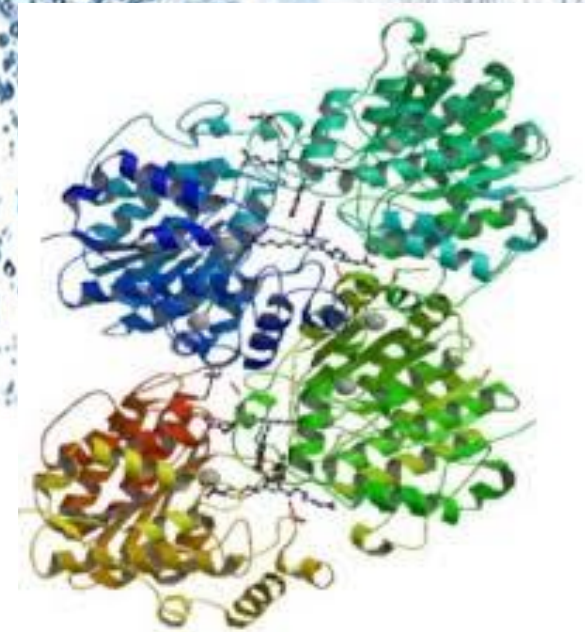
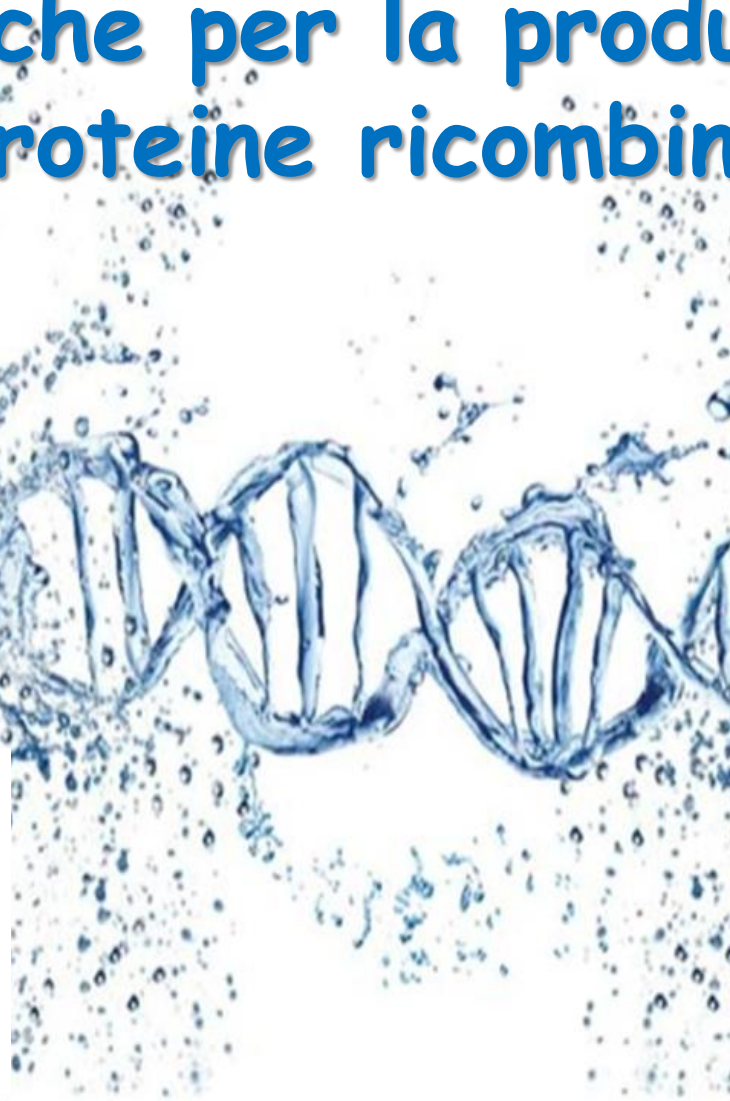
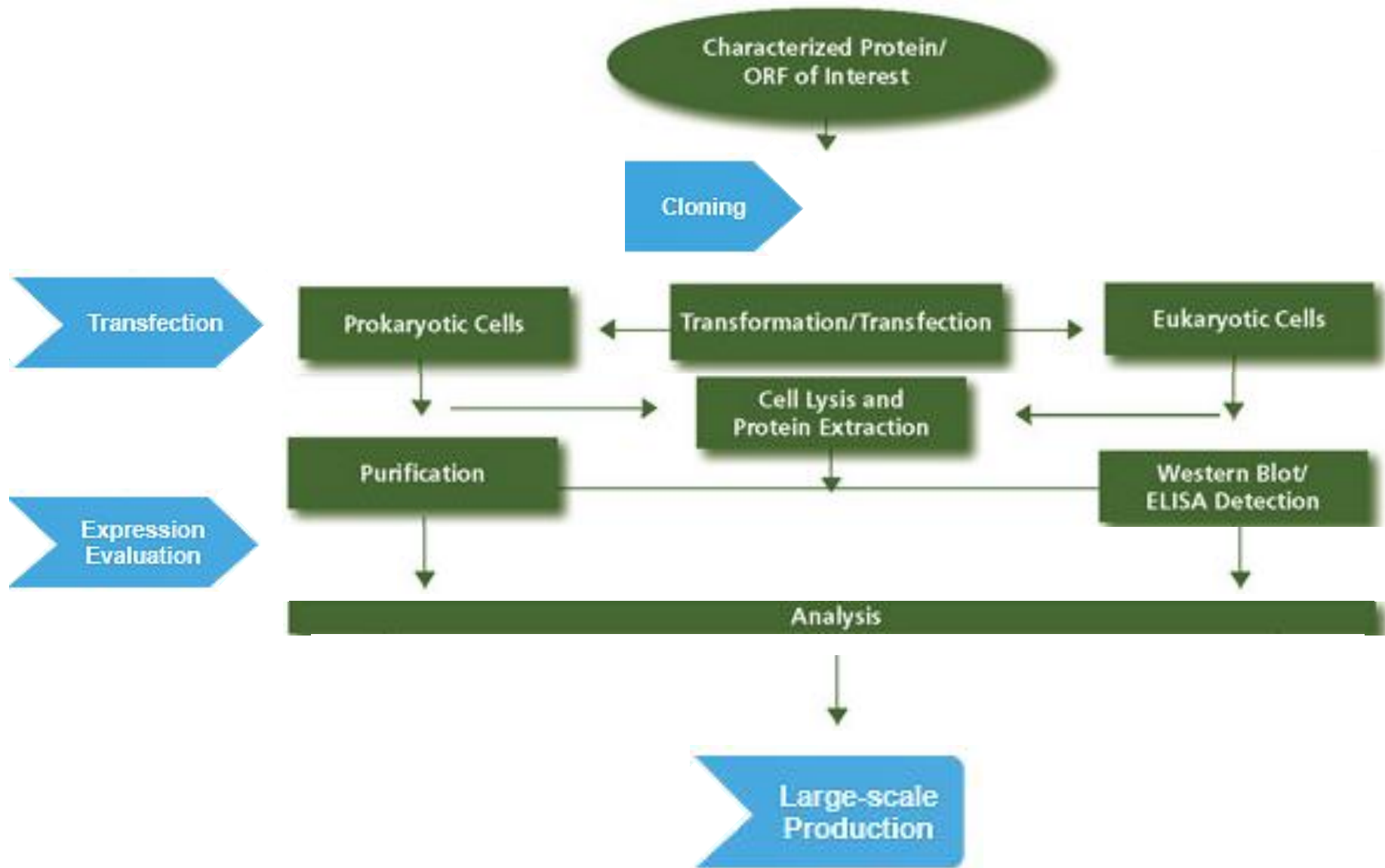


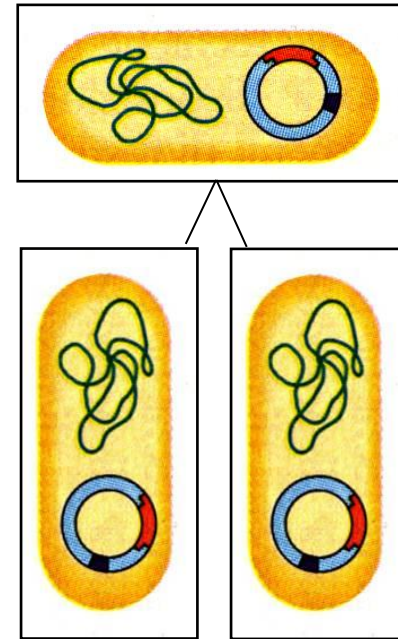
Tecniche per la produzione di proteine ricombinanti



Come produrre proteine ricombinanti



La natura insegna.....



PLASMIDI:

piccole molecole di DNA circolare extracromosomiche che si replicano autonomamente all'interno di batteri.

I più comunemente utilizzati sono quelli che replicano in *E. coli*.

Al momento delle divisione cellulare, una o più copie identiche del plasmide vengono trasmesse ad in ogni cellula figlia

Contengono **pochi geni**, ad esempio quelli per la **resistenza ad antibiotici**.

