

TECNOLOGIA DEL DNA RICOMBINANTE



Tecnologia del DNA ricombinante

Si definisce tecnologia del DNA ricombinante l'insieme delle tecniche di laboratorio che consentono di isolare sequenze di DNA per trasferirle nel genoma di altre cellule, in modo da studiarne la funzione o per ottenerne elevate quantità.

Con il termine di **ingegneria genetica** ci si riferisce in maniera generica alle tecniche del DNA ricombinante.

La tecnologia del DNA ricombinante è alla base delle moderne biotecnologie. Possiamo definire biotecnologie tutte quelle tecniche che, **basandosi sull'utilizzo di organismi viventi o di loro derivati**, siano volte alla produzione di sostanze specifiche.



Prodotti biotecnologici

PROTEINE

- Proteine umane
- Proteine umane chimeriche
- Anticorpi monoclonali murini
- Anticorpi monoclonali chimerici, oppure umanizzati

OGM

- Piante
- Animali



Esempi di proteine umane ricombinanti

Proteine

- insulina ricombinante utilizzata per il trattamento del diabete, è il primo farmaco biologico ad essere stato approvato nel 1982
- ormoni (somatotropina e gonadotropina)
- fattori della coagulazione del sangue (FVIII e FXI)
- fattori di crescita ematopoietici (eritropoietina)
- interferoni con proprietà immunomodulatorie

Proteine di fusione (chimeriche)

Queste proteine associano nella stessa molecola due o più funzioni diverse:

- **Etanercept**, un farmaco biologico utilizzato per il trattamento di malattie infiammatorie croniche. Una parte blocca la citochina infiammatoria TNF-alfa; l'altra parte è la porzione costante dell'immunoglobulina umana IgG1 (Fc) che ne aumenta la stabilità.
- **Aflibercept** un farmaco antitumorale che “fonde” la porzione Fc dell'IgG1 e due porzioni per bloccare diversi fattori di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF-A e VEGF-B).



Clonaggio di un gene

Clonaggio indica una serie di passaggi attraverso i quali è possibile isolare un gene.

- **Isolare DNA** dalla cellula o tessuto in analisi
- **Tagliare DNA** in frammenti
- Preparare delle **librerie genomiche** utilizzando vettori plasmidici
- **Screening delle librerie** per individuare il clone contenente il gene di interesse (attraverso ibridazione acidi nucleici)
- **Confermare identità del frammento** attraverso analisi della lunghezza e della sequenza
- Una volta clonato il gene può essere inserito in un **vettore di espressione per ottenere la proteina di interesse.**



