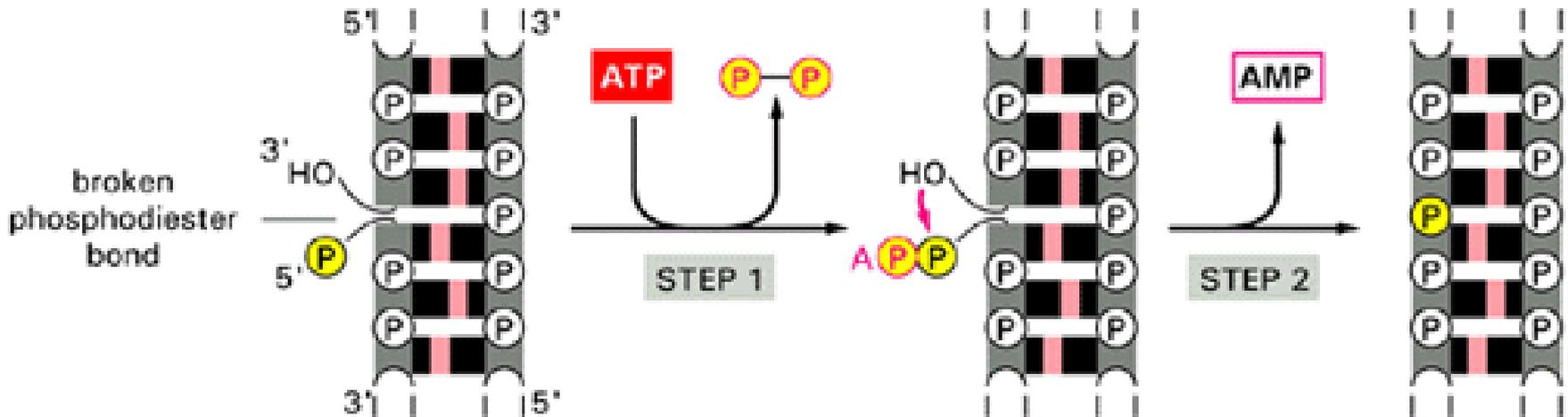


Ligazione

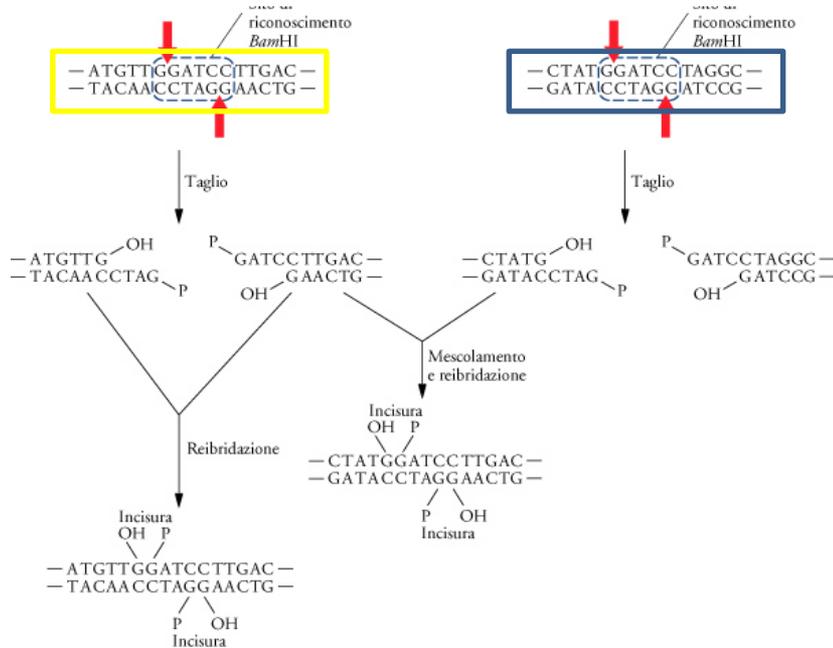
Dopo aver tagliato (e isolato) specifici frammenti di DNA, il passo successivo di un clonaggio consiste nel “cucirli” tra loro in modo covalente. Nella maggior parte dei casi questo compito è affidato alle ligasi, enzimi che catalizzano la formazione di legami fosfodiesterici tra estremità 3'-OH e 5'-P di molecole di DNA adiacenti, uguali (ligazione intra-molecolare) o diverse (ligazione inter-molecolare). Catalizzano, inoltre la chiusura di interruzioni a singolo filamento (nicks) in molecole di DNA a doppio filamento.

Il ruolo naturale della ligasi consiste nella riparazione dei nicks a singolo filamento di DNA danneggiati o nella giunzione dei frammenti di Okazaki durante la duplicazione del DNA. L'appaiamento labile di due frammenti di restrizione con estremità coesive, dunque, è simile alla giunzione di due nicks, molto vicini, situati su filamenti opposti.

Le DNA ligasi sono enzimi capaci di legare covalentemente due molecole di DNA adiacenti con estremità libere



Legatura di estremità coesive



La DNA ligasi salda nicks a singolo filamento con un 5'-P ed un 3'-OH

Gli enzimi più usati in laboratorio sono quelli derivati da *E. coli* e dal fago T4:

La ligasi da *E. coli* richiede il cofattore NAD e magnesio e lega solo basi contigue.

La DNA ligasi che deriva dal fago T4 richiede ATP e ioni magnesio e lega anche estremità BLUNT (con minor efficienza).

DNA ligasi (T4 o *E.coli*)

DNA LIGASI

La DNA ligasi salda nicks a singolo filamento con un 5'-P ed un 3'-OH

Le estremità “coesive”, che contengono cioè corti filamenti a singolo filamento complementari tra loro, che vengono generate da molti enzimi di restrizione, facilitano il compito della ligasi, perché le estremità tendono ad appaiarsi tra loro.