Vettori di clonaggio e vettori di espressione

Alcune date:

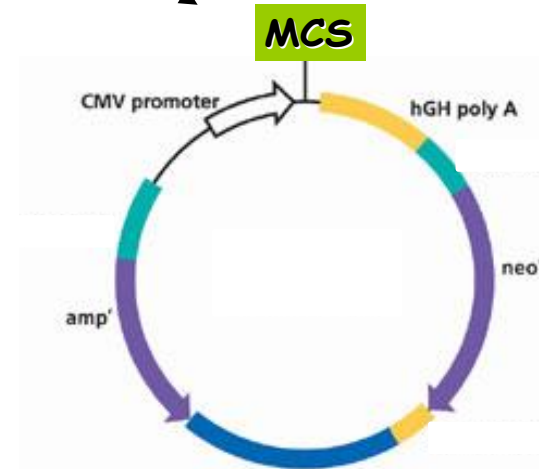
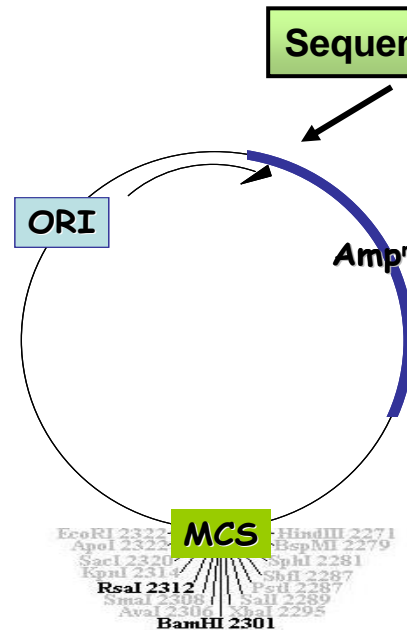
1970: Isolato il primo enzima di restrizione

1970: Creato il primo DNA ricombinante

1977: Creato il primo vettore di clonaggio (pBR322)

1978: Espressione in E. coli della prima proteina ingegnerizzata (insulina)

1999: Espressione di proteine mediante trasfezione transiente di cellule di mammifero



Polylinker o multi-cloning site (MCS)



Origine di replicazione batterica



Gene resistenza (propagazione)



Promotore forte per espressione

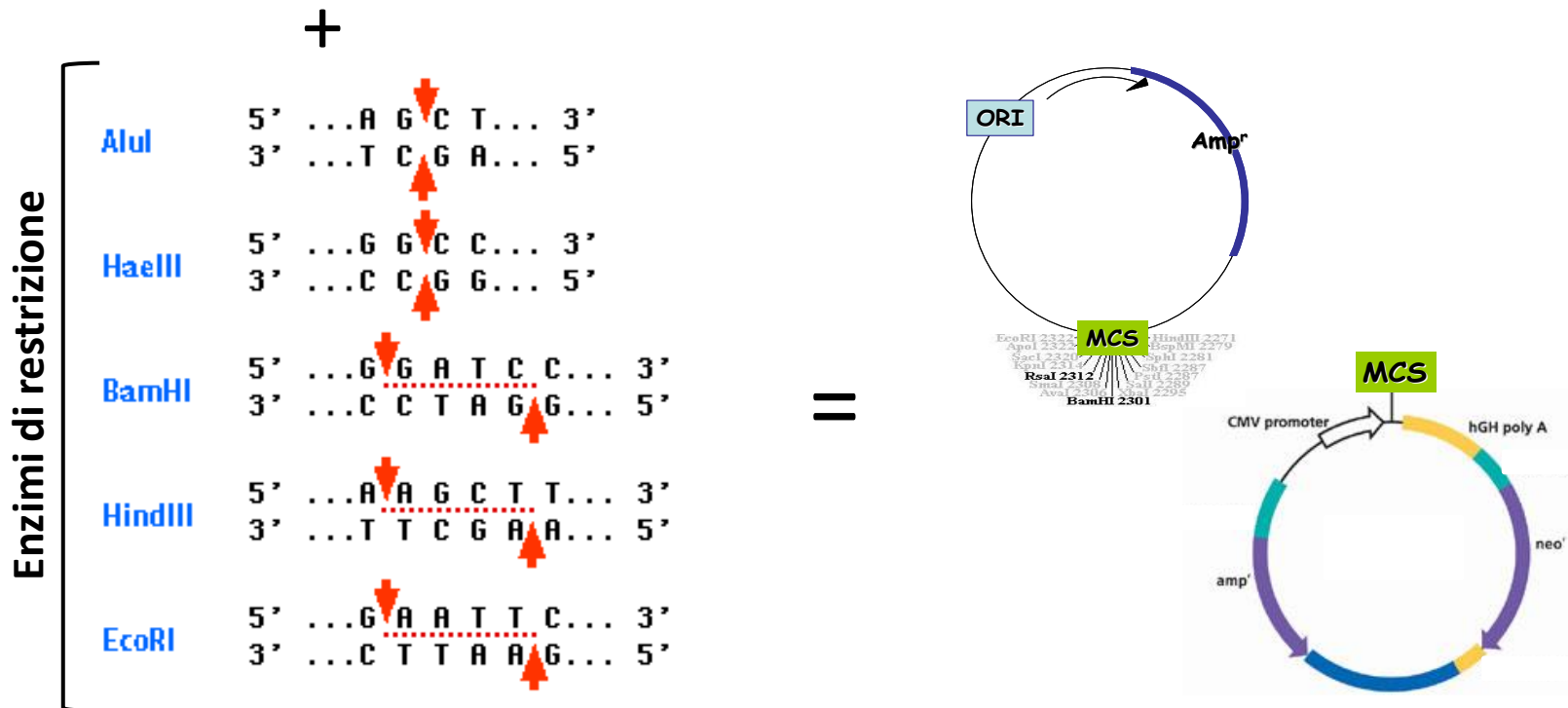


Gene resistenza (selezione)



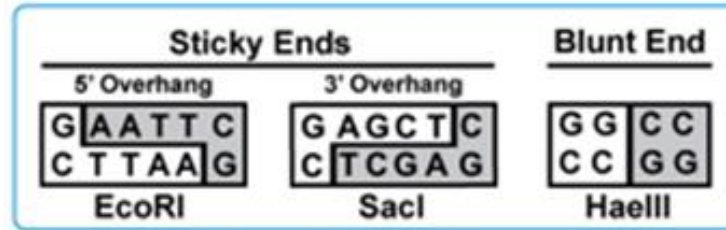
Tipici enzimi per la manipolazione degli acidi nucleici

Enzyme	Specific example	Use in nucleic acid manipulation
DNA polymerases	<i>Taq</i> DNA pol	Thermostable DNA polymerase used in PCR
Reverse transcriptase	AMV-RT	RNA-dependent DNA polymerase, used in cDNA synthesis
Nucleases	DNase I	Non-specific endonuclease that cleaves DNA
	RNase H	Used in second strand cDNA synthesis
Phosphatases	Alkaline phosphatase	Removes 5'-phosphates from DNA and RNA
Ligases	T4 DNA ligase	Links 5'-phosphate and 3'-hydroxyl ends via phosphodiester bond



Clonaggio in vettori plasmidici

Tipi di estremità generate dagli enzimi di restrizione



Inserto
+
Vettore
=
Vettore ricombinante

Enzimi di restrizione:

- Vengono isolati dai **batteri** che li producono per difendersi da DNA eterologhi (in particolare dal DNA dei batteriofagi)
- Sono in grado di **tagliare il DNA** a livello di **siti di restrizione** aventi **sequenze** specifiche con di lunghezza variabile (**4-10 nt**) di natura **palindromica** (uguali se lette in direzione 5' → 3' su entrambe le eliche)

Nomenclatura :