TAGLIARE IL DNA: Enzimi di restrizione

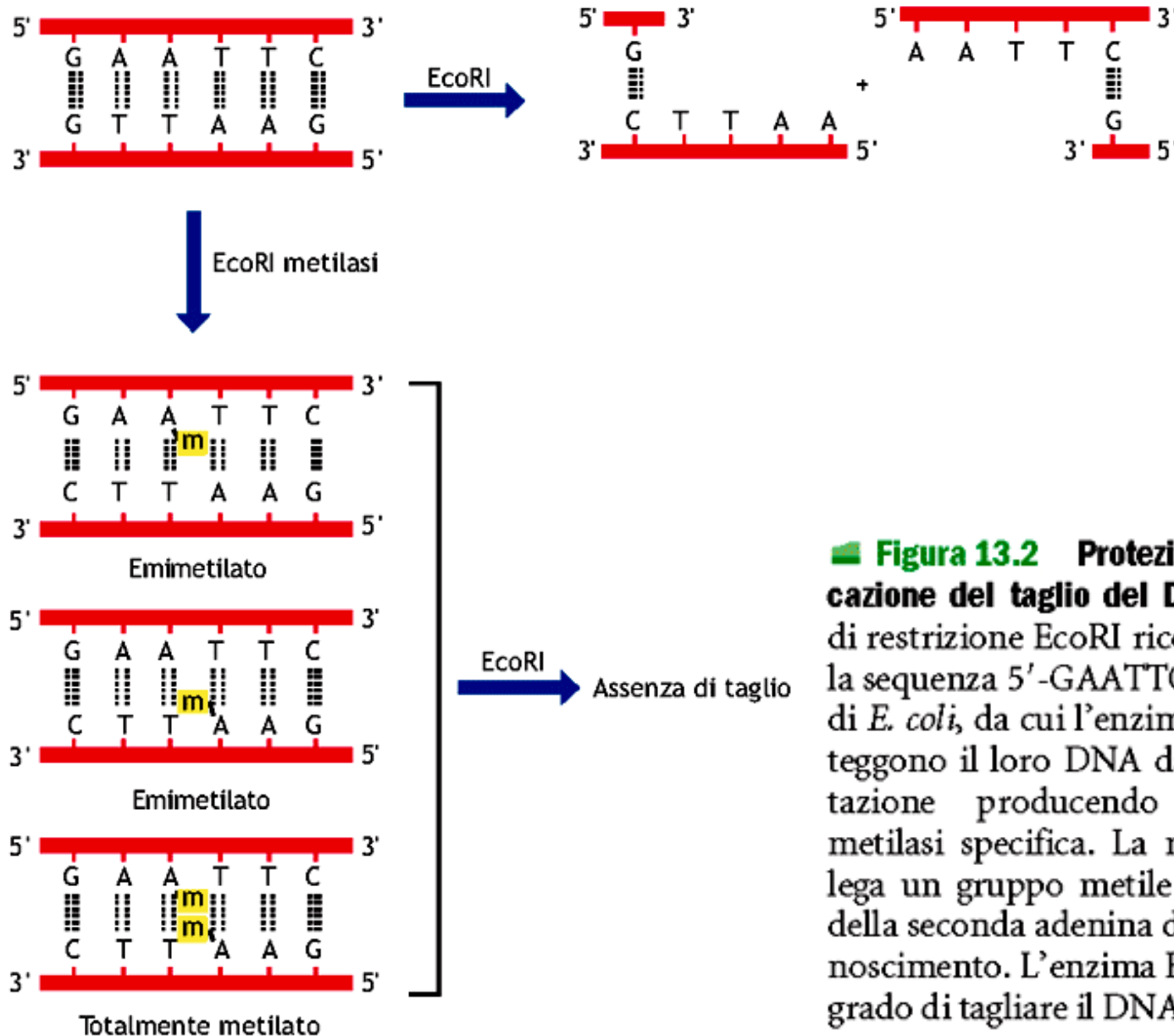


Figura 13.2 Protezione per modificazione del taglio del DNA. L'enzima di restrizione EcoRI riconosce e taglia la sequenza 5'-GAATTC-3'. I ceppi R di *E. coli*, da cui l'enzima deriva, proteggono il loro DNA dalla frammentazione producendo anche una metilasi specifica. La metilasi EcoRI lega un gruppo metile all'atomo N6 della seconda adenina del sito di riconoscimento. L'enzima EcoRI non è in grado di tagliare il DNA così metilato.

Clonaggio di un gene

Clonaggio indica una serie di passaggi attraverso i quali è possibile isolare un gene.

- **Isolare DNA dalla cellula o tessuto in analisi**
- **Tagliare DNA in frammenti**
- **Preparare delle librerie genomiche utilizzando vettori plasmidici**
- **Screening delle librerie per individuare il clone contenente il gene di interesse (attraverso ibridazione acidi nucleici)**
- **Confermare identità del frammento attraverso analisi della lunghezza e della sequenza**
- **Una volta clonato il gene può essere inserito in un vettore di espressione per ottenere la proteina di interesse.**



Plasmidi

- I plasmidi sono molecole circolari di DNA a doppio filamento autoreplicanti
- In genere le loro dimensioni sono comprese tra 1kb e oltre 500kb, e sono presenti nella cellula con un numero di copie che varia da 1 a 100
- Si riscontrano in quasi tutti i batterici e possono conferire un particolare fenotipo:
 - *geni per il metabolismo di alcune sostanze,*
 - *geni per la resistenza agli antibiotici*