Se, invece, bisogna ligare 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.

DNA Ligase Selection Chart

While more than one ligase may work for your application, the following selection chart presents our recommendations for optimal performance.

	Blunt/TA Ligase Master Mix	Instant Sticky-end Master Mix	ElectroLigase®	T4 DNA Ligase	Hi-T4™ DNA Ligase	Salt-T4™ DNA Ligase	Quick Ligation™ Kit	T3 DNA Ligase	T7 DNA Ligase	HiFi Taq DNA Ligase	Taq DNA Ligase	9°N™ DNA Ligase	NEBNext Quick Ligation™ Module	SplintR® Ligase	E.coli DNA Ligase
DNA APPLICATIONS															
Ligation of sticky ends	★★	★★★	★★	★★	★★	★★	★★★	★★	★★	*	*	*			*
Ligation of blunt ends	★★★	*	★★	★★	★★	★★	★★★	★★							
T/A cloning	★★★	*	★★	★★	★★	★★	★★	*	*						
Electroporation			★★★	★★	★★										
Ligation of sticky ends only									★★★						
Repair of nicks in dsDNA	★★	★★	★★	★★★	★★★	★★★	★★	★★	★★	★★	★★	★★		★★	★★
High-complexity library cloning	★★	★★	★★	★★★			★★								
Adapter Ligation ▲	★★★	★★	★★	*			★★	*					▲		
Ligation-Dependent DNA Sequence & SNP Detection (LCR, LDR & related methods)										★★★	★★	★★			
Ligation-Dependent RNA Sequence & SNP Detection				*										★★★	
Ligation of adjacent ssDNAs on an RNA splint														★★★	
NGS APPLICATIONS															
NGS Library Prep dsDNA-dsDNA (ligation)	▲			▲				▲					▲		
FEATURES															
Salt tolerance (>2X that for T4 DNA Ligase)						✓		✓							
Ligation in 15 min. or less	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Master Mix Formulation	✓	✓											✓		
Thermostable										✓	✓	✓			
Thermotolerant					✓					✓	✓	✓			
Recombinant	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

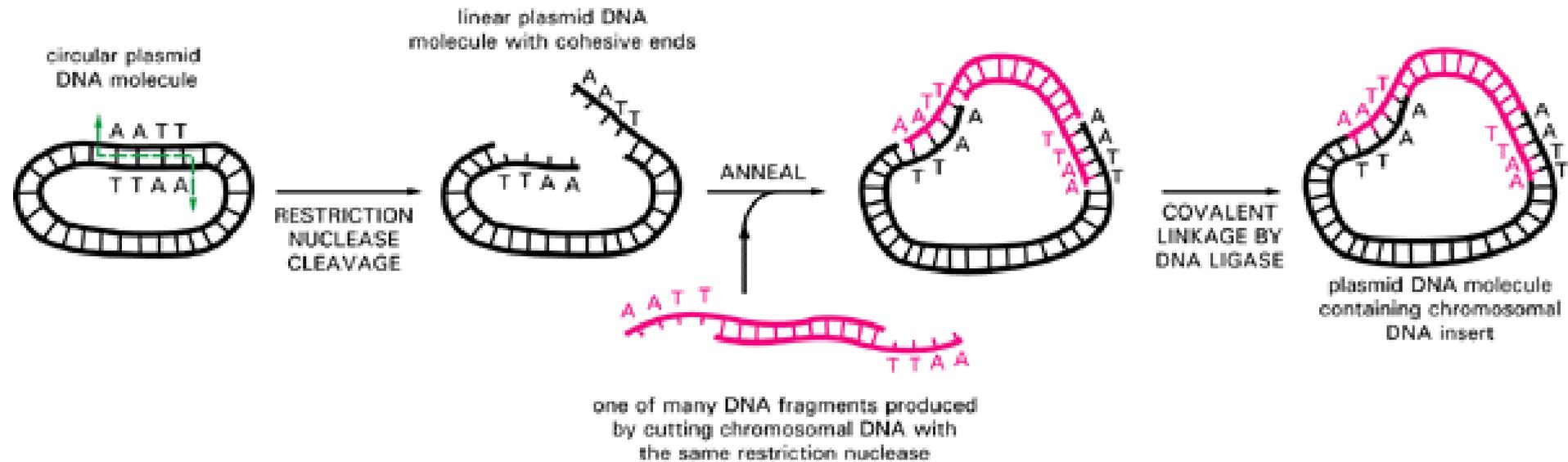
KEY	
★★★	Optimal, recommended ligase for selected application
★★	Works well for selected application
*	Will perform selected application, but is not recommended
▲	Please consult the specific NGS protocol to determine the optimal enzyme for your needs

Per ottenere buoni risultati la reazione di ligazione deve essere accuratamente ottimizzata rispetto alla:

- temperatura e al tempo di reazione
- alla concentrazione totale del DNA
- alla concentrazione dell'inserto e del vettore.

Per quanto riguarda la concentrazione è importante sia quella del DNA totale (T), che quella dell'inserto (I) e del vettore (V). In linea di massima, basse concentrazioni di DNA favoriscono le reazioni di primo ordine come la ricircularizzazione del vettore, la cui velocità è linearmente proporzionale alla sua concentrazione. D'altra parte aumentare la concentrazione totale incrementando la concentrazione di vettore, peggiora la situazione, ma aumentare la concentrazione dell'inserto aumenta la probabilità di avere inserti circularizzati o vettori con inserti multipli.

Cosa può succedere in una reazione ligasica ?

