

DNA ricombinante

Per DNA ricombinante si intendono molecole di DNA ottenute unendo tra loro segmenti di DNA derivanti da fonti biologiche diverse.

Sebbene molecole di DNA ricombinante possano formarsi anche naturalmente (ad esempio durante il crossing over o durante il ciclo lisogeno dei batteriofagi) generalmente per DNA ricombinate si intendono molecole prodotte artificialmente (per ricerca o per applicazioni biotecnologiche).

Due categorie principali di enzimi sono indispensabili per la preparazione di DNA ricombinante:

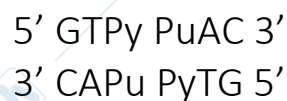
Le *Endonucleasi di Restrizione* e le *DNA Ligasi*.

Endonucleasi di Restrizione

Fino alla fine degli anni '60 tutte le desossiribonucleasi note non presentavano alcuna specificità di sequenza. Di conseguenza non potevano essere impiegate per ricostruire l'ordine originale dei frammenti da esse originati a partire da una grossa molecola di DNA.

La prima nucleasi di restrizione viene scoperta nel 1970.

Si tratta dell'enzima *HindII* che idrolizza il legame fosfodiesterico del DNA esclusivamente a livello della sequenza consenso:



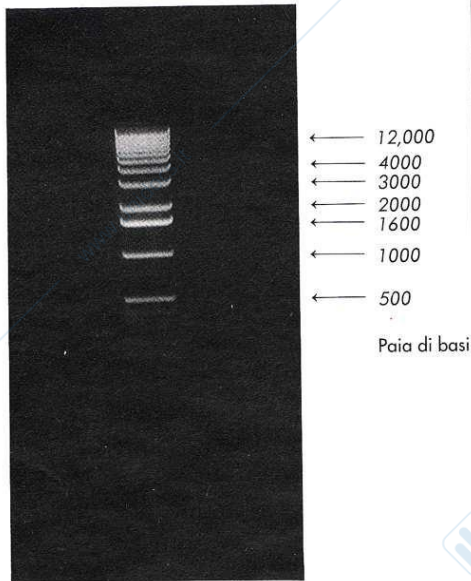
Enzimi di restrizione

Microorganismo	Sigla dell'enzima	Sequenza
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>HaeIII</i>	5' ... G G C C ... 3' 3' ... C C G G ... 5'
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	5' ... T C G A ... 3' 3' ... A G C T ... 5'
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>HbaI</i>	5' ... G C G C ... 3' 3' ... C G C G ... 5'
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>DdeI</i>	5' ... C T N A G ... 3' 3' ... G A N T C ... 5'
<i>Moraxella bovis</i>	<i>MboII</i>	5' ... G A A G A (N) ₈ ... 3' 3' ... C T T C T (N) ₇ ... 5'
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRV</i>	5' ... G A T A T C ... 3' 3' ... C T A T A G ... 5'
	<i>EcoRI</i>	5' ... G A A T T C ... 3' 3' ... C T T A A G ... 5'
<i>Providencia stuarti</i>	<i>PstI</i>	5' ... C T G C A G ... 3' 3' ... G A C G T C ... 5'
<i>Microcoleus</i>	<i>MstII</i>	5' ... C C T N A G G ... 3' 3' ... G G A N T C C ... 5'
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	<i>NotI</i>	5' ... G C G G C C G C ... 3' 3' ... C G C C G G C G ... 5'

1. Tagliano sequenze specifiche di DNA

2. Isolate da molte migliaia di ceppi batterici
3. Identificati oltre 150 differenti siti di restrizione specifici
4. Riconoscono sequenze specifiche composte da 4 a 8 basi

I diversi frammenti generati a partire da un determinato campione di DNA da un particolare enzima di restrizione possono essere separati elettroforeticamente su gel d'agaroso fornendo un profilo altamente specifico.



Esistono tre classi principali di endonucleasi di restrizione.

Quelle di tipo I e di tipo III tagliano il DNA a livello di siti diversi da quello di riconoscimento

Originano frammenti non prevedibili

Non sono utili per produrre DNA ricombinante.

Quelle di tipo II riconoscono siti specifici e tagliano il DNA esattamente al loro livello

Estremamente utili per mappare e ricostruire DNA *in vitro*.