EcoRI

E = genere *Escherichia*

co = specie *coli*

R = ceppo RY13

I = prima endonucleasi isolata

AMA

ANNA

ARTE TETRA

AI LATI D'ITALIA

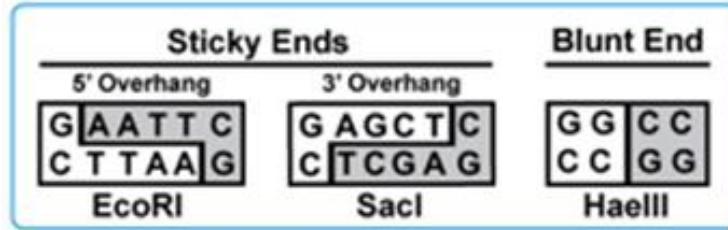
I TOPI NON AVEVANO NIPOTI

A MAN A PLAN A CANAL PANAMA

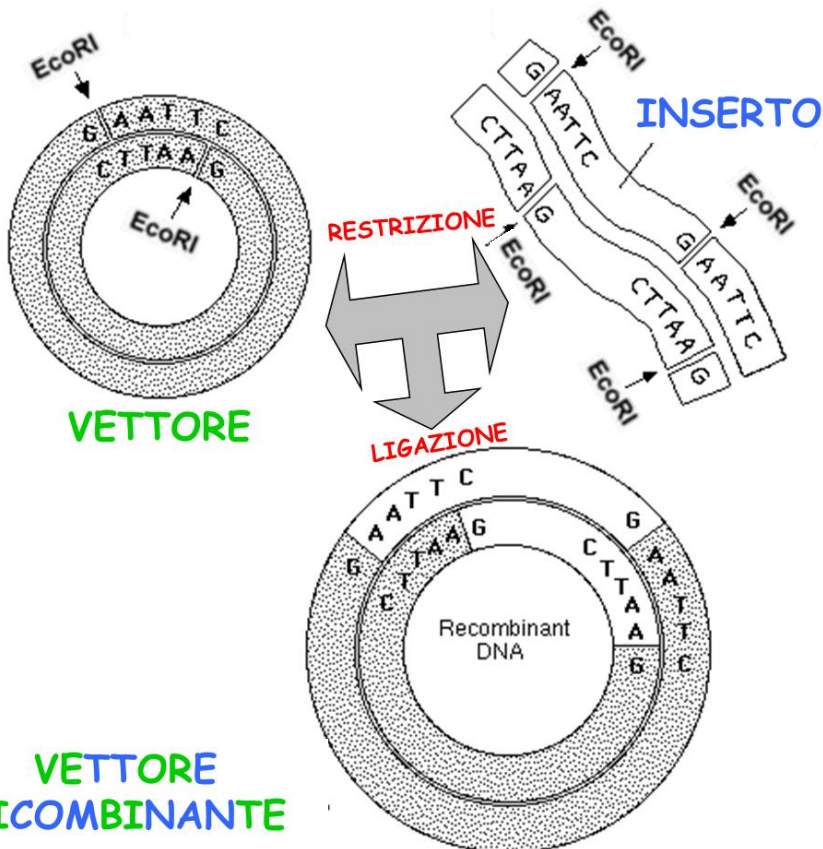
ALLE CARTE T'ALLENI NELLA TETRA CELLA

Clonaggio in vettori plasmidici

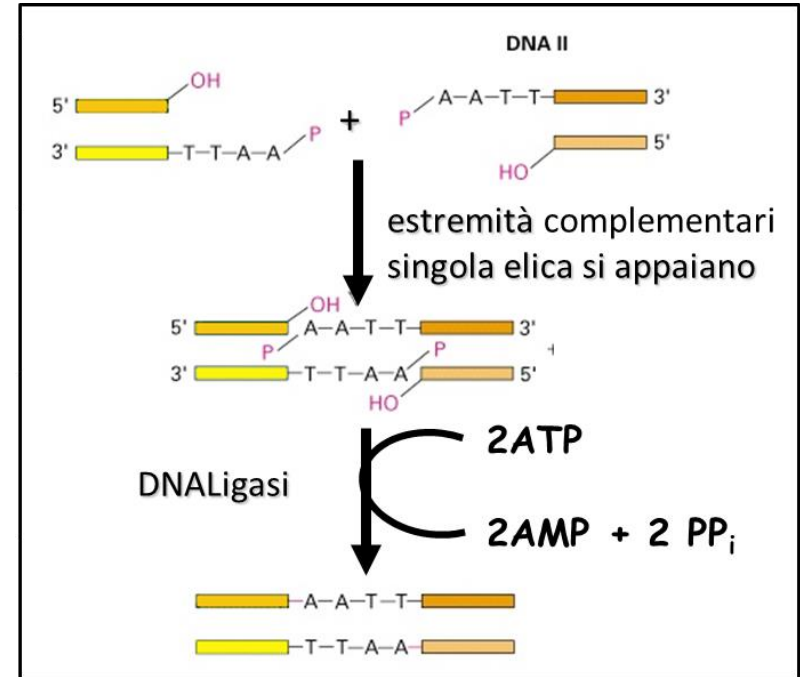
Tipi di estremità generate dagli enzimi di restrizione



Inserto
+
Vettore
=
Vettore ricombinante

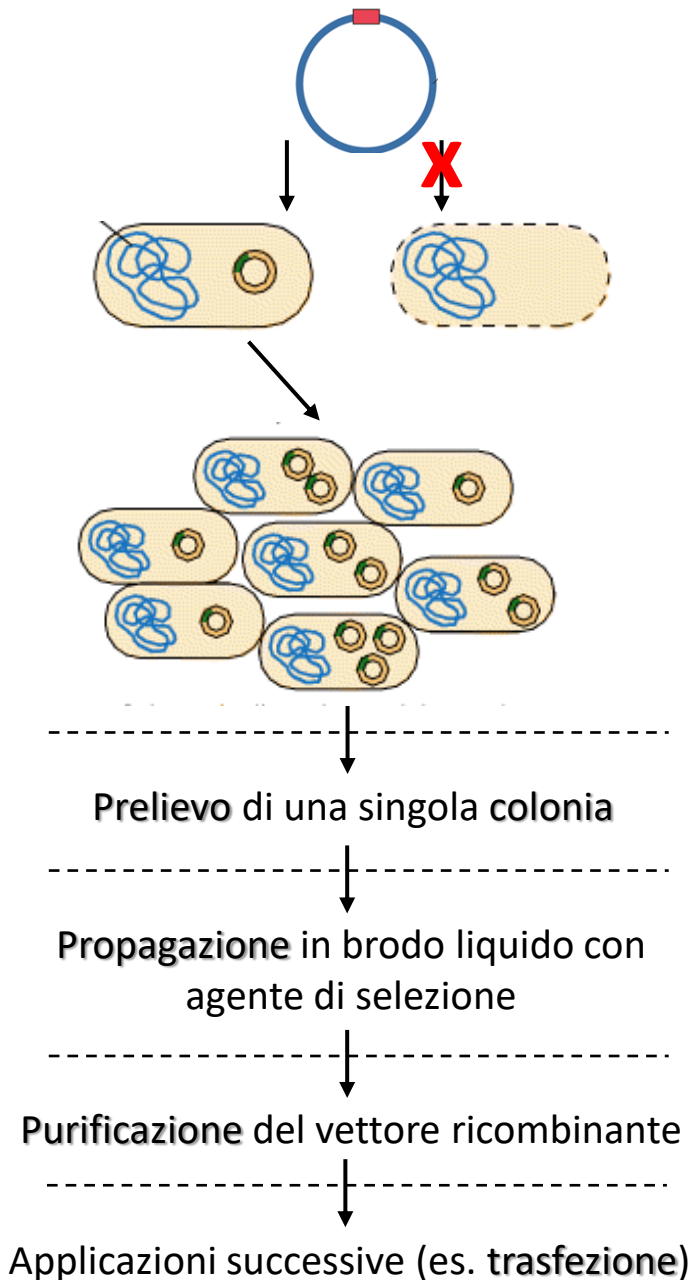


Ligases Links 5'-phosphate and 3'-hydroxyl ends via phosphodiester bond



Generalmente si usa la **ligasi del fago T4**

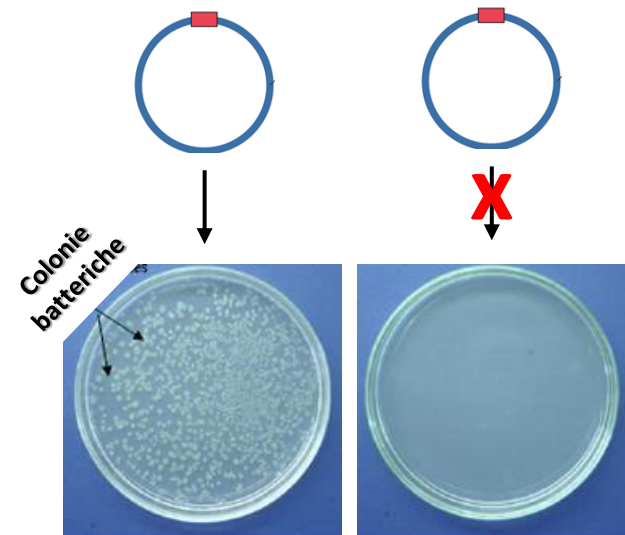
Propagazione del vettore ricombinante - Trasformazione batterica



Principio:

- Utilizzo di batteri «competenti»
- Grazie al rapporto vettore/batteri, solo alcuni (circa 1 su 10.000) saranno in grado di internalizzare il vettore (trasformazione)

Viene sfruttato il gene **Amp^r** presente sul vettore che conferisce **resistenza all'agente di selezione (ampicillina)**



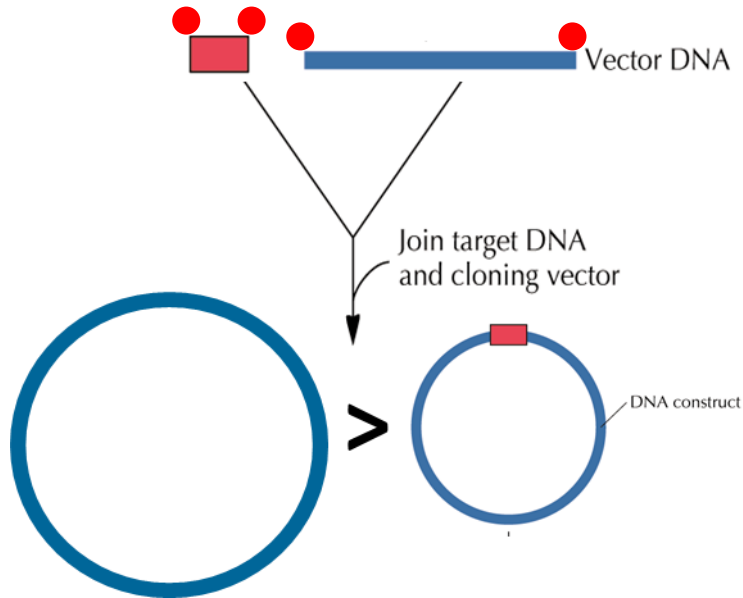
Controllo negativo???

Clonaggio in vettori plasmidici - Richiusura del vettore

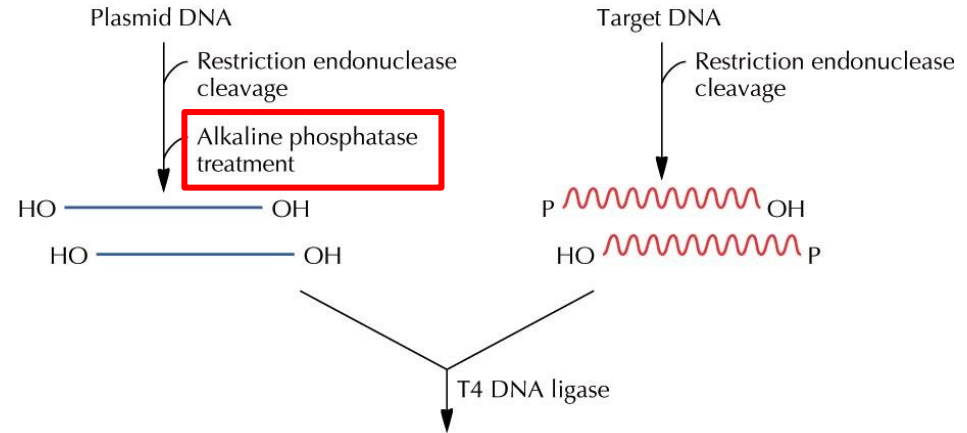
L'incontro tra Inserto e Vettore è affidato ai rapporti molari delle molecole in soluzione

Non direzionale (1 enzima)

Estremità compatibili ●



Alkaline phosphatase Removes 5'-phosphates from DNA and RNA



Il vettore linearizzato viene trattato con la **Fosfatasi Alcalina** che **rimuove il gruppo fosfato (PO_4) in 5'**.