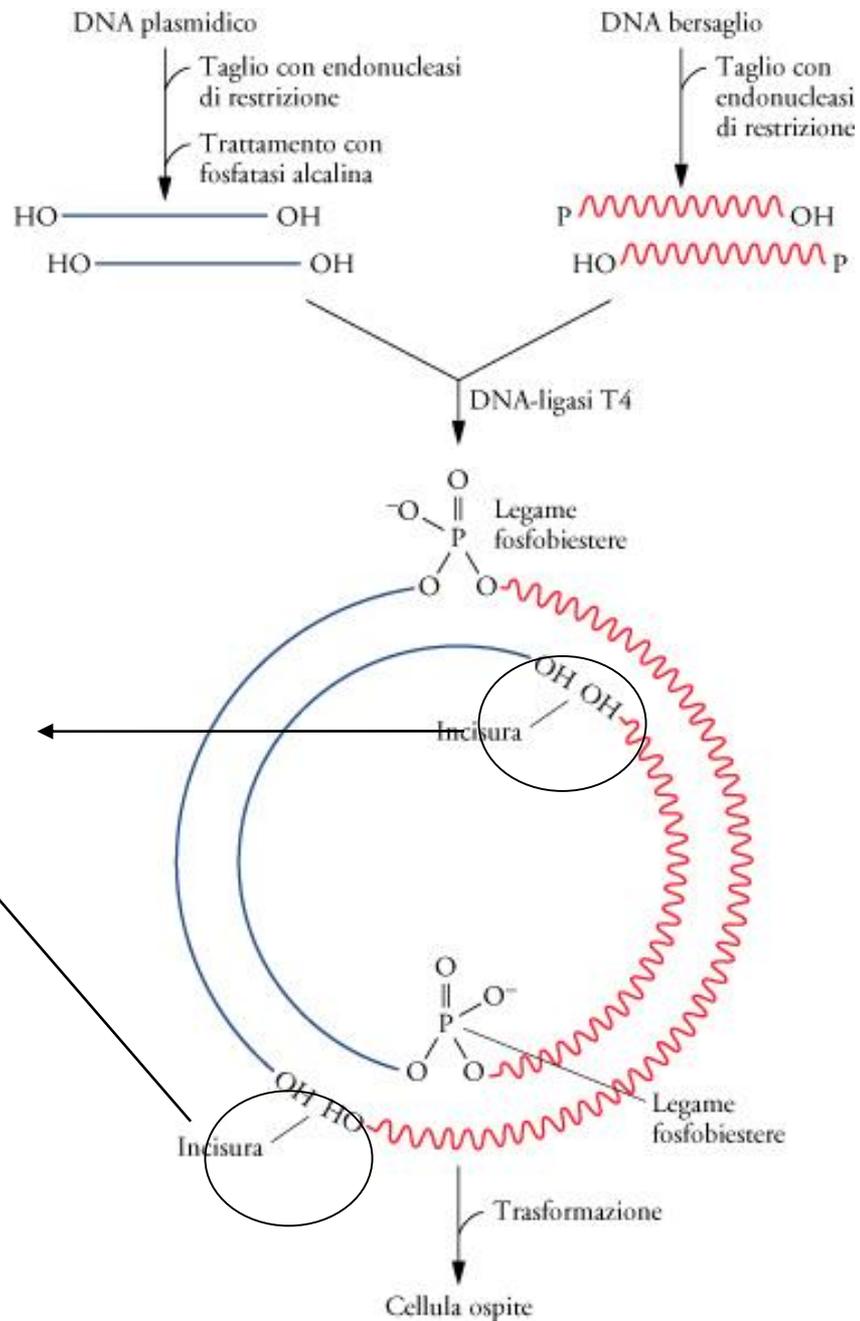


1. Il vettore si richiude su se stesso senza legarsi con l'inserto

1. Il vettore si lega con l'inserto

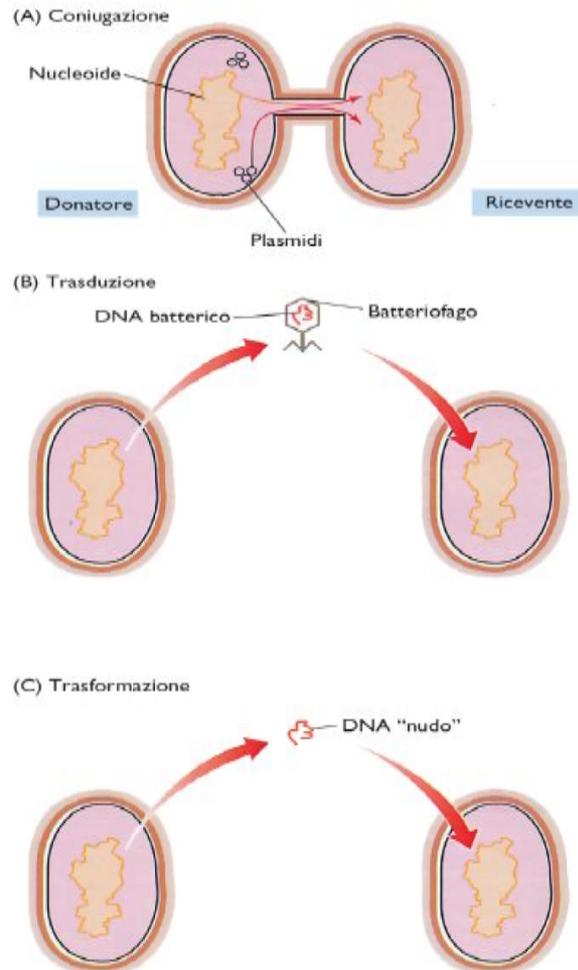
La fosfatasi alcalina serve per la defosforilazione del vettore

- **Rimuove il fosfato alle estremità 5' del vettore**
- **Impedendo la richiusura DEL VETTORE SU SE STESSO**
- **Questo passaggio non occorre se le estremità prodotte per restrizione sono incompatibili**



Riparate dagli enzimi della cellula ospite

Con il termine **TRASFORMAZIONE** si intende l'inserimento di materiale genetico (DNA esogeno) nei batteri, mentre con il termine **TRASDUZIONE** si intende il trasferimento di materiale genetico mediato da batteriofagi (nei batteri); **TRASFEZIONE** è il termine usato per trasferire DNA esogeno con agenti trasfettanti nelle cellule eucariotiche.