Escherichia coli



Vettori Plasmidici

I vettori plasmidici sono ottenuti ingegnerizzando i plasmidi naturali

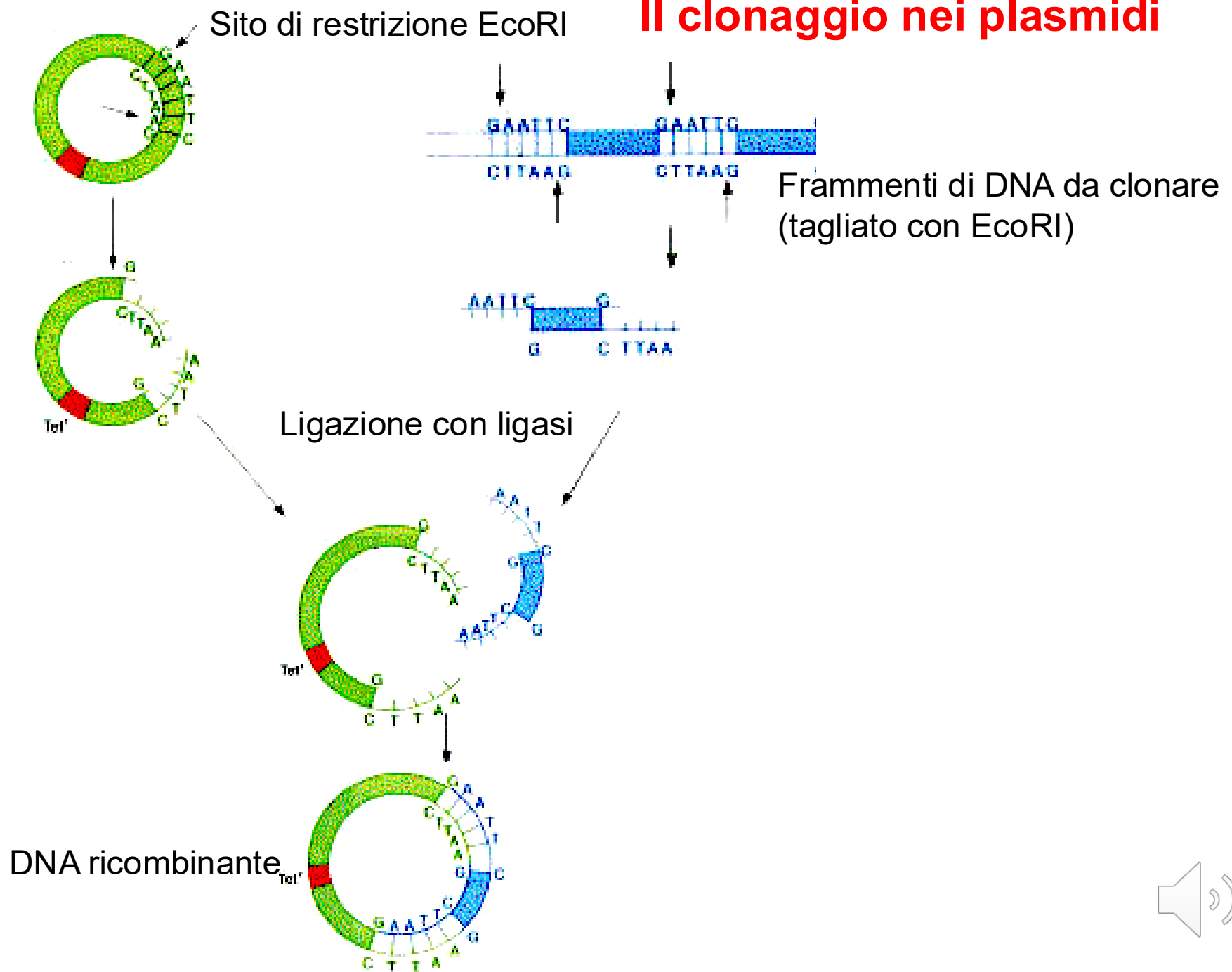
Piccole dimensioni (< di 15 kb), per aumentare la resa di trasferimento del DNA esogeno: **più sono grandi più sono instabili.**