Tale trattamento impedisce la richiusura del vettore prevenendo l'azione della DNA-ligasi (non si formano i legami fosfodiesteri)

Soluzione 1

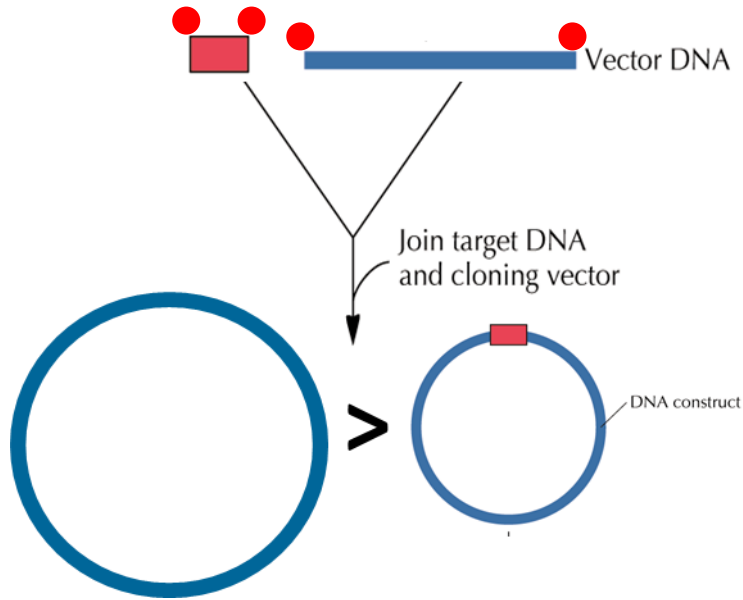
Defosforilazione del vettore con **fosfatasi alcalina**

Clonaggio in vettori plasmidici - Richiusura del vettore

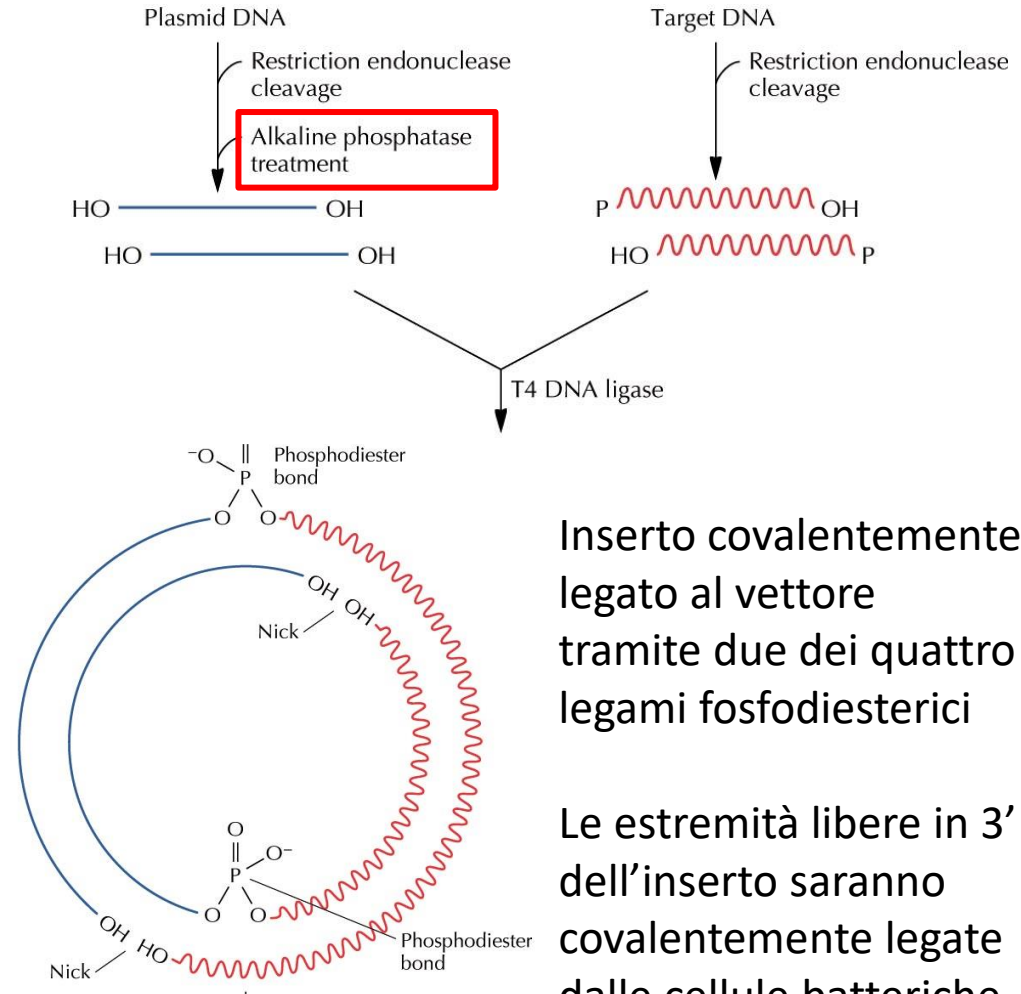
L'incontro tra Inserto e Vettore è affidato ai rapporti molari delle molecole in soluzione

Non direzionale (1 enzima)

Estremità compatibili ●



Alkaline phosphatase Removes 5'-phosphates from DNA and RNA



Inserto covalentemente legato al vettore tramite due dei quattro legami fosfodiesterici

Le estremità libere in 3' dell'inserto saranno covalentemente legate dalle cellule batteriche

Soluzione 1

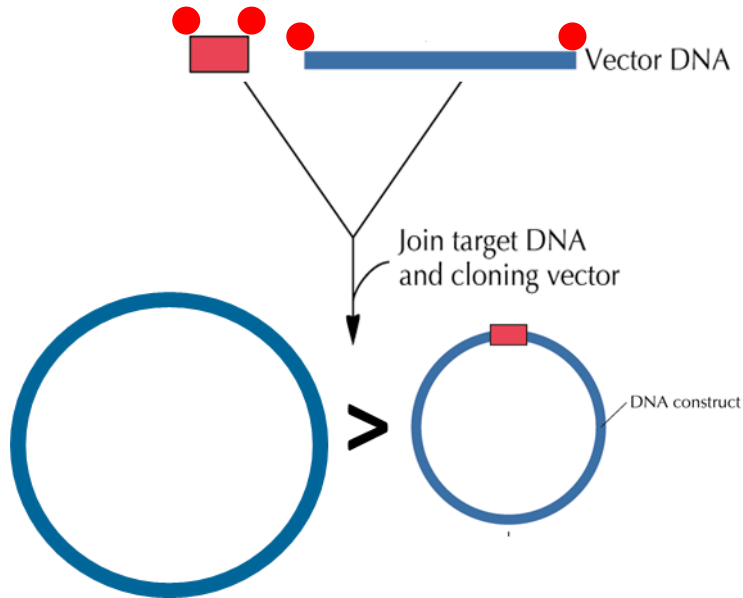
Defosforilazione del vettore con **fosfatasi alcalina**

Clonaggio in vettori plasmidici - Richiusura del vettore

L'incontro tra Insetto e Vettore è affidato ai rapporti molarli delle molecole in soluzione

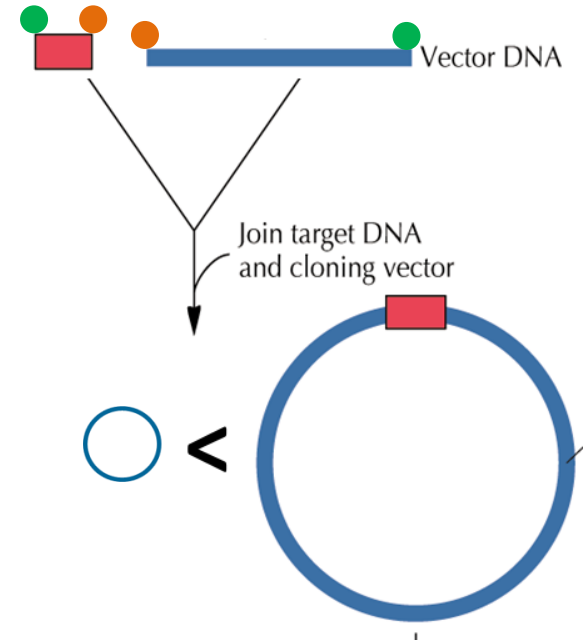
Non direzionale (1 enzima)

Estremità compatibili ●



Direzionale (2 enzimi diversi)

Estremità NON compatibili ●●



Soluzione 2

Utilizzo di due **enzimi diversi** → estremità non compatibili → **clonaggio direzionale**

PCR: Polymerase Chain Reaction

Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction

K. MULLIS, F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN, AND H. ERLICH
Cetus Corporation, Department of Human Genetics, Emeryville, California 94608

Enzima: **Taq** polimerasi isolata da batterio **T**hermophilus **aq**uaticus
T di lavoro: **72°C** (enzima altamente resistente)

Reagenti:

DNA

Buffer

dNTPs

MgCl₂

Primer F

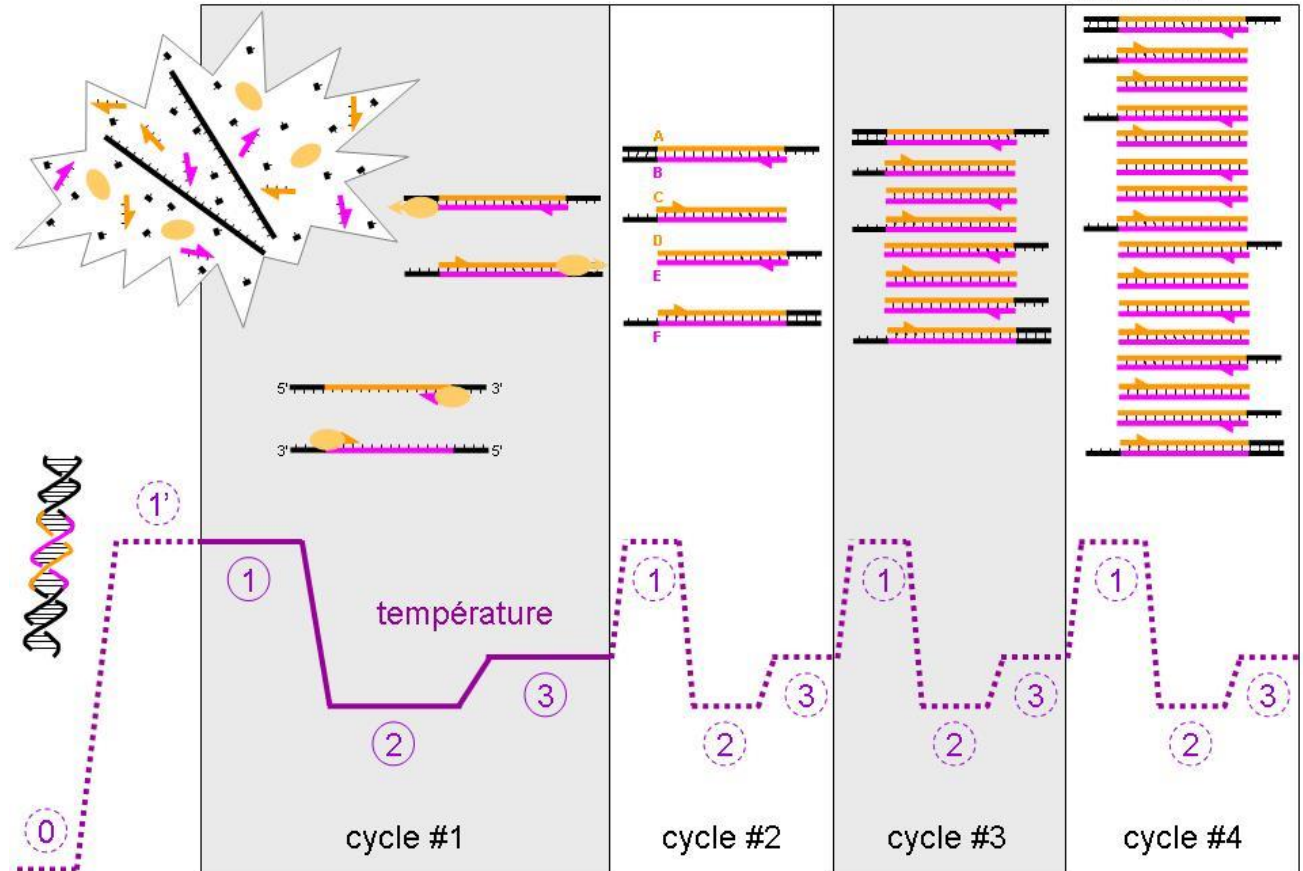
Primer R

Enzima Taq DNA pol

H₂O

Amplificazione esponenziale

cycle #n.....→



Tipica reazione

95°C 5'

95°C 30''

58°C 30''

72°C 30''

72°C 10'

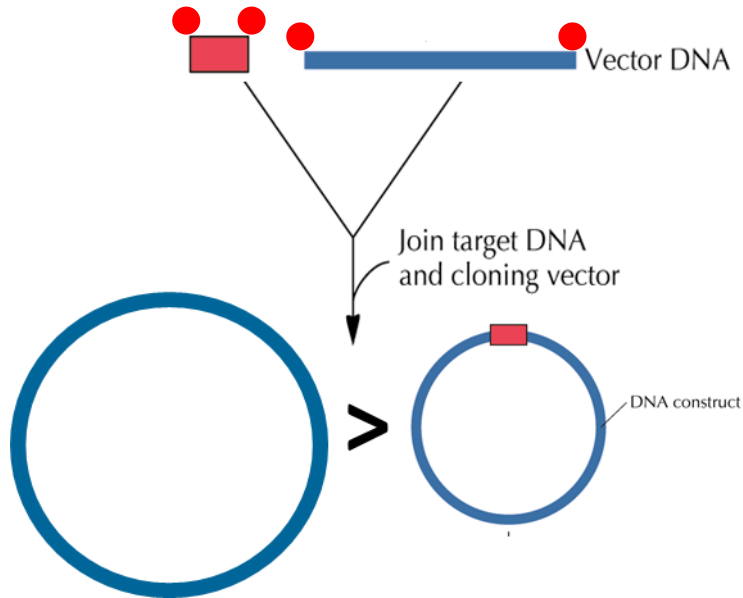
30 cicli

Clonaggio in vettori plasmidici - Richiusura del vettore

L'incontro tra Insetto e Vettore è affidato ai rapporti molarli delle molecole in soluzione

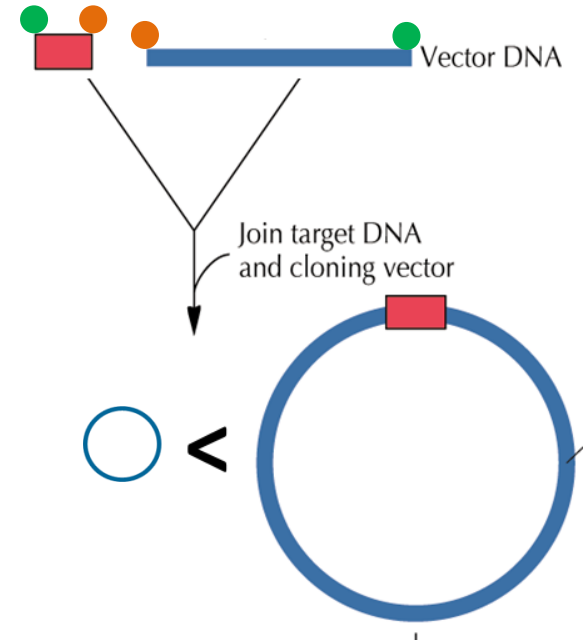
Non direzionale (1 enzima)

Estremità compatibili ●



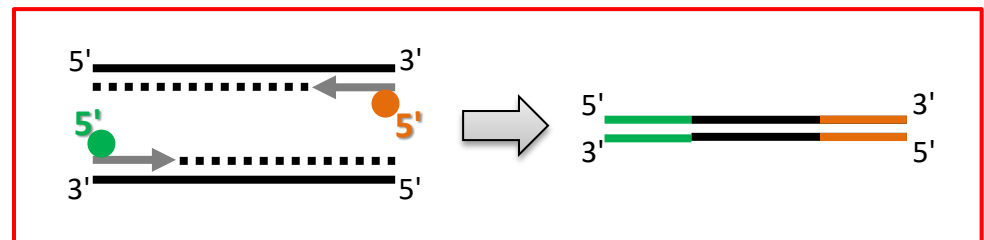
Direzionale (2 enzimi diversi)

Estremità **NON** compatibili ●●



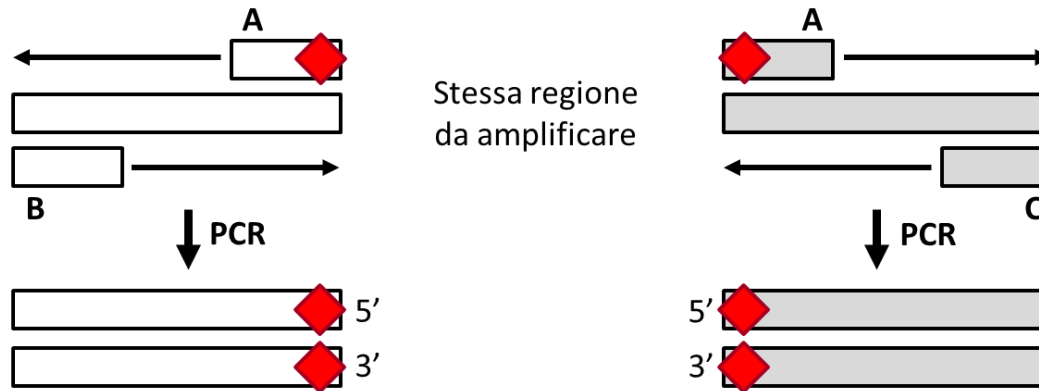
In entrambi i casi:

L'**inserto** può derivare da altro plasmide o da una **PCR** con primer aventi sequenze riconosciute da enzimi di restrizione alle estremità 5'

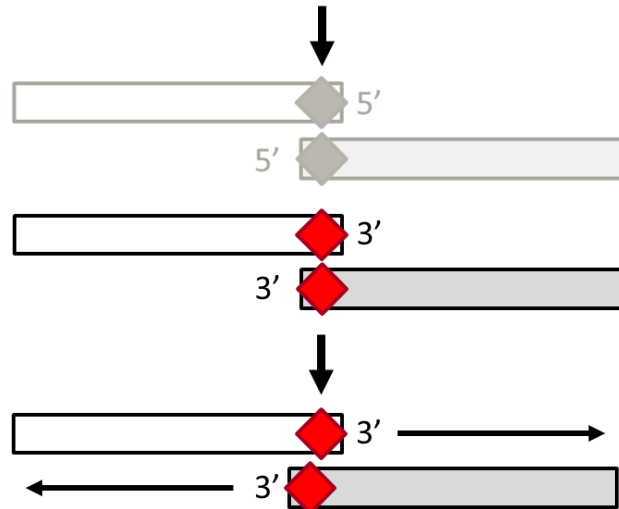


Inserimento di mutazioni - Overlap extension PCR

2 reazioni di PCR, in cui uno dei **primer** contiene la **mutazione** da inserire, producono **frammenti sovrapponibili (overlap)** a livello della regione mutata → estensione in 3'