TRASFORMAZIONE

**PROCESSO CON IL QUALE SI INTRODUCE DNA PURIFICATO
IN UNA CELLULA BATTERICA**

**TRATTAMENTO PRELIMINARE DI *E. coli* CON CLORURO DI
CALCIO (CaCl_2)**

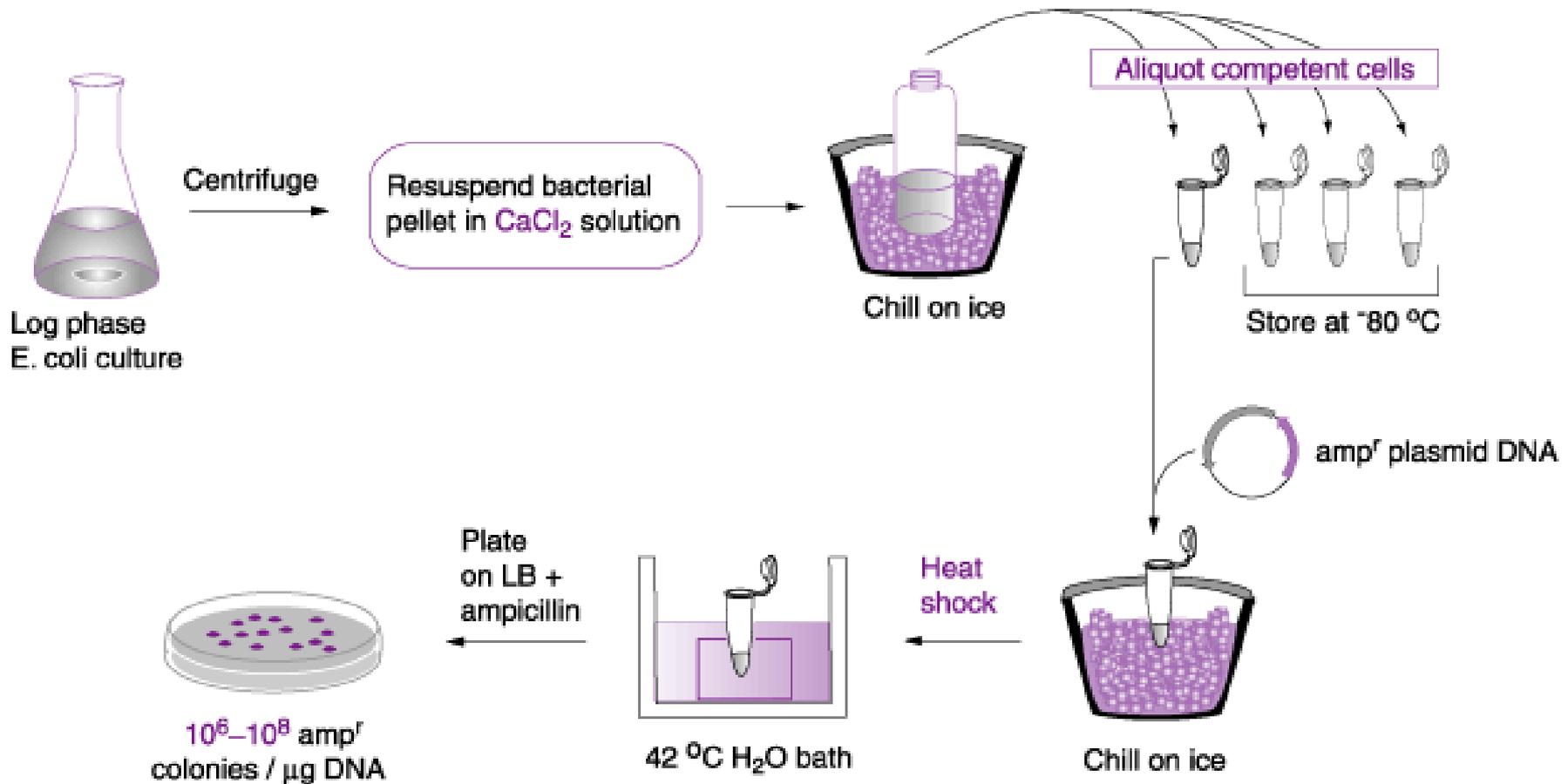
CARATTERISTICHE DELLA CELLULA OSPITE:

**PRIVE DI GENI PER GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE (Per evitare la
degradazione del clone)**

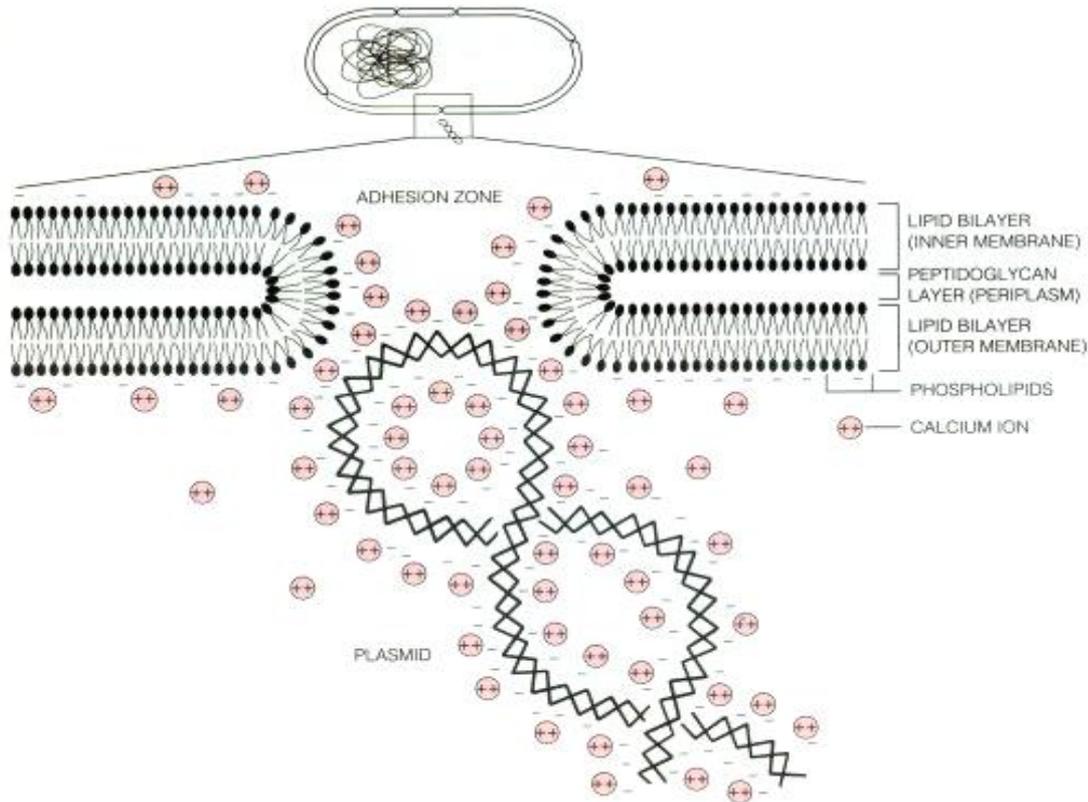
**NEGATIVE ALLA RICOMBINAZIONE (RecA-) (Per evitare che il
DNA inserto venga alterato)**

Trasformazione in CaCl_2

Crescita di un ceppo E.Coli in terreno ricco di nutrienti.
Le cellule si raccolgono quando sono in fase logaritmica



TRASFEZIONE

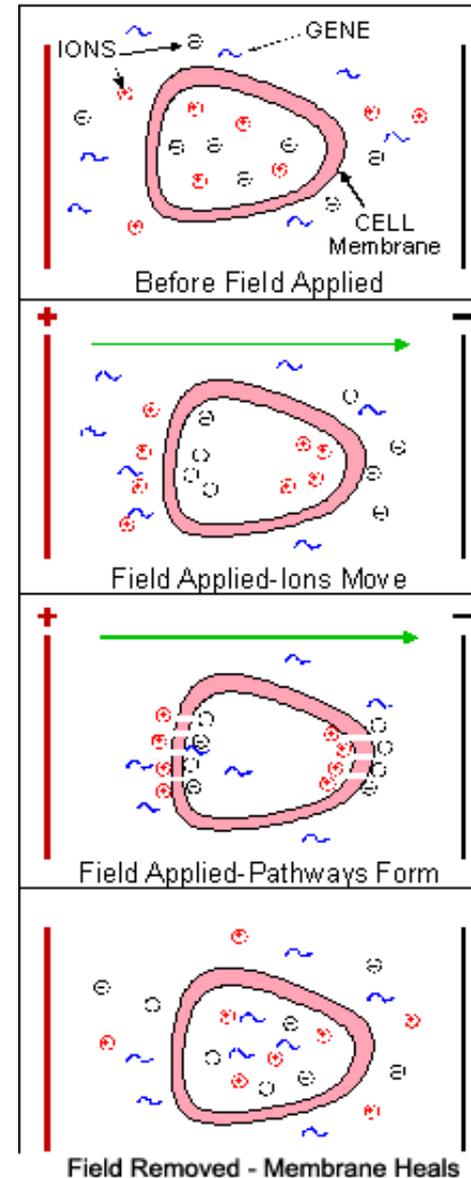


- ✓ I cationi divalenti schermano le cariche negative sul DNA (dei gruppi fosfato)
- ✓ La combinazione di bassa temperatura e di cationi divalenti può aiutare a cristallizzare regioni della membrana rendendo più accessibili i canali di assunzione del DNA

Trasformazione per Elettroporazione

➤ Le cellule batteriche unite al DNA vengono sottoposte ad una veloce scarica elettrica che permette la formazione di "elettropori" che favoriscono l'entrata di DNA.

