

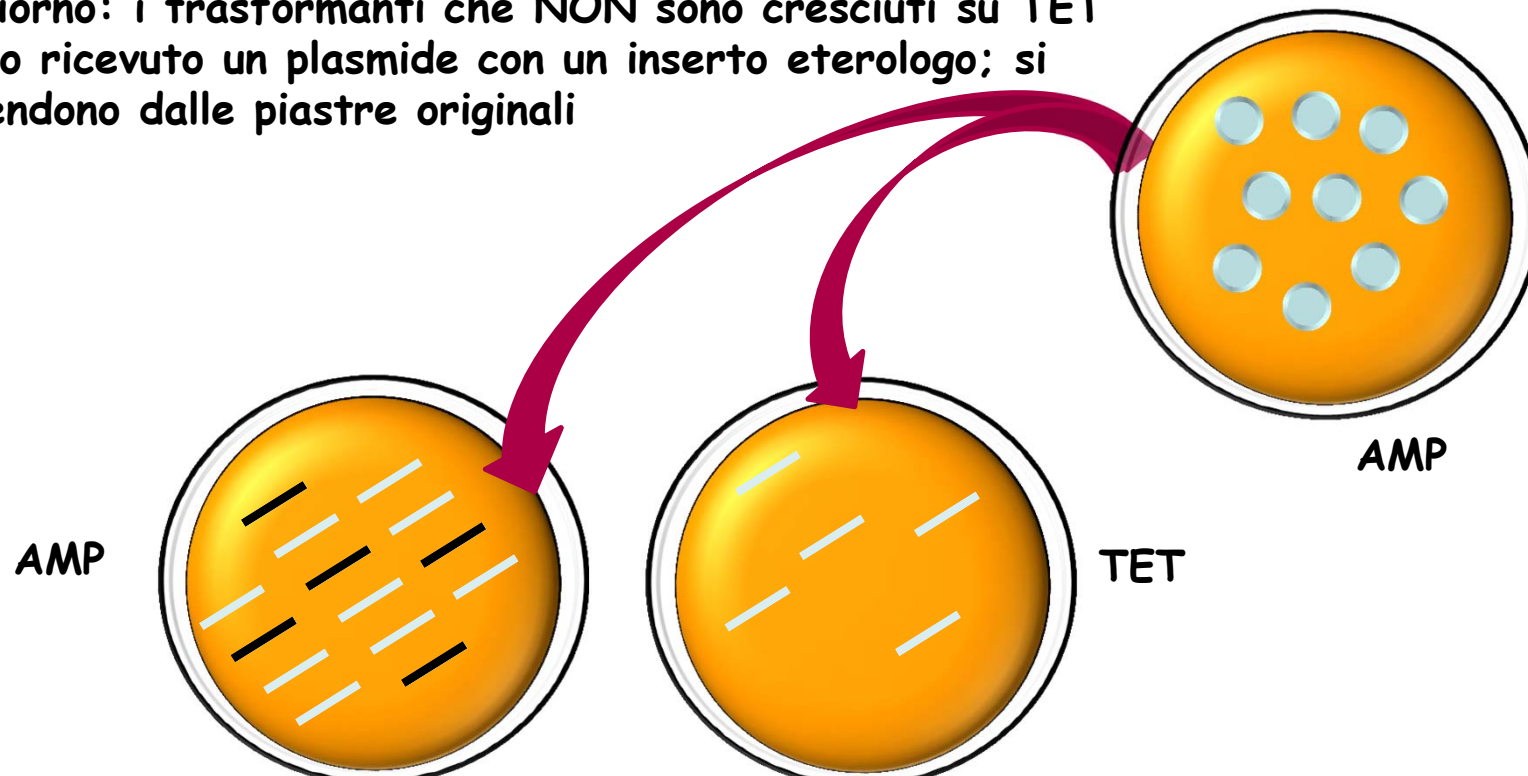
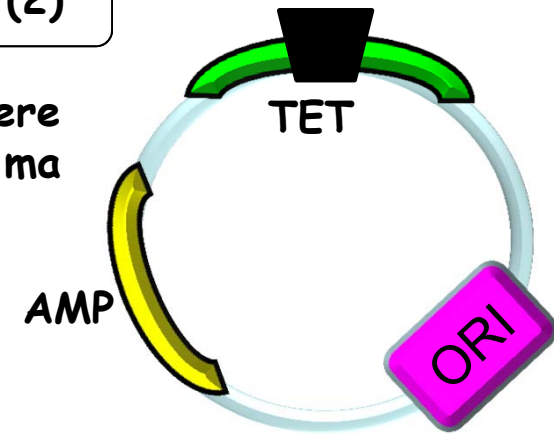
MARCATORI DI SELEZIONE (2)

I determinanti di antibiotico-resistenza possono essere usati anche come seconda selezione (vecchi plasmidi) ma questa scelta comporta tempi più lunghi

ES: clonazione all'interno di TET, interrompe il gene

1° Giorno: dopo la trasformazione: selezione su AMP:
crescono tutti i trasformanti che hanno ricevuto un plasmide; si inoculano su TET

2° Giorno: i trasformanti che NON sono cresciuti su TET
hanno ricevuto un plasmide con un inserto eterologo; si riprendono dalle piastre originali

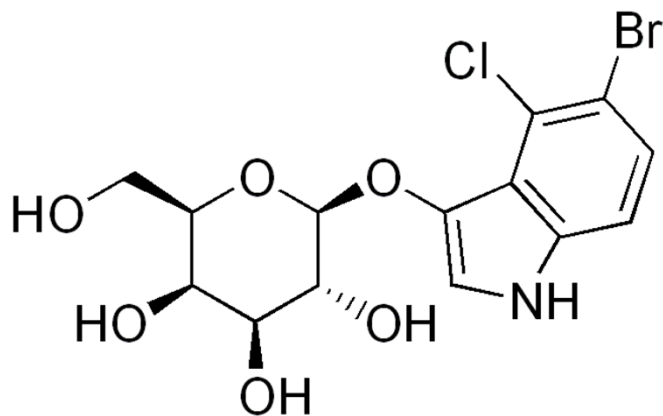
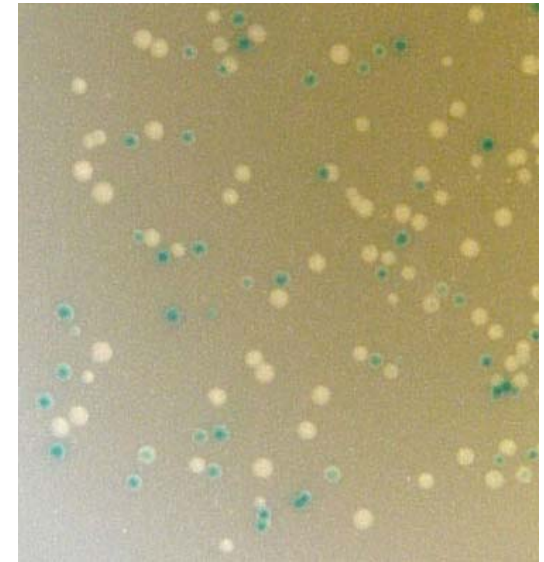


MARCATORI DI SELEZIONE (2)

I più usati sono marcatori che conferiscono attività enzimatiche rilevabili con metodi istochimici

α -peptide della β -galattosidasi (bianco/blu)

Richiede un ceppo ospite difettivo e complementabile

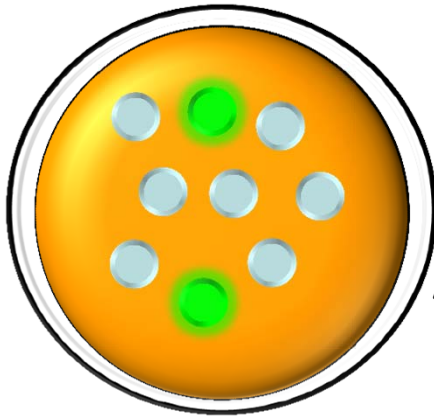


Reattivo: X-gal
(5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside)

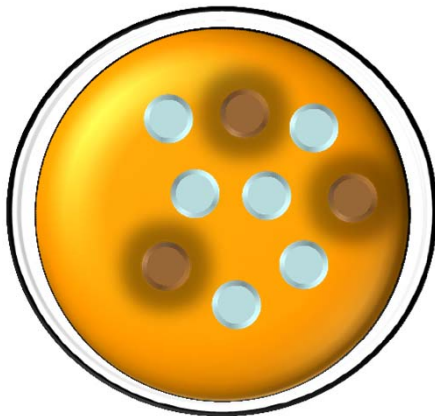
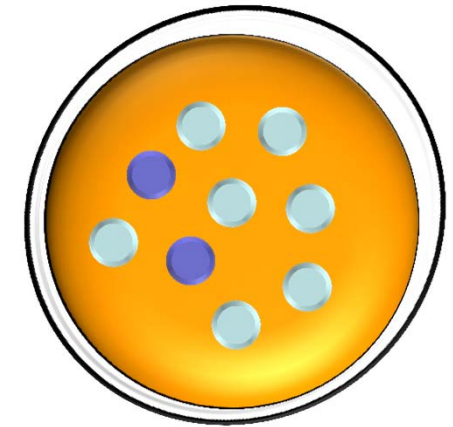
L'inattivazione inserzionale si attua clonando all'interno del gene che codifica il marcatore

Esempi di altri sistemi che possono essere usati con qualunque ceppo

L'inattivazione inserzionale si attua clonando tra il promotore e il gene che codifica il marcatore



phoC (*Morganella morganii*): rivelabile con verde metile + fenolftaleina difosfato nel terreno o con BCIP (5-bromo-4-Cloro-3 indolil-fosfato)



Pigmento melanino-simile di *Streptomyces*,
rivelabile con tirosina nel terreno

PROMOTORI

UN BUON PROMOTORE DEVE ESSERE:

FORTE

$T_{78}T_{82}G_{68}A_{58}C_{52}A_{54}$ -35	--	$16_{21}17_{52}18_{19}$ spaziatore	--	$T_{82}A_{89}T_{52}A_{59}A_{49}T_{89}$ Pribnow (-10)
---	----	---------------------------------------	----	---

FUNZIONALE IN CEPPI DI
E. COLI DIVERSI

INDUCIBILE
IN MODO

SEMPLICE

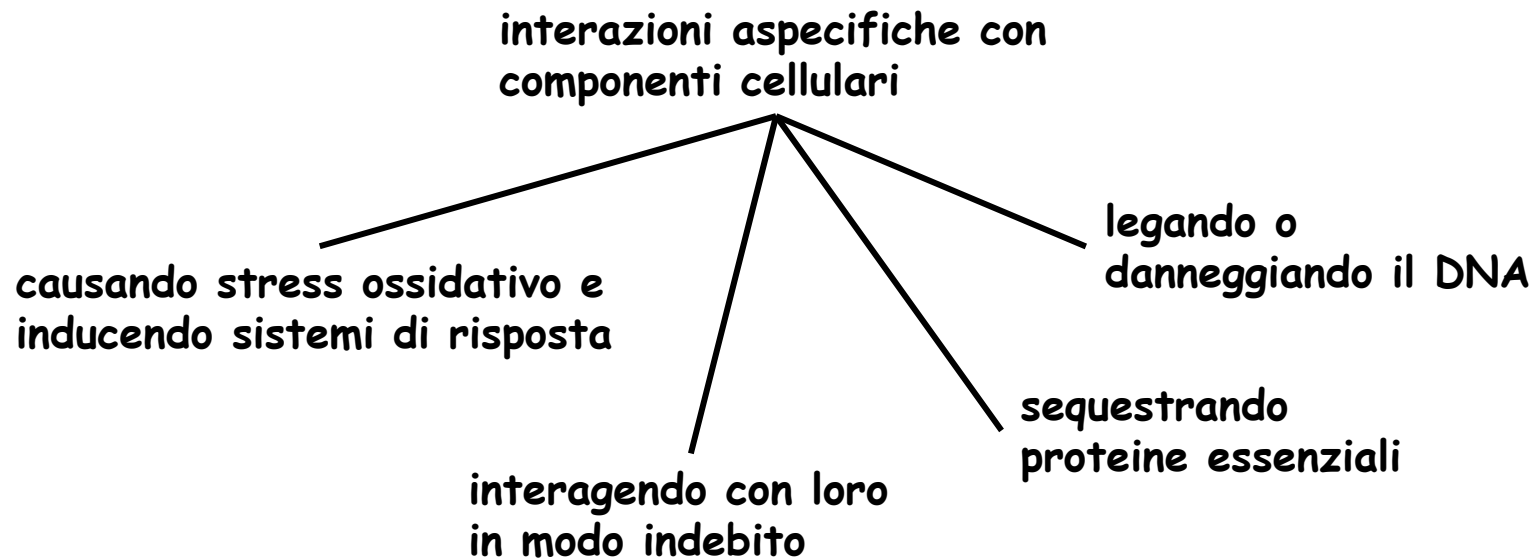
ECONOMICO

INDIPENDENTE DAI NORMALI
COMPONENTI DEI TERRENI DI COLTURA

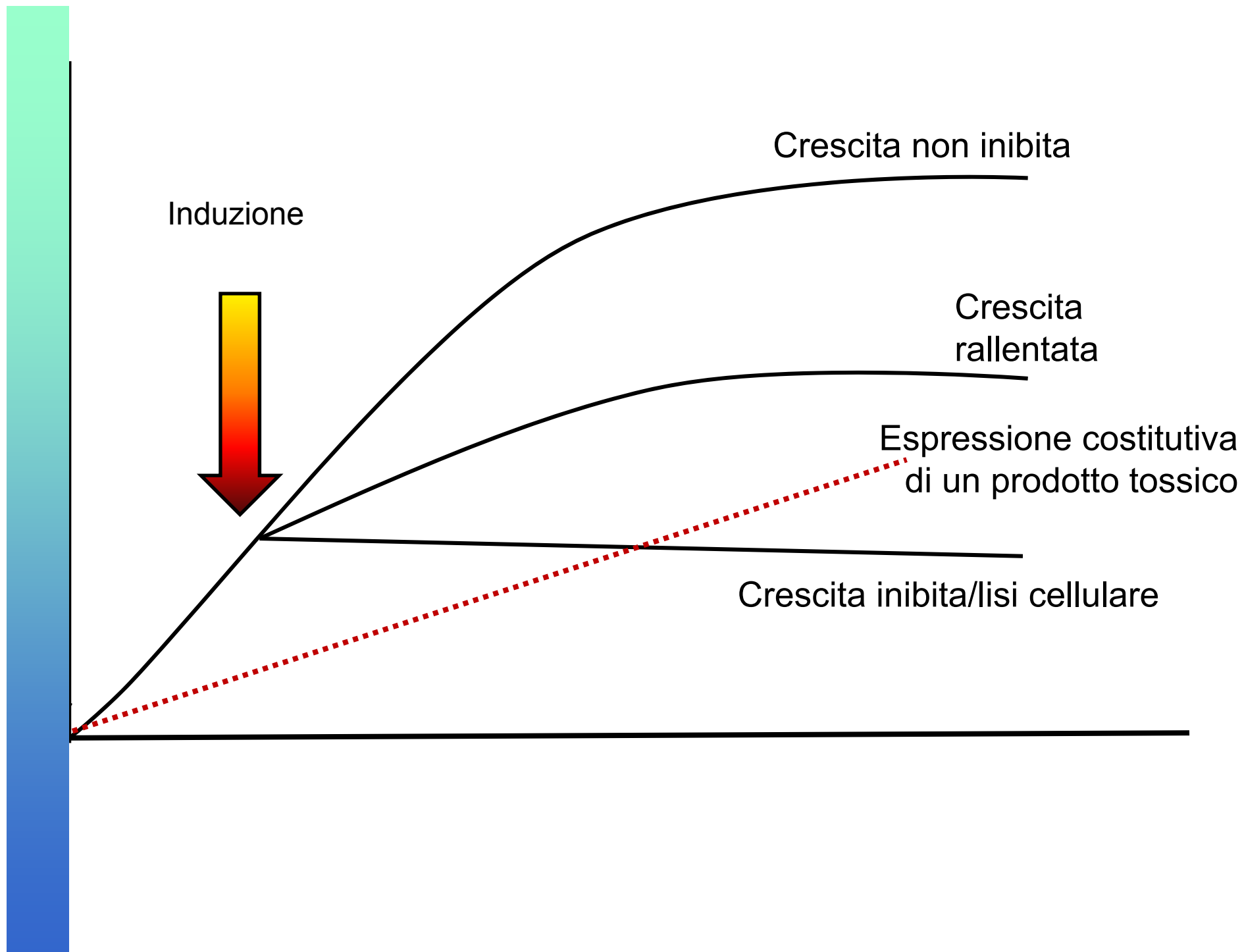
REGOLAZIONE NECESSARIA PERCHE'

Presenza di proteine estranee → attivazione di proteasi

Tossicità del prodotto



la regolazione permette di ottenere una buona crescita
prima che il prodotto venga espresso



REGIONE SD-INIZIO ORF

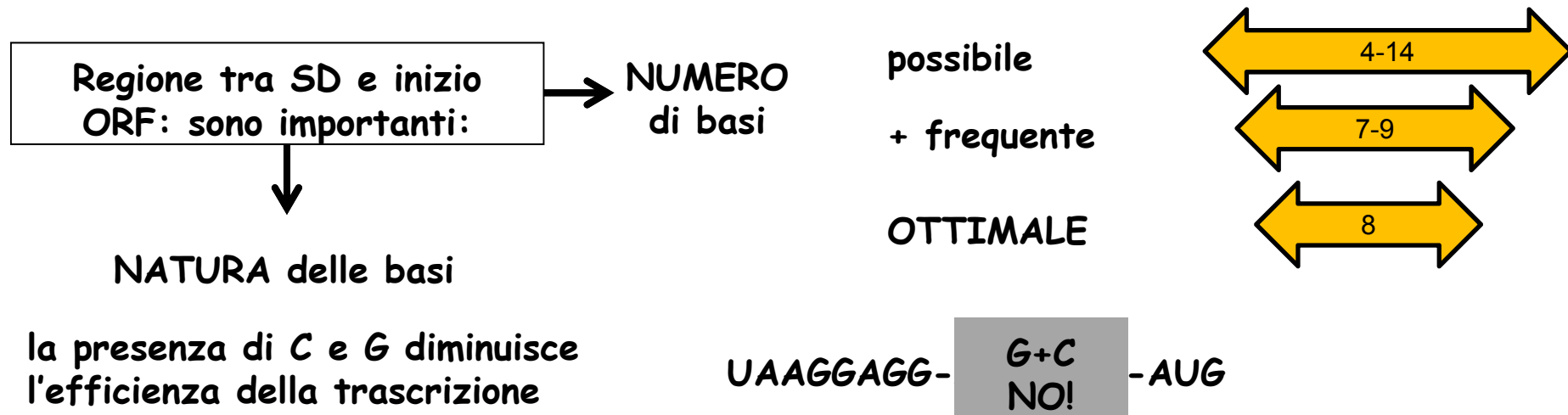
consensus 5'-UAAGGAGG-3'

Una buona sequenza SD, in *E. coli*, deve essere di 6-8-bp

Il codone di inizio della ORF è in genere AUG

In specie microbiche con G+C elevato può essere GUG

Per l'espressione in *E. coli*, in questi casi, conviene modificare il codone d'inizio



devono essere assenti palindromi che possano mascherare SD o coinvolgere l'inizio della ORF

NO! {

ccugaauUAAGGAGGnnnnnnnAUGauucagg

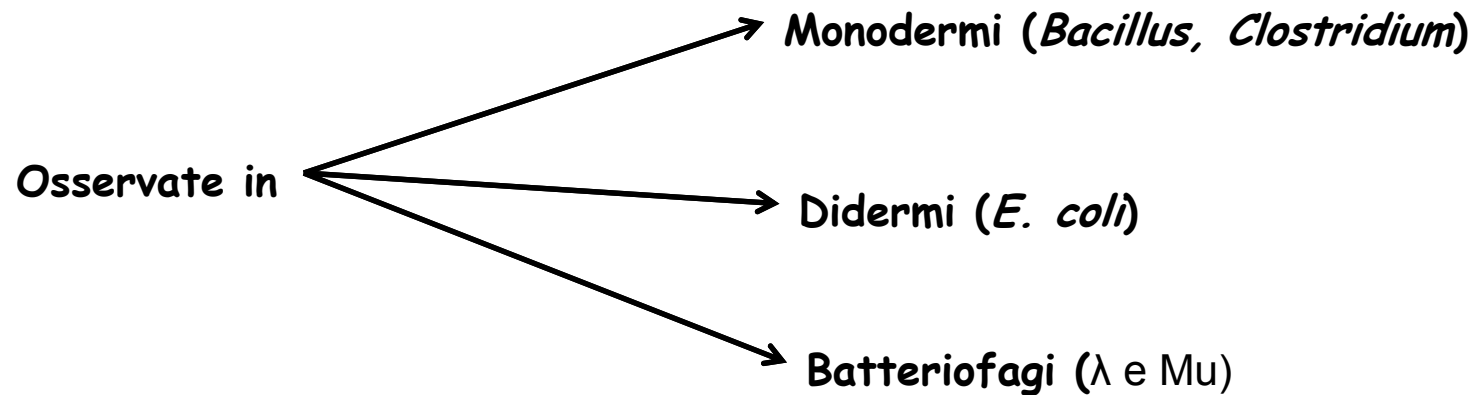
UAAGGAGGacucgagaAUGnnnnnnnnnucucgagu

SEQUENZE "UP"

SEQUENZE RICCHE DI "A" E DI "T" SITUATE A MONTE DELLA -35

Aumentano il livello di espressione (30-70%)

si legano alla subunita' "α" della RNA polimerasi



Meno conservate di -35 e -10

consensus [-59 nnAAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTTnnAAAAnnn -38]

Promotori più usati in *E. coli*

lac promoter

INDUZIONE: IPTG

RESA: MEDIO-BASSA

REGOLAZIONE: INSUFFICIENTE

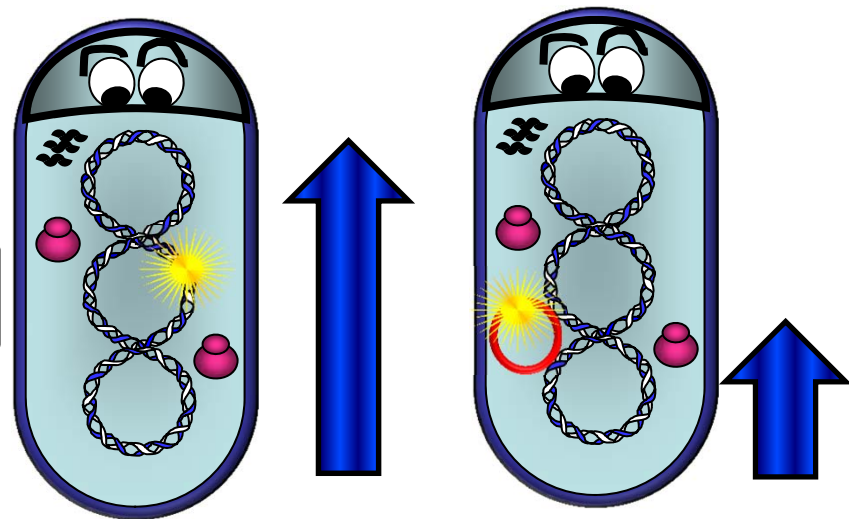
Adatto per espressioni di
livello MODERATO

Plac tende ad essere "leaky"
(è difficile sopprimere l'espressione basale)

Particolarmente se il repressore
non è sullo stesso plasmide

Induzione con IPTG -
relativamente costosa (lattosio)

In laboratorio l'induzione non è
realmente necessaria



tacI

-35

-10

trp = TTGACA TTAACT

tac I

TTGACA

TATAAT

AATTGTGAGCGGATAACAATT

RBS

Hind III

*Eco*RI
*Xba*I

lacUV5

TTTACA

TATAAT

AATTGTGAGCGGATAACAATT

Operatore lac UV5

INDUZIONE: IPTG

RESA: MEDIO-ALTA (5x rispetto ai parentali)

REGOLAZIONE: POSSIBILE (LAC I)

ESPRESSIONE BASALE: ALTA

Ottiene una buona resa anche
se inferiore a quella del T7

La sua forza può essere un
problema con prodotti tossici e
proteine di membrana

AraBAD

dirige l'espressione dell'operone ARA è strettamente regolabile, e rappresenta un'utile alternativa per la produzione di proteine eterologhe in *E. coli*

Arabinosio: molto economico compatibile con le procedure GMP



l'espressione basale praticamente assente se manca l'arabinosio e c'è glucosio, compensa la relativa debolezza strutturale del promotore

CTGACG -- 18 -- TACTGT *araBAD*

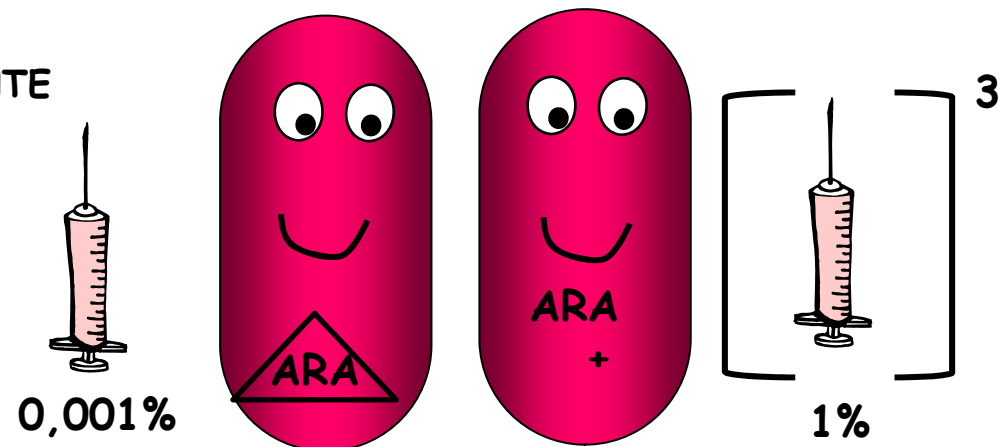
TTGACA -- 17 -- TATAAT consensus

INDUZIONE: ARABINOSIO, DOSE DIPENDENTE

RESA: MODULABILE

REGOLAZIONE: STRETTA

ESPRESSIONE BASALE: BASSA