Requisiti necessari:

- **Presenza della sequenza ori**, origine della replicazione: tale sequenza è necessaria per avviare la duplicazione autonoma del plasmide all'interno della cellula ospite;
- **Marcatori genetici o geni marcatori selezionabili**: tali sequenze sono necessarie per selezionare le cellule che hanno incorporato il plasmide da quelle che ne sono prive; antibiotico come l'ampicillina
- **sito di clonazione multipla (o polylinker)** : tale sequenza contiene siti unici di riconoscimento per endonucleasi di restrizione in cui inserire il DNA esogeno.

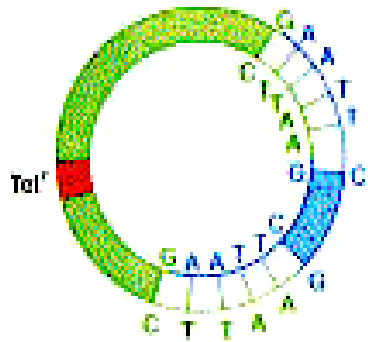


Il clonaggio nei plasmidi



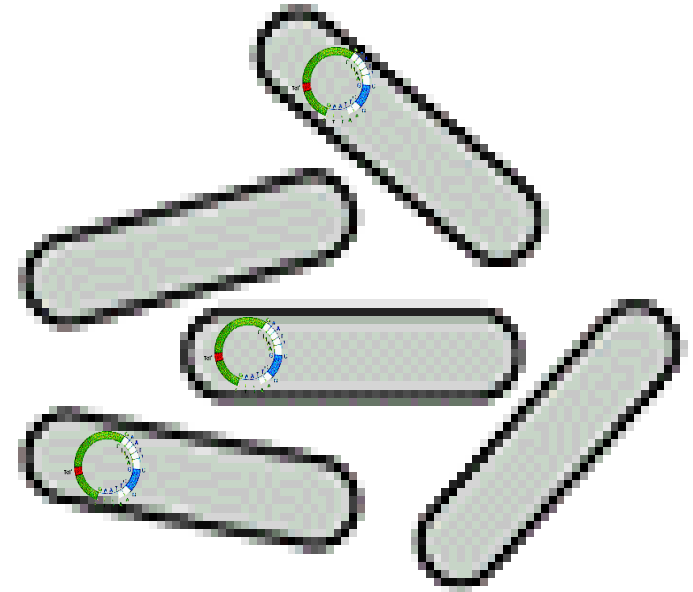
La trasformazione batterica

E. coli



Trasformazione

Trattamento dei batteri con CaCl_2 : aumenta la permeabilità di membrana.



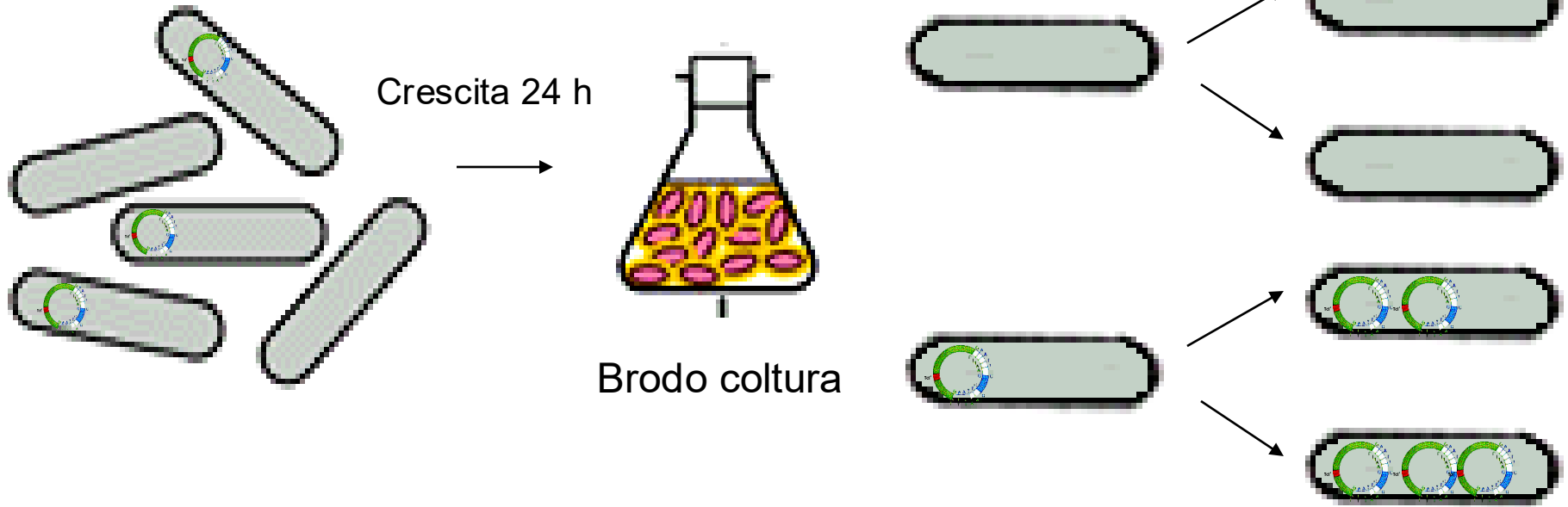
Risultato della trasformazione

- 1) Batteri SENZA plasmide
- 2) Batteri con plasmide SENZA DNA
- 3) Batteri con plasmide con DNA non di nostro interesse
- 4) Batteri con plasmide con il nostro DNA



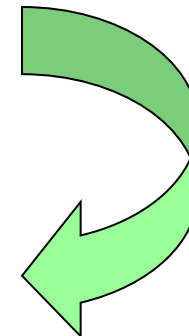
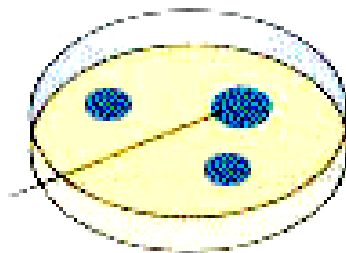
La selezione delle colonie batteriche ricombinanti

E. Coli trasformati



Petri con antibiotico

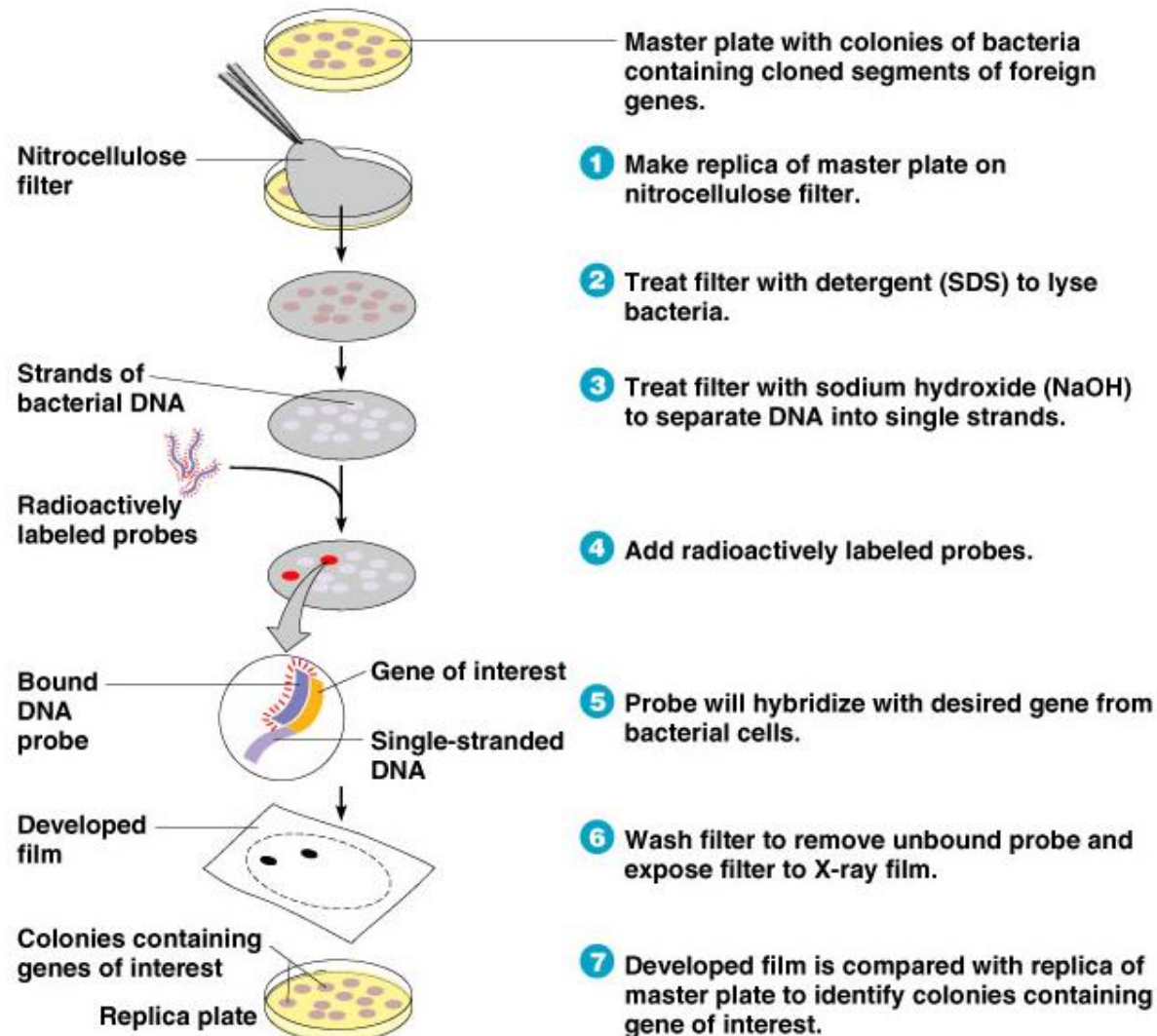
Colonia batterica
contenente il DNA
ricombinante



Selezione dei
batteri



Identificazione del clone contenente il vettore con il gene di interesse



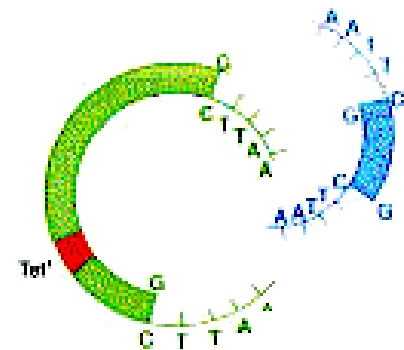
Il clonaggio nei plasmidi: estrazione del DNA ricombinante

Si preleva la colonia e la si espande ulteriormente in un mezzo contenente tetraciclina

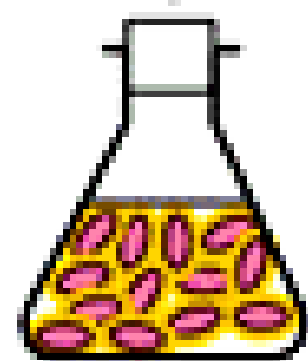
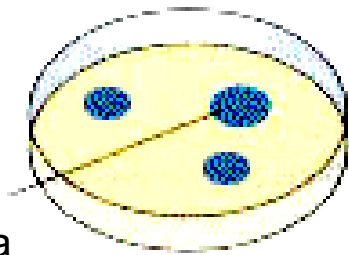
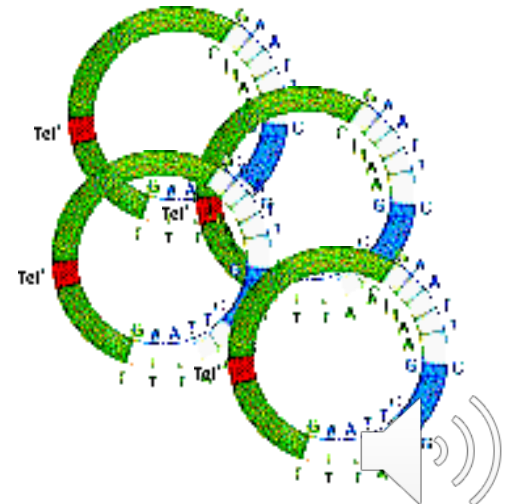
24 h

Lisi dei batteri ed estrazione del DNA ricombinante

Digestione enzimatica con EcoRI



Analisi della sequenza nucleotidica



Le cellule-fabbrica
in ingegneria genetica

Microorganismi

Escherichia coli

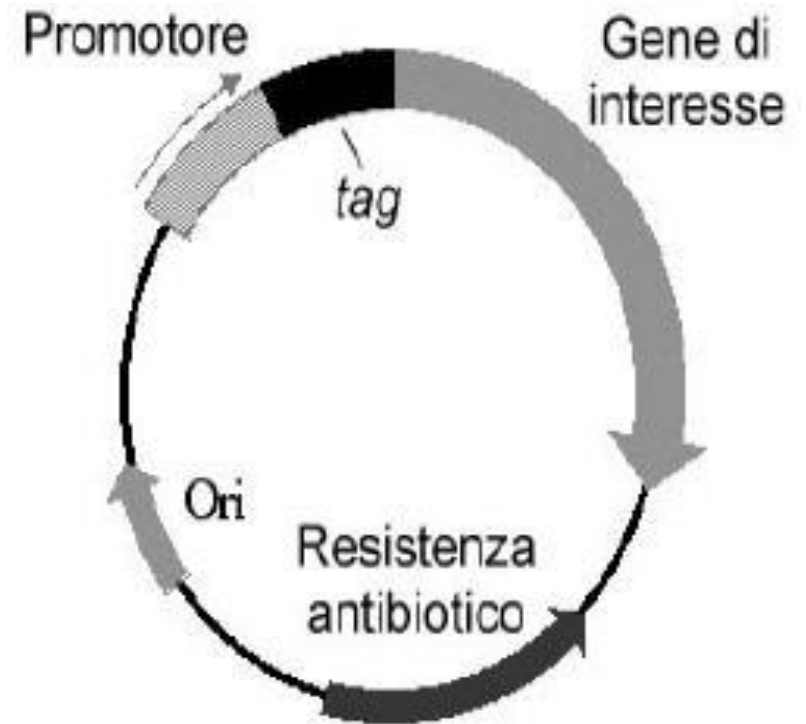
Bacillus subtilis

Corynebacteria

Pseudomonas

Saccharomyces cerevisiae

Pichia pastoris



Il vettore di espressione deve contenere il promotore



Le cellule-fabbrica in ingegneria genetica

Cellule di mammifero

CHO= Chinese hamster ovary

BHK21= Baby hamster kidney

NS0= mieloma di topo

HEK-293= human embryo kidney

Per-C6= human retina derived

La proteina può subire modifiche post-traduzionali (ad esempio glicosilazione) più simili a ciò che accade in vivo se espressa in cellule di mammifero



La scoperta della PCR ha facilitato l'isolamento e l'amplificazione delle sequenze genica

Cloning vs. PCR