➤ Competenza: 10^8 - 10^{10} cellule trasformate / μg di DNA



CLONAGGIO:

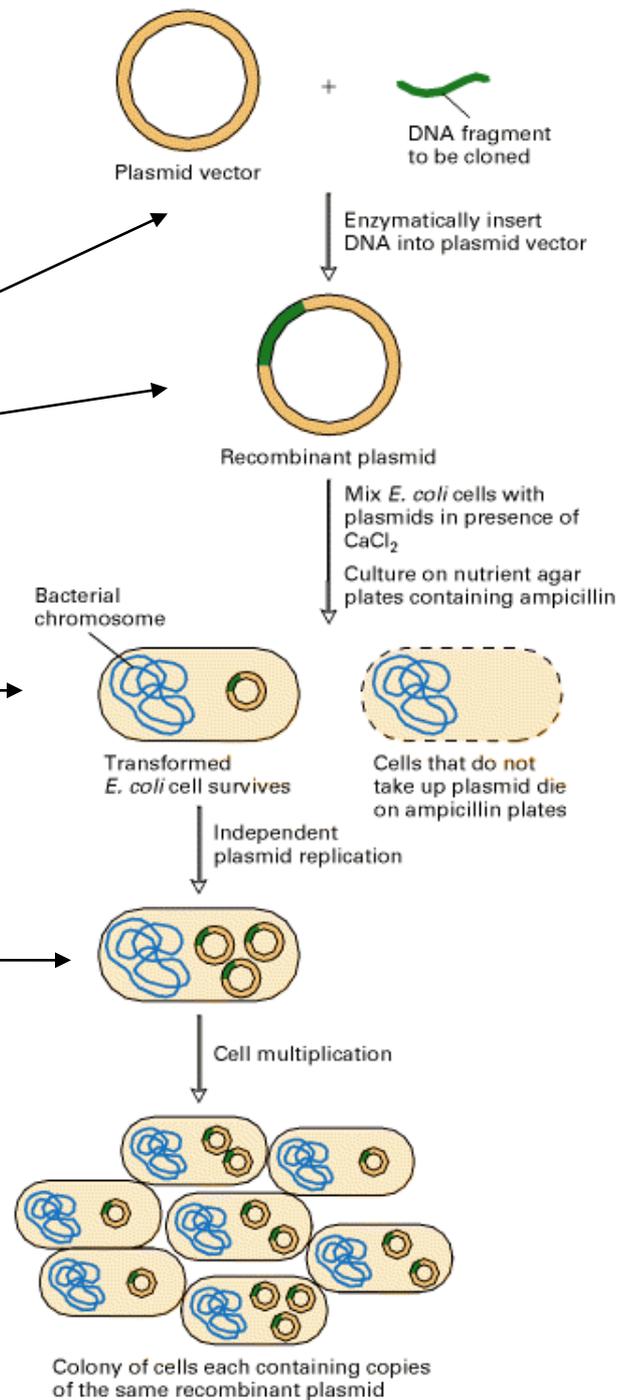
-PREPARAZIONE DI VETTORE E INSERTO

- LIGASI

- TRASFORMAZIONE

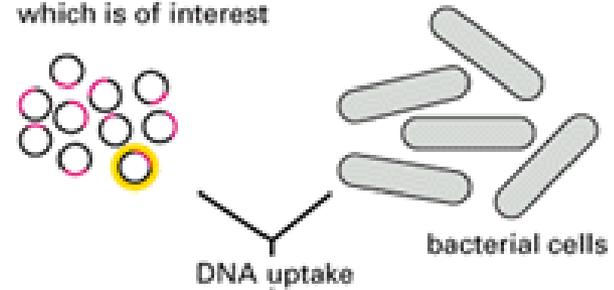
- SELEZIONE

- CRESCITA COLONIE



IDENTIFICAZIONE DELLA COLONIA BATTERICA DI INTERESSE

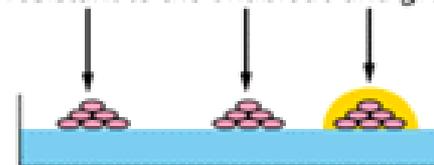
many plasmids each containing
a different DNA insert, one of
which is of interest



bacteria plated out on medium
containing antibiotic



only bacteria carrying a plasmid are
resistant to the antibiotic and grow



test for colony containing
the desired DNA clone and
inoculate into a large
culture

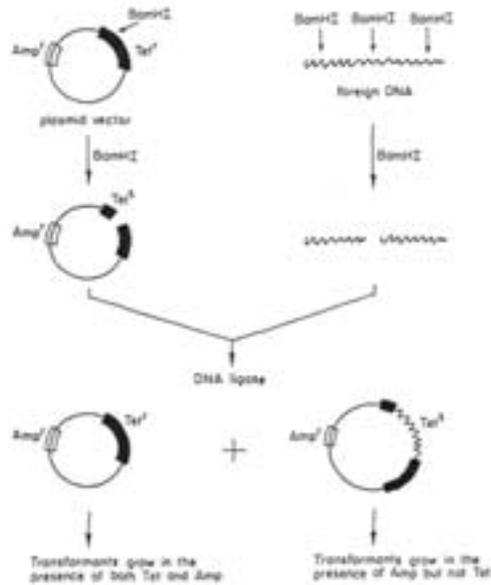


plasmid DNA purification

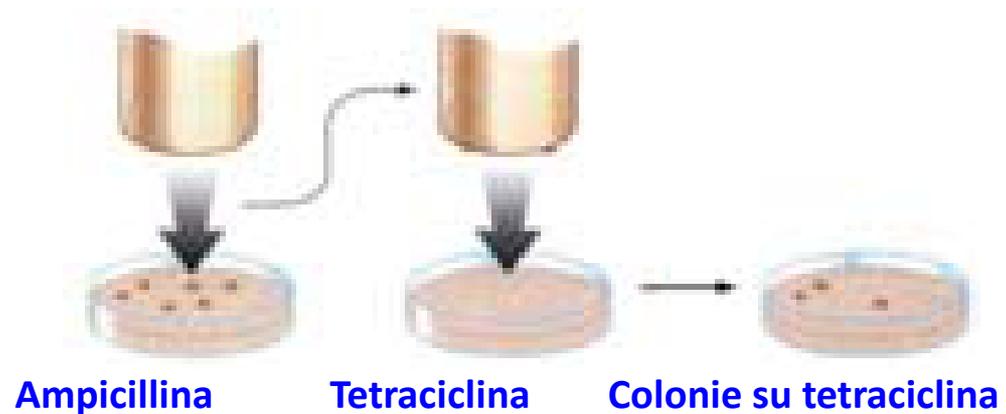


Inattivazione Inserzionale -marcatore *tet*-

Si taglia pBR322 ed il DNA bersaglio con l'enzima *Bam*HI. Al termine della ligazione si formano i soliti due prodotti:



- pBR322 circolarizzato cresce in ampicillina e tetraciclina
- pBR322 ricombinante cresce solo in ampicillina, perché l'inserzione del DNA bersaglio inattiva il gene *tet*



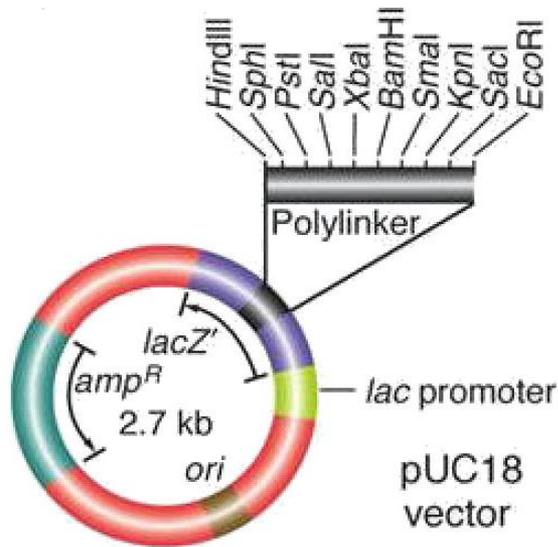
Le colonie di batteri che ospitano DNA ricombinante sono ampicillina-resistenti e tetraciclina-sensibili (*amp^r, tet^s*) e si possono isolare con un piastramento in replica.

Si può fare anche l'esperimento reciproco tagliando pBR322 ed il DNA bersaglio con l'enzima *Pst*I, inattivando il gene *amp*. In questo caso i cloni ricombinanti saranno tetraciclina-resistenti ed ampicillina sensibili.

Inattivazione del gene per la resistenza all'antibiotico

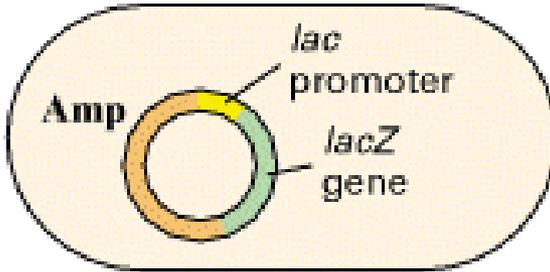
Sebbene lo schema concettuale di questi esperimenti rimanga concettualmente valido, questo tipo di selezione dei cloni ricombinanti non è più in uso, perché la selezione in due passaggi implica che bisogna attendere un giorno in più per conoscere i risultati finali della clonazione.

Inattivazione inserzionale del gene LacZ'

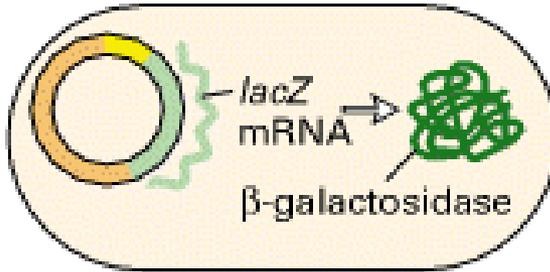


- Resistenza all'ampicillina (da pBR322)
- Replicone di pMB1 modificato per consentire la replicazione di un alto numero di copie per cellula (500-700)
- Elementi di controllo di *lac* (*Plac*)
- Gene *lacZ'*, codificante per un α -peptide funzionale della β -galattosidasi
- Sito di policlonaggio, fiancheggiato da sequenze per l'appaiamento dei primer universali “forward” e “reverse”

L'enzima beta-galattosidasi può essere utilizzato per discriminare le colonie che contengono un plasmide con inserto da quelle che contengono un plasmide senza inserto