Le endonucleasi di restrizione prendono il nome dall'organismo in cui sono state scoperte con un sistema di lettere e numeri.

HindIII	Haemofilus influenzae (ceppo d)	3° enzima di quel tipo
SMAI	Serratia marcescens	1° enzima di quel tipo
EcoRI	Escherichia coli (ceppo R)	1° enzima di quel tipo
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens (ceppo H)	1° enzima di quel tipo

Ad oggi sono state isolate e caratterizzate più di 3000 endonucleasi di restrizione di tipo II, di cui circa 240 sono disponibili commercialmente.

Tutte le endonucleasi di restrizione di tipo II note sono formate da due subunità identiche che si uniscono a formare un omodimero.

Le endonucleasi di restrizione di tipo II riconoscono brevi sequenze simmetriche di DNA di 4-8 pb. Simmetriche nel senso che la sequenza letta nella direzione 5' → 3' su un filamento è uguale alla sequenza letta in direzione 5' → 3' sul filamento complementare (sequenze palindromo, vale a dire uguali quando sono lette nelle due direzioni).

In biologia molecolare si utilizzano soprattutto endonucleasi di restrizione di tipo II che riconoscono e tagliano sequenze di 6 pb.

Un sito particolare di 4 paia di basi ricorre in media ogni 256 paia di basi.

Un sito di 6 paia di basi ogni 4096 paia di basi.

La distribuzione dei siti non è però regolare.

Es. *NotI* riconosce una sequenza di 8 paia di basi molto rara nei mammiferi; di conseguenza produce frammenti di DNA lunghi da 1 a 1.5 milioni di paia di basi.

Le endonucleasi di restrizione mostrano una specificità di sequenza altissima: il cambiamento di una singola base nel sito di riconoscimento dell'endonucleasi di restrizione elimina completamente l'attività enzimatica.

Alcuni enzimi di restrizione (es. *EcoRI*) generano un taglio sfalsato, in cui le code complementari a singolo filamento sono chiamate estremità "appiccicose" o coesive perché possono formare legami idrogeno con le code complementari a singolo filamento di altri frammenti di DNA.

Se molecole di DNA derivanti da fonti diverse hanno gli stessi siti di riconoscimento palindromi, entrambi presenteranno estremità coesive complementari qualora vengano digerite dalla stessa endonucleasi di restrizione. Questi frammenti possono quindi essere successivamente uniti insieme da una DNA ligasi.

Altri enzimi di restrizione (es. *SmaI*) tagliano entrambi i filamenti del DNA nello stesso punto e generano estremità piatte senza nucleotidi non appaiati.

Inizialmente l'endonucleasi di restrizione si lega in modo aspecifico con l'ossatura zucchero-fosfato del DNA. In questa prima fase il sito attivo dell'enzima è tenuto distante dai legami fosfoesterici. L'enzima comincia a scorrere lungo un solco del DNA per una distanza di 30-50 pb. Se non trova il suo sito specifico si stacca dal DNA e si riattacca in un altro punto (salto).

Quando invece l'enzima incontra la sua sequenza specifica di restrizione, il suo sito catalitico si attiva e in presenza di Mg^{++} (cofattore indispensabile) taglia i due filamenti del DNA duplex (idrolizza cioè il legame fosfoesterico tra il fosfato di un nucleotide e lo zucchero del nucleotide adiacente, producendo estremità libere 5'-fosfato e 3'-OH).

La seconda categoria di enzimi indispensabili per generare molecole di DNA ricombinante è quella delle *DNA ligasi*.

Le DNA ligasi catalizzano la formazione di un legame fosfoesterico tra il 5'-fosfato di un nucleotide su un frammento di DNA e il 3'-ossidrile di un altro (legatura).

Questa reazione richiede energia fornita dall'idrolisi di ATP.

Le DNA ligasi sono enzimi chiave nell'ingegneria genetica: frammenti di restrizione originati da DNA di origine diversa ad opera di uno stesso enzima di restrizione si possono appaiare a livello delle loro estremità coesive complementari. I filamenti, però, non sono uniti da legami covalenti fosfoesterici. Per saldare le interruzioni è necessaria la DNA ligasi.

Se le estremità generate dalle endonucleasi di restrizione sono piatte, la DNA ligasi riesce comunque a saldare i frammenti ma l'efficienza della reazione è estremamente bassa. Per ovviare a questo inconveniente i ricercatori modificano le estremità piatte dei frammenti di restrizione con l'enzima deossinucleotidil transferasi terminale che aggiunge dei nucleotidi (quelli che il ricercatore aggiunge nel mix di reazione) all'estremità 3' del frammento piatto. Ad esempio si aggiunge una coda di poli(A) ad un frammento di restrizione e una coda di poli(T) all'altro. A questo punto i frammenti si appaiano spontaneamente e possono essere poi saldati con facilità dalla DNA ligasi.

La produzione di molecole di DNA ricombinante (formate cioè dall'unione di frammenti di DNA di origine diversa) è alla base delle tecniche di *clonaggio molecolare*.

Il *Clonaggio Molecolare* è un procedimento che permette di isolare e amplificare (cioè creare tante coppie identiche all'originale) una determinata sequenza di DNA (di solito corrispondente ad un gene ma non necessariamente. Ad esempio si possono anche clonare delle regioni di controllo per poterle studiare meglio).

Clonaggio del gene di una determinata proteina in un vettore plasmidico al fine di produrre grosse quantità di quella proteina.

Vettori = grosse molecole di DNA che si legano al frammento di DNA di interesse e che hanno la capacità di replicarsi autonomamente in cellule ospiti.

Esistono varie categorie di vettori, i più semplici dei quali sono i plasmidi.

Clonaggio del DNA di una determinata proteina (es. Insulina) in un plasmide per produrla in grande quantità in *E. coli*.

Un vettore plasmidico tipicamente contiene:

- 1) Un polylinker (sito di clonaggio multiplo) che possiede un certo numero di siti specifici per varie endonucleasi di restrizione. Tagliando il polylinker con un determinato enzima di restrizione si originano due estremità coesive dove è possibile inserire un frammento di DNA estraneo (es. gene dell'Insulina) le cui estremità siano state originate dal medesimo enzima di restrizione.
- 2) Il gene per la resistenza ad un determinato antibiotico (marker di selezione). In questo modo è possibile selezionare i batteri che hanno acquisito il plasmide (batteri trasformati) da quelli che non ce l'hanno (e che quindi in presenza dell'antibiotico muoiono).
- 3) Un sito per l'inizio della duplicazione molto forte. In questo modo i batteri trasformati avranno al loro interno moltissime copie del plasmide.
- 4) L'espressione del gene inserito all'interno del polylinker è sotto il controllo del promotore di un operone (tipicamente dell'operone Lac). In questo modo è possibile indurre l'espressione della proteina ricombinante solo quando si immette nella coltura batterica l'induttore (lattosio). Molto utile per evitare l'espressione continua di proteine che a lungo andare potrebbero essere tossiche per il batterio.

Metodi per introdurre DNA in cellule procariotiche ed eucariotiche

Trasformazione per i batteri

Transfezione per le cellule eucariotiche

- 1) Incubazione con cloruro di calcio
- 2) Elettroporazione
- 3) Lipofezione (mediante liposomi)
- 4) Vettori virali

1) Incubazione con cloruro di calcio

Incubando batteri con soluzioni ad elevata concentrazione di sali di calcio si ha una permeabilizzazione delle membrane cellulari e ciò permette l'ingresso nella cellula dei plasmidi.

2) Elettroporazione

Trattando le cellule (procariotiche o eucariotiche) con forte corrente elettrica si formano nelle membrane cellulari dei piccoli fori che permettono l'ingresso dei vettori d'espressione.

3) Lipofezione

Solo per cellule eucariotiche. Si generano delle piccole particelle (liposomi) delimitate da una membrana lipidica e contenenti al loro interno il DNA ricombinante. Il liposoma si fonde con la membrana cellulare e libera all'interno del citoplasma il suo contenuto.

4) Vettori virali

Si utilizzano virus modificati che infettano le cellule e vi introducono il DNA ricombinante.

STRATEGIE DI BASE PER IL CLONAGGIO

1) Scelta della fonte di DNA da cui partire:

- DNA genomico (cromosomico)
- DNA complementare (cDNA)
- DNA amplificato tramite PCR (se si conoscono le estremità del frammento da clonare e quindi si possono disegnare dei primers specifici)

Dipende dallo scopo del clonaggio

Se si vuole la sequenza codificante del gene (e quindi della proteina) =

Se si vuole conoscere le sequenze di controllo (o gli introni)=

2) Preparazione di un insieme di frammenti di DNA da inserire in vettori

Frammenti di Dna cromosomico ottenuti con enzimi di restrizione cDNA ottenuto dagli mRNA utilizzando la *trascrittasi inversa*

3) Screening di tutte le colonie batteriche per individuare la sequenza di interesse

Sintesi del DNA complementare (cDNA)

Una popolazione di mRNA isolata da un tessuto o da un tipo cellulare specifici comprende tutti gli mRNA di tutte le proteine sintetizzate in quel tessuto o in quel tipo cellulare.

Per prima cosa si purifica tutto l'mRNA del tessuto o della cellula (per l'insulina si partirebbe dal pancreas).

L'mRNA si purifica mediante una colonna cromatografica per affinità che contiene delle sequenze di poliT o poliU legate a granuli di resina. In presenza di elevate concentrazioni di sali gli mRNA si legano alle sequenze di poliT o poliU grazie alle loro code di poliA. La successiva eluizione dalla colonna degli mRNA avviene con un tampone a bassa concentrazione salina.

Un cDNA a filamento singolo viene sintetizzato dalla trascrittasi inversa utilizzando come stampo gli mRNA e come primer una sequenza di poliU. La trascrittasi inversa tende a formare un'ansa all'estremità 3' del primo filamento di cDNA.

L'mRNA viene quindi degradato con una ribonucleasi o con una soluzione alcalina.

Il secondo filamento del cDNA è sintetizzato dalla DNA polimerasi I di *E. coli* che utilizza il 3' dell'ansa come punto di partenza.

L'ansa viene infine rimossa dalla nucleasi S1.

Le estremità coesive vengono aggiunte ai cDNA dalla DNA ligasi utilizzando dei linker specifici (per le varie endonucleasi di restrizione).

Come si riconosce il cDNA specifico per la proteina di interesse (es. Insulina)?

Ciascun cDNA diverso viene inserito in un plasmide e questi plasmidi vengono utilizzati per trasformare un'intera popolazione di batteri (in modo che ogni singolo batterio contenga al suo interno molte copie di un solo plasmide (e quindi di un solo cDNA).

Questi batteri vengono piastrati su delle capsule Petri in modo che ogni colonia derivi da un singolo batterio.



Come riconoscere la colonia che è stata trasformata con il cDNA di interesse?

A questo scopo si utilizzano sonde nucleotidiche marcate (radioattive) ottenute sulla base della sequenza proteica

Lunghezza minima di un oligonucleotide: 17-20 nucleotidi

Numero di aminoacidi da conoscere: almeno 6 (contigui)

Poiché, però, il codice è degenerato si deve utilizzare un pool di oligonucleotidi

E' necessario conoscere la sequenza di un peptide di almeno 6 amino acidi della proteina. A partire da questa sequenza si ottengono tutti i possibili oligonucleotidi (che codificano per quel peptide).

Si sintetizzano tutti questi oligonucleotidi marcati con atomi radioattivi.

Le colonie batteriche sono parzialmente trasferite su una membrana (di nitrocellulosa o nylon), i batteri sono quindi lisati e il loro DNA viene denaturato.

Le sonde marcate sono poste sulla membrana e se trovano il cDNA complementare vi si legano. Le sonde non ibridizzate vengono invece lavate via.

La membrana è esposta ad una lastra da raggi X. Dove sono presenti le sonde radioattive (e quindi in corrispondenza delle colonie batteriche contenenti il giusto cDNA) la lastra viene impressionata.

Confrontando l'autoradiogramma con la capsula di Petri originaria è possibile identificare la colonia batterica trasformata con il cDNA per la proteina di interesse.

Questi batteri possono essere raccolti, fatti crescere e utilizzati per produrre la proteina di interesse o per subclonare (ri-clonare) il cDNA in un plasmide più adatto (ottimizzato) per produrre grandi quantità della proteina ricombinante.