

ZANICHELLI

Valitutti, Taddei, Maga, Macario

Carbonio, metabolismo, biotech

**Chimica organica,
biochimica e biotecnologie**

ZANICHELLI

Capitolo B5

Manipolare il genoma: le biotecnologie

ZANICHELLI

Sommario

1. Che cosa sono le biotecnologie
2. Le origini delle biotecnologie
3. I vantaggi delle biotecnologie moderne
4. Il clonaggio genico
5. Tagliare il DNA con gli enzimi di restrizione
6. Saldare il DNA con la DNA ligasi
7. I vettori plasmidici
8. Le librerie genomiche
9. La reazione a catena della polimerasi o PCR
10. L'impronta genetica
11. Il sequenziamento del DNA
12. I vettori di espressione

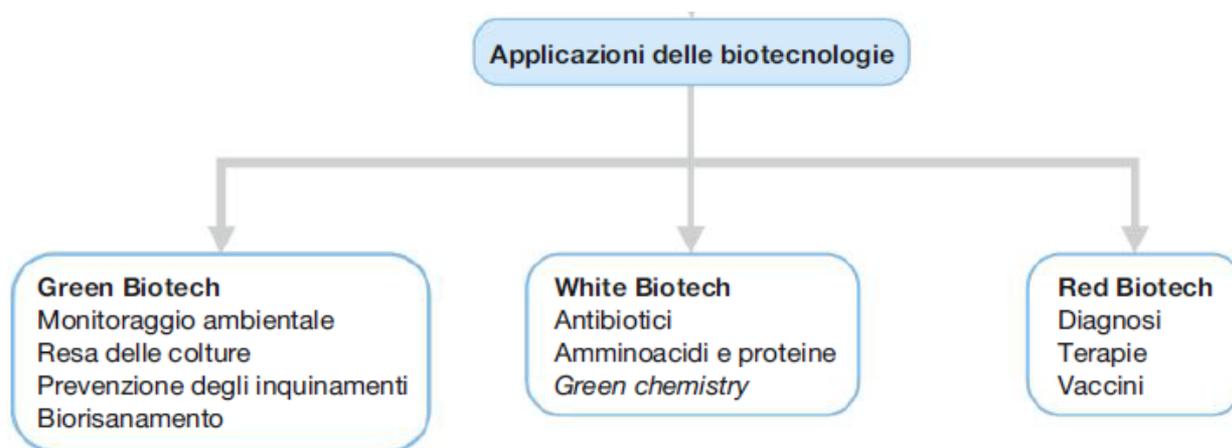
Sommario

- 13. La produzione biotecnologica di farmaci
- 14. I modelli animali transgenici
- 15. La terapia genica
- 16. Le terapie con le cellule staminali
- 17. Le applicazioni delle biotecnologie in agricoltura
- 18. La produzione di biocombustibili
- 19. Le biotecnologie per l'ambiente

Che cosa sono le biotecnologie

Le **biotecnologie** sono applicazioni tecnologiche che utilizzano organismi viventi o loro derivati per realizzare prodotti e processi per usi specifici.

Biotecnologie moderne usano la tecnologia del DNA ricombinante, che agisce sul genotipo degli organismi per ottenere nuovi fenotipi utili.



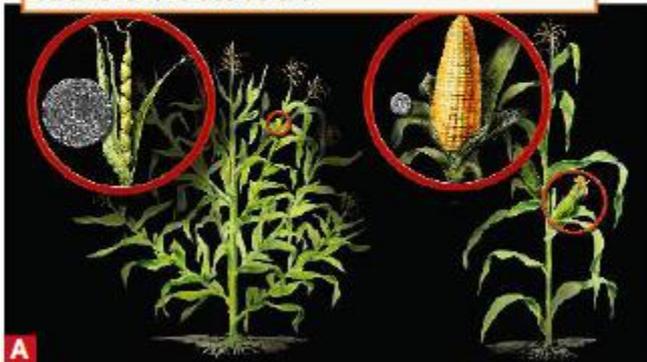
Le origini delle biotecnologie

Gli esseri umani hanno **da sempre** utilizzato gli organismi viventi a proprio vantaggio, spesso modificandone anche la struttura genetica.



fermentazioni, domesticazione di piante e animali

Il mais attuale (a destra) è stato ottenuto dagli antichi agricoltori dell'America centrale dal *teosinte* (a sinistra), una varietà di mais selvatico, per selezione progressiva dei semi con le caratteristiche desiderate.



Collezione di semi di mais attualmente coltivati. L'ultimo a destra è un seme di *teosinte*.



I vantaggi delle biotecnologie moderne

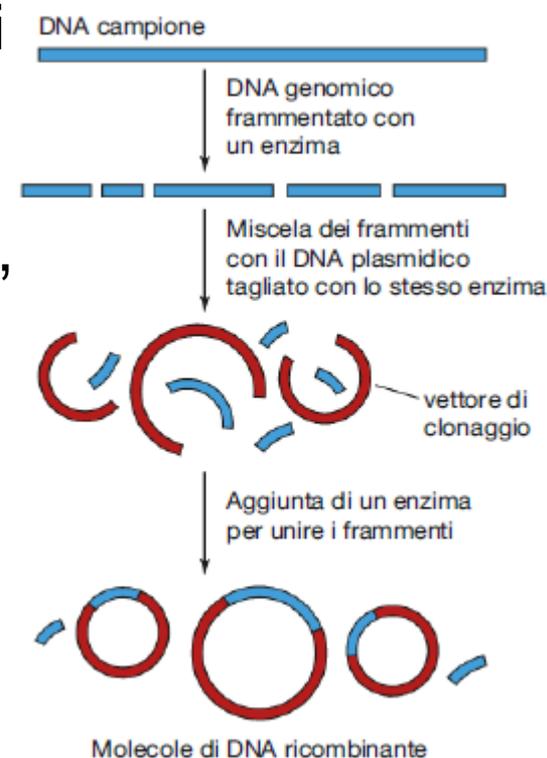
Le **biotecnologie moderne** offrono numerosi vantaggi.

1. Le tecniche di ingegneria genetica sono **più efficaci** perché consentono di trasferire solo i geni desiderati
2. I geni trasferiti possono provenire da specie anche molto distanti dal punto di vista evolutivo rispetto alla specie ricevente: si generano così **varietà impossibili da ottenere con gli incroci tradizionali**
3. Le moderne biotecnologie agiscono in modo mirato e permettono di ottenere le caratteristiche desiderate con un'**alterazione genetica minima**, spesso limitata a un singolo gene (o a una parte di esso) tra le migliaia che compongono il genoma

Il clonaggio genico

Il **clonaggio genico** permette di ottenere milioni di copie del gene di interesse.

1. Il **gene** di interesse viene separato dagli altri geni dell'organismo di partenza
2. Il gene viene inserito all'interno di una molecola di DNA plasmidico modificata, (**vettore di clonaggio**).
3. Il DNA ricombinante viene inserito all'interno della cellula ospite
4. Si isolano le cellule che hanno incorporato il plasmide
5. Il vettore si replica all'interno della cellula trasformata

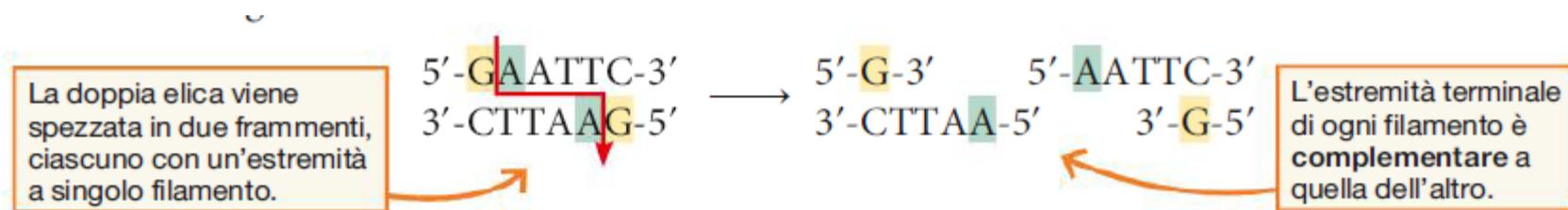


Tagliare il DNA con gli enzimi di restrizione

Endonucleasi di restrizione



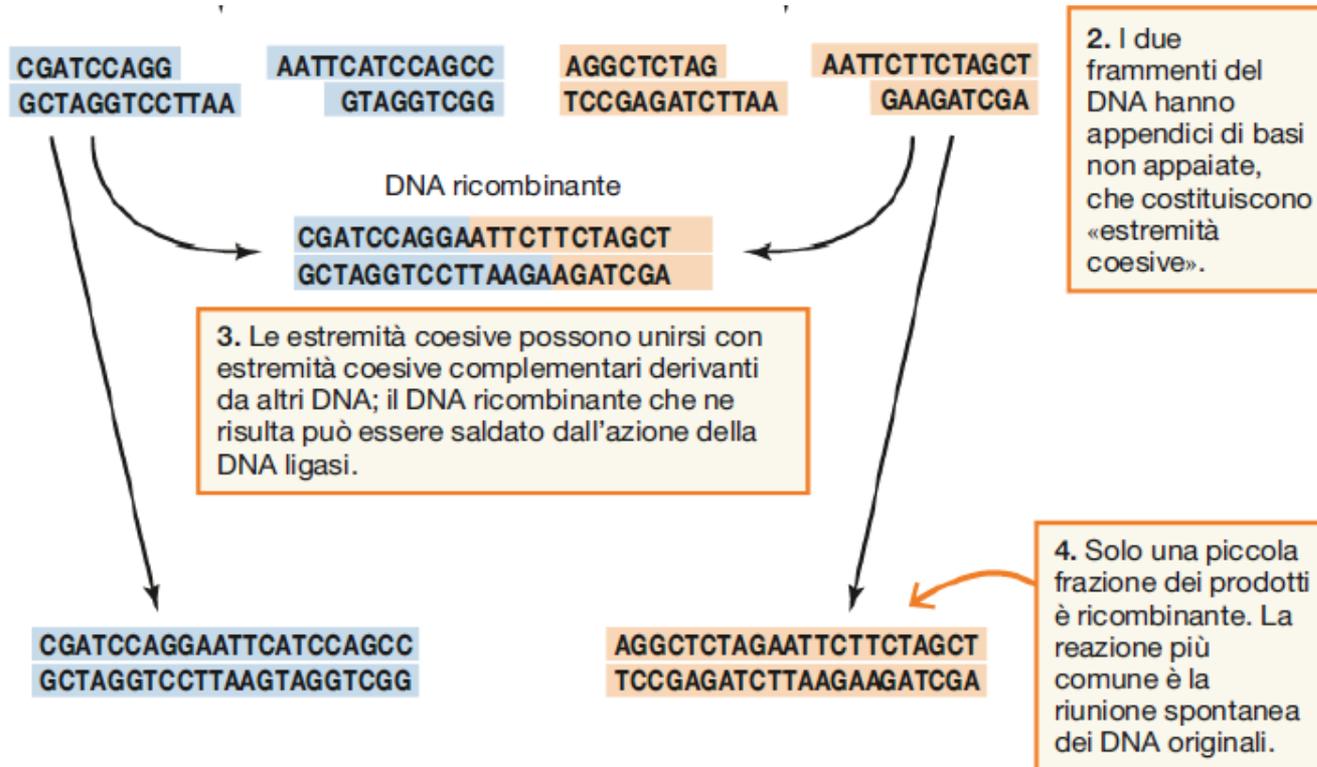
separano un frammento dalla molecola di DNA che lo contiene in corrispondenza di una specifica sequenza bersaglio.



Gli enzimi endonucleasi come EcoRI producono delle **estremità coesive** (chiamate *sticky ends* in inglese) che sono molto utili per il clonaggio.

Saldare il DNA con la DNA ligasi

DNA ligasi  ricostituisce il legame fosfodiesterico tra due nucleotidi adiacenti



I vettori plasmidici

I **vettori plasmidici** sono molecole di DNA circolare a doppia elica lunghi alcune migliaia di nucleotidi usati per il clonaggio.

Tutti i vettori contengono alcuni elementi essenziali:

- un'**origine di replicazione** per consentirne la replicazione del plasmide a ogni divisione cellulare
- geni per la **resistenza ad antibiotici**, che agiscono come marcatori per selezionare le cellule che hanno incorporato il vettore
- un **sito multiplo di clonaggio** o *polilinker* in cui sono presenti numerose sequenze di riconoscimento per diversi enzimi di restrizione e dove, grazie a tagli di restrizione, viene inserito il frammento di DNA da clonare

Le librerie genomiche

Le **librerie genomiche** o **genoteche** sono collezioni di cloni batterici ciascuno contenente un diverso frammento di DNA.

I frammenti genici contengono sia le sequenze codificanti (**esoni**) sia le sequenze non codificanti (**introni**).

Il modo più conveniente per isolare e clonare un gene eucariotico consiste nel **partire dal corrispondente mRNA**, perché tutti gli introni sono già stati rimossi durante lo splicing.

Per generare la molecola di cDNA dall'mRNA si utilizza l'**enzima trascrittasi inversa** dei retrovirus.

La reazione a catena della polimerasi o PCR

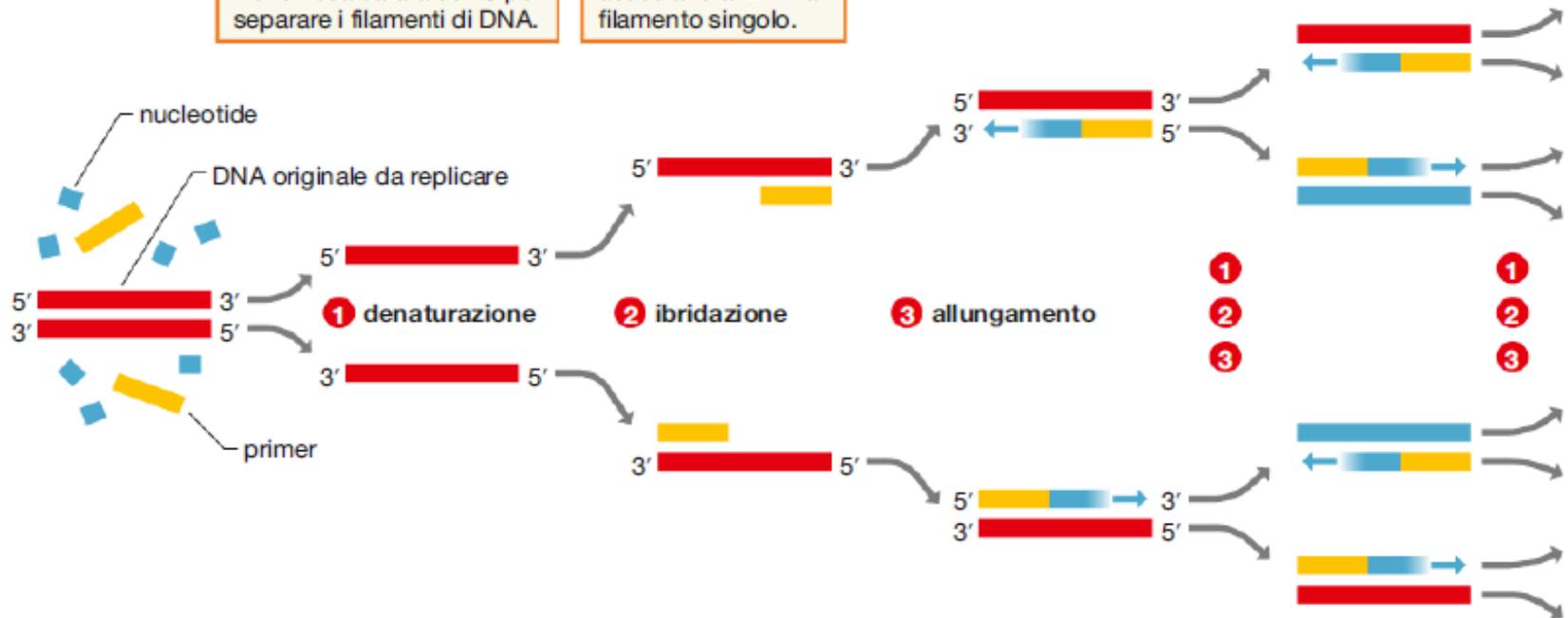
La **PCR** permette di ottenere milioni di copie della sequenza genica originaria partendo da un frammento di DNA.

1. Denaturazione. Una molecola di DNA contenente una sequenza che si desidera copiare viene riscaldata a 90 °C per separare i filamenti di DNA.

2. Ibridazione. Quando la miscela si raffredda, i primer artificiali si associano al DNA a filamento singolo.

3. Allungamento. I nucleotidi trifosfato e la Taq polimerasi consentono la sintesi di due nuovi filamenti di DNA.

4. Grazie alla ripetizione del processo, in poco tempo si possono ottenere milioni di copie del DNA originale.



L'impronta genetica

Ogni individuo contiene un'informazione genetica unica e individui diversi presentano minime ma significative differenze di sequenza.

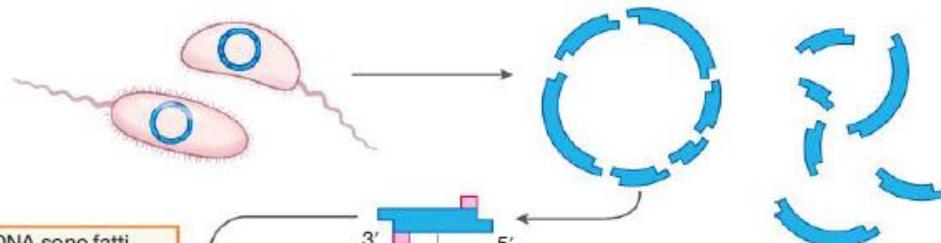
Queste differenze permettono di stabilire se due campioni di DNA appartengono allo stesso individuo oppure no.

In particolare, nella genetica forense si utilizzano:

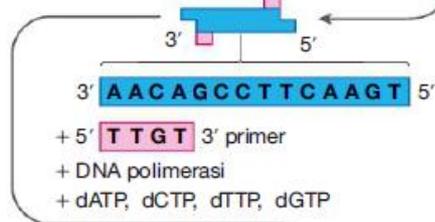
- l'analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione (**RFLP**, dall'inglese *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
- **l'impronta genetica o DNA fingerprinting**

Il sequenziamento del DNA

1. Si digerisce il genoma da sequenziare con enzimi di restrizione.

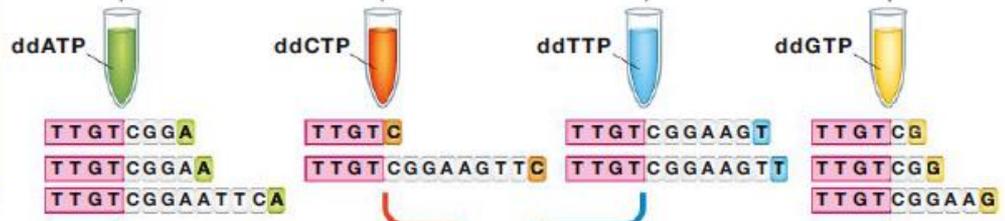


2. I frammenti di DNA sono fatti reagire con una miscela di reazione contenente un primer (in rosa), l'enzima DNA polimerasi e i desossinucleotidi (in bianco) utili per la sintesi dei filamenti complementari.

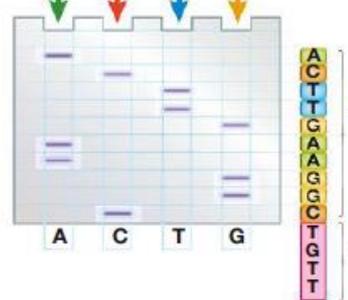


3. La miscela è divisa in quattro provette, ciascuna contenente uno dei quattro didesossinucleotidi (colorati).

4. In ogni miscela si formano frammenti di lunghezza diversa, a seconda del punto in cui l'allungamento è stato interrotto dal didesossinucleotide.



5. Si caricano i prodotti delle quattro reazioni nei pozzetti di un gel per l'elettroforesi.

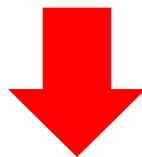


6. Procedendo dal frammento più piccolo (in basso) verso il più grande (in alto), si ricostruisce l'ordine con cui i nucleotidi sono stati incorporati. La sequenza che emerge è complementare a quella che si intendeva sequenziare.

Il sequenziamento genico permette di ricostruire l'ordine in cui le basi si susseguono lungo il filamento di DNA.

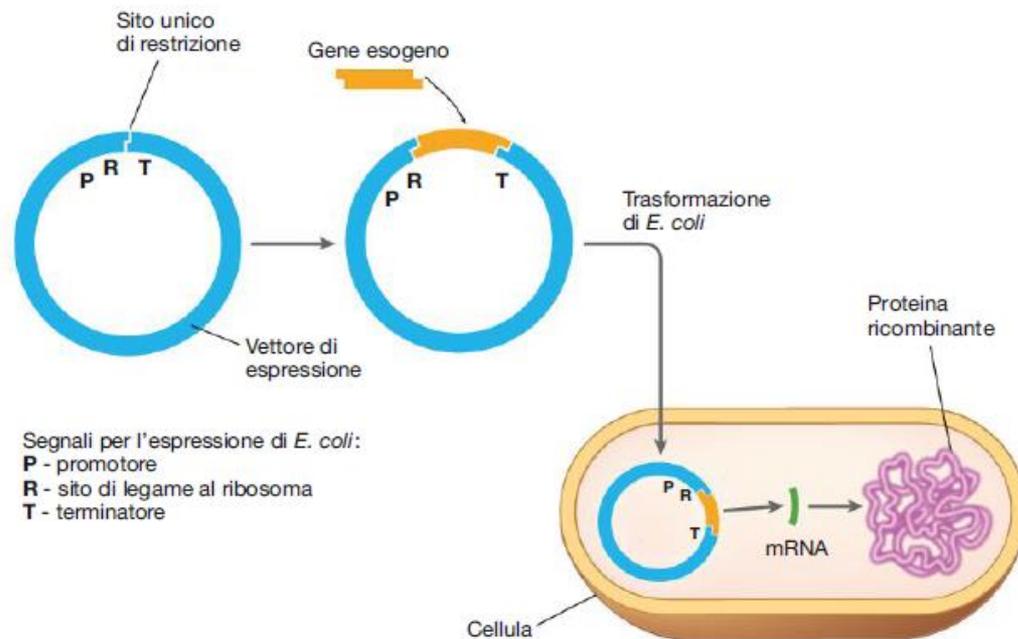
I vettori di espressione

Organismo geneticamente modificato o OGM



esprime un gene che deriva da un altro organismo

Per raggiungere questo scopo si usano dei vettori plasmidici particolari: i **vettori di espressione** consentono di fare esprimere il gene clonato al loro interno in una qualsiasi cellula ricevente.



La produzione biotecnologica di farmaci

È possibile inserire il gene per una proteina in cellule facili da coltivare, come i batteri (**bioreattori**); l'apparato metabolico cellulare permette poi di sintetizzarla a costi minori e con un impatto ambientale più ridotto.

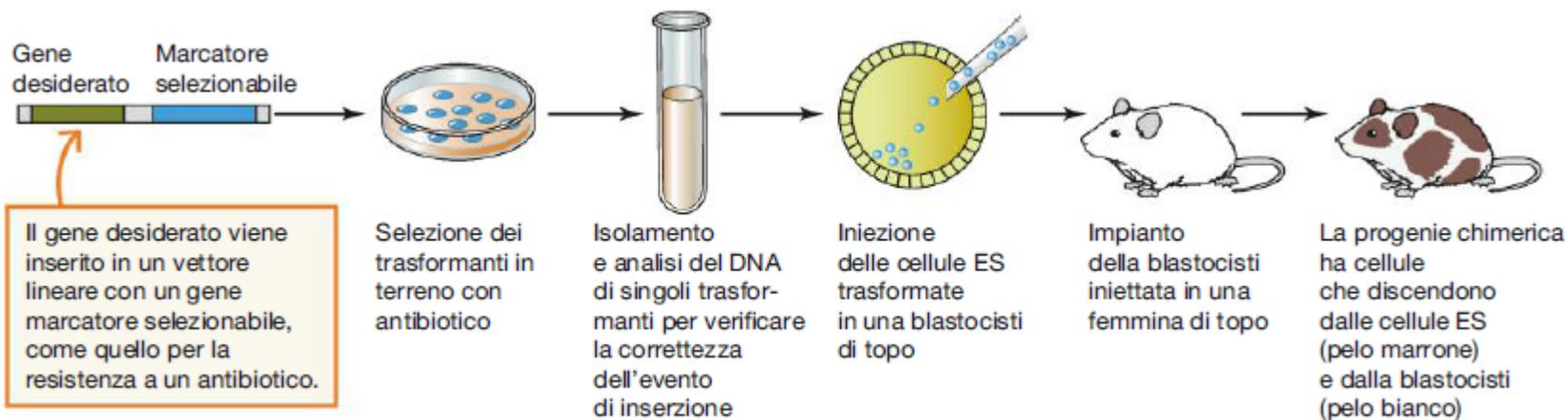
Talvolta si usano piante o animali, che hanno un apparato per la sintesi e la modificazione post-traduzionale delle proteine molto più simile a quello umano rispetto ai batteri.

Alcuni farmaci ottenuti con le biotecnologie:

- insulina e altri ormoni
- fattori per la coagulazione
- anticorpi e vaccini

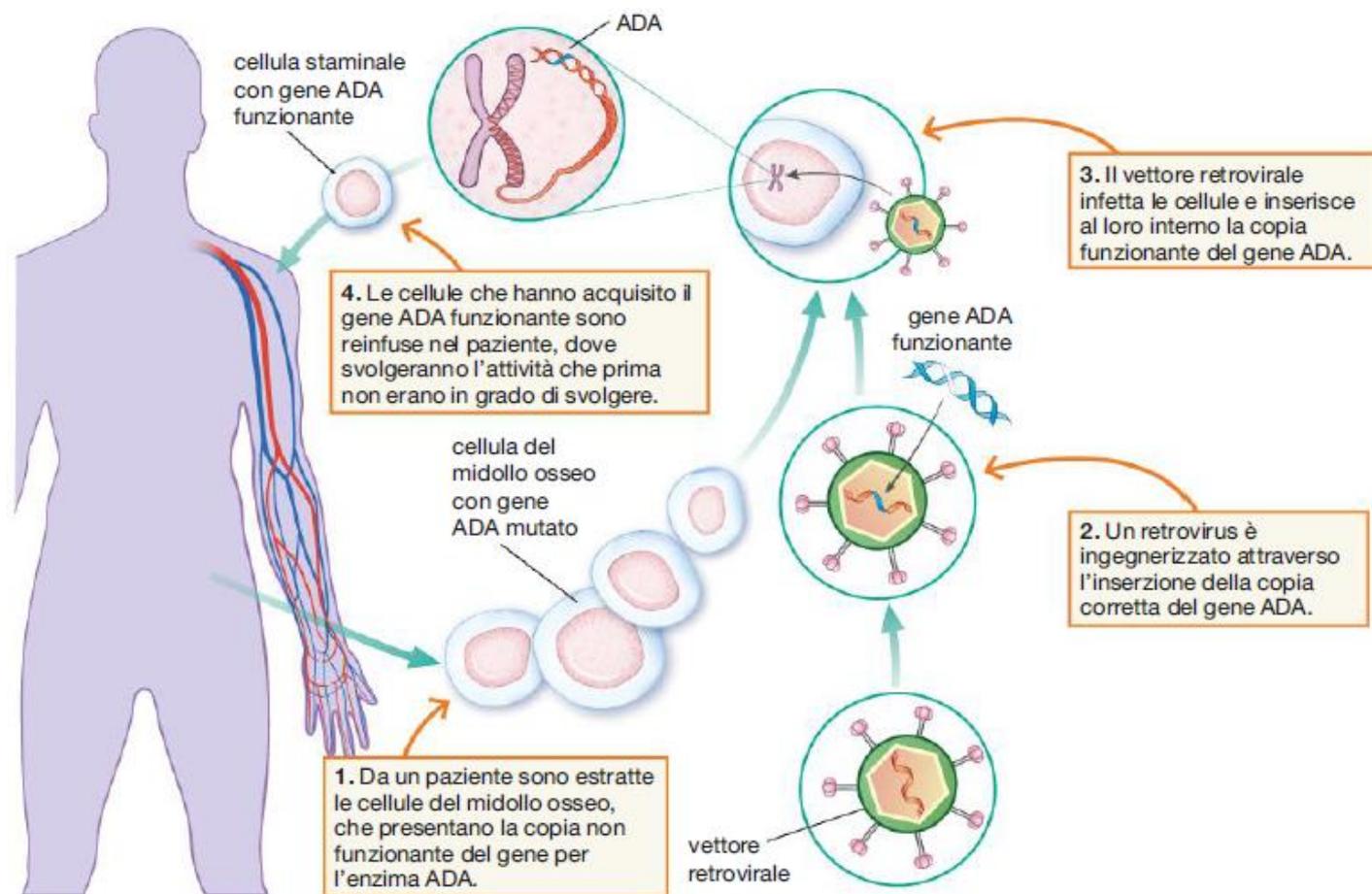
I modelli animali transgenici

Le biotecnologie permettono di generare **modelli animali transgenici** per lo studio delle malattie umane, incorporando i geni che causano le malattie oppure eliminando il gene che esprime un certo carattere.



La terapia genica

Grazie alle biotecnologie, oggi è possibile **sostituire un gene non funzionale con la sua copia corretta**.



Le terapie con le cellule staminali

Nelle prime fasi dello sviluppo l'embrione è formato da cellule non differenziate: sono le **cellule staminali**.

Esistono diversi tipi di cellule staminali:

- **cellule staminali totipotenti** in grado di dare origine a tutti i tipi cellulari e quindi, potenzialmente, a un intero organismo
- **cellule staminali pluripotenti** possono differenziarsi in uno dei tre foglietti embrionali (mesoderma, ectoderma ed endoderma) ma non possono generare un intero individuo
- **cellule staminali multipotenti** generano un limitato numero di tipi cellulari (come le cellule staminali ematopoietiche, che producono le cellule del sangue)

Le terapie con le cellule staminali

È possibile, almeno in teoria, avere a disposizione una riserva per **differenziare diversi tipi di cellule** o addirittura interi **organi**.

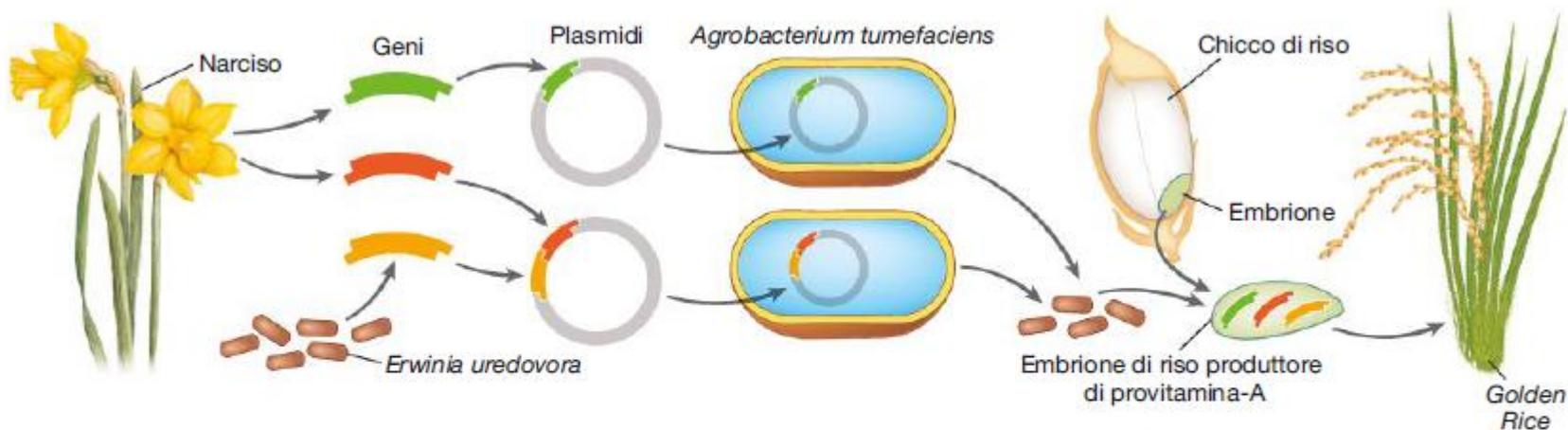
Tuttavia esistono le cellule staminali embrionali umane (pluripotenti) possono essere prodotte solo generando in vitro embrioni umani, una procedura che pone importanti questioni di ordine etico.

Le biotecnologie offrono una soluzione a questi problemi, permettendo di generare un terzo tipo di cellule staminali, dette **staminali pluripotenti indotte (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cells*)** che si ottengono dalla riprogrammazione di cellule adulte già differenziate.

Le applicazioni delle biotecnologie in agricoltura

È possibile ingegnerizzare piante agro-alimentari per dotarle di nuove caratteristiche vantaggiose, come:

- la **resistenza ai parassiti**
- la presenza di particolari **nutrienti**



1. Due geni sono estratti dalla pianta del narciso e uno dal batterio *Erwinia uredovora*.

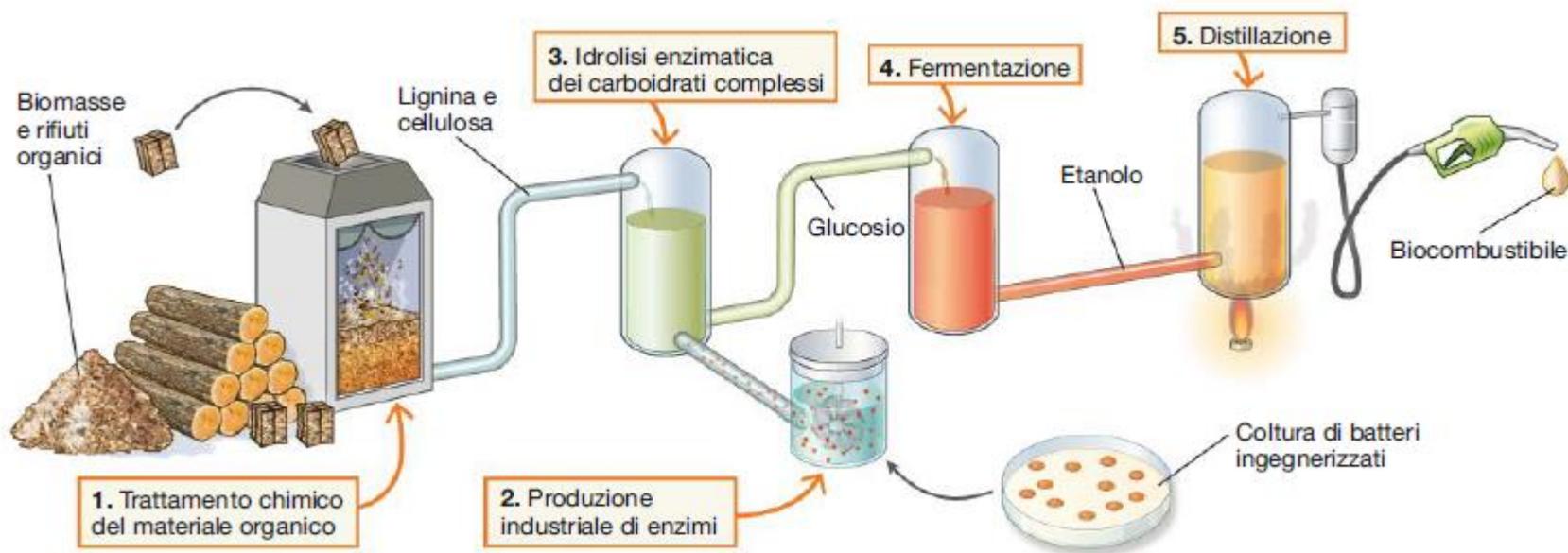
2. I geni e i loro promotori sono inseriti in plasmidi che poi vengono incorporati da *Agrobacterium tumefaciens*.

3. *A. tumefaciens* è messo in coltura con degli embrioni di riso, nei quali trasferisce i geni di interesse.

4. L'embrione si sviluppa e forma i semi, che sono seminati per dare colture transgeniche ricche di β -carotene, un precursore della vitamina A.

La produzione di biocombustibili

I **biocombustibili** (bioetanolo e biodiesel) possono essere sintetizzati per fermentazione a partire da masse vegetali. Si usano **microrganismi OGM** in grado di degradare la cellulosa e sintetizzare gli acidi grassi.



Le biotecnologie per l'ambiente

La possibilità di riprogrammare il metabolismo delle cellule trova importanti applicazioni anche nella lotta all'inquinamento come il sistema per il **biorisanamento**.

Tra gli inquinanti più pericolosi e difficili da eliminare ci sono i metalli pesanti, per i quali si possono usare batteri OGM immobilizzati in **biofiltri**.