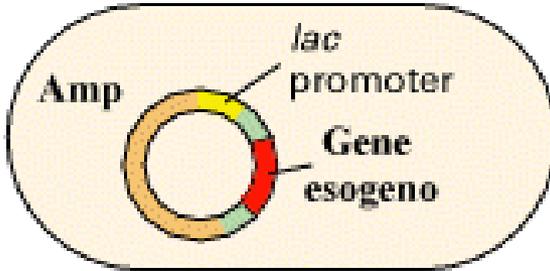


- IPTG

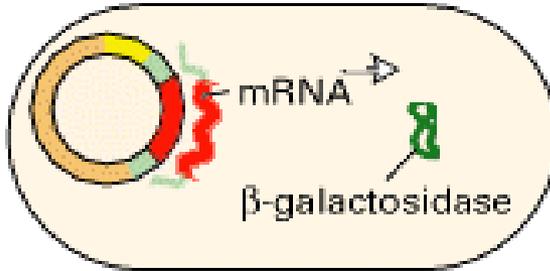


+ IPTG

**Colonia Amp resistente
blu**



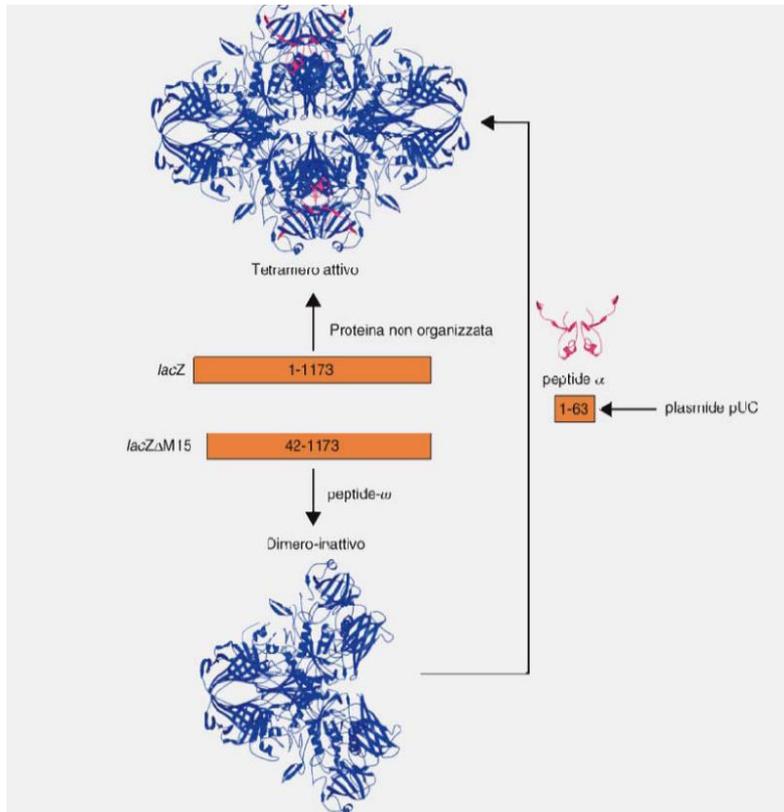
- IPTG



+ IPTG

**Colonia Amp resistente
bianca**

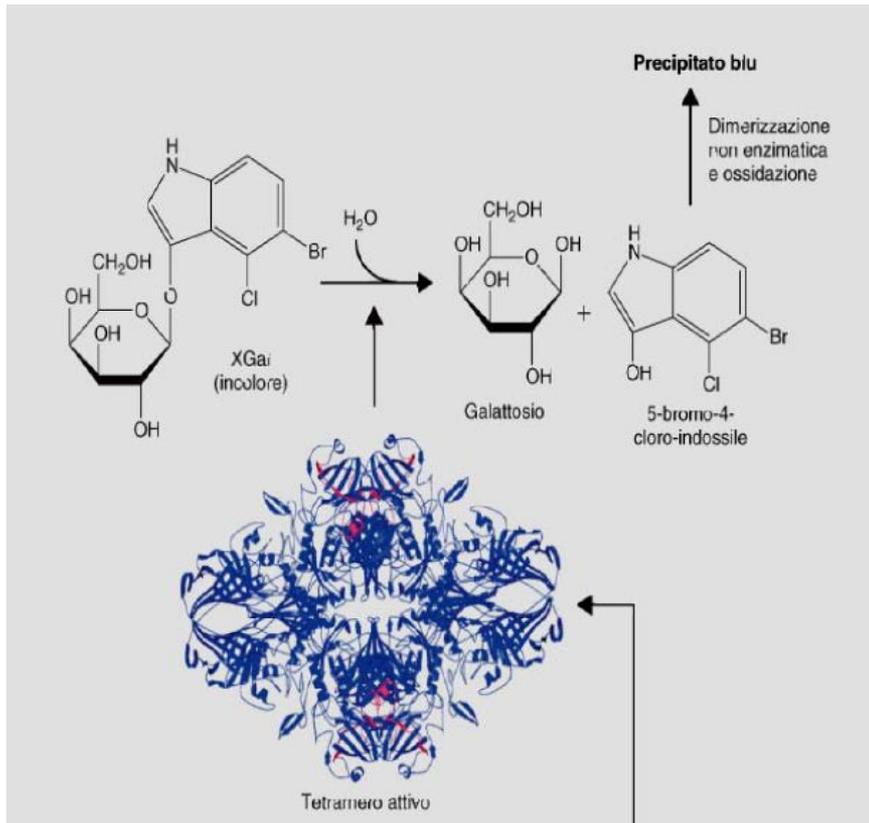
α -complementazione



In *E. coli*, l'enzima β -galattosidasi (1173aa) è il prodotto del gene *lacZ* e la sua forma attiva è un omotetramero. Esistono dei ceppi di *E. coli* mutanti per *lacZ* (*lac* Δ M15) che producono una proteina mancante della regione N-terminale della proteina di 11173 aa (**peptide ω**), incapace di formare un tetramero attivo e non hanno attività β -galattosidasica.

α -complementazione:

Nei ceppi *lac* Δ M15, il peptide ω e il peptide α , codificato dal plasmide pUC18, possono complementare in *trans* per dar luogo ad un'attività β -galattosidasica funzionale. Quindi il plasmide pUC18 è in grado di complementare il gene *lacZ* difettivo del batterio



La β -gal funzionale in presenza dell'induttore IPTG, è in grado di idrolizzare un substrato cromogenico chiamato X-gal in galattosio e in 5-bromo-4-cloroindossile. Quest'ultimo dimerizza spontaneamente e produce un colorante blu insolubile (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo)

β -galattosidasi

X gal: 5-bromo-4-cloro-indolil- β -galattoside
IPTG: isopropil- β -D-tiogalattopiranoside

Inserzione di un frammento di DNA nel vettore plasmidico pUC19, per produrre una molecola di DNA ricombinante. pUC19 contiene molti siti di restrizione unici localizzati in un polylinker, che servono per la costruzione di molecole di DNA ricombinante. L'inserzione di un frammento di DNA nel polylinker interrompe parte del gene per la β -galattosidasi (*lacZ'*), rendendo non funzionale l'enzima in *E. coli*. La selezione per il colore bianco-blu descritta nel testo serve per distinguere i vettori contenenti o meno l'inserto.

