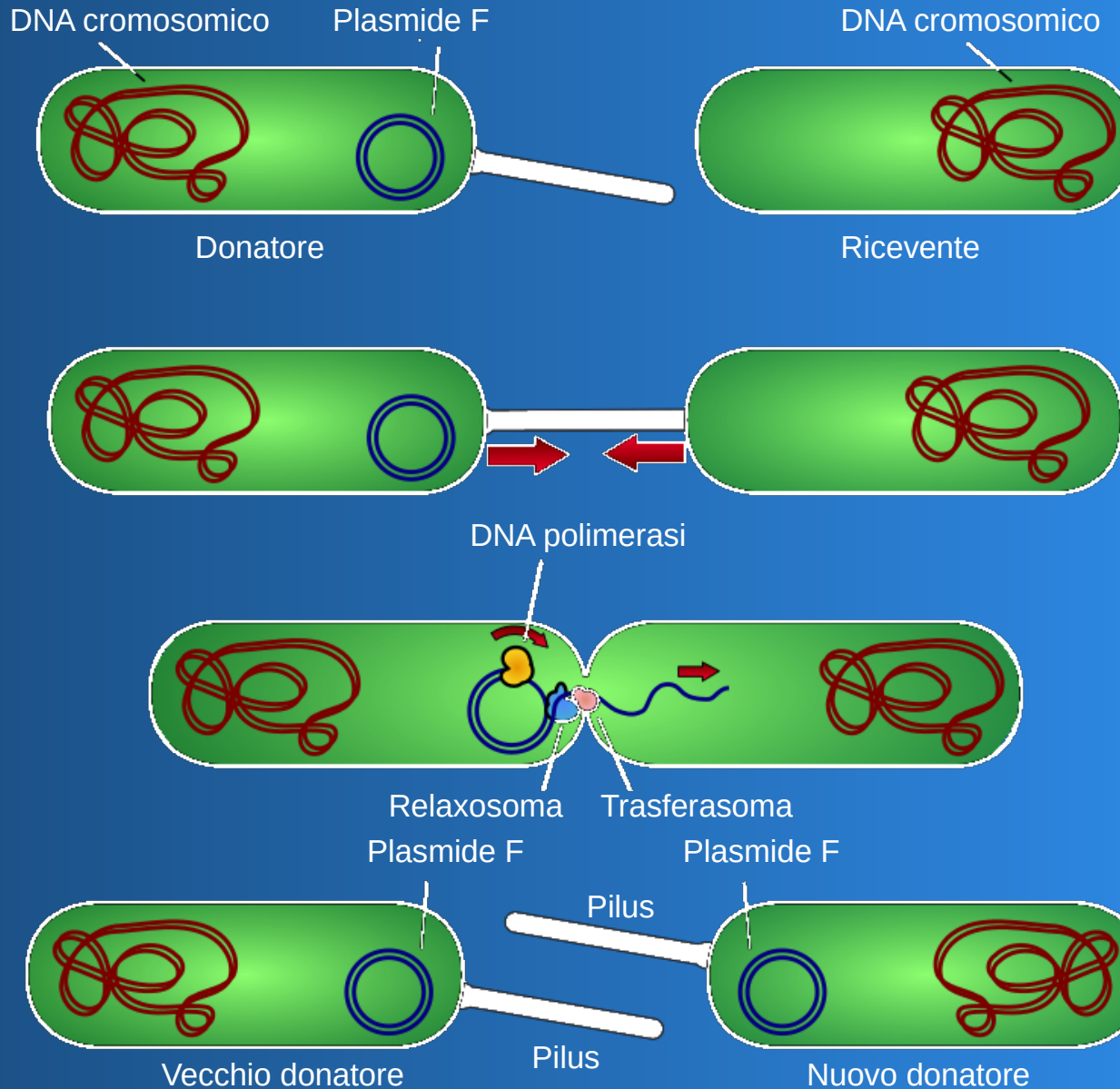
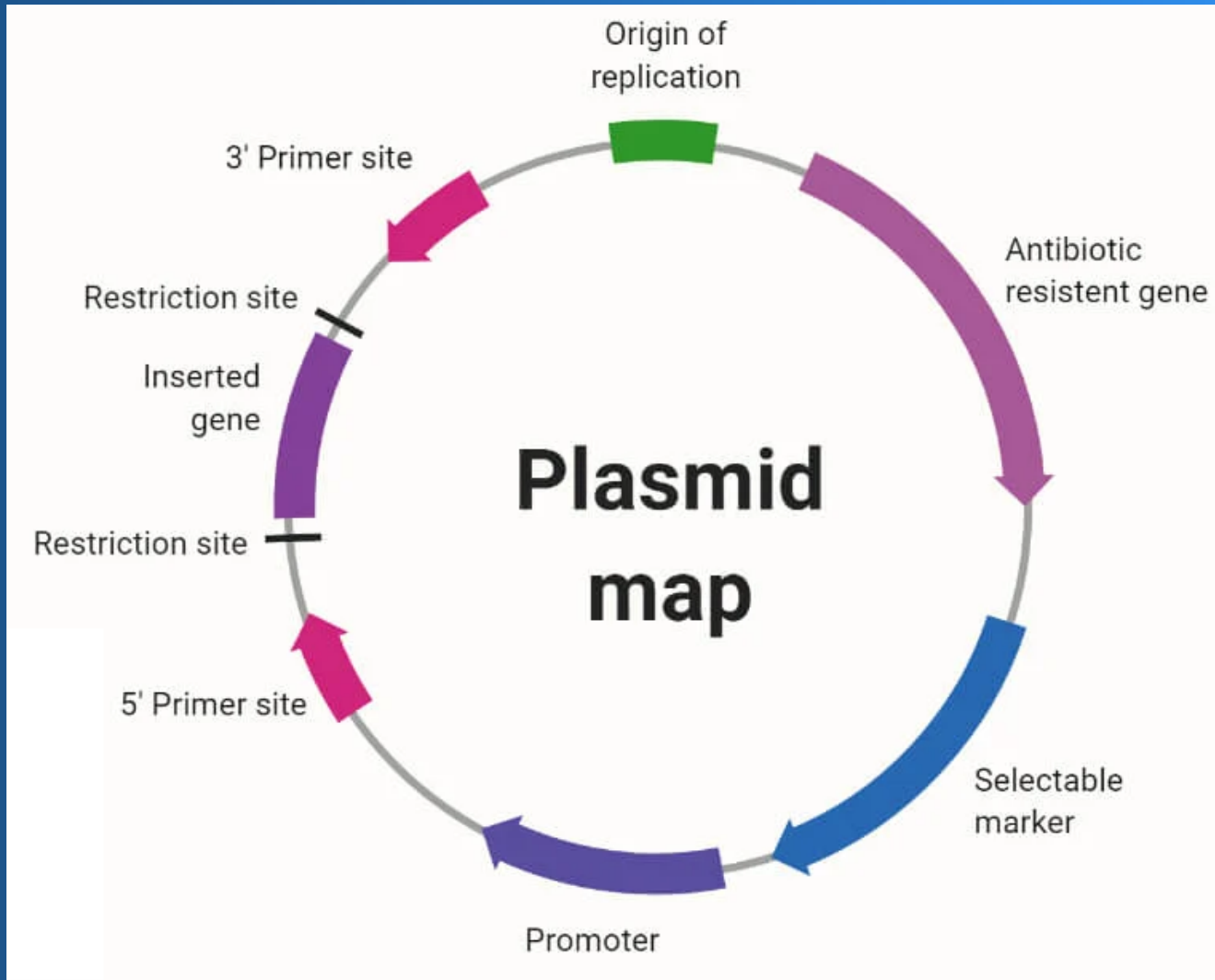


Biotecnologie – uso dei batteri



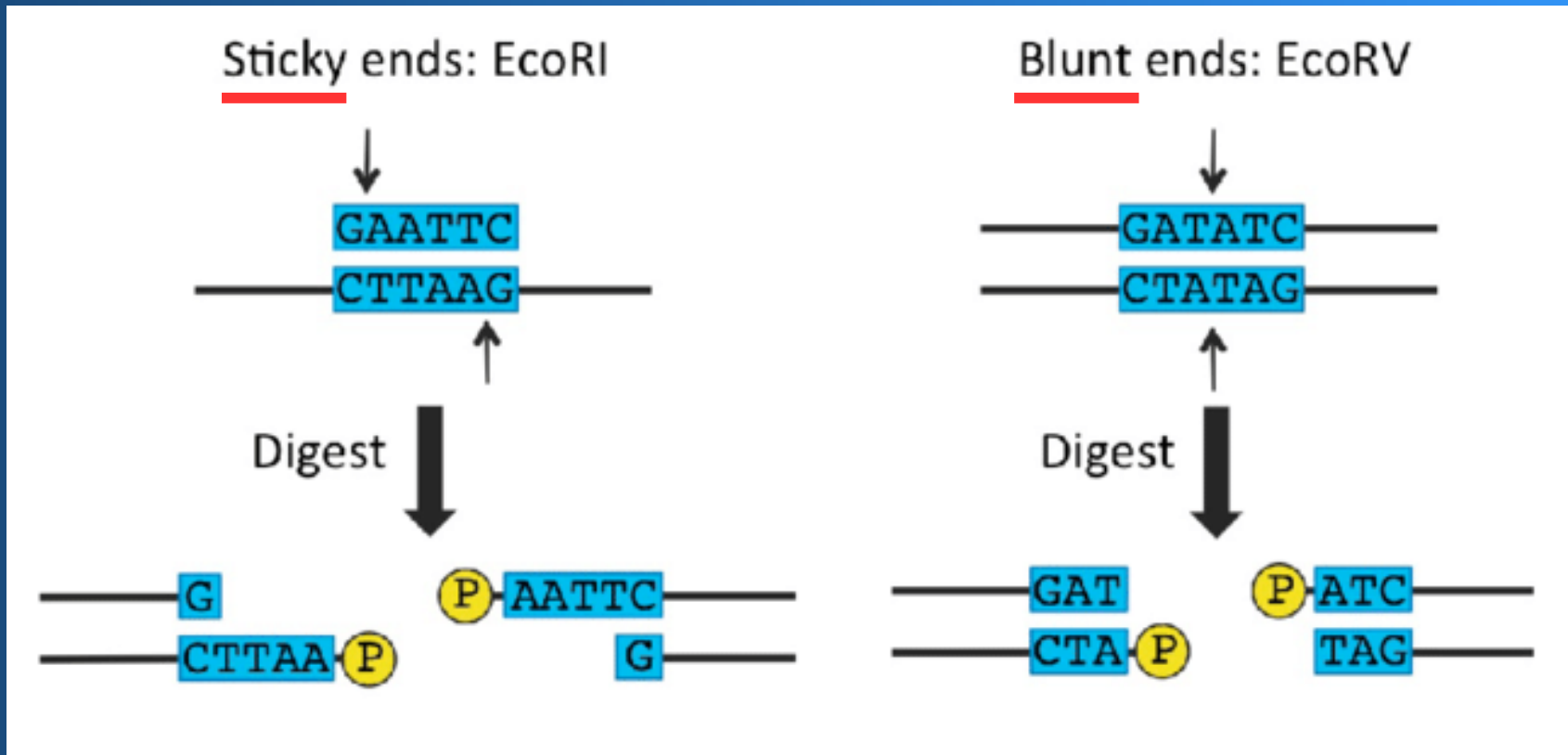
**1-100 copie di
DNA plasmidico
per cellula**

Plasmidi - proprietà



Enzimi di restrizione

Gli enzimi usati per i clonaggi molto spesso riconoscono sequenze PALINDROMICHE

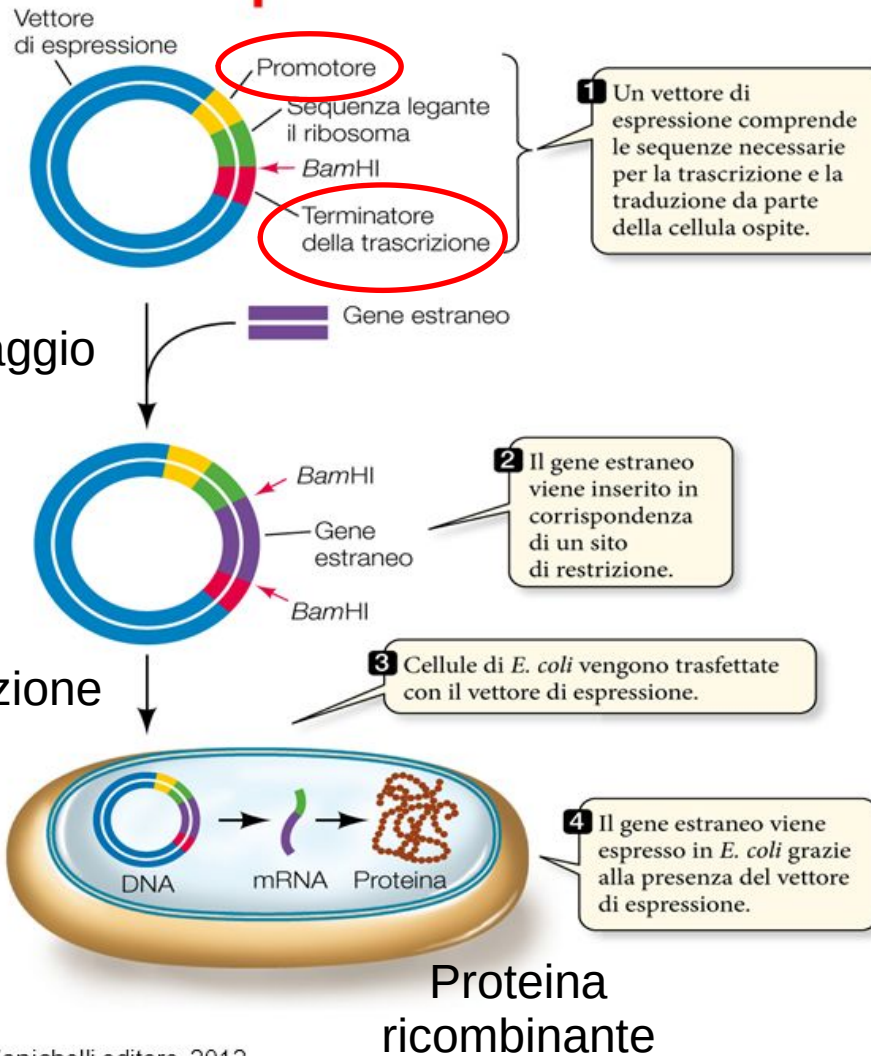


Enzimi di restrizione

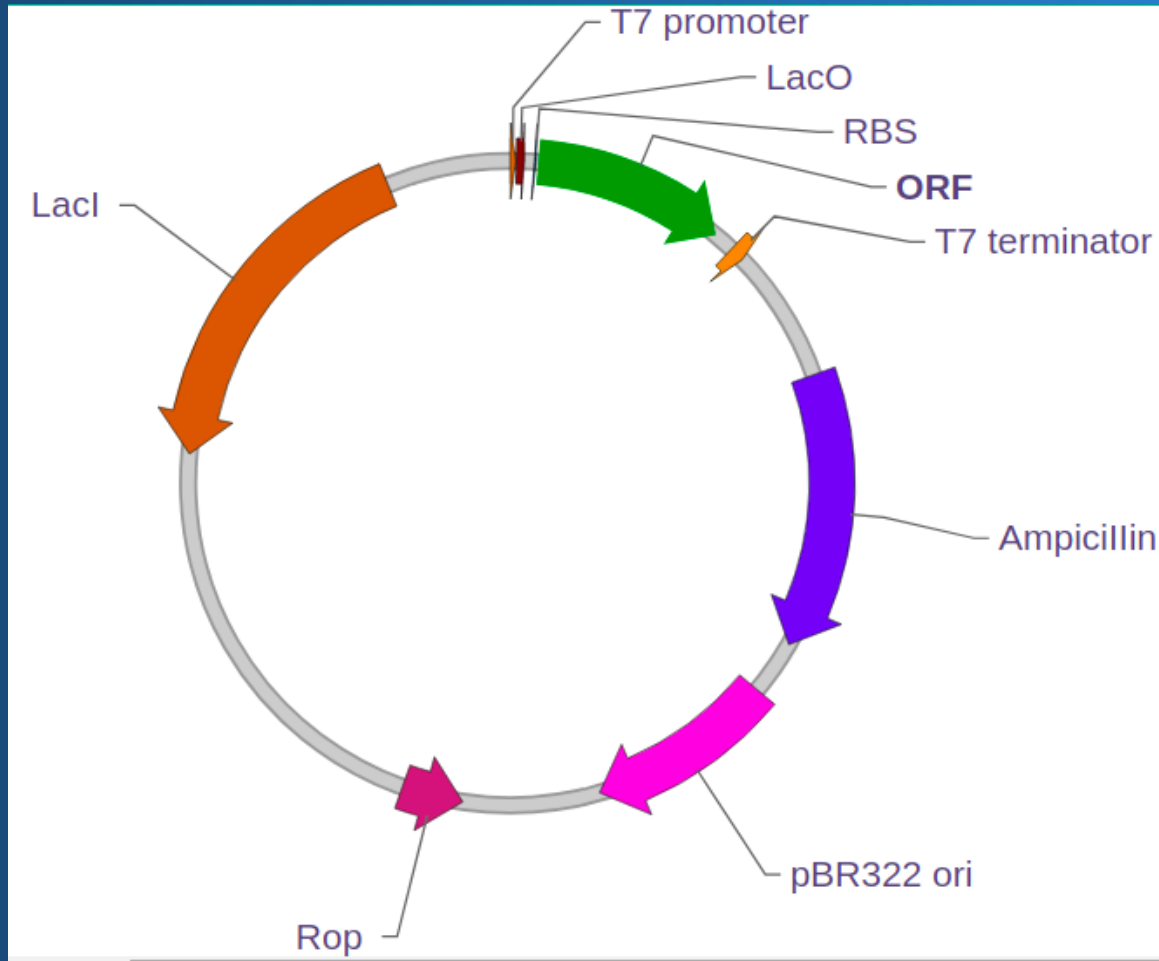
<i>Microorganisms</i>	<i>Restriction enzymes</i>	<i>Cleavage sites</i>	<i>Cleavage products</i>	
<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	<i>Bam</i> HI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5\text{-GGATCC-3} \\ 3\text{-CCTAGG-5} \end{array}$	5-G 3-CCTAG	GATCC-3 G-5
<i>B. globigii</i>	<i>Bgl</i> II	$\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-AGATCT-3} \\ 3\text{-TCTAGA-5} \end{array}$	5-A 3-TCTAG	GATCT-3 A-5
<i>Escherchia coli RY13</i>	<i>Eco</i> RI	$\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GAATTC-3} \\ 3\text{-CTTAAG-5} \end{array}$	5-G 3-CTTAA	AATTC-3 G-5
<i>Haemophilus influenzae Rd</i>	<i>Hin</i> dIII	$\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-AAGCTT-3} \\ 3\text{-TTCGAA-5} \end{array}$	5-A 3-TTCGA	AGCTT-3 A-5
<i>H. parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GTTAAC-3} \\ 3\text{-CAATTG-5} \end{array}$	5-GTT 3-CAA	AAC-3 TTG-5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK 8	<i>Kpn</i> I	$\begin{array}{c} \uparrow \downarrow \\ 5\text{-GGTACC-5} \\ 3\text{-CCATGG-3} \end{array}$	5-GGTAC 3-C	C-3 CATGG-5
<i>Streptomyces albus G</i>	<i>Sal</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GTCGAC-3} \\ 3\text{-CAGCTG-5} \end{array}$	5-G 3-CAGCT	TCGAC-3 G-5
<i>Staphylococcus aureus</i> 3AI	<i>Sau</i> 3AI	$\begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5\text{-GATC-3} \\ 3\text{-CTAG-5} \end{array}$	5- 3-CTAG	GATC-3 5

Vettori di espressione

Tecniche di
Biologia
Molecolare



Anatomia di un vettore: serie pET



LacI: attiva LacO

T7 promoter: promotore di un batteriofago

LacO: reprime la trascrizione

RBS: ribosome binding site

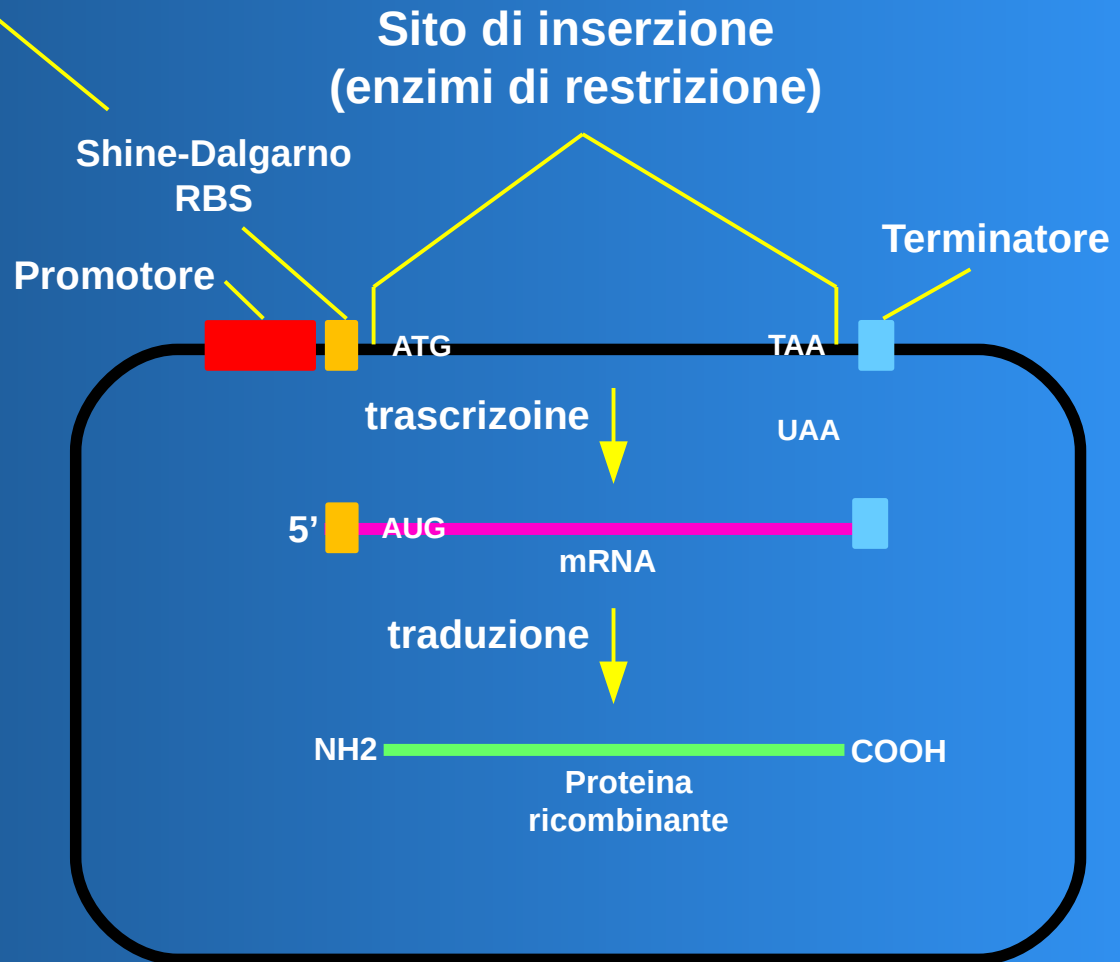
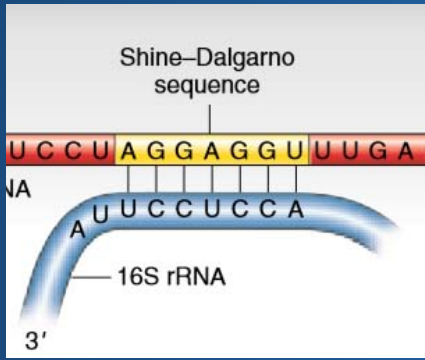
ORF: open reading frame

Amp: resistenza all'ampicillina

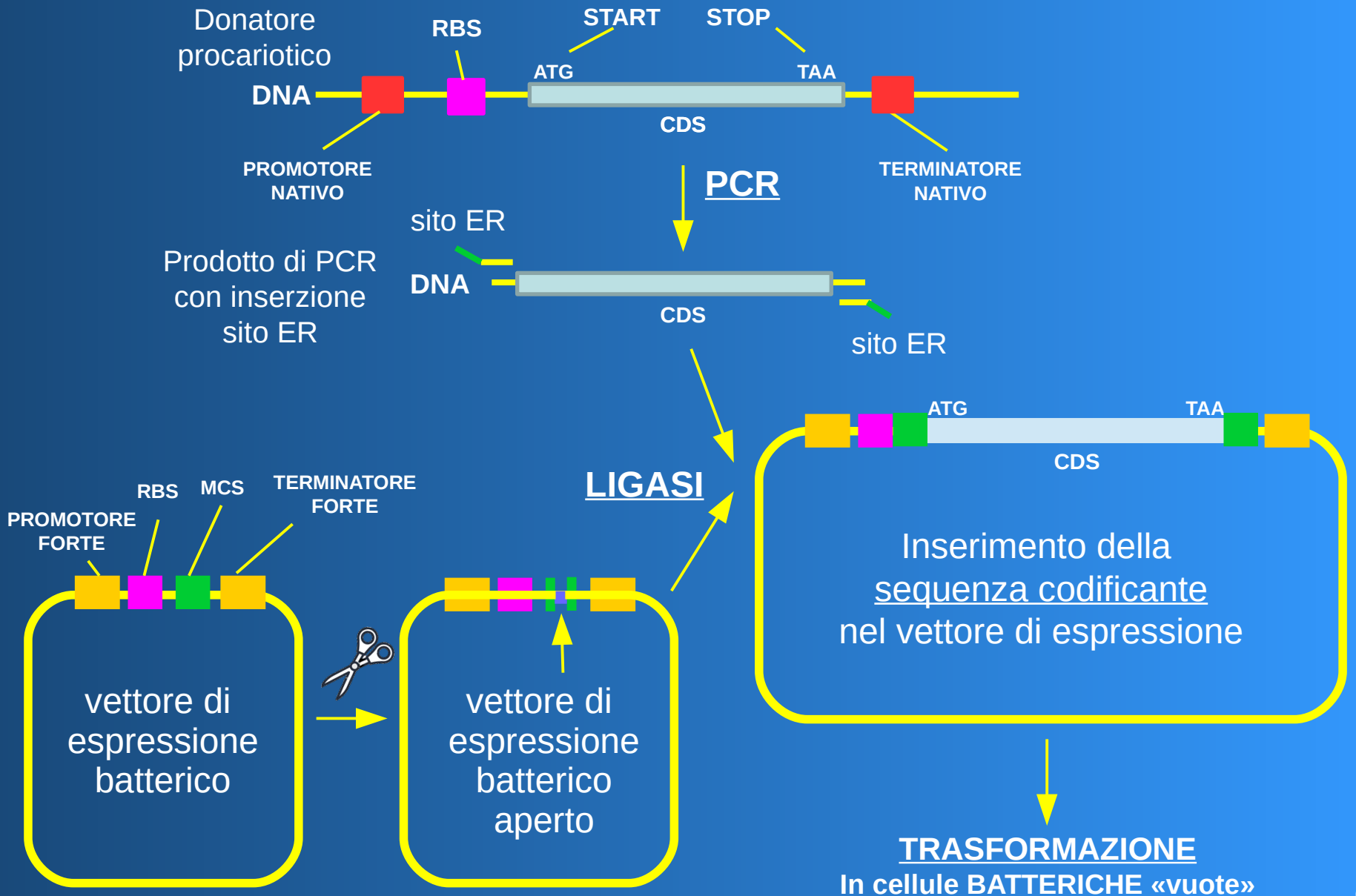
Ori: origine di replicaizione

Rop: controlla il numero di copie

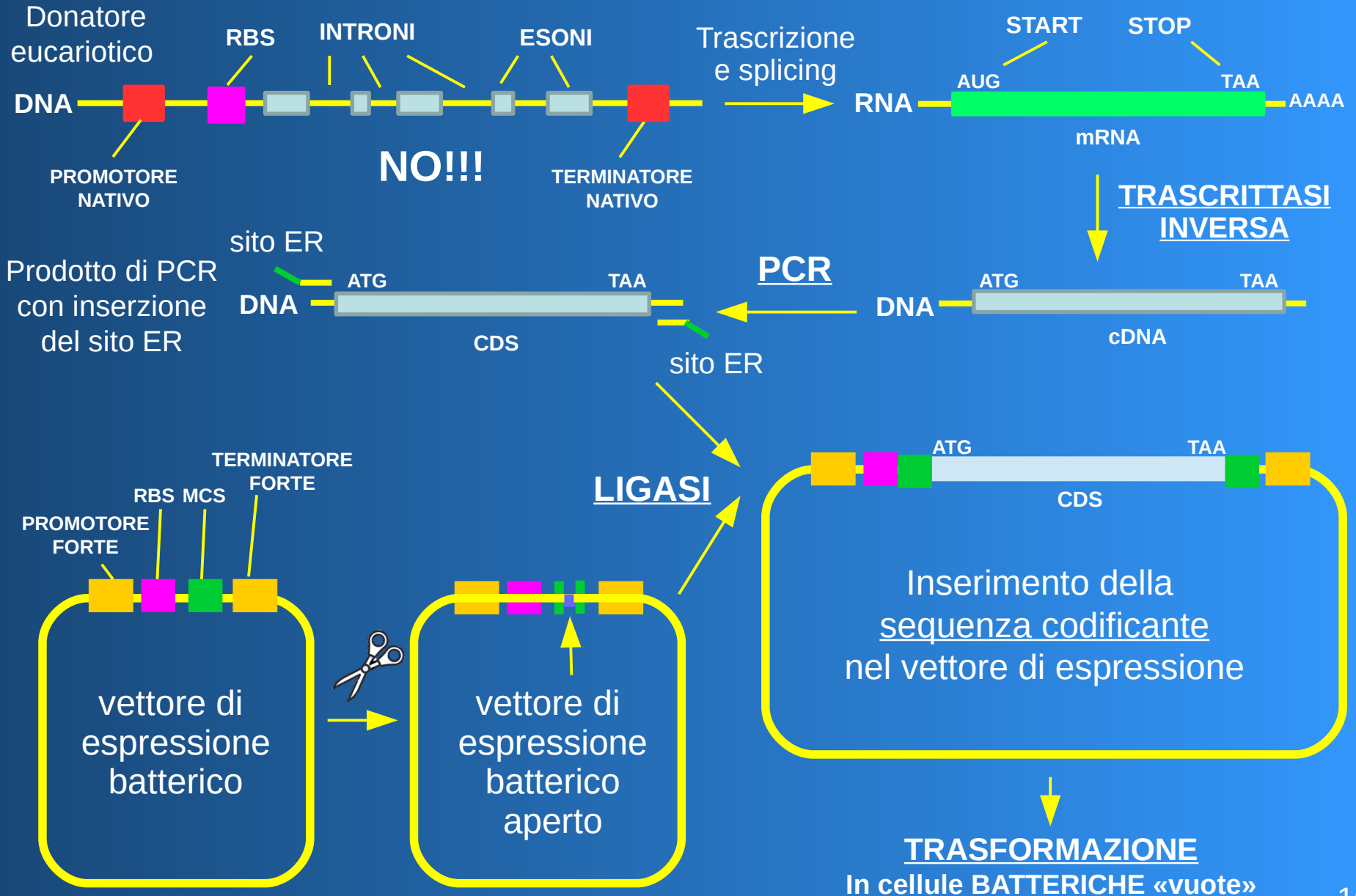
Clonaggio ed espressione



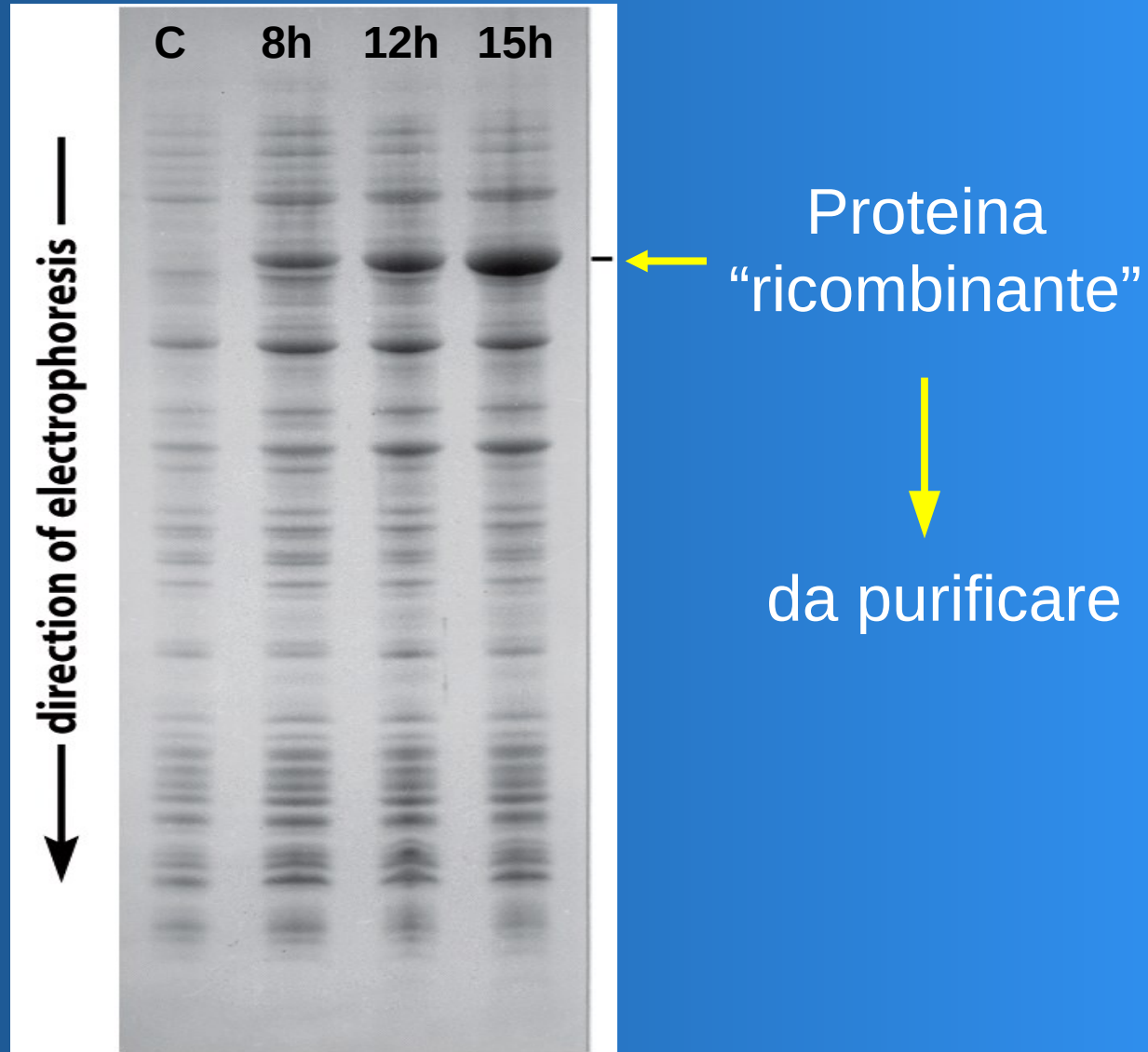
Clonaggio di geni batterici



Clonaggio di geni eucariotici



Elettroforesi di proteine: SDS PAGE



Proteine ricombinanti terapeutiche

PRIMA GENERAZIONE
(identiche a quelle naturali)

ORMONE DELLA CRESCITA

INSULINA

ERITPOIETINA

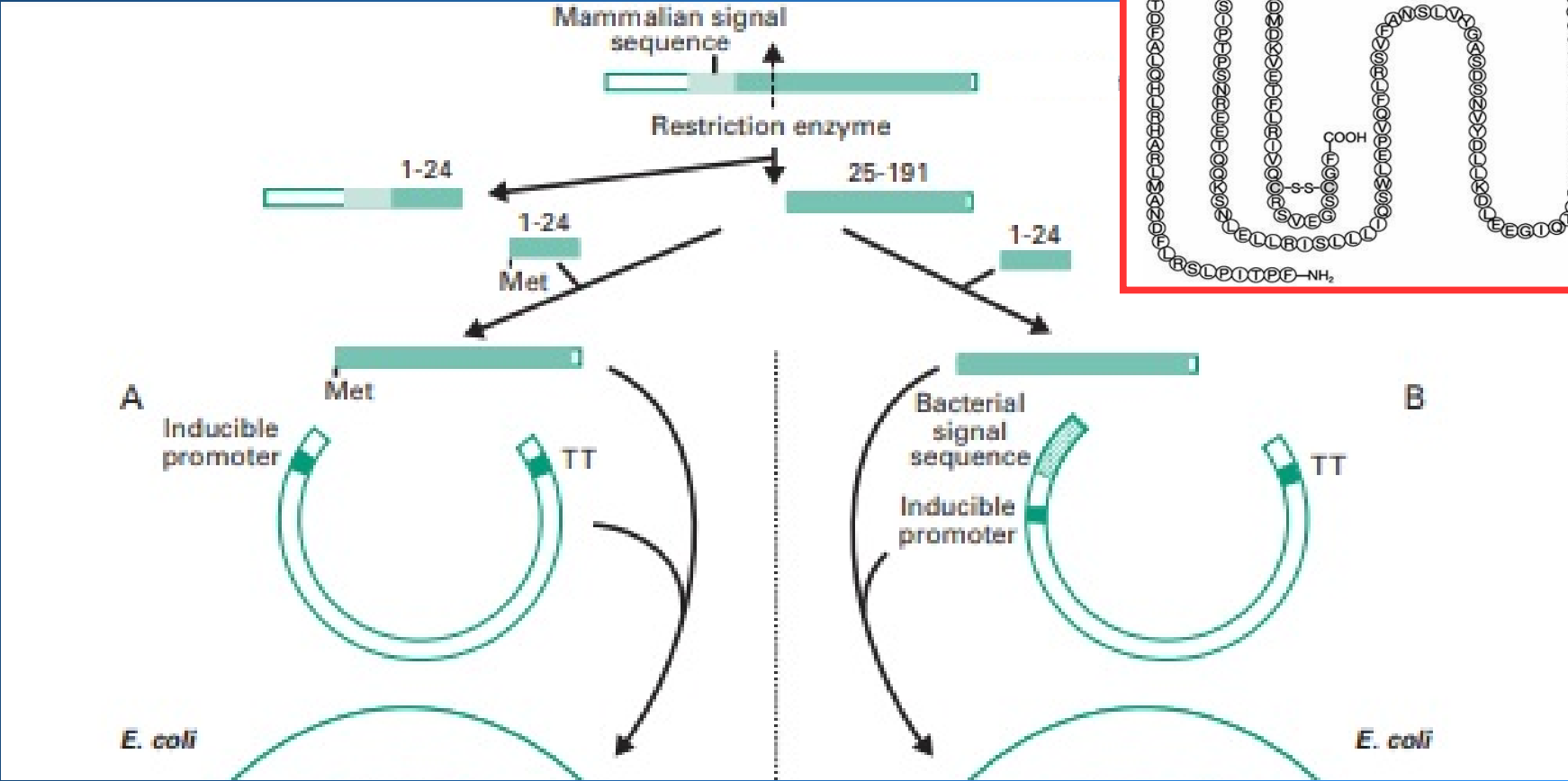
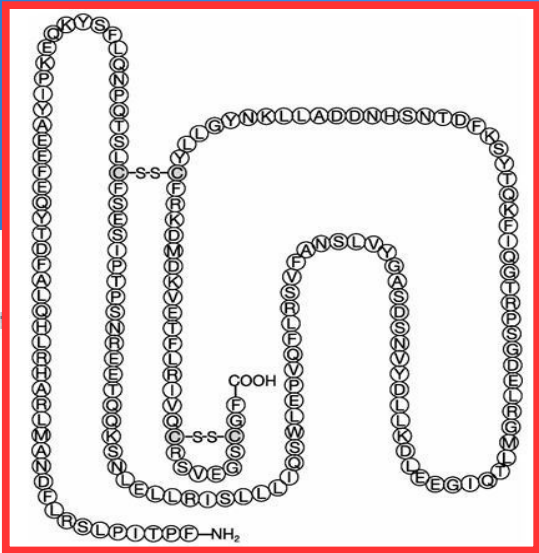
G-CSF

FATTORI ANTIEMOFILICI

VACCINI RICOMBINANTI

Ormone della crescita umano (hGH)

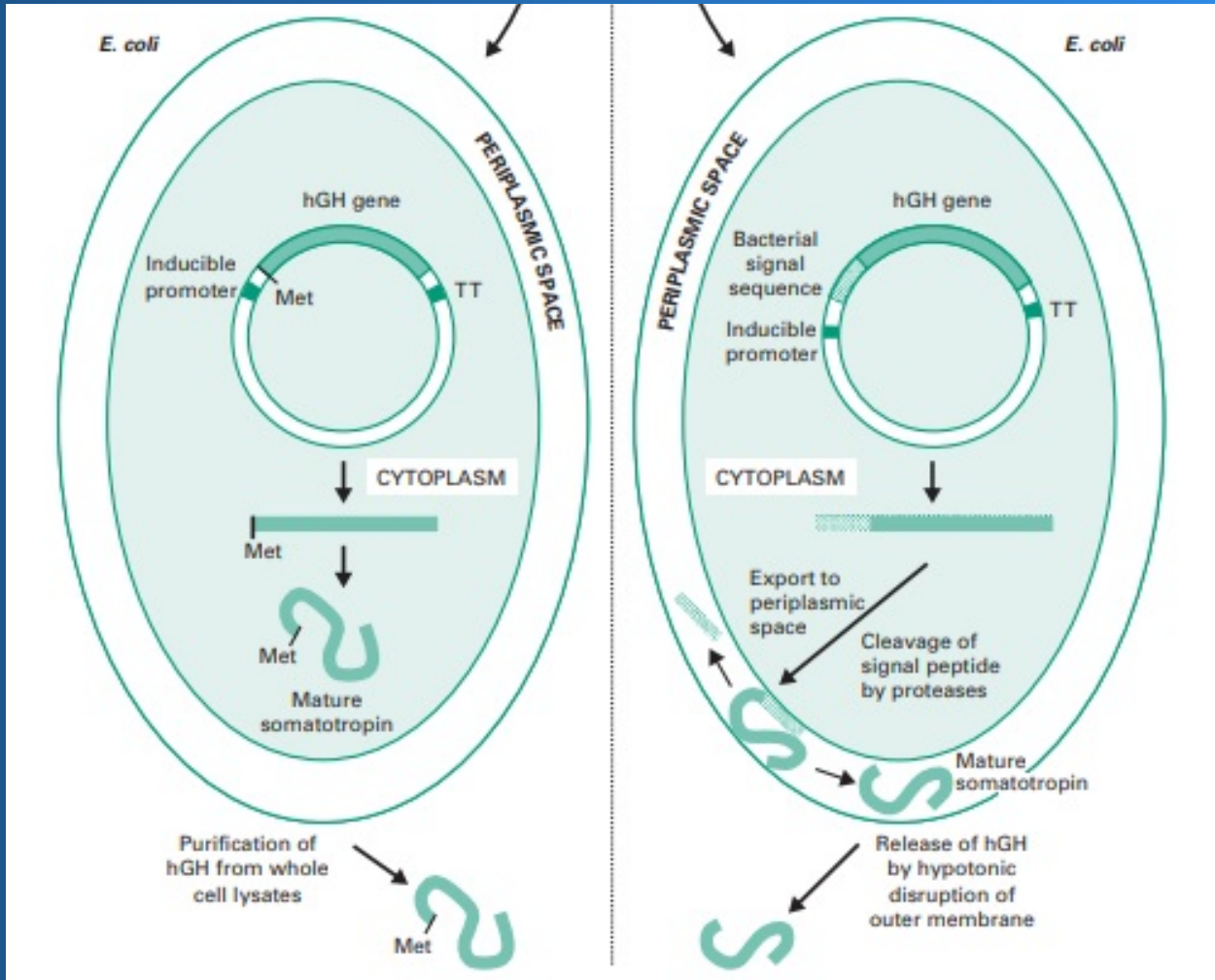
Target →



Ormone della crescita umano (hGH)

Produzione
citoplasmatica

Esportazione
periplasmatica

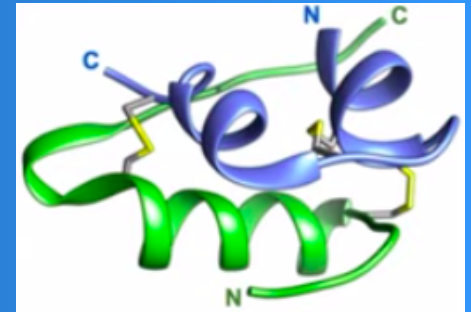
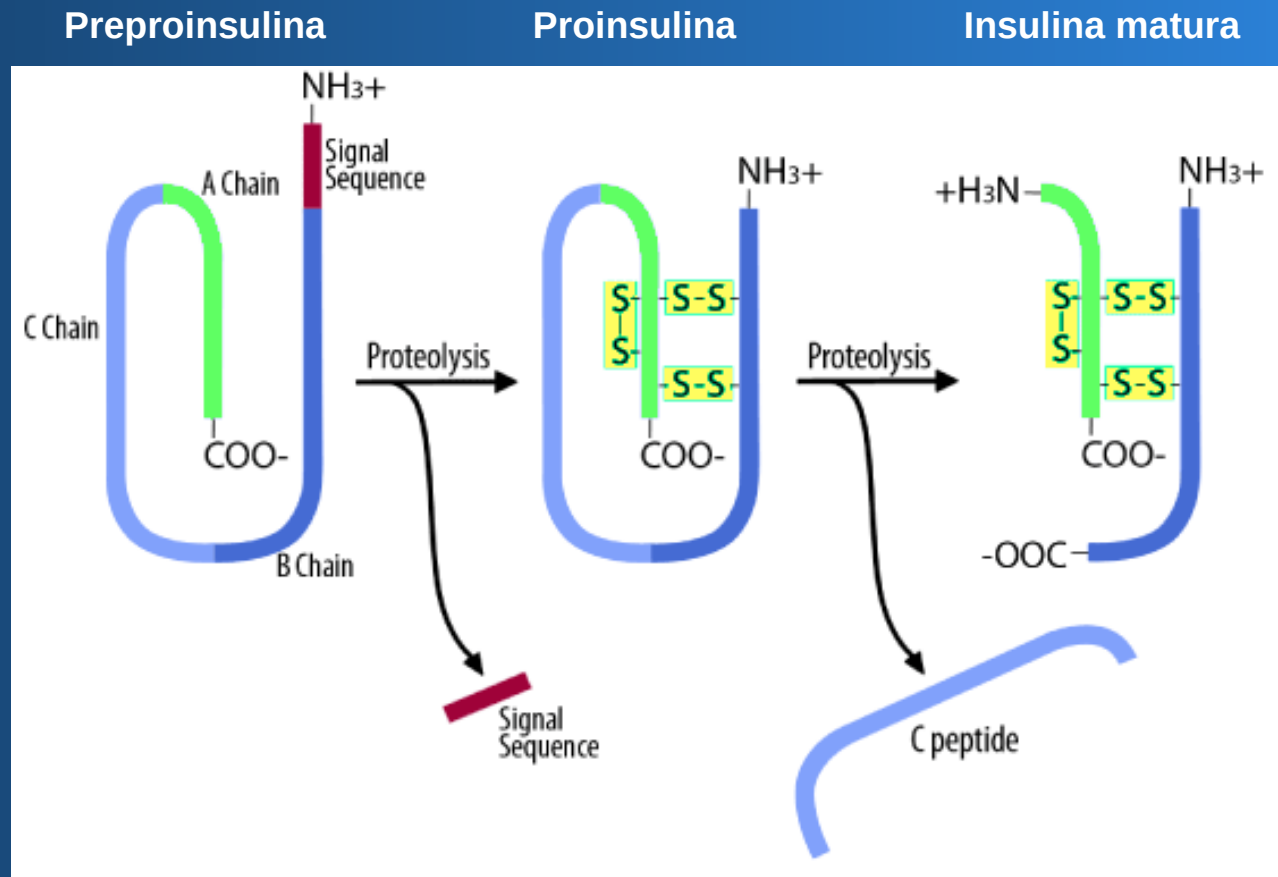


LISI MECCANICA +
PURIFICAZIONE

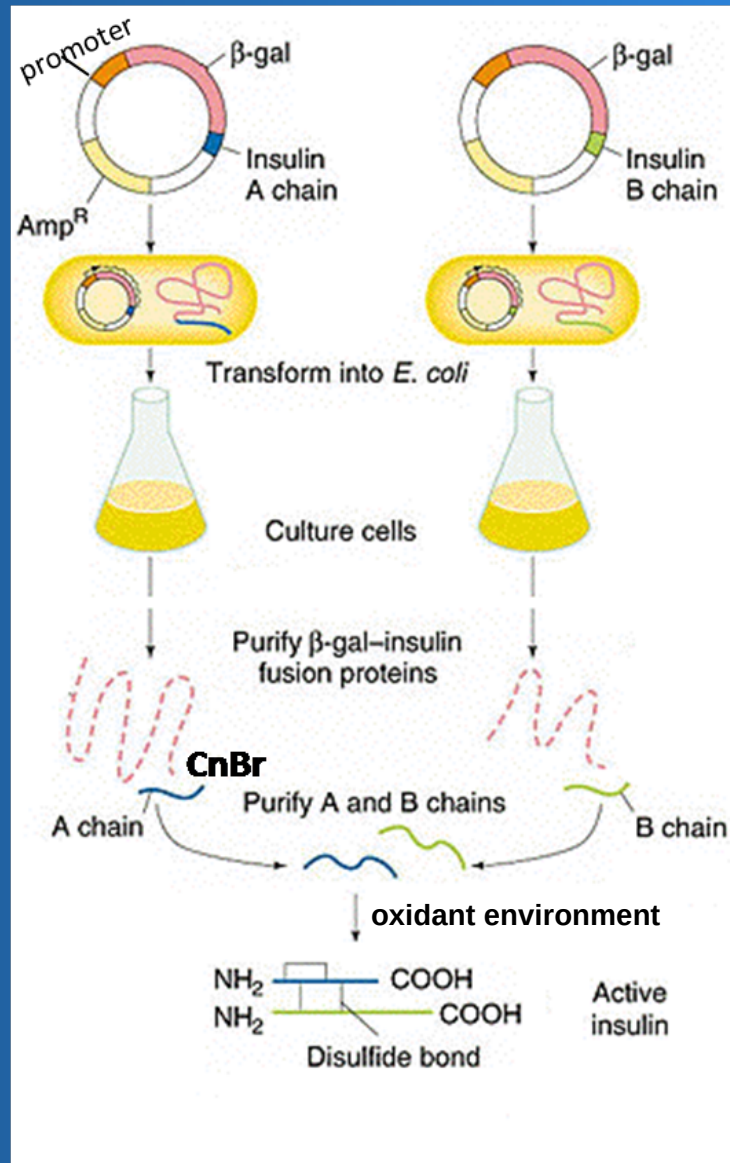
LISI OSMOTICA +
PURIFICAZIONE

Insulina umana ricombinante

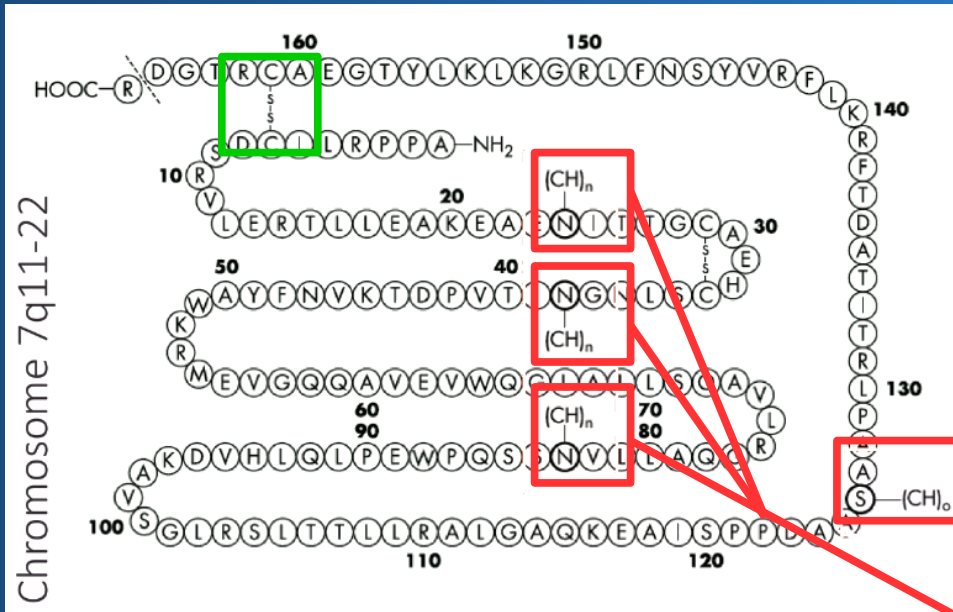
La pre-proinsulina viene prodotta e secreta dal pancreas come unica catena che viene maturata mediante due tagli proteolitici liberandosi del peptide segnale (RER) e del peptide C (protettore dei vasi arteriosi)



Insulina umana ricombinante



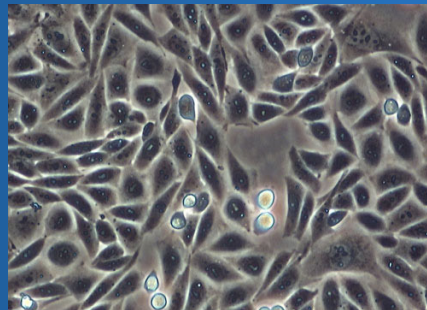
Biotecnologie e doping sportivo



ERITROPOIETINA (EPO)

Ormone proteico, stimola la eritropoiesi, provoca aumento dei globuli rossi e migliora l'efficienza nell'ossigenazione dei muscoli sotto sforzo

Prodotto biotecnologicamente come ormone naturale



**Chinese Hamster Ovary (CHO)
Cells Expression system**

La presenza di **glicosilazioni**
COSTRINGE

la sua produzione in cellule di mammifero CHO

Vaccino HBV (epatite B): questione di folding

Proteina S (HBsAg)
del capsid
utilizzata come vaccino

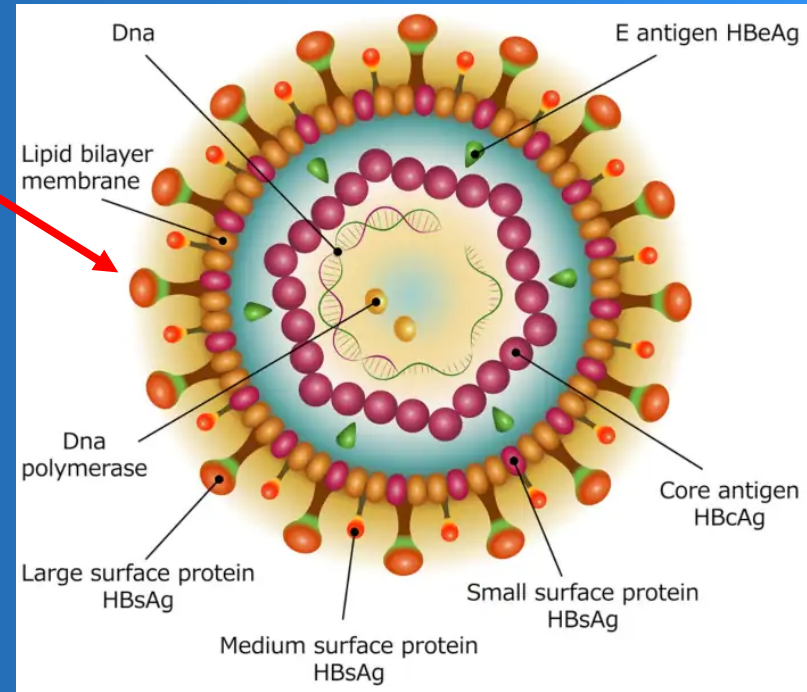
Virus non coltivabile => ricombinante

Se espressa in E.coli
il folding
risulta diverso da quello nativo.

▼
La risposta immunitaria non è
protettiva

Se espressa in lievito
il folding è corretto.

▼
E' utilizzata come vaccino



Hepatitis B surface AntiGen

Recombivax HB
Engerix-B
Heplisav-B



Vaccino contro il meningococco

Il meningococco (*Neisseria meningitidis*) è un diplococco Gram-negativo che causa la meningite. il genoma (2.3 Mb) è stato sequenziato nel 2000.

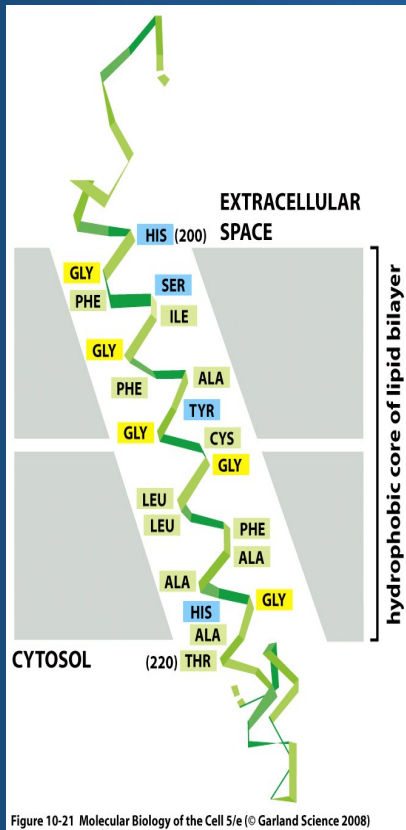


Figure 10-21 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Sequenza di arresto:
~ 20 aminoacidi
per lo più Idrofobici
che formano una alfa-elica

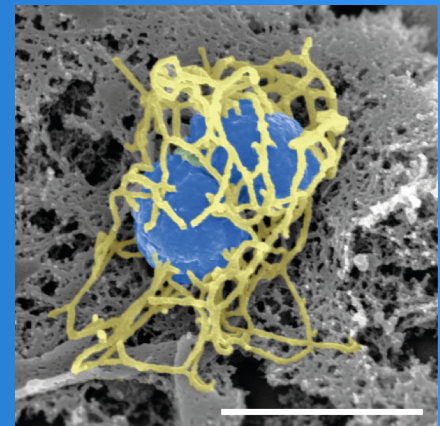
Genome
↓
Reverse Vaccinology

~ 2150 ORF

bioinformatica

~ 600 proteine
di membrana
o secrete

TUTTE clonate
ed espresse in batteri



<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10710307/>

Vaccino contro il meningococco

Aminoacidi
Idrofobici
dell'alfa-elica

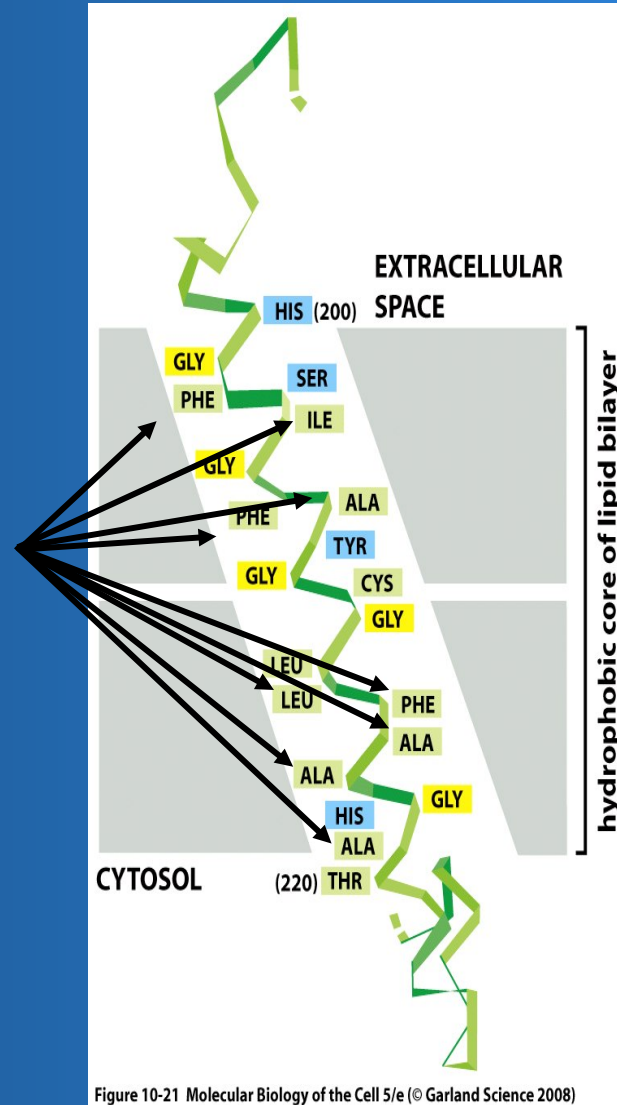
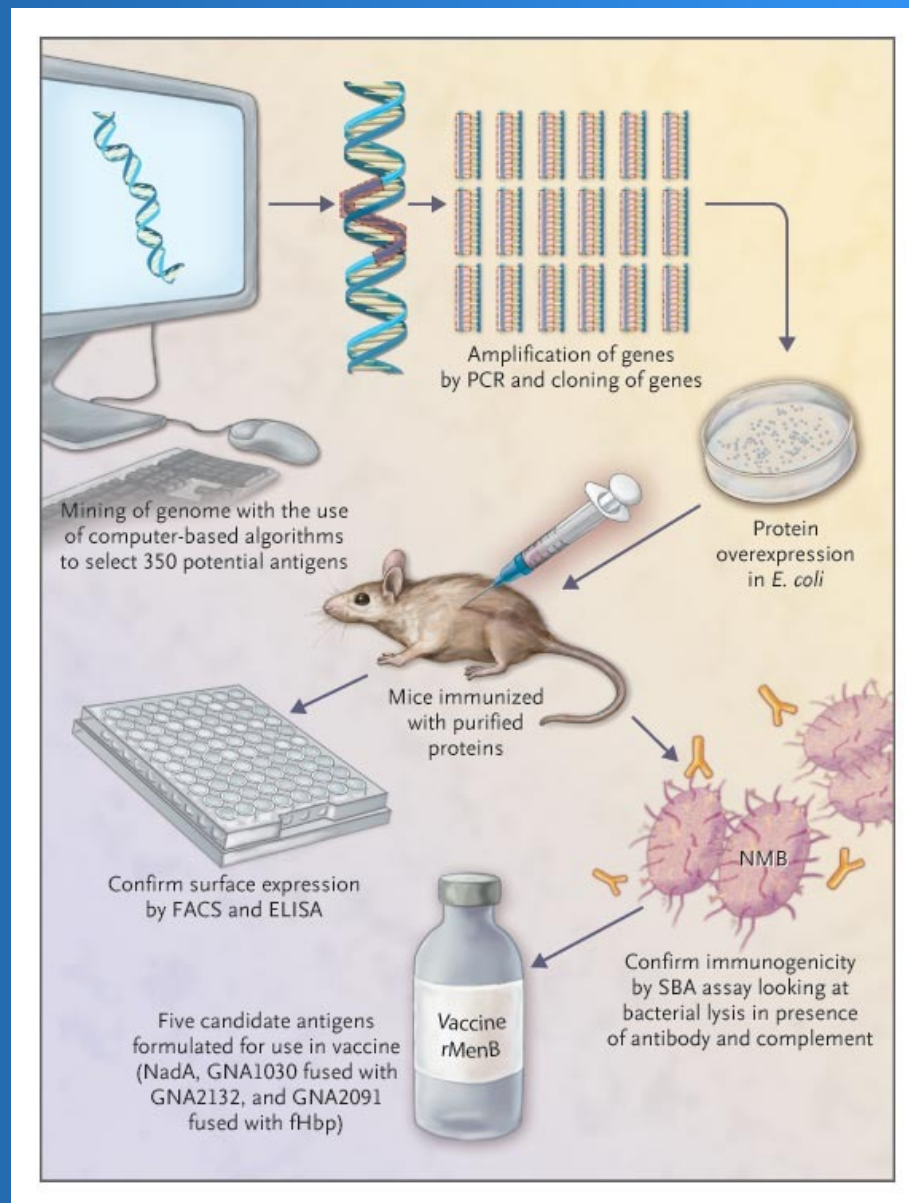
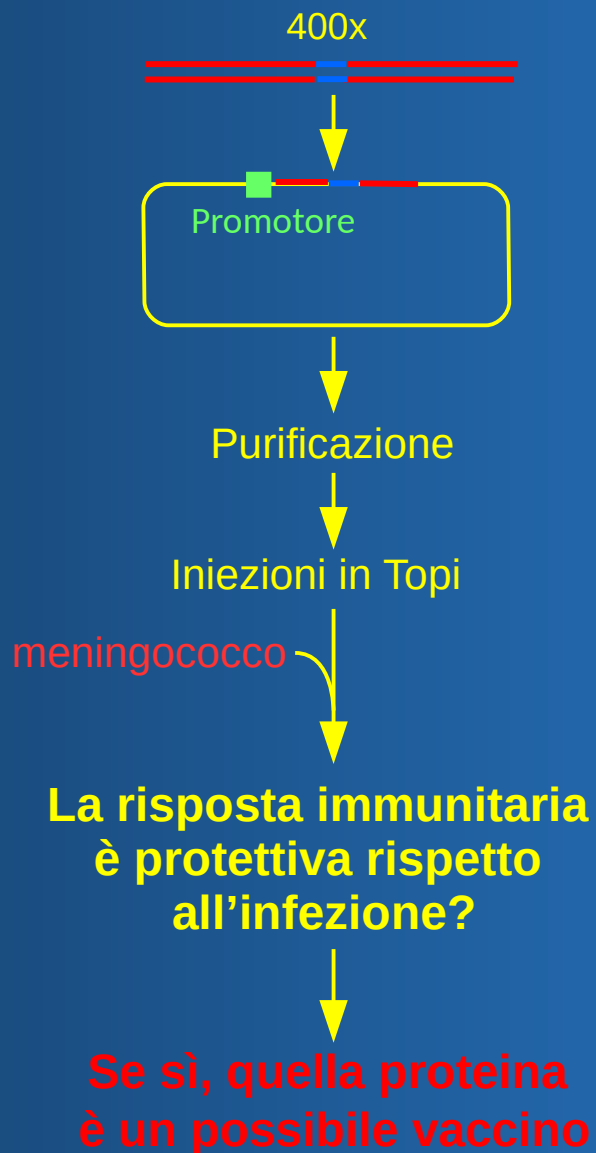


Figure 10-21 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Vaccino contro il meningococco



SECONDA GENERAZIONE
(proteine modificate
mediante mutagenesi "in vitro")

VACCINI RICOMBINANTI

tPA

INSULINA

ANTICORPI

Mutagenesi oligonucleotide-diretta

Sostituire uno (o pochi) nucleotidi
nella sequenza codificante per una
proteina

ESEMPIO:

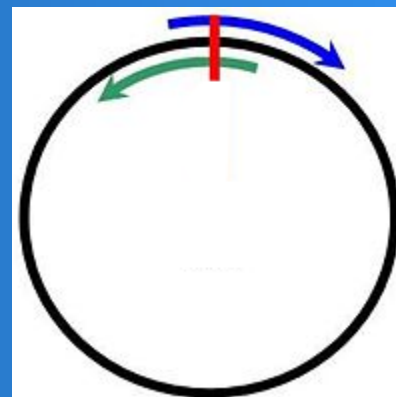
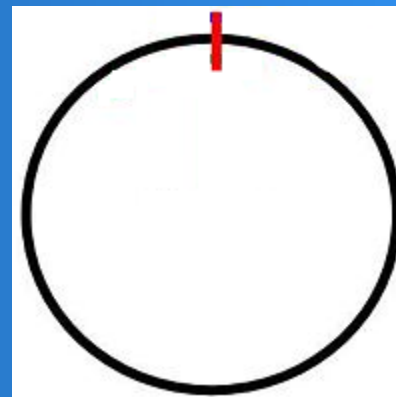
In un codone **TGC**

(codificante per CISTEINA)

viene sostituita la **T** con la **G**,

trasformandolo nel codone **GGC**

che codifica per GLICINA



ORIGINALE

5' - GAATGAT**GC**AGGATTGATCTATGG - 3'

PRIMER FWD

5' - GAATGAG**GC**AGGATTGATCTATGG - 3'

PRIMER REV

3' GACCCGATGCTTACT**CCG**TCCTA - 5'

Mutagenesi: diabete

L'insulina è un ormone di natura proteica prodotto nel pancreas. Facilita il passaggio del glucosio dal sangue alle cellule ed ha pertanto azione ipoglicemizzante. Viene utilizzata nella gestione del paziente diabetico.

assorbimento rapido

Lispro: inversione di Lisina B28 e Prolina B29

Aspart: mutazione di Prolina B28 in Aspartato

- maggiore solubilità
- minore formazione di polimeri
- rapido assorbimento



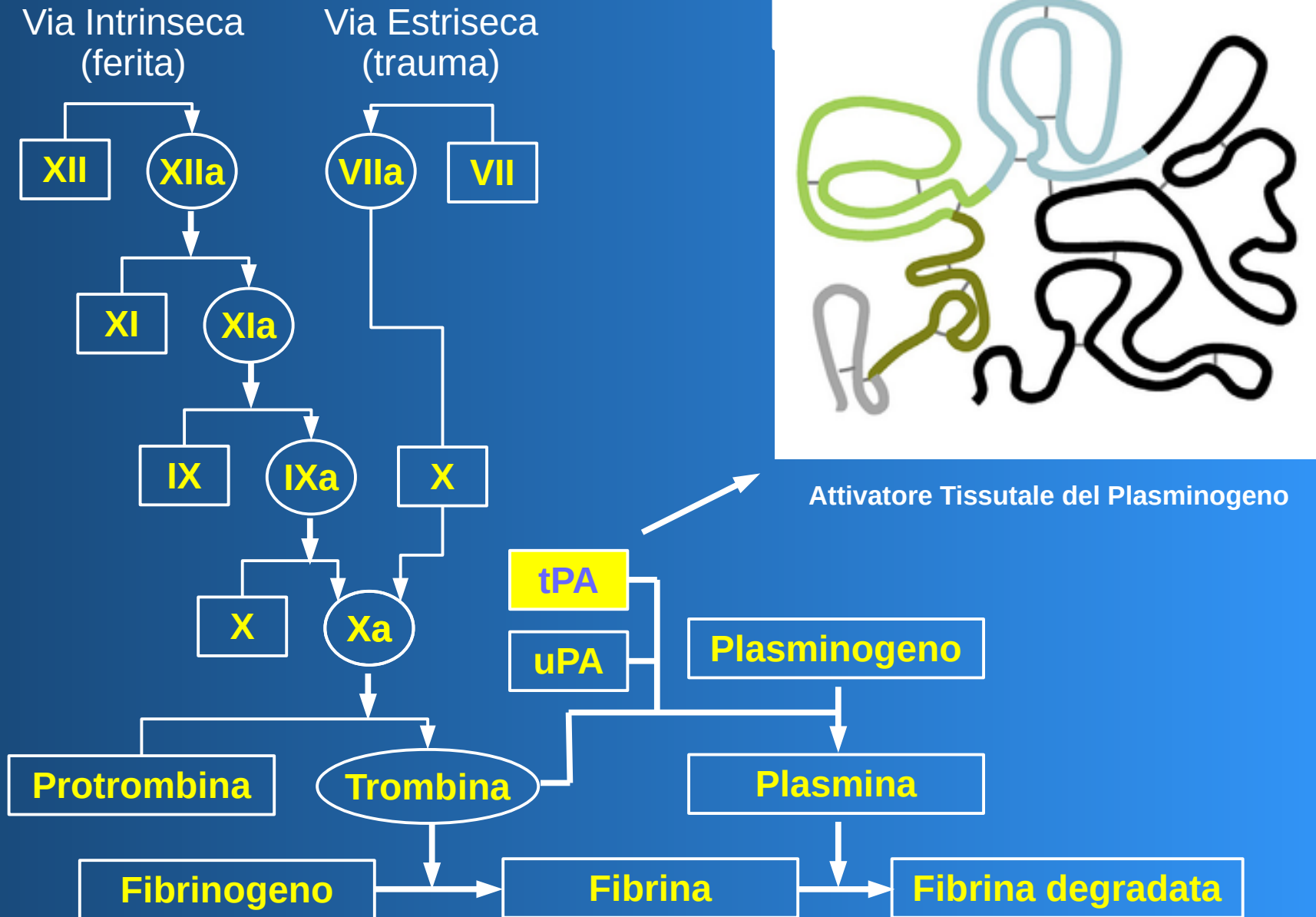
Detemir: delezione di treonina B30
miristilazione di lisina B29

- di-esamerizzazione,
- precipitazione
- rilascio graduale

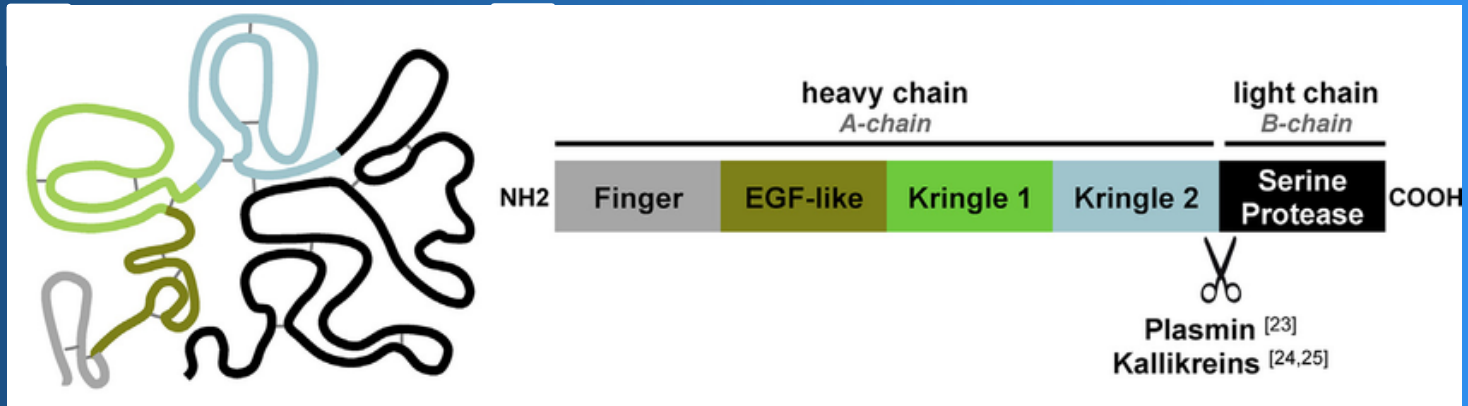
assorbimento lento



Mutagenesi: coagulazione



Mutagenesi: coagulazione



Finger

- Binding to fibrin [13]
- Interaction with membrane receptors: LRP, Annexin II [14,15]

EGF-like

- Activation of EGF receptor [16]

Kringle 1

- Mannose receptors mediated uptake/clearance by liver endothelial cells [17]

Kringle 2

- Binding/activation of plasminogen, PDGF-CC, NMDA receptor [18-20]

Serine
Protease

- Proteolytic activity *via* its catalytic triad (His³²², Asp³⁷¹, Ser⁴⁷⁸) [10,21]

tPA ricombinante

- Thr103Asn: aumenta di 10 volte la stabilità nel siero
- Lys-His-Arg-Arg296Ala-Ala-Ala-Ala : maggiore affinità per i coaguli di fibrina

Alteplase **tPA normale umano** **(hrtPA)**

Approvato per infarto, ictus e embolia
Prodotto in cellule animali in coltura

Tenecteplase **tPA umano con due modificazioni** **aminoacidiche.**

Approvato per infarto.
Maggiore affinità per la fibrina.
Prodotto in cellule animali in coltura

Retepase **tPA umano non glicosilato** **e più corto**

Approvato per infarto.
Emivita incrementata
Prodotta in E. coli

Desmopase **tPA della saliva dei** **pipistrelli vampiri**

Approvato per ictus.
Emivita doppia nel sangue
Prodotto in cellule animali in coltura

Mutagenesi: vaccino per la pertosse

Produzione di tossine batteriche modificate,
da parte dello stesso ceppo patogeno, dopo
mutazione genetica

Vaccino Antipertosse

- Mediante la tecnica del DNA ricombinante è stato ottenuto un ceppo di Bordetella Pertussis capace di produrre una tossina della pertosse del tutto identica, antigenicamente, a quella del ceppo patogeno, ma assolutamente priva di tossicità.
- La tossina mutata, prodotta in laboratorio su larga scala, viene purificata e impiegata come vaccino

ADP-ribosilasi

Tossina attiva

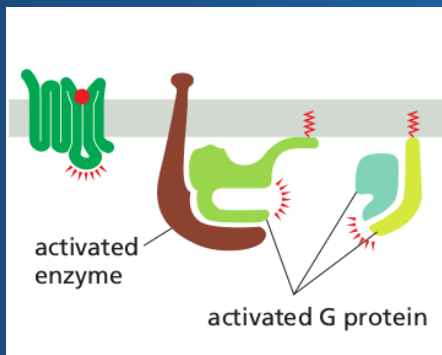
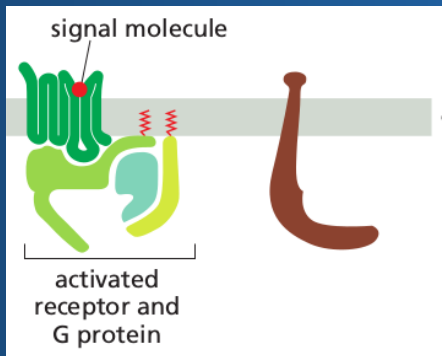
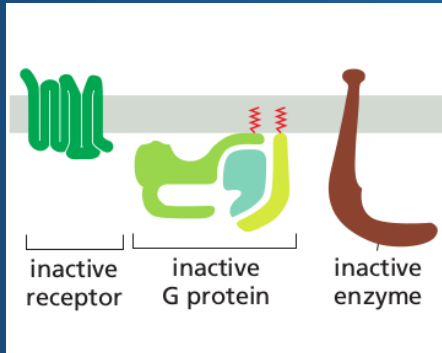


Enzima inattivo

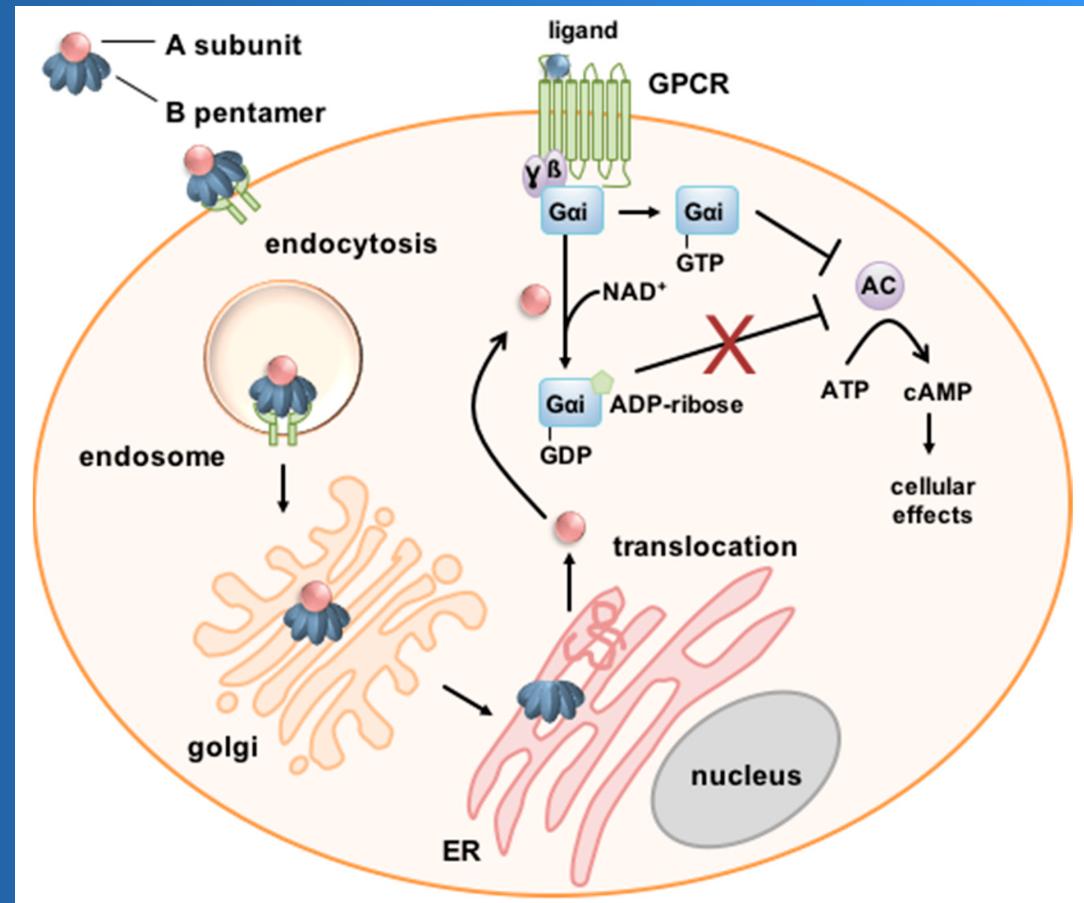
Proteina non tossica

Mutagenesi: vaccino per la pertosse

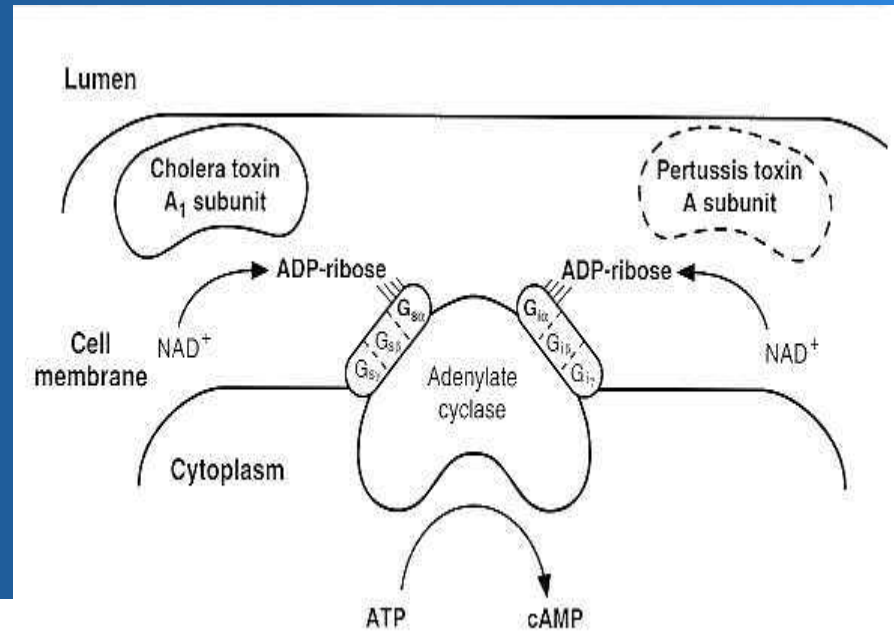
Segnalazione dei recettori a proteine G trimeriche



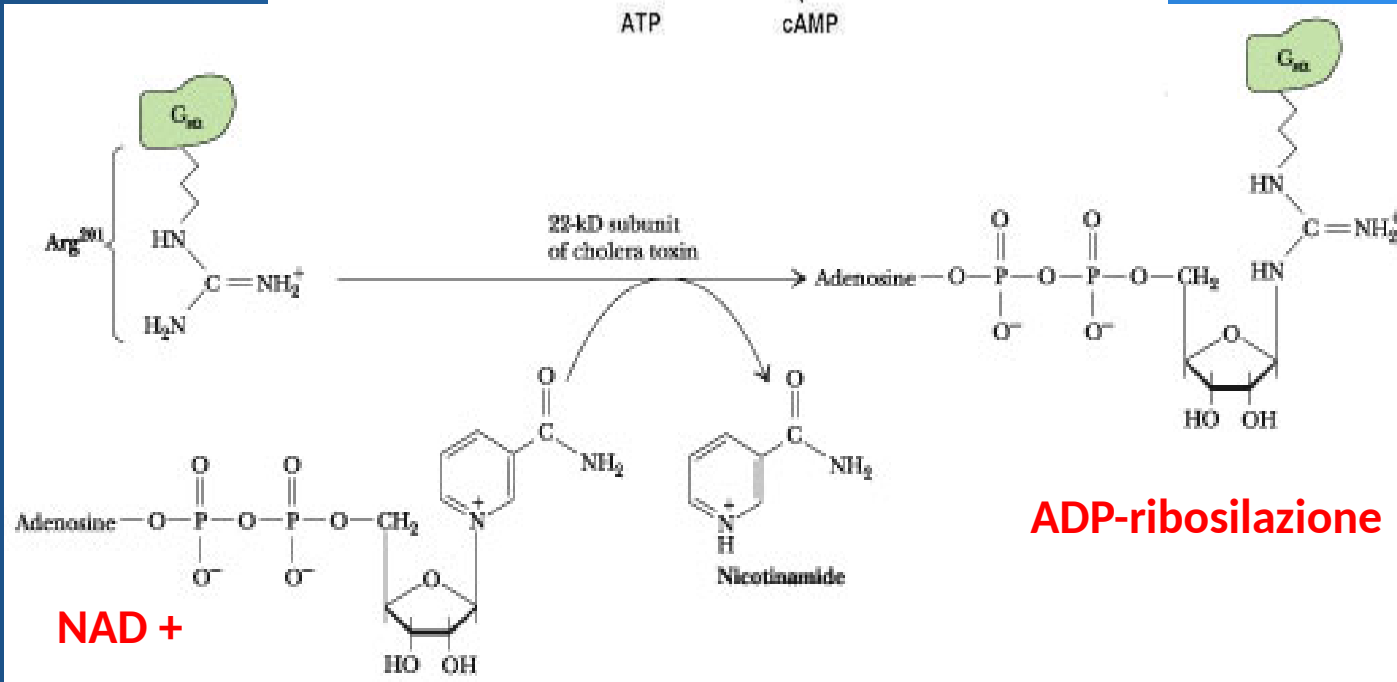
Bordetella pertussis è un coccobacillo Gram-negativo aerobio obbligato. Lega le cellule epiteliali ciliate delle vie respiratorie esacerbando la secrezione di muco e provocando crisi di tosse. La chiave è una iperattivazione della adenilato ciclasi causata dalla mancata inibizione da parte di proteine G inibitrici a causa dell'azione della subunità A della tossina.



Mutagenesi: vaccino per la pertosse



Tossicità mediata da ADP-ribosilazione di proteine G



Mutagenesi: vaccino per la pertosse

Clonaggio della tossina da Bordetella



Mutagenesi e studio di funzione



Identificati AA determinanti funzionali



Gene mutato inattivo ricostruito



Sostituzione del gene in Bordetella



Purificazione della proteina mutata

Immunobiology Research Institute Siena, Siena, Italy

Received 3 June 1992
Accepted 10 June 1992

We have used recombinant DNA technologies to clone the pertussis toxin gene, express it in bacteria, map the B and T cell epitopes of the molecule, and to identify the amino acids that are important for enzymatic activity and toxicity. Finally, we have used this information to mutate the gene in the chromosome of *Bordetella pertussis* in order to obtain a strain that produces a molecule that is already non-toxic.



Difterite

Tetano

Pertosse

Proteine ricombinanti

Proteine prodotte in

- ✓ Batteri
- ✓ Lieviti
- ✓ Cellule animali



- ✓ Vantaggi
- ✓ Proteine altamente purificate
- ✓ Quantità virtualmente illimitate
- ✓ Economia
- ✓ Sicurezza



Proteine ricombinanti

Possibili difficoltà dell'espressione in batteri

La proteina **NON** mantiene la sua funzione perché:

- Il folding non è corretto

Produzione in lievito o in cellule animali

- La proteina necessita di modificazioni post-traduzionali

Produzione in cellule animali

Colture cellulari: derivazione

Cellule primarie

- numero di passaggi limitato
- fisiologia intatta

Cellule trasformate (immortalizzate, o linee cellulari)

- numero di passaggi elevato
- variazioni di espressione di oncogeni/oncosoppressori
- fisiologia alterata

Espianti tumorali

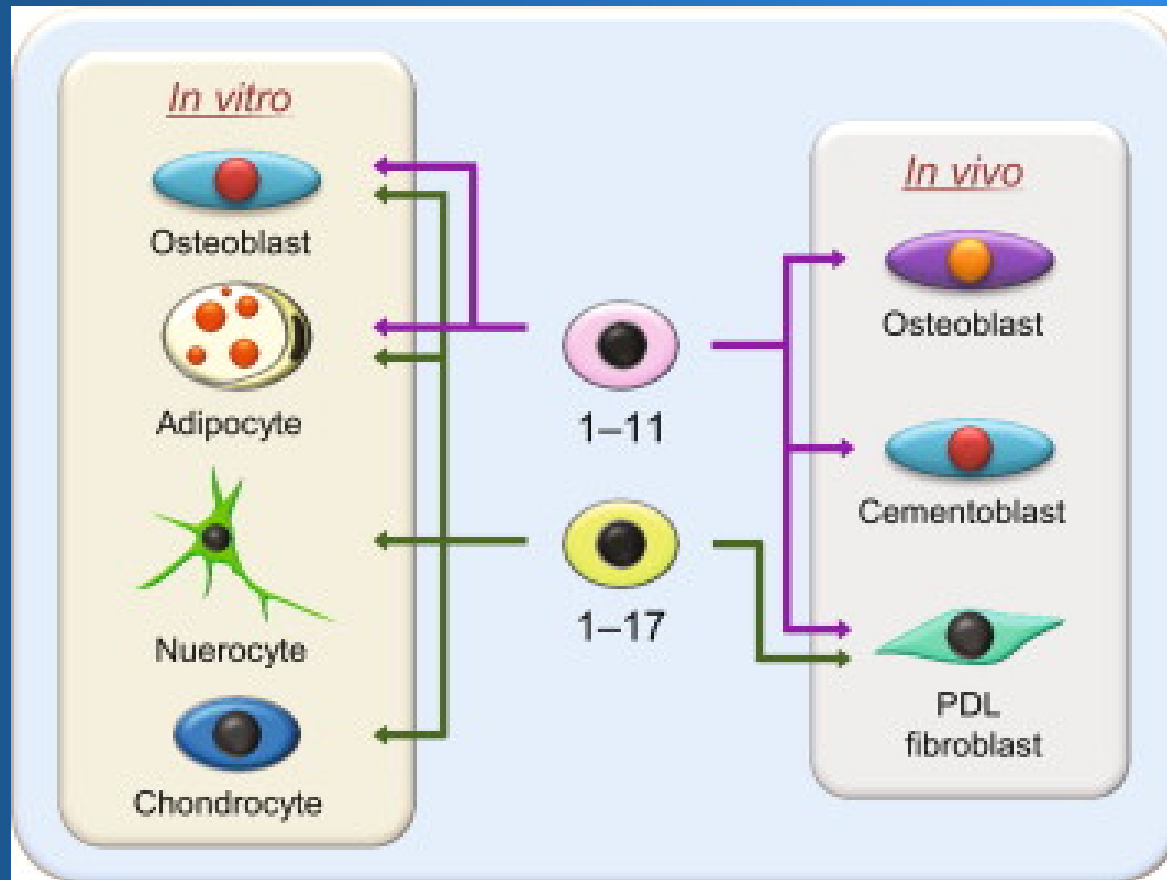
- numero di passaggi elevato
- fisiologia identica alla patologia dell'espianto



La American Type Culture Collection (ATCC) autentica l'**identità delle linee** utilizzando gli short tandem repeats (STR) che sono unici per ogni linea cellulare

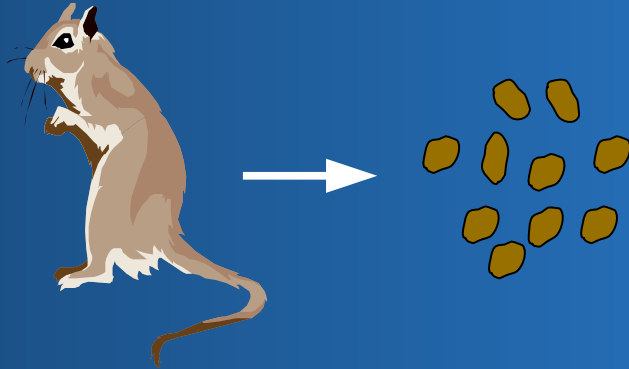
Linee cellulari: comportamento

La valenza di una linea cellulare coltivata può essere diversa da quella che aveva nel tessuto originale e una volta in coltura può essere indotta a formare tipi cellulari variabili



Linee cellulari: vantaggi

Propagazioni di cellule fuori dall' organismo



Due tipi di colture cellulari:

- **colture primarie**
- **linee cellulari**

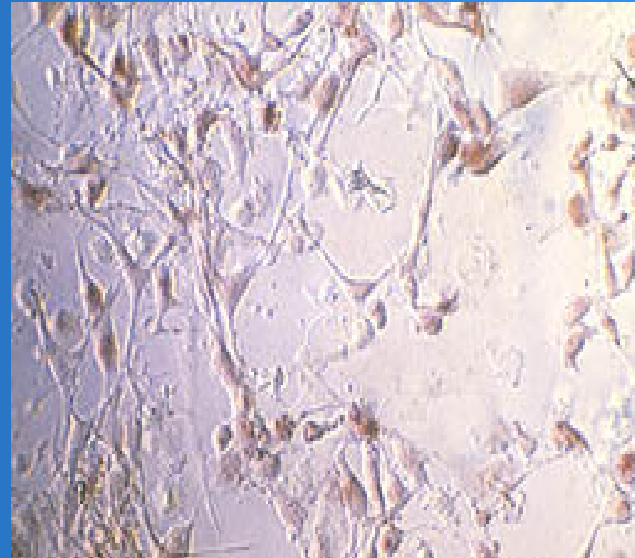
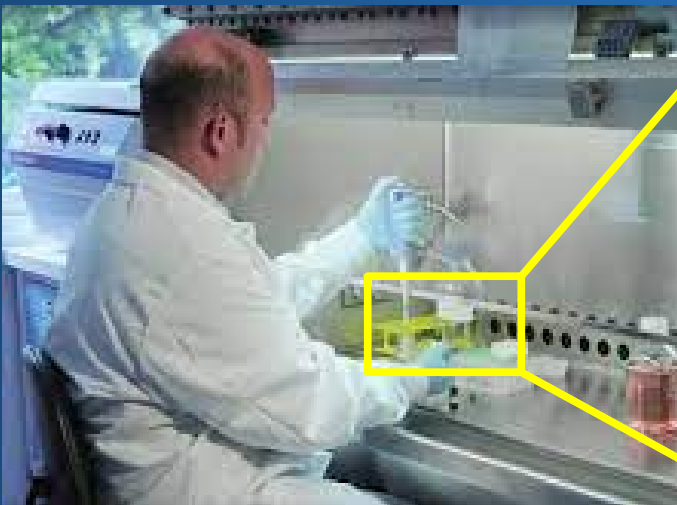
Vantaggi

- ✓ L'ambiente extracellulare puo' essere manipolato
- ✓ Uso di un tipo cellulare ben definito
- ✓ Grandi quantita' di cellule
- ✓ Studio di varie funzioni cellulari

Problemi

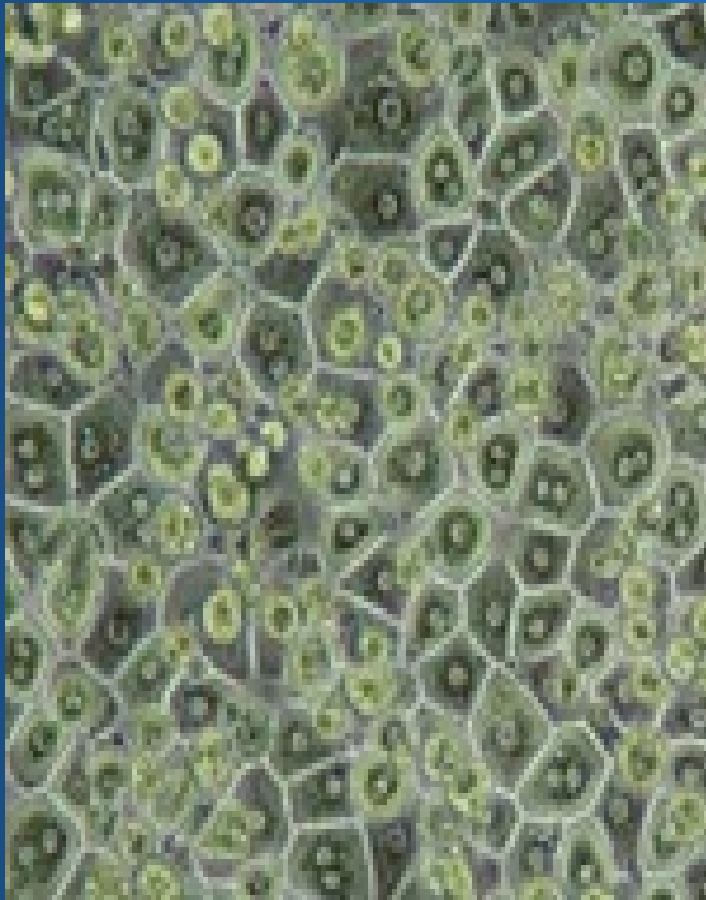
- ✓ Adesione su superficie
- ✓ Crescita 2D
- ✓ Numero di passaggi
- ✓ Diverso comportamento

Gestione delle colture cellulari

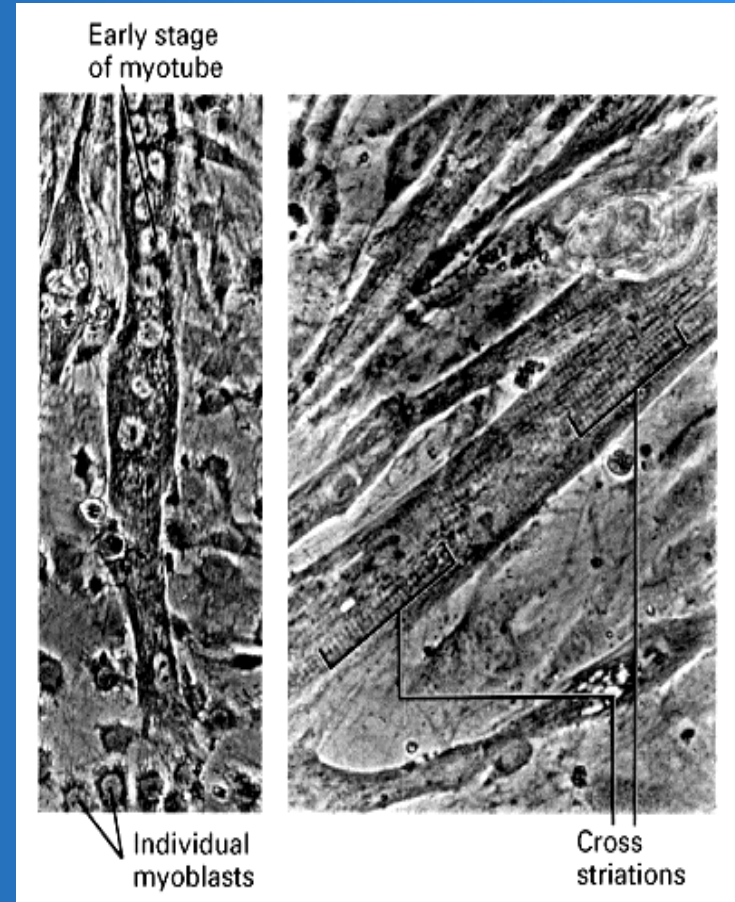


Mantenimento del fenotipo originale

**Cellule epatiche
HepG2 differenziate**

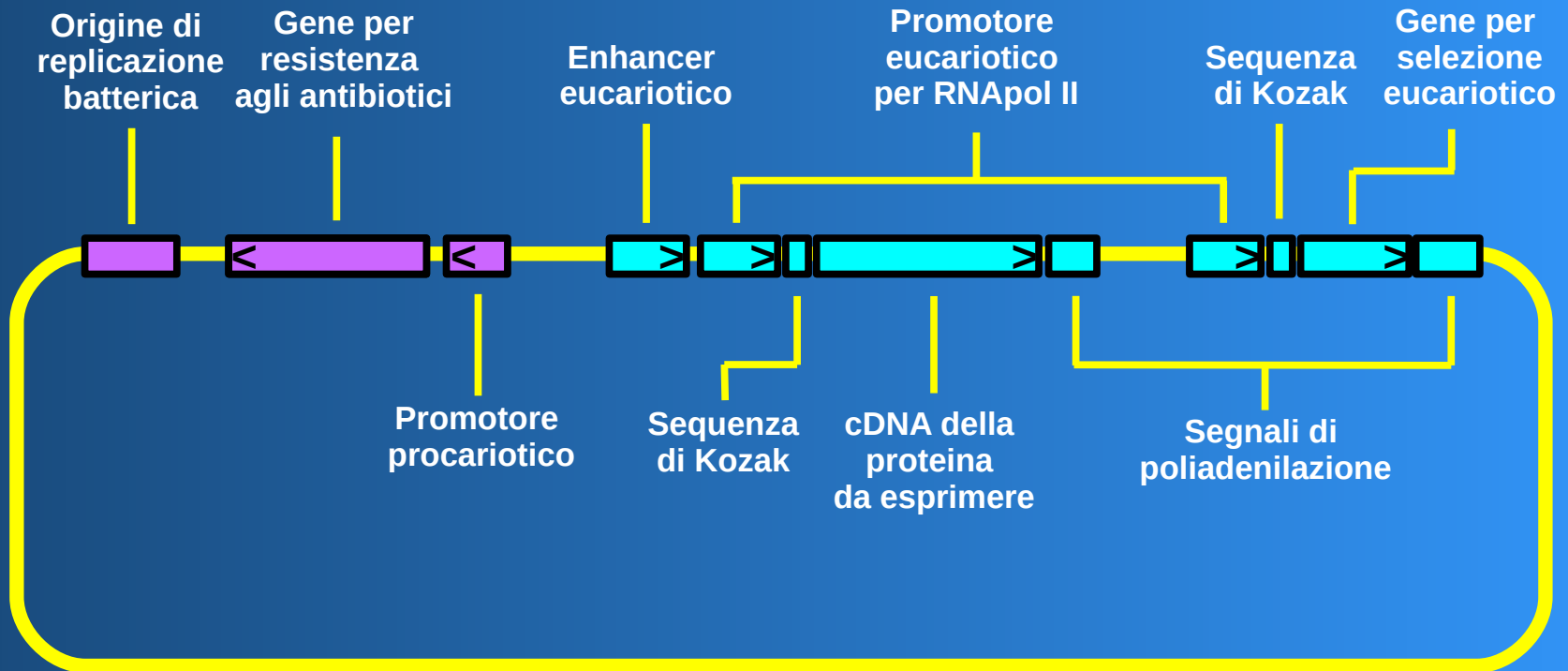


**Cellule muscolari
C2C12 differenziate**

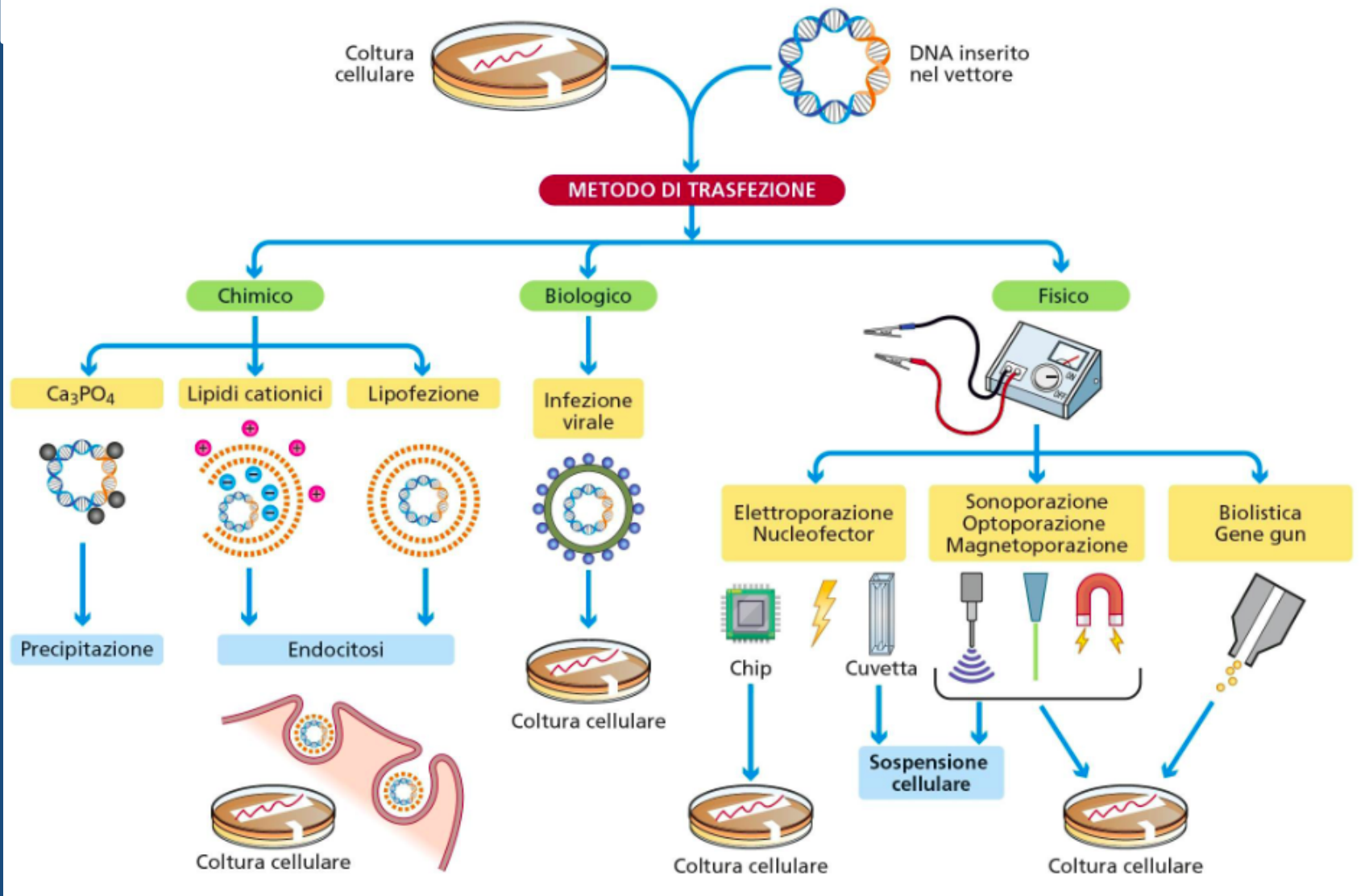


Vettore per ospiti eucariotici

Deve essere capace di duplicarsi in E.coli e di funzionare come un gene nel nucleo di cellule animali in coltura

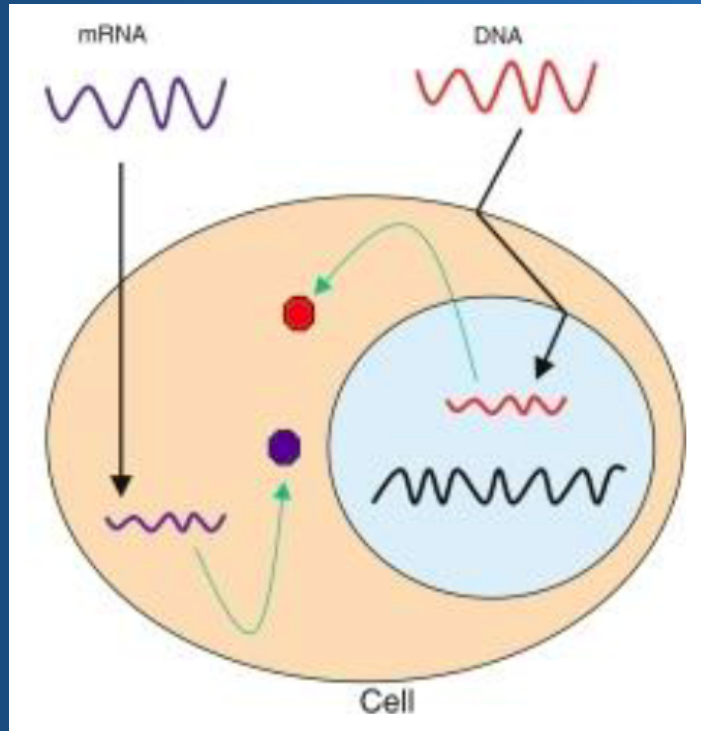


Trasfezione di vettori in eucarioti

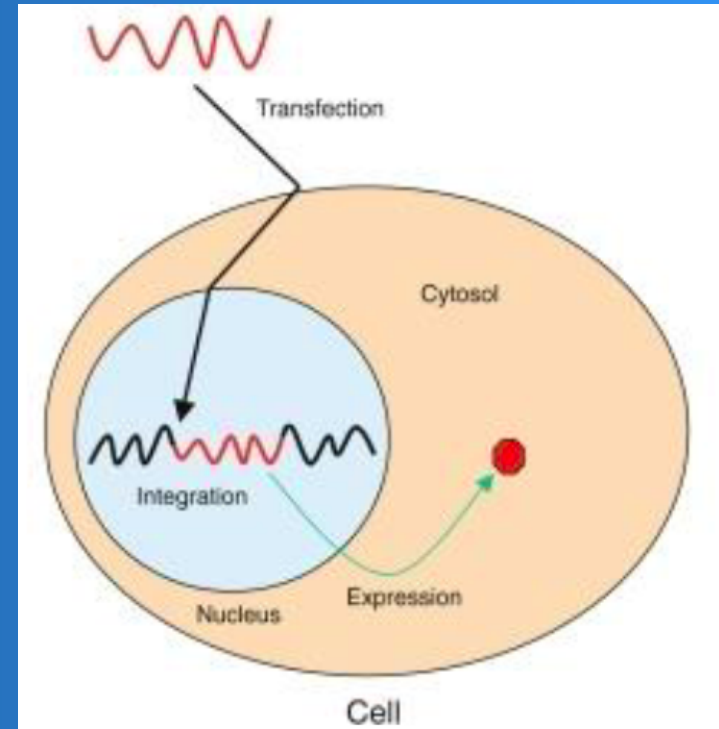


Trasfezione di vettori in eucarioti

Trasfezione transiente



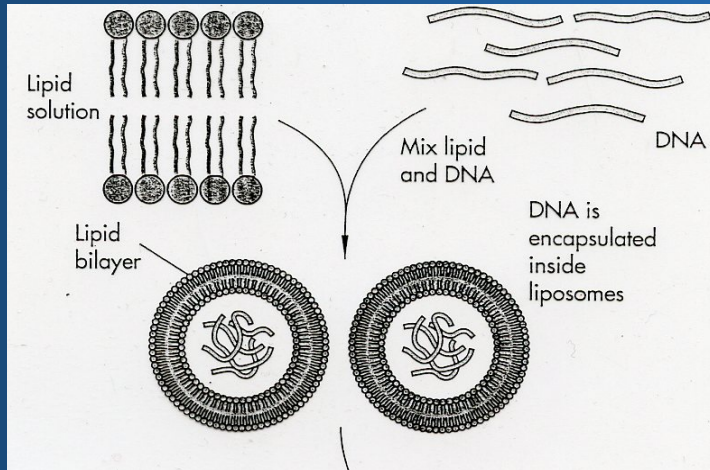
Trasfezione stabile



- Esperimenti a breve termine
- Over-espressione/silenziamento
- Popolazione disomogenea
- Il DNA non si duplica (diluizione)

- Esperimenti a lungo termine
- Plasmide integrato nel genoma
- Popolazione omogenea
- Server marker di selezione

Lipofezione



Liposomi
caricati con
i vettori di espressione