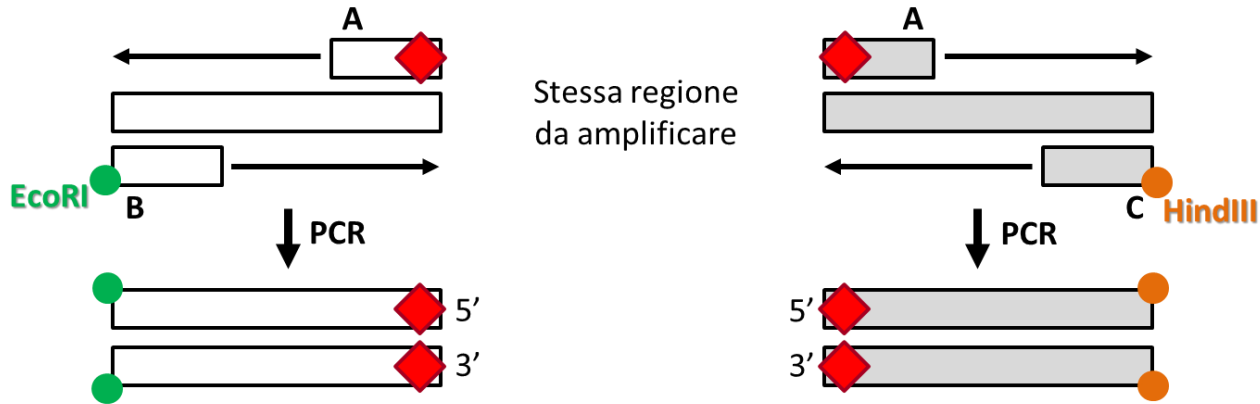
Denaturazione e appaiamento dei prodotti di PCR



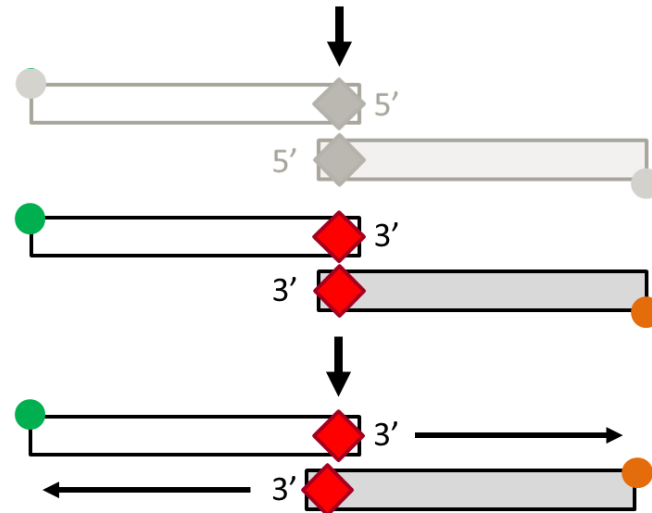
"Overlap" dei frammenti ed estensione delle estremità 3' libere

Inserimento di mutazioni - Overlap extension PCR

2 reazioni di PCR, in cui uno dei primer contiene la **mutazione** da inserire, producono **frammenti sovrapponibili (overlap)** a livello della regione mutata → estensione in 3'

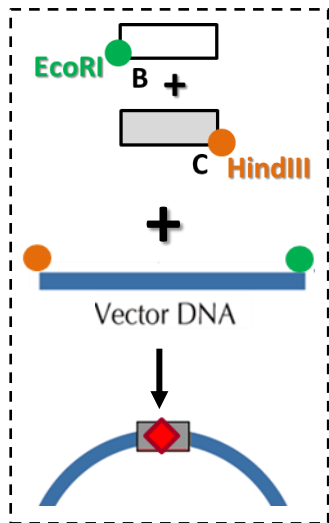


Denaturazione e appaiamento dei prodotti di PCR



"Overlap" dei frammenti ed estensione delle estremità 3' libere

Es.



I **primer B e C** contengono **siti di restrizione** per il successivo clonaggio in vettori

Inserimento di mutazioni - Mutagenesi sito-specifica

Metodo veloce e ormai altamente efficiente ed ottimizzato

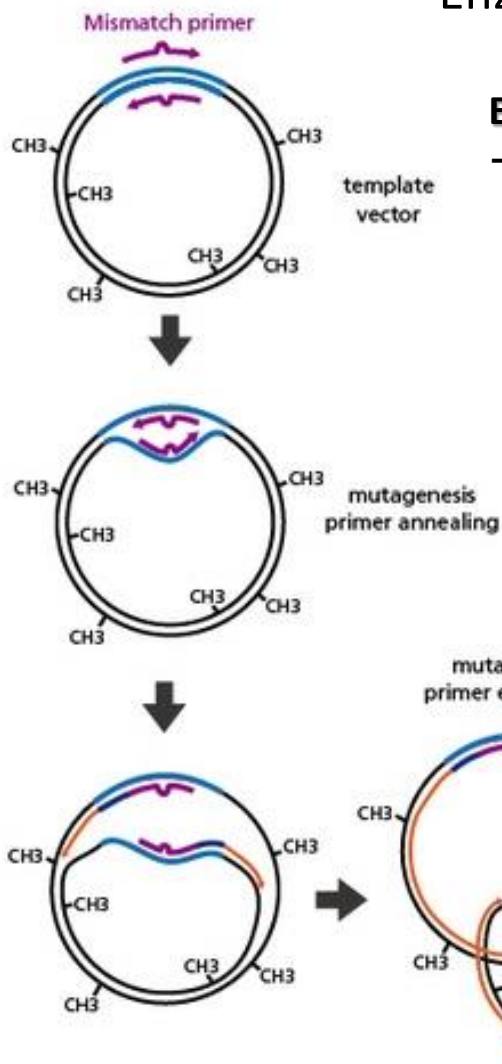
Utilizzo di **due oligonucleotidi (25-30 bp) complementari** tra loro e contenenti un **mismatch centrale**

Enzima: **Pfu** polimerasi isolata dal batterio **Pirococcus furiosus**

T di lavoro: **68°C**

Enzima ad alta fedeltà (errore 1.3×10^{-6} ; Taq pol, 8×10^{-6})

→ deve «copiare» sequenze molto lunghe di DNA (interi vettori, fino a 10 Kb)



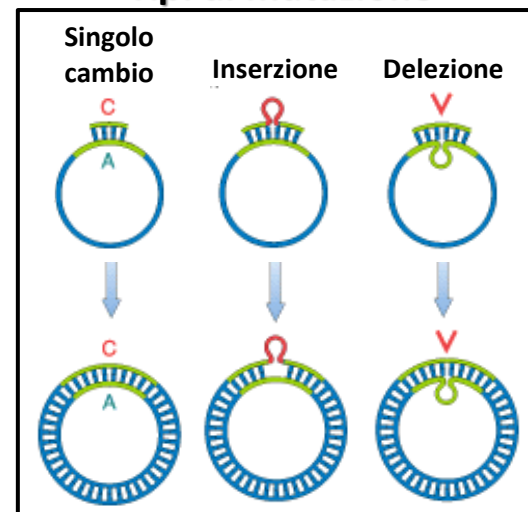
Amplificazione lineare

Risultato:

Miscela di vettore
wild-type + vettore con la mutazione



Tipi di mutazione



Inserimento di mutazioni - Mutagenesi sito-specifica

Amplificazione lineare

Risultato:

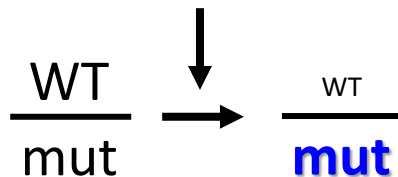
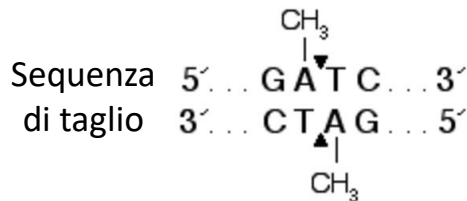
Miscela di vettore
wild-type + vettore con la mutazione

Si sfrutta un meccanismo naturale di
difesa dei batteri → resistenza agli
enzimi di restrizione (metilazione)

Enzima **DpnI**

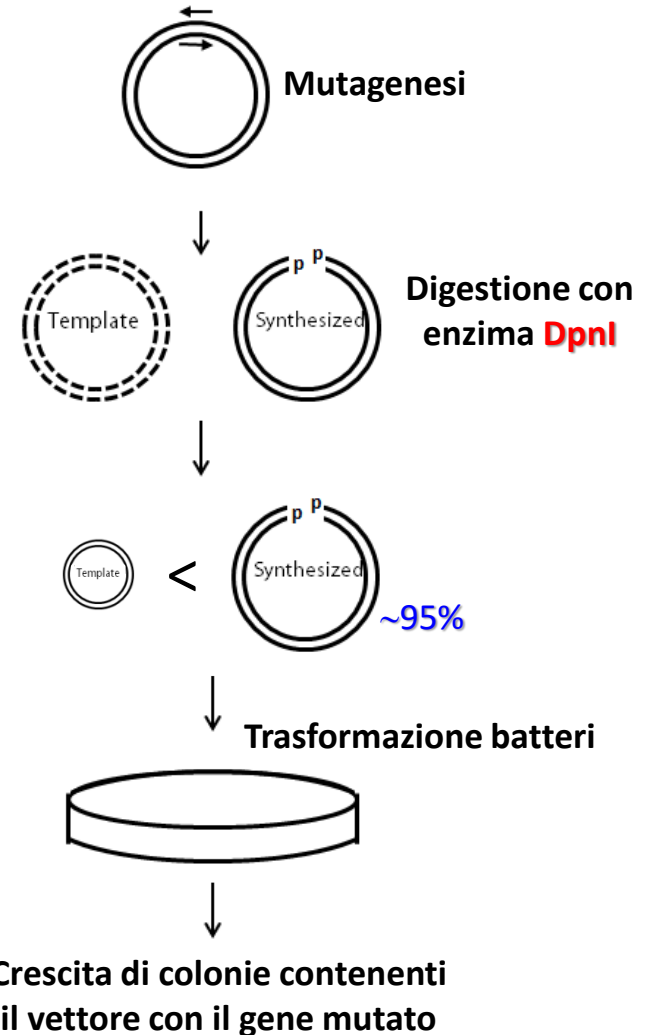
Riconosce e **taglia**

solo il **DNA metilato** (quindi **WT**)



Il rapporto vettore WT/mut va a favore
del vettore mut (teorico 5%/95%)

Processo di mutagenesi nell'insieme:



Espressione in cellule eucariotiche

I vettori di espressione consentono di produrre proteine ricombinanti una volta veicolati all'interno del sistema cellulare opportuno (es. cellule di mammifero)

Trasfezione transiente

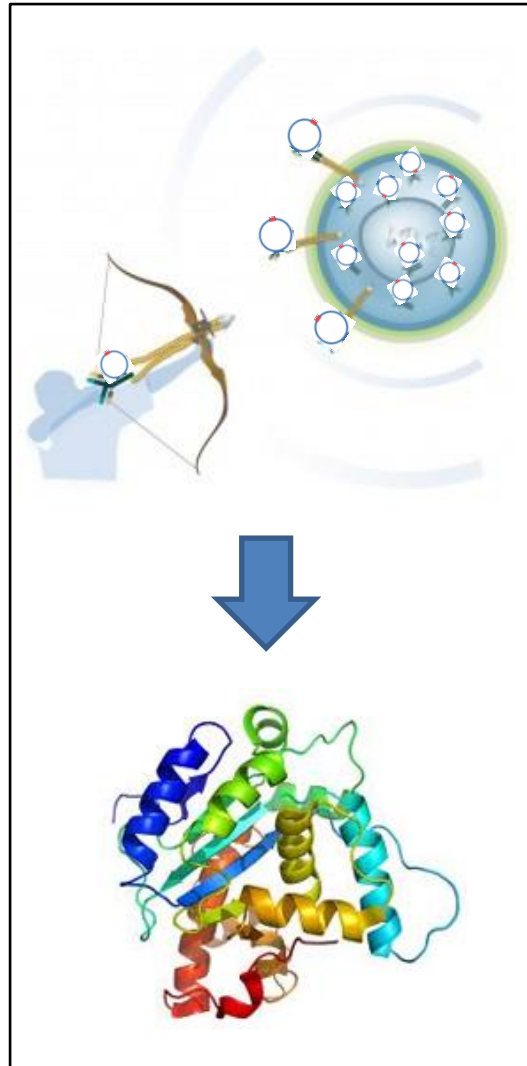
Il vettore inserito esiste all'interno della cellula per un **periodo limitato** di tempo (**circa 72 h**)



Il vettore **non** viene **trasmesso** alle generazioni successive di cellule



Produzione dipendente dalla **forza** del **promotore** e dalle **caratteristiche** della **proteina**
(Metodo utile per studi di espressione)



Trasfezione stabile

Il vettore inserito permane **stabilmente** all'interno della cellula



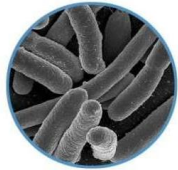
Il vettore **viene trasmesso** alle generazioni successive di cellule



Produzione di **elevate quantità di proteine** per studi successivi (es. purificazione, studi di funzione, ecc.)

Trasfezione mediante lipofezione

Sistemi cellulari comunemente utilizzati per la produzione di proteine ricombinanti



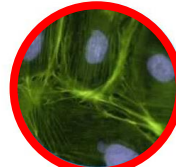
E.coli cells



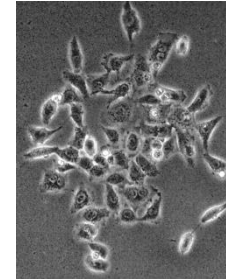
Yeast cells



Insect cells



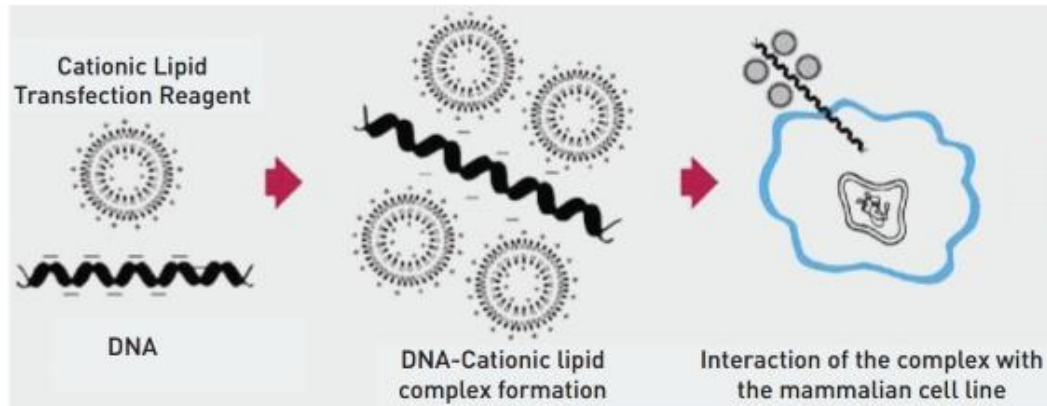
Mammalian cells



Human Embrionic Kidney (HEK) 293 cells → Linea immortalizzata derivante da rene embrionale umano

Molto utilizzata (es. espressione fattori della coagulazione) perché ha un'alta efficienza di trasfezione

Metodo molto utilizzato: **Lipofezione** (mediante **liposomi carichi +**)



Vantaggio: metodo veloce ed efficiente

Limite: lieve tossicità agente trasfettante

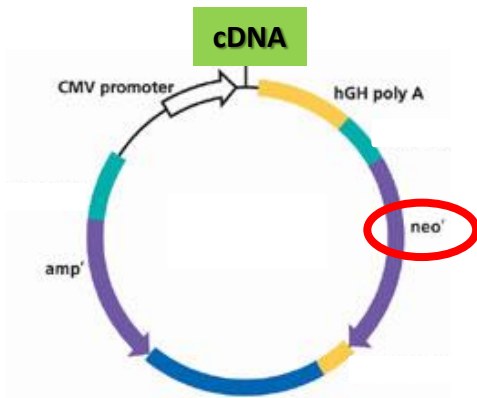
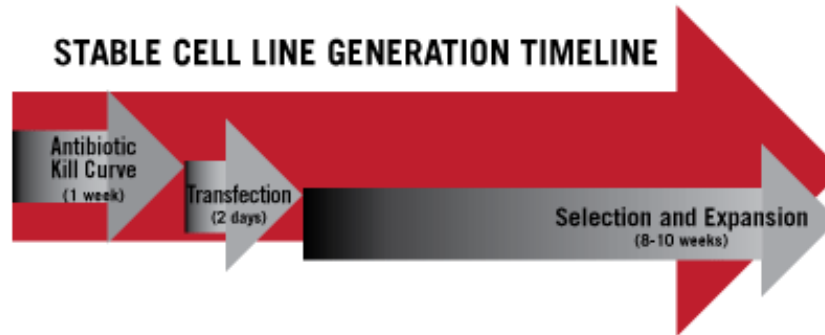
Stesso metodo e protocollo per trasfezione transiente e stabile

Cosa decide se è stabile o transiente???

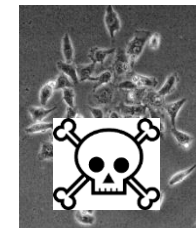
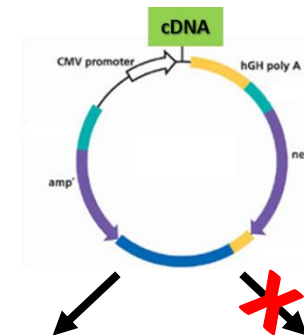
Allestimento di linee cellulari ad espressione stabile

Anche se più lunga e laboriosa rispetto alla trasfezione transiente conferisce il vantaggio di ottenere una **linea cellulare** che esprime in modo **stabile** una **proteina di interesse** (sia in modo costitutivo sia in modo inducibile).

STABLE CELL LINE GENERATION TIMELINE

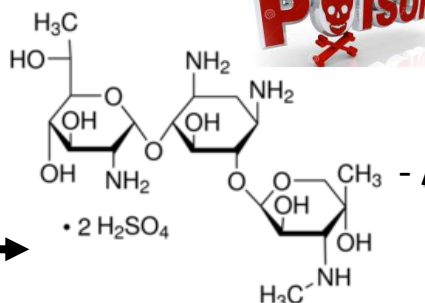


Si sfrutta un gene (es. **Neo^r**) che conferisce **resistenza** per un **agente di selezione** tossico per le cellule



G418 (geneticina)

- **Antibiotico** della classe degli aminoglicosidi
- Interferisce con la sintesi proteica
- Uno degli agenti di selezione più usati



Polylinker o multi-cloning site

Origine di replicazione batterica

Gene resistenza (propagazione)

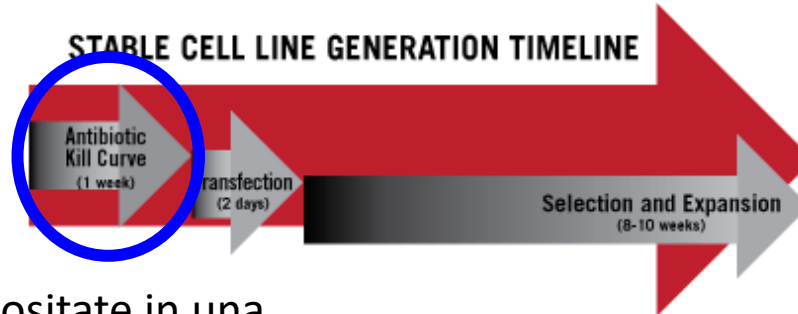
Promotore forte per espressione

Gene resistenza (selezione)

Allestimento di linee cellulari ad espressione stabile

Selezione cloni stabili = **resistenza** agente di selezione grazie alla presenza del vettore

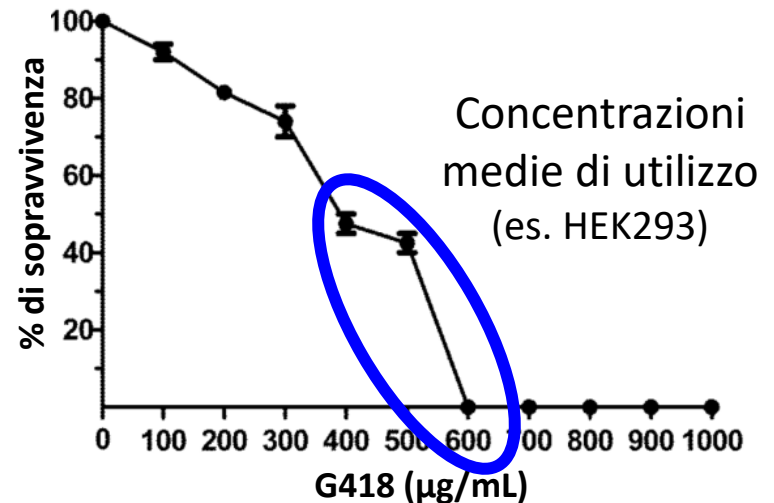
È necessario conoscere la **concentrazione ottimale** per il processo di selezione, che può variare a seconda del tipo di linea cellulare in uso → **KILLING CURVE**.



Le **cellule** vengono depositate in una piastra a più pozzetti e **trattate** con **concentrazioni crescenti** di G418

	1	2	3	4	5	6
A	0	0	50	50	100	100
B	200	200	300	300	400	400
C	500	500	600	600	700	700
D	800	800	900	900	1000	1000

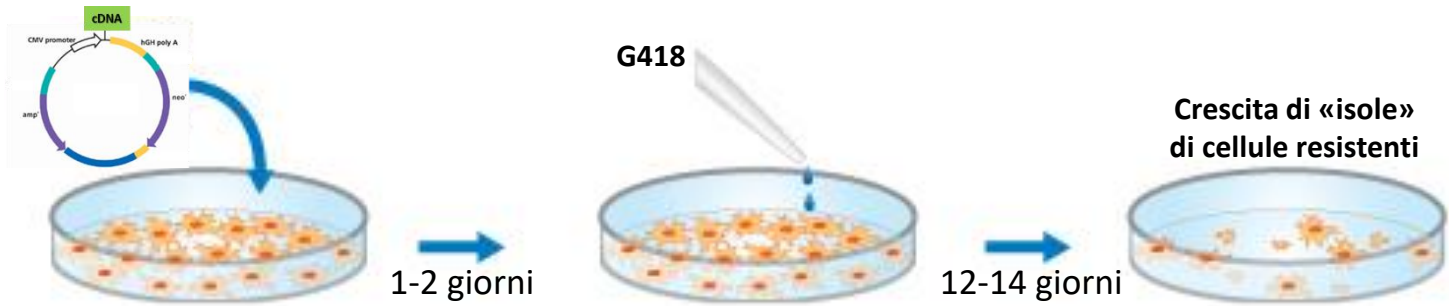
Piastra "24-well"



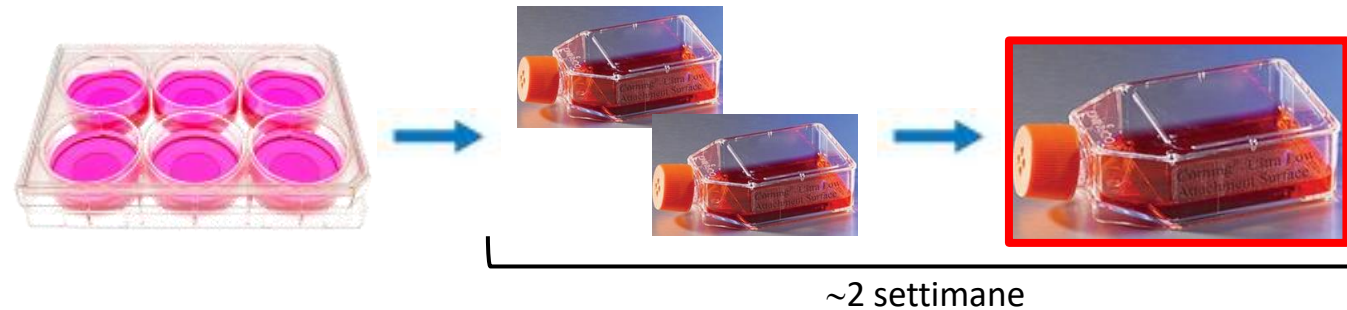
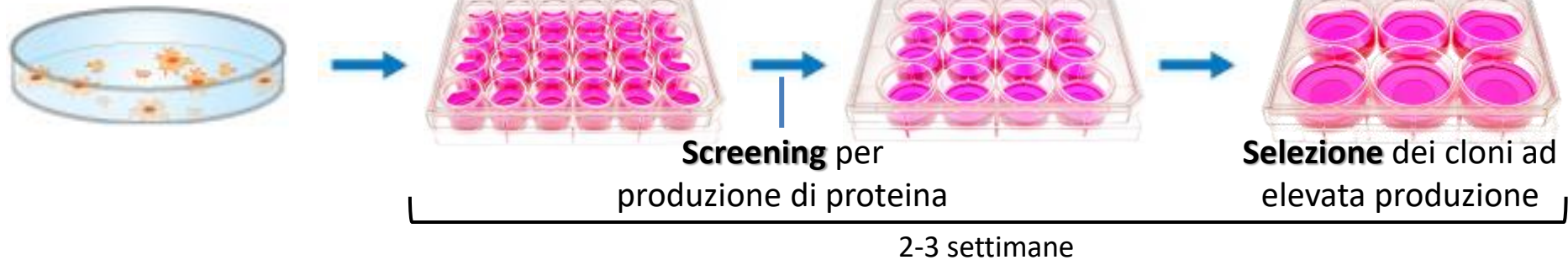
Le **cellule trasfettate** con il vettore avranno un **vantaggio selettivo** rispetto a quelle non trasfettate

Processo di selezione dei cloni

Trattamento con l'agente di selezione → pressione selettiva → selezione



"Picking" di singoli cloni



Linea cellulare stabilizzata

(la pressione selettiva data dall'agente di selezione fa sì che il vettore venga mantenuto e trasmesso alle generazioni successive di cellule)

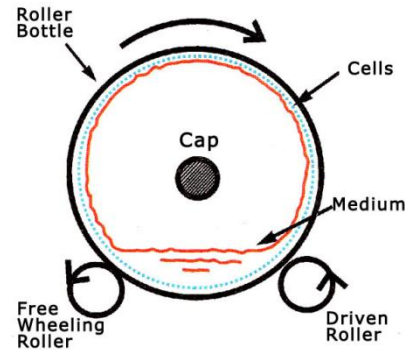
Riassunto protocollo tipico per la selezione di cloni stabili



Sistemi per la produzione di proteine ricombinanti



Bottiglie rotanti («roller bottles»)

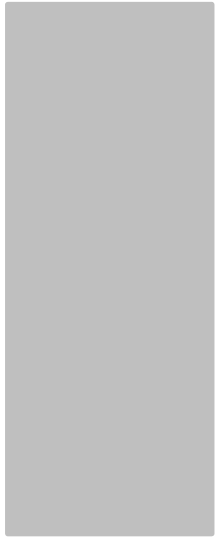


Cell factories («condomini per cellule»)



Sforzi ripagati in produzione di proteine!

PCR: Polymerase Chain Reaction

Reagenti	Concentrazioni iniziali	Concentrazioni finali	Volumi (μl)
DNA	100 ng/ μL	4 ng/ μL	
Buffer	10X	1X	
dNTPs	2 mM	0.2 mM	
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	
Primer F	6.8 pmol/ μL	0.272 pmol/ μL	
Primer R	6.8 pmol/ μL	0.272 pmol/ μL	
Enzima	5 U/ μL	0.5 U/camp.	
H ₂ O			

50 μl

Peri i calcoli: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

Oppure: si ragiona sui rapporti di concentrazione dei reagenti tenendo in considerazione il volume finale

PCR: Polymerase Chain Reaction

Reagenti	Concentrazioni iniziali	Concentrazioni finali	Volumi (μ l)
DNA	100 ng/ μ L	4 ng/ μ L	2
Buffer	10X	1X	5
dNTPs	2 mM	0.2 mM	5
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1.5
Primer F	6.8 pmol/ μ L	0.272 pmol/ μ L	2
Primer R	6.8 pmol/ μ L	0.272 pmol/ μ L	2
Enzima	5 U/ μ L	0.5 U/camp.	0.1
H ₂ O			32.4
			<hr/> 50 μ l

Per i calcoli: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

Oppure: si ragiona sui rapporti di concentrazione dei reagenti tenendo in considerazione il volume finale