

Lezione 3-4

Giovedì 11 Marzo 2010

corso Biologia applicata BU,
Ingegneria genetica BCM

clonaggio specializzato o olistico

poter avere tutto un genoma o tutto un trascrittoma
in una collezione di plasmidi ha aperto nuove possibilità

però cambiano i vettori

come?

da pBR322 a PUC ai cosmidi e fasmidi

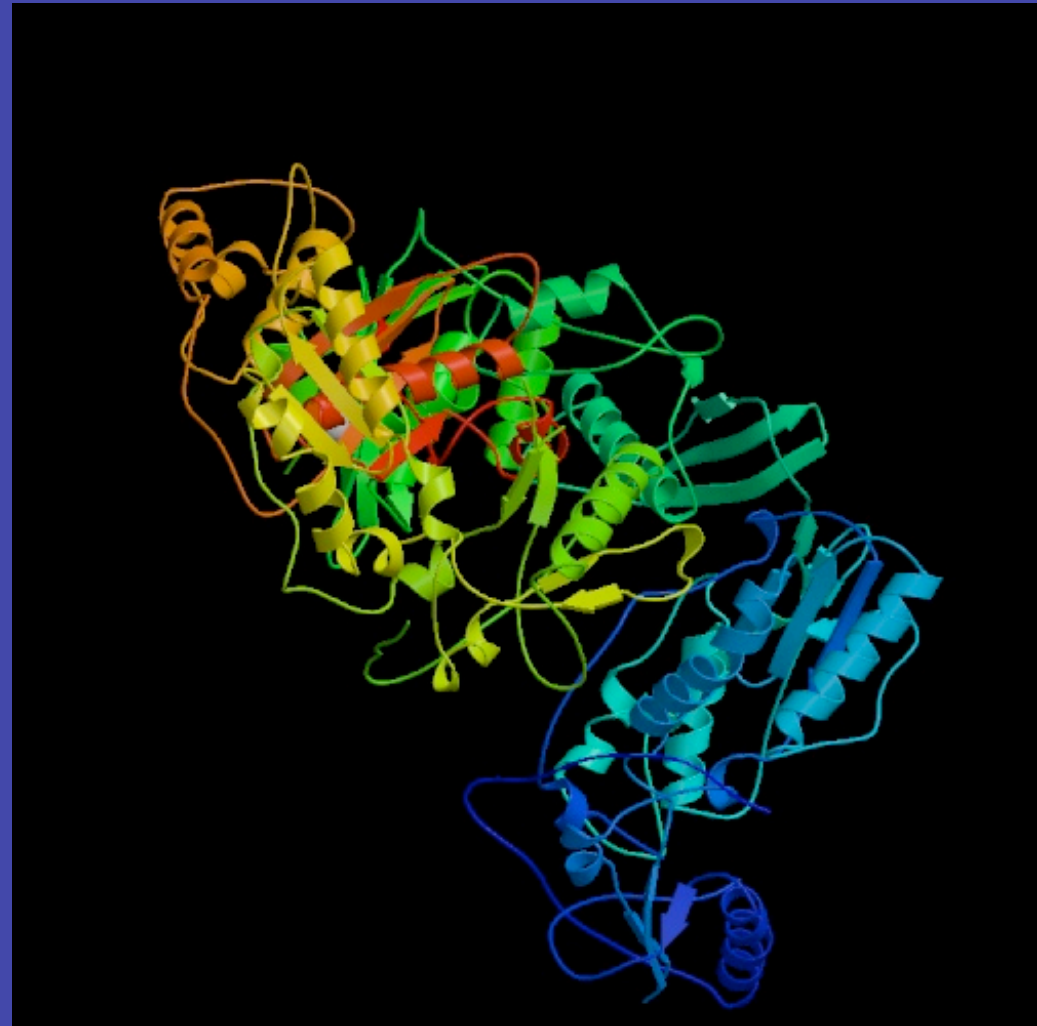
l'invenzione delle “libraries” genomiche e di cDNA

la reverse transcriptase

"Is function the mechanical result of form, or is form merely the manifestation of function or activity? What is the essence of life ----- organization or activity?"

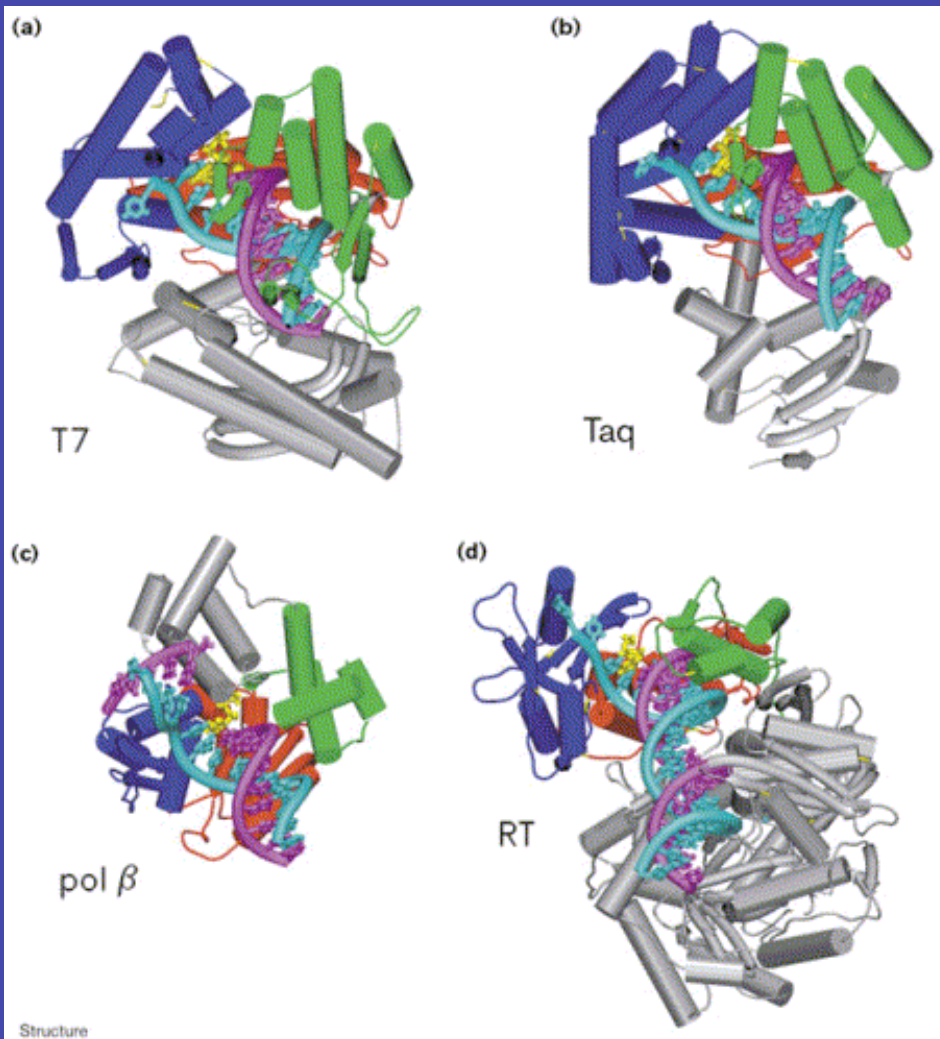
- Étienne Geoffroy St. Hilaire (1772-1844)

la funzione è il risultato meccanico della forma?
c'è una sola forma per poter fare la trascrizione inversa?
o la forma è puramente il frutto della funzione



confronti di polimerasi (conservazione di strutture)

convergenza o evoluzione o tutte e due ?



quindi la domanda è giusta!
cosa è che da la funzione?

La funzione è il risultato meccanico della forma o la forma è solamente la manifestazione della funzione o dell'attività? Geoffrey 1772-1844. Avrà conosciuto sicuramente Lamarck.

tutte hanno uno ione metallo nel sito attivo

pol β in eucarioti per exc. repair

confronti intelligenti

Doublie, Sawaya, & Ellenberger (1999) compared the structures of four different polymerases from three different families and found that although the amino acid sequences of these enzymes were very dissimilar, they all had metal ions (usually magnesium) in their active site. During nucleotidyl transfer, these metal ions play a key role in interacting with the phosphates of the nucleotides and the 3'-end of the primer. These metal binding sites are highly conserved among different DNA polymerases, which highlights their importance for proper function of nucleotide polymerization.

Gli autori hanno confrontato 4 polimerasi di tre famiglie diverse, hanno a.a. diversi ma tutte hanno nel sito attivo uno ione metallo (quasi sempre Magnesio). Lo ione metallo interagisce con il fosfato del Nucleotide e la terminazione 3' del primer durante il transfer del nucleotide. Questi siti metallo-proteina sono altamente conservati ed evidenziano l'importanza nella funzione propria della polimerizzazione degli acidi nucleici.

è la funzione causa della struttura?

certamente certe strutture si sono conservate e sono state riutilizzate (famiglie di geni)

in questo caso c'è convergenza, perchè l'omologia di sequenza è bassa, ma i tempi di evoluzione sono tali per cui ogni a.a. può essere sostituito fuorchè la struttura funzionante che è rimasta la stessa con lo stesso ione al sito attivo

mentre a livello scheletrico di organo si può dimostrare convergenza evolutiva in un caso come questo è più difficile

strutture base + nuove soluzioni

origine di replicazione

resistenza antibiotici per la selezione

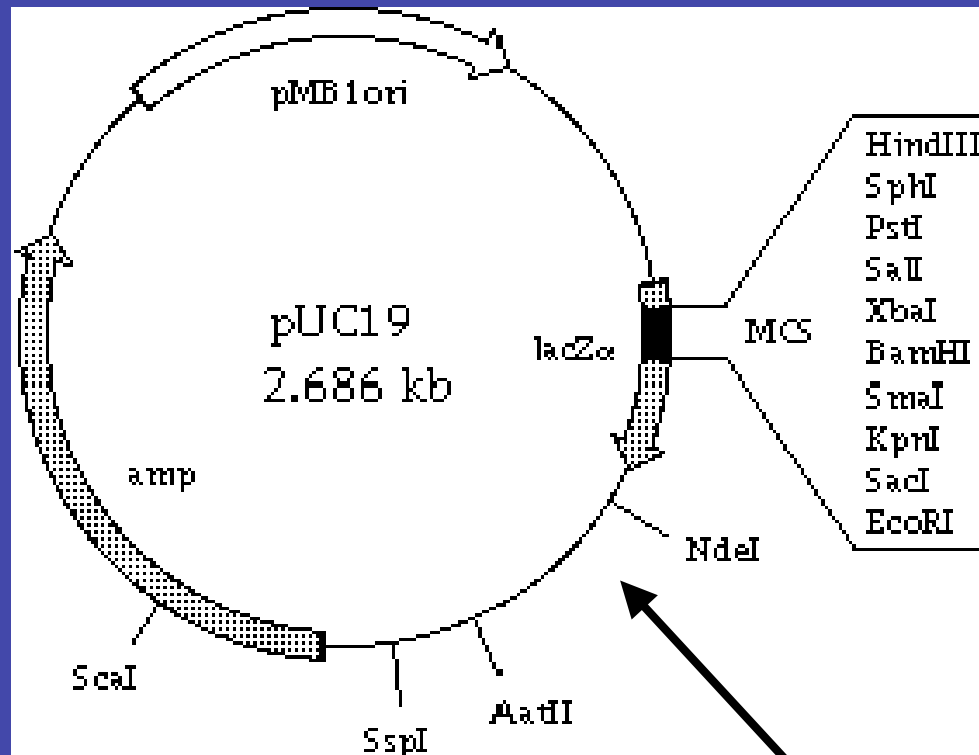
sito multiplo di clonaggio

geni reporter di fusione

per frammenti lunghi tolleranza nella replicazione e stabilità

il gene β -lac per lo screening

pUC 18, 19



MCS = multiple cloning site
sito multiplo di clonaggio
l'inserto interrompe l' ORF
del gene Lac Z le colonie
blue (wt) diventano bianche

l'origine di replicazione di f'
per ottenere DNA a singolo
filamento per sequenziamento

da plasmide a vettore

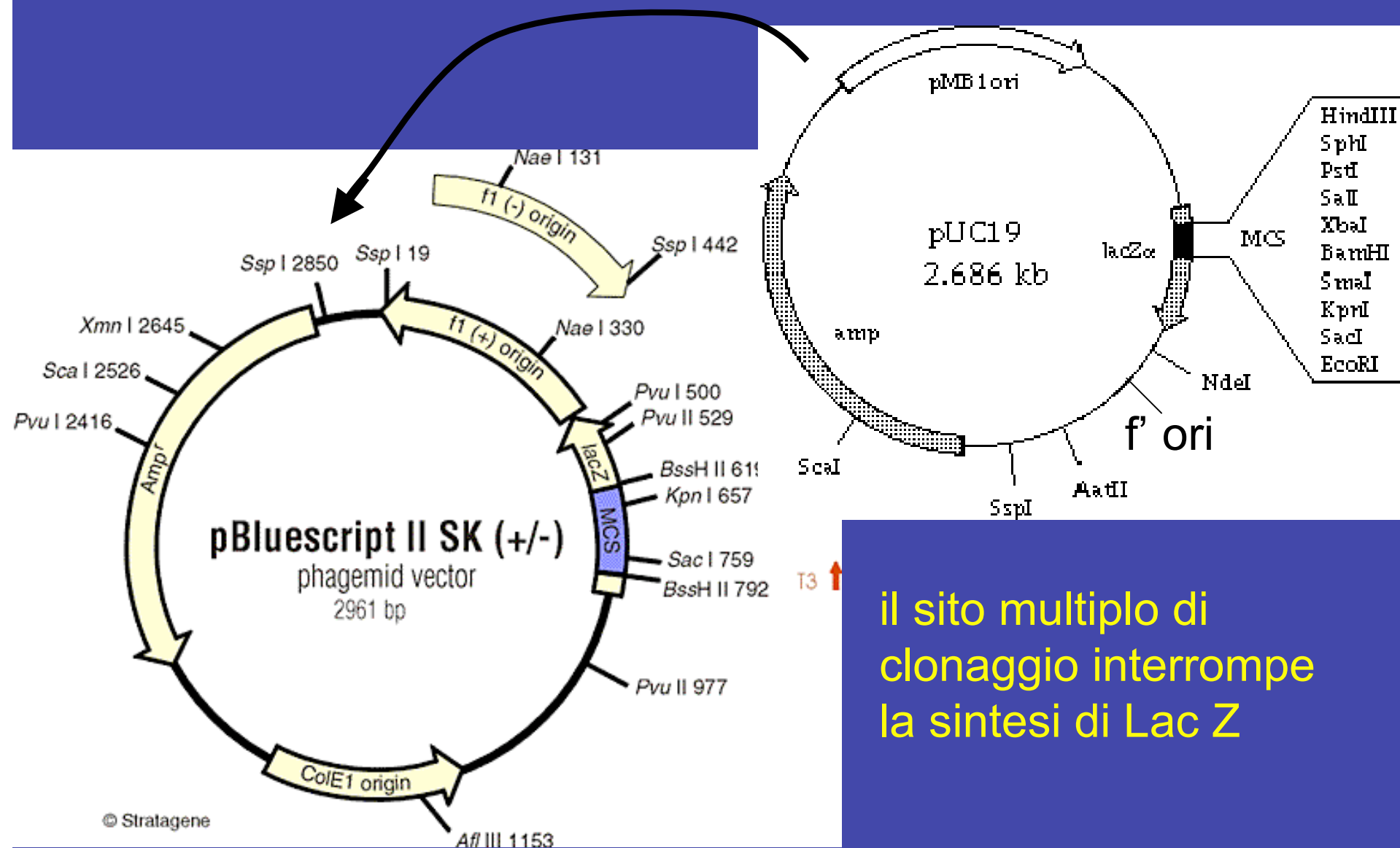
il plasmide diventa vettore quando vi si clona una sequenza e non è più la forma wt. originale, diventa trasportatore di DNA che naturalmente non gli apparterebbe

mutagenesi dei siti di restrizione inutili

creazione del sito multiplo di clonaggio con molti siti di restrizione

il sito multiplo di clonaggio è stato utilizzato in quasi tutti i plasmidi a partire da pUC 18 e 19 con inversione del MCS e per l'origine di replicazione di $f' + / -$ sin e dx

pUC e pBluescript



il sito multiplo di clonaggio interrompe la sintesi di Lac Z

nuovi usi dei plasmidi

dai clonaggi e subclonaggi per analisi più fini e sequenziamento

le libraries di DNA genomico e cDNA (trascrittoma)

i vettori di espressione in E.coli o eucarioti

sistemi con promotori costitutivi o inducibili

negli eucarioti i plasmidi non si replicano

trasfezione transiente o stabile

la trasfezione stabile avviene tramite
integrazione del vettore

librerie - libraries

clonaggio di un gene dal DNA genomico

da gel col supporto della tecnica Southern

da una library rappresentativa

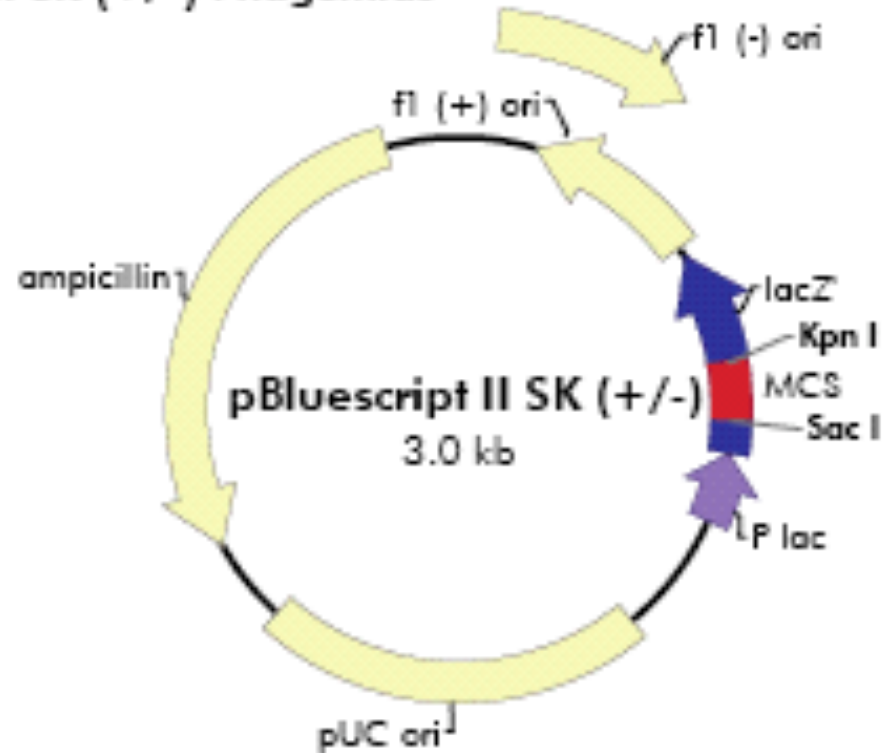
le librerie possono essere anche:

di cDNA (trascrittoma)

di espressione (proteoma)

pBlue script

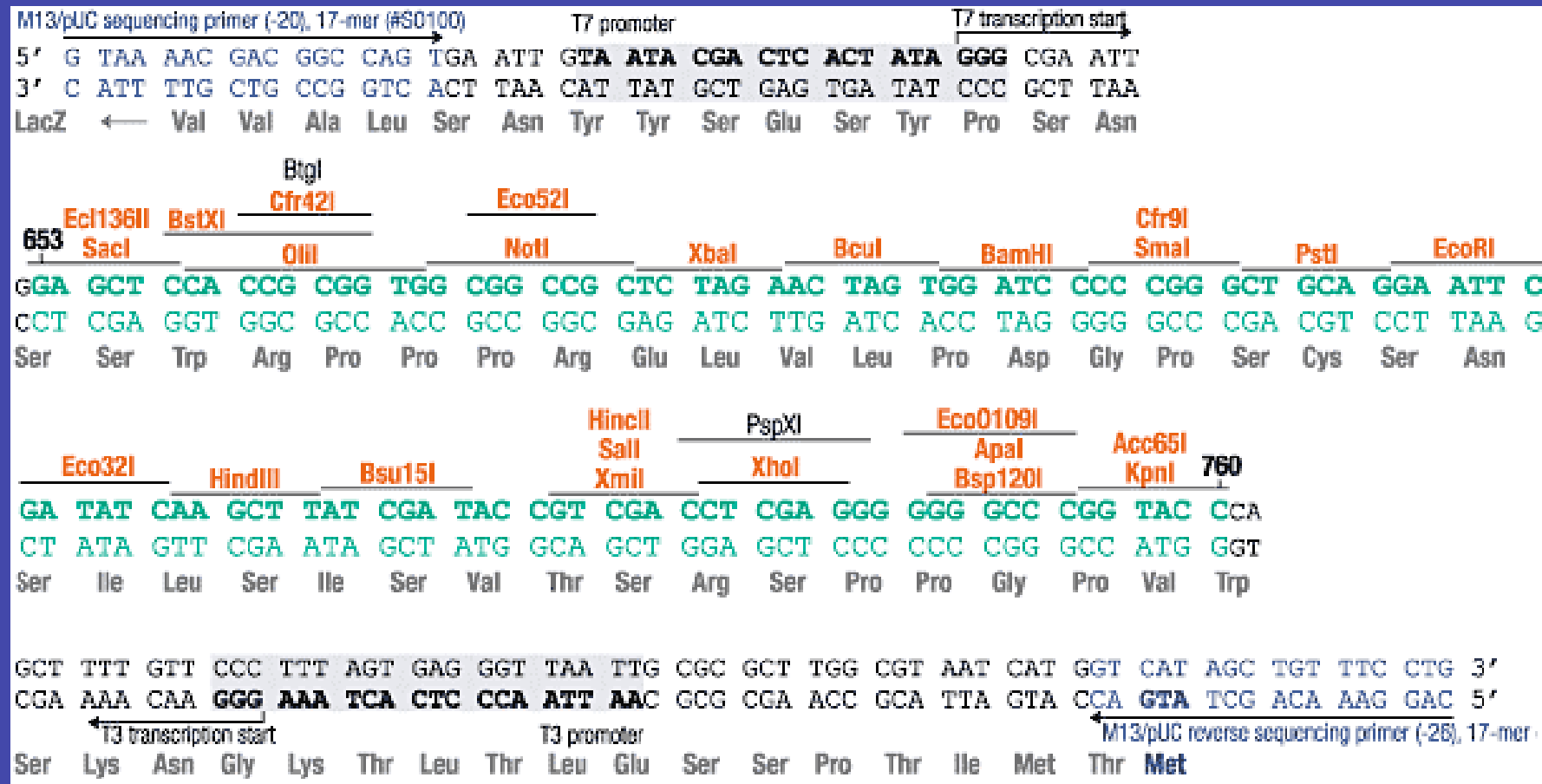
pBluescript II SK (+/-) Phagemids



f' per avere il singolo filamento di DNA da sequenziare

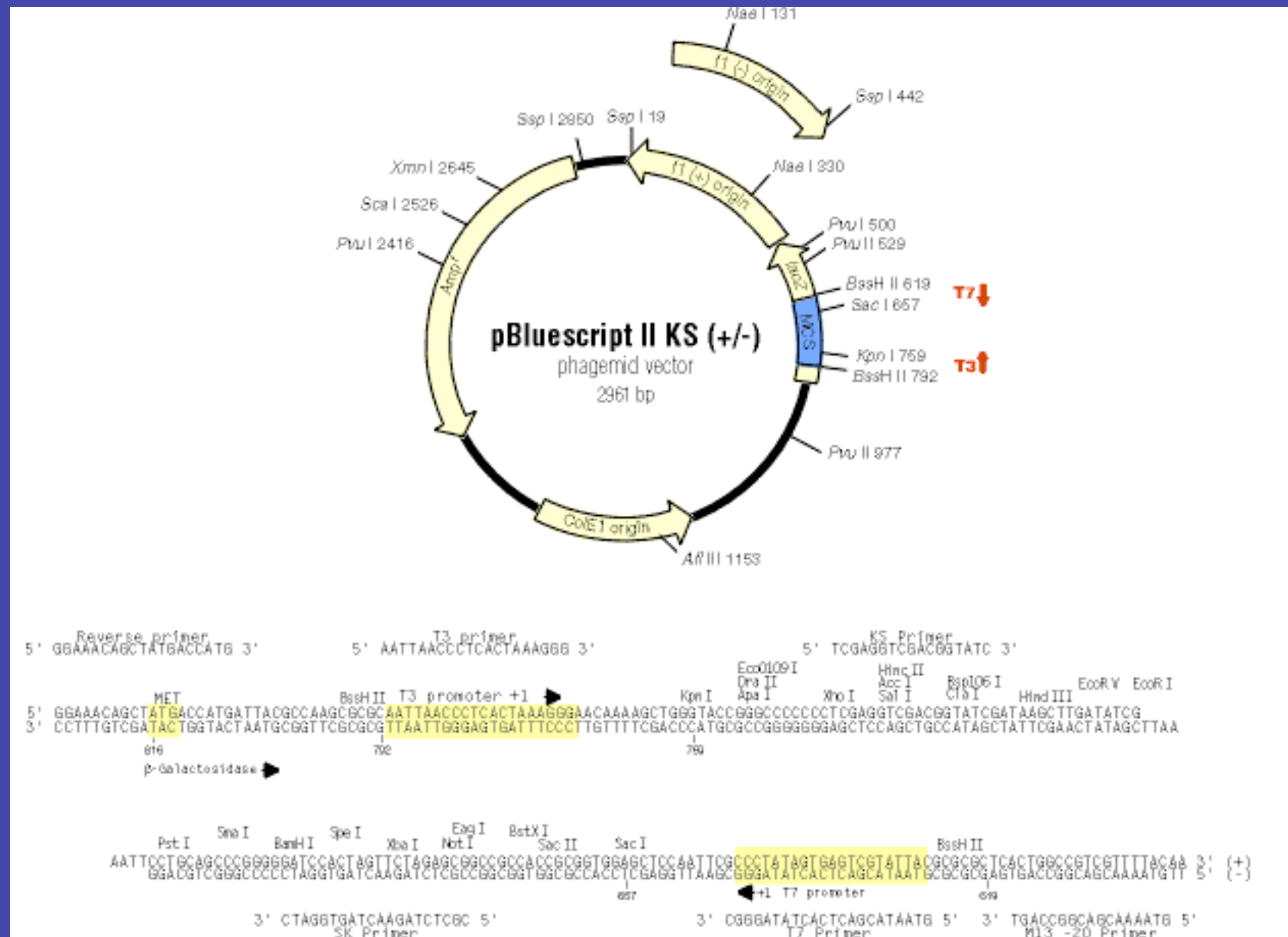
pBluescript MCS

pBluescript II KS(-), pBluescript II KS(+)



rna polimerasi dei fagi T3 e T7 ed Sp6 per avere sonde a singola elica

mappa e MCS pBluescript

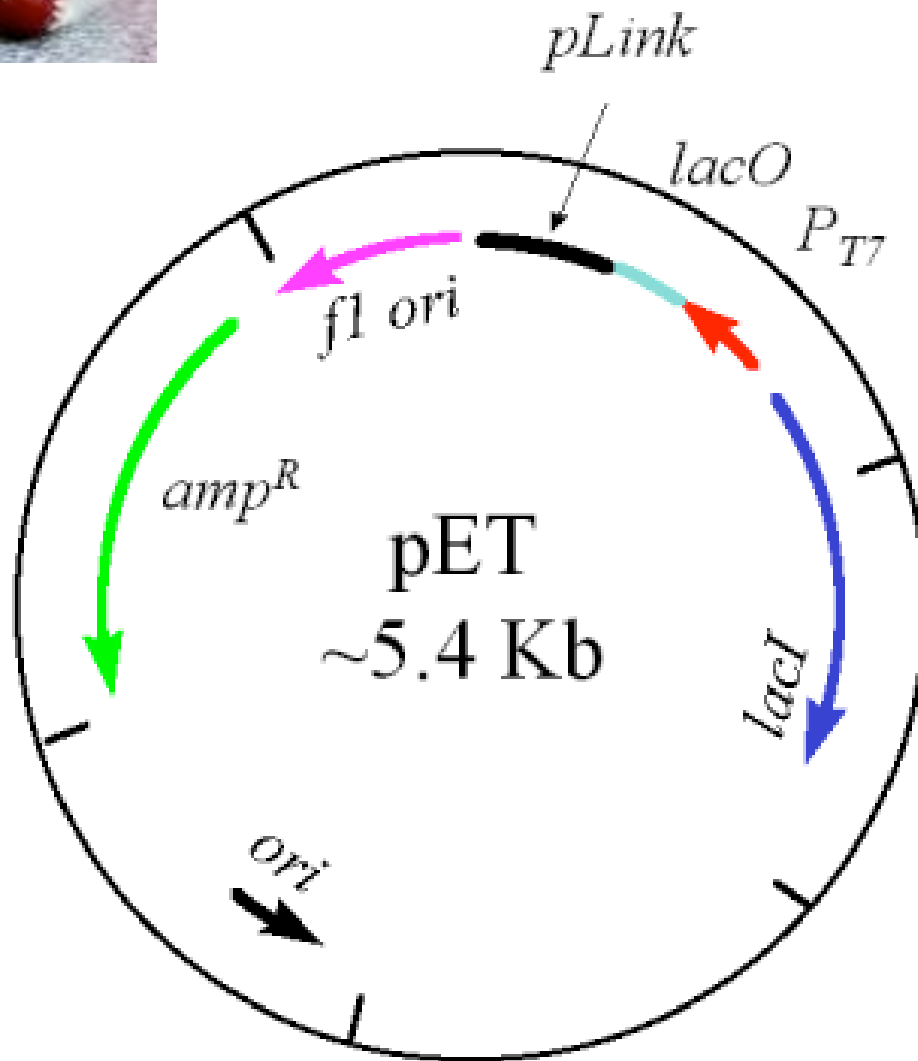


vettore di espressione pET

Figure 1: The pET Vector. This plasmid contains a drug resistant marker for ampicillin resistance (green), the *lacI* gene (blue), the T7 transcription promoter (red), the *lac* operator region (pale green) 3' to the T7 promoter, and a polylinker region (black). Also, there are two origins of replication - one is the f1 origin which enables the production of a single stranded vector under appropriate conditions, and the other is the conventional origin of replication. This image was used with permission from Dr. Michael Blaber, of Florida State University. The original reference can be found [here](#).

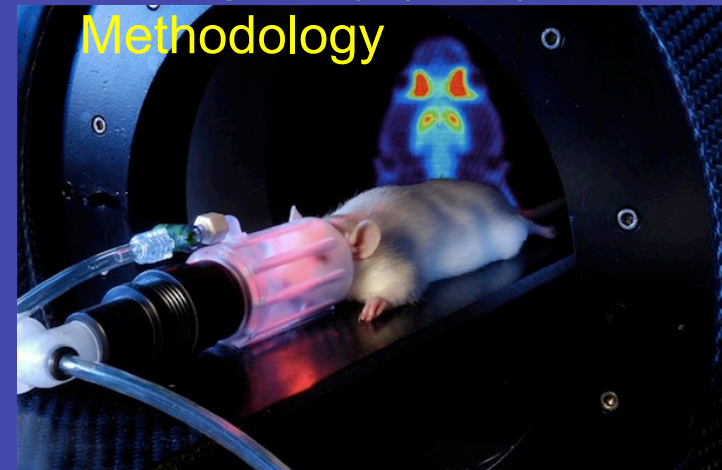


è un pET non una PET



Pet

Positron Emission
Tomography (PET)
Methodology



ha bisogno della T7 polymerase

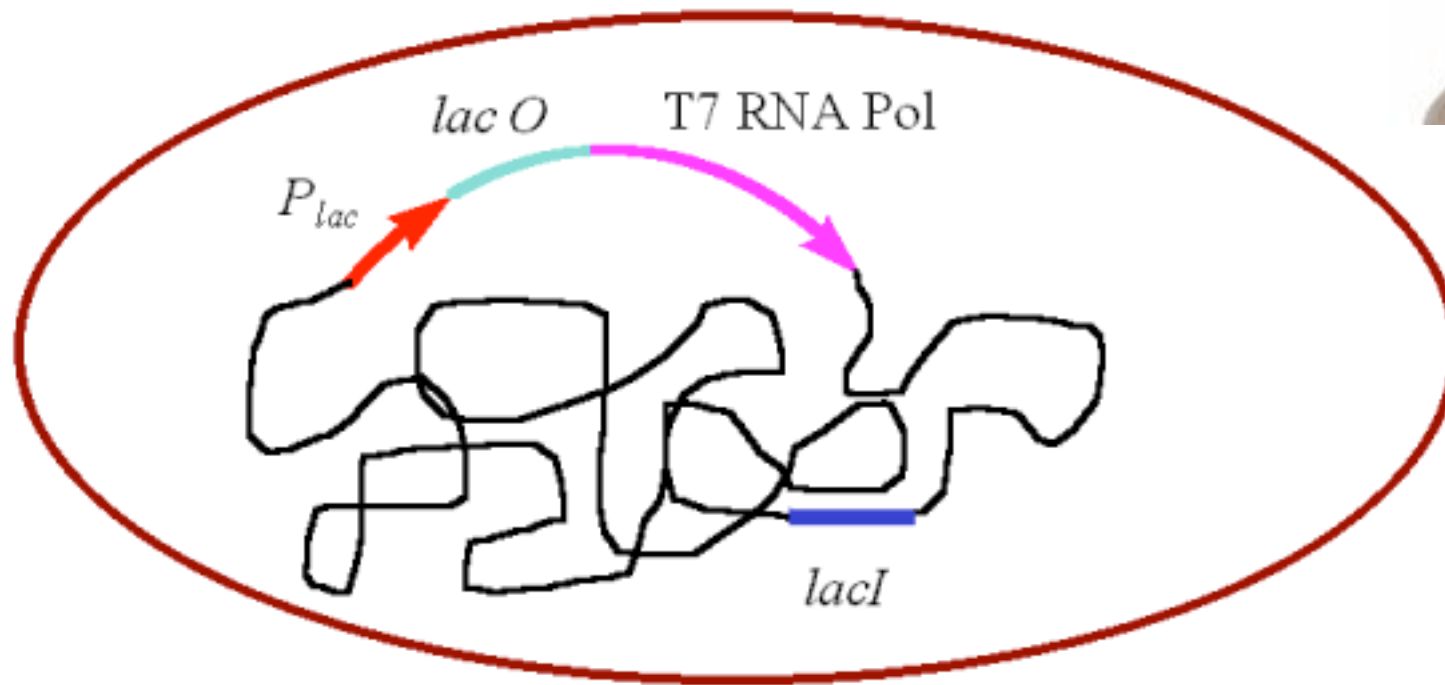
One of the most important parts of the pET Expression System involves the fact that YFG is not transcribed unless the T7 RNA polymerase is present. Prokaryotic cells do not produce this type of RNA, and therefore the T7 RNA polymerase must be added. Usually, the host cell for this expression system is a bacteria which has been genetically engineered to incorporate the gene for T7 RNA polymerase, the lac promoter and the lac operator in it's genome. When lactose or a molecule similar to lactose is present inside the cell, transcription of the T7 RNA polymerase is activated.. Typically, the host cell used is E. coli strain BL(DE3) (Blaber, 1998). The diagram below shows the genome of the host cell.

la cellula ospite del pET

Figure : The Host Chromosome. The lac promoter is in red, the lac operator is green, the gene which encodes the T7 RNA polymerase is pink, and the lac inducer is blue. The host cell genome is represented by the black line, and the brown line represents the cell membrane. This image was used with permission from Dr. Michael Blaber, of Florida State University. The original reference can be found [here](#).

yfg =your favorite gene / yfp = your favorite protein

la cellula ospite per il pET

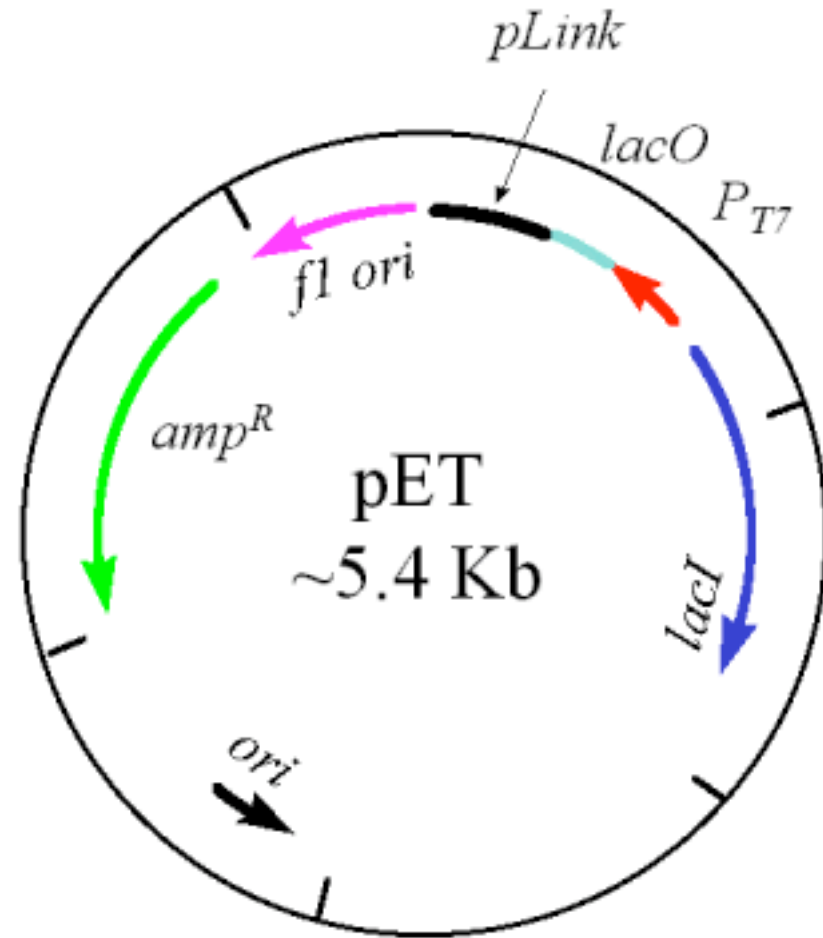


BL(DE3) Host Chromosome

ricapitolando pET expression vector

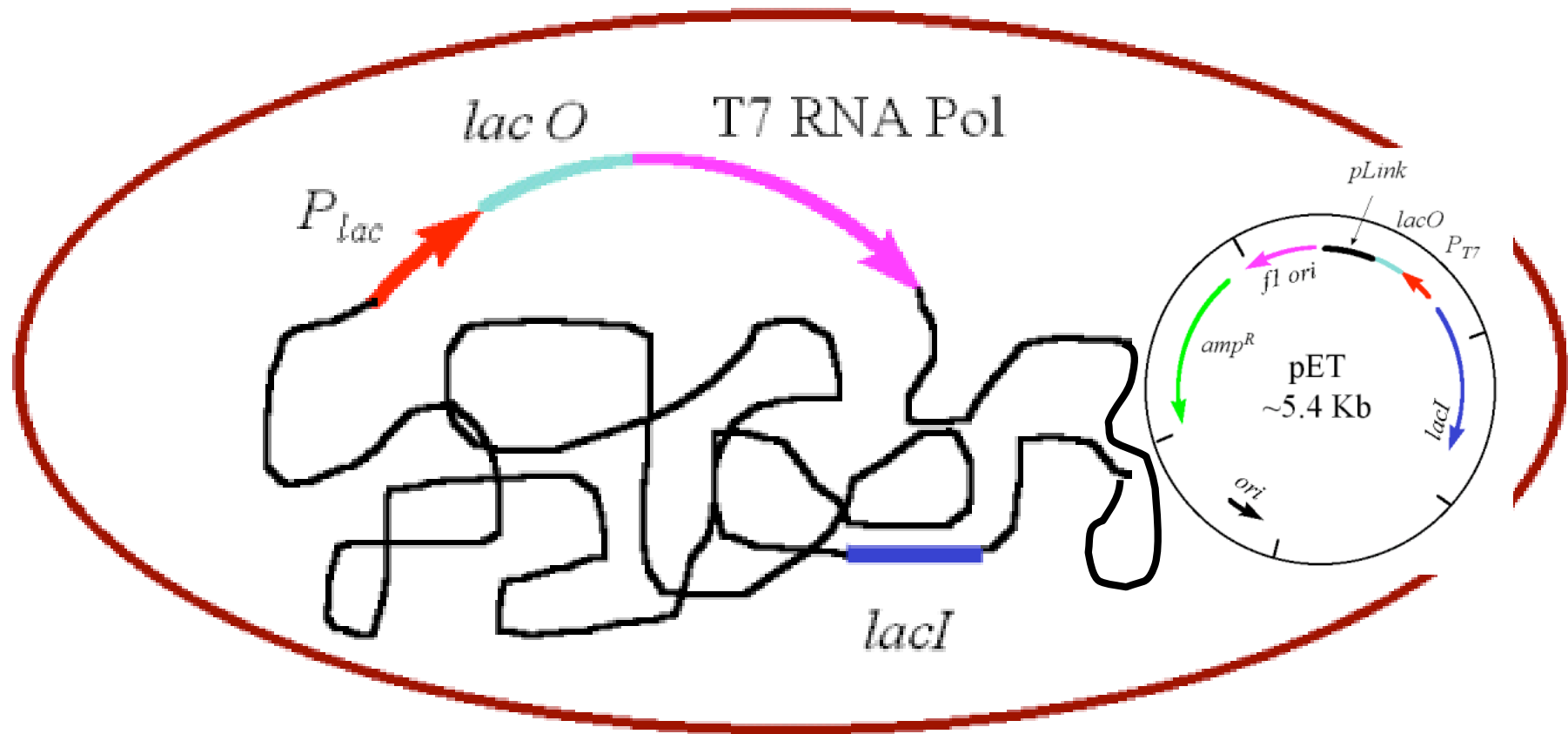
ha bisogno della presenza della T7 RNA polymerasi

per esprimere il vostro gene favorito
YFG (your favorite gene) si usano
cellule che hanno la RNA pol T7
controllata dallo stesso induttore
del YFG cioè del lattosio
o dei suoi analoghi,



c'è apposta il ceppo BL(DE3)

che esprime la T7 polimerasi col controllo dell'operatore lac O



BL(DE3) Host Chromosome

con l'induzione di lac 2 effetti

con l'induzione dell'operatore lac O si ha sia l'induzione della T7 polymerasi che della trascrizione del YFG (your favorite gene)

In poche ore i batteri avranno accumulato una grande quantità di proteina YFP che potrà essere estratta e purificata per tutti gli scopi possibili.

Unico limite è che la proteina è prodotta in ambiente batterico e non potrà avere eventuali processamenti eucariotici e particolari “foldings” prodotti da cellule eucariotiche

integrazione nel genoma

i plasmidi si possono integrare in maniera “random”

nei microorganismi sono stati individuati enzimi che fanno avvenire ricombinazione sito specifica riconoscendo delle sequenze consensus

il sistema Cre-Lox del fago P1

il sistema FLP detto flip di lievito *Saccharomyces cerevisiae*

questi sistemi derivano dalla applicazione di un processo naturale di ricombinazione utilizzabile anche in altri organismi

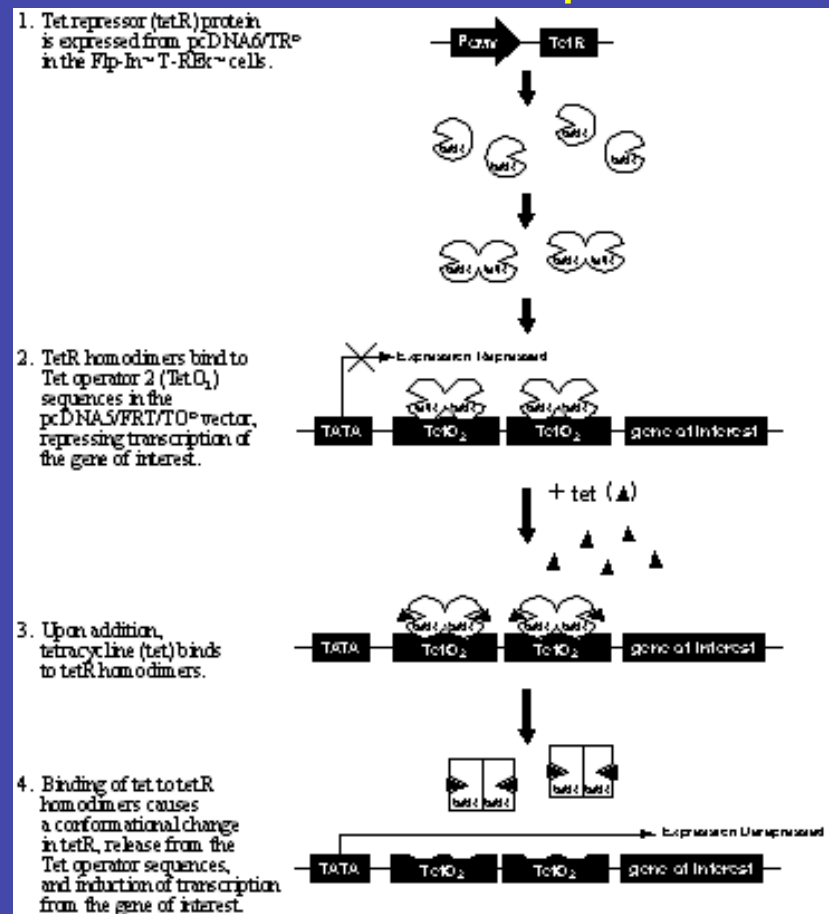
il principio è applicabile perchè il DNA è universale

FLP system

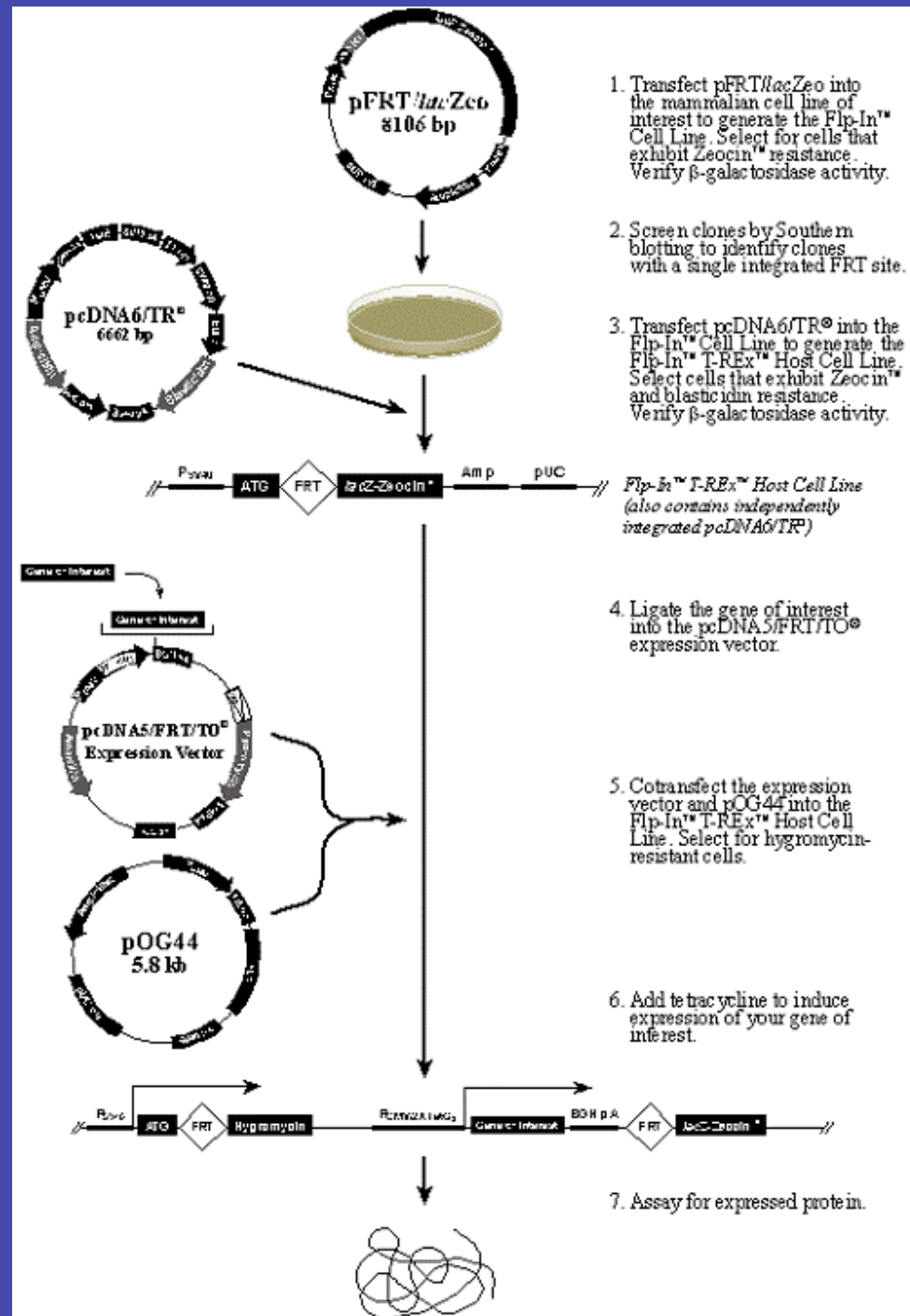
vettore di inserzione del gene di interesse pcDNA5/FRT/TO
resistenza Hygromicina (Flp Recomb Target)

vettore per espressione dell'enzima Flp recombinase p0G44
cotrasfettato per la ricombinazione sito specifica

sistema a più
passaggi:
ceppo ospite già pronto
plasmide
con gene di interesse



i vari passaggi



espressione in cellule eucariotiche

cambiano le condizioni, i plasmidi non si replicano nelle cellule eucariotiche

le origini di replicazione autonome non bastano, ci vogliono le strutture cromosomiali : centromeri, telomeri, regioni regolative

- trasfezione transiente
- linee stabilizzate con integrazione del vettore nel genoma
(rilevante il sito di integrazione)

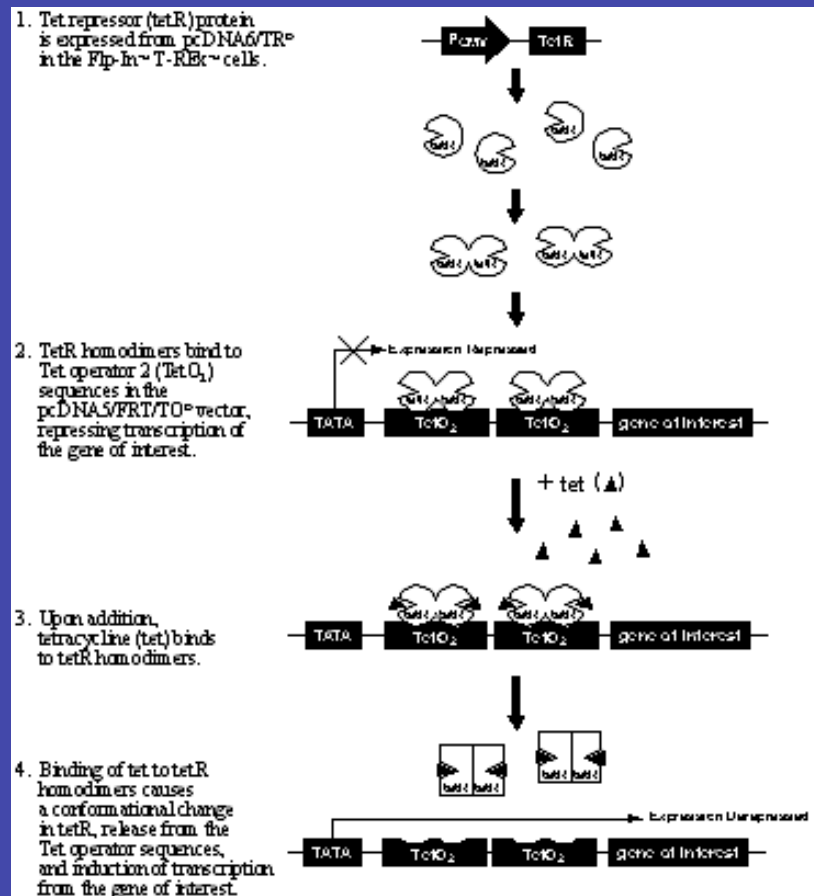
per studi di espressione c'è stata l'invenzione di molti sistemi:
il sistema FLP è piuttosto efficiente

FLP system

vettore di inserzione del gene di interesse pcDNA5/FRT/TO
resistenza Hygromicina (Flp Recomb Target)

vettore per espressione dell'enzima Flp recombinase p0G44
cotrasfettato per la ricombinazione sito specifica

sistema a più
passaggi:
ceppo ospite già pronto
plasmide
con gene di interesse



repressione

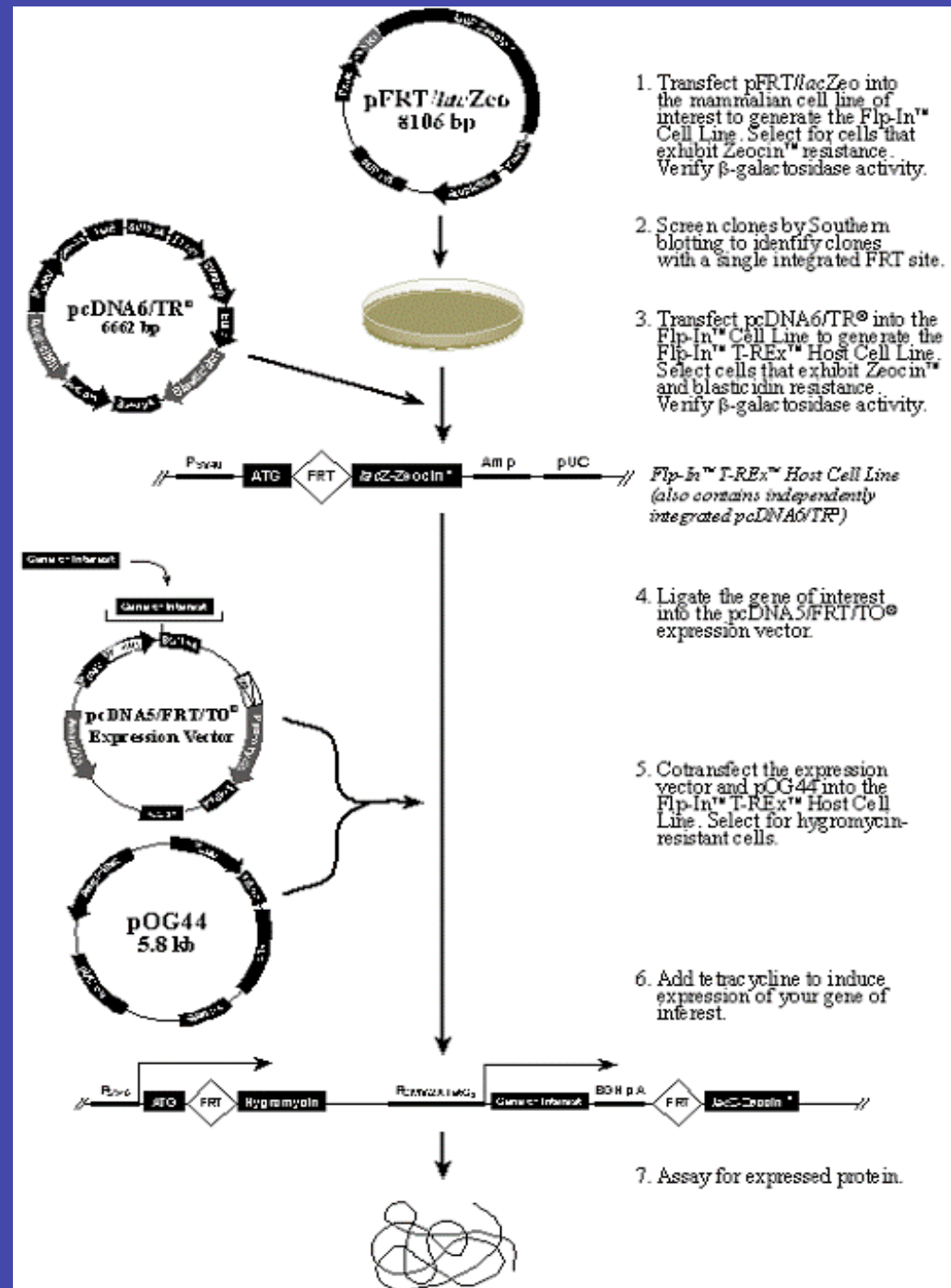
induzione

espressione

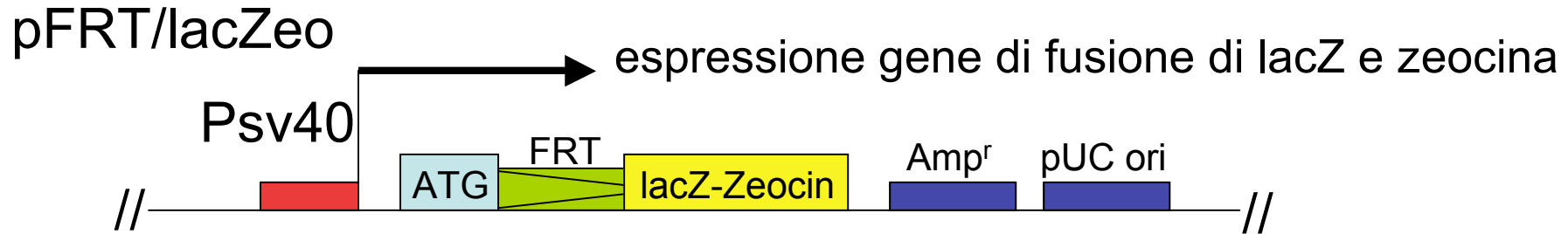
i vari passaggi del sistema FLP

integrazione nella linea
cotrasfezione GOI
+ p ricombinasi
e p repress Tetraciclina

pFRT lac Zeo
pcDNA 6/TR
pcDNA 6FRT/TO
pOG44



strutture del 1° plasmide



FRT = Flp Recombination Target

Flp-In Host Cell Line

la linea cellulare trasfettata diventa target per l'integrazione tramite Flp

la linea può essere cotrasfettata con il plasmide con il gene cDNA di interesse + pOG44 (che esprime la Flp recombinase)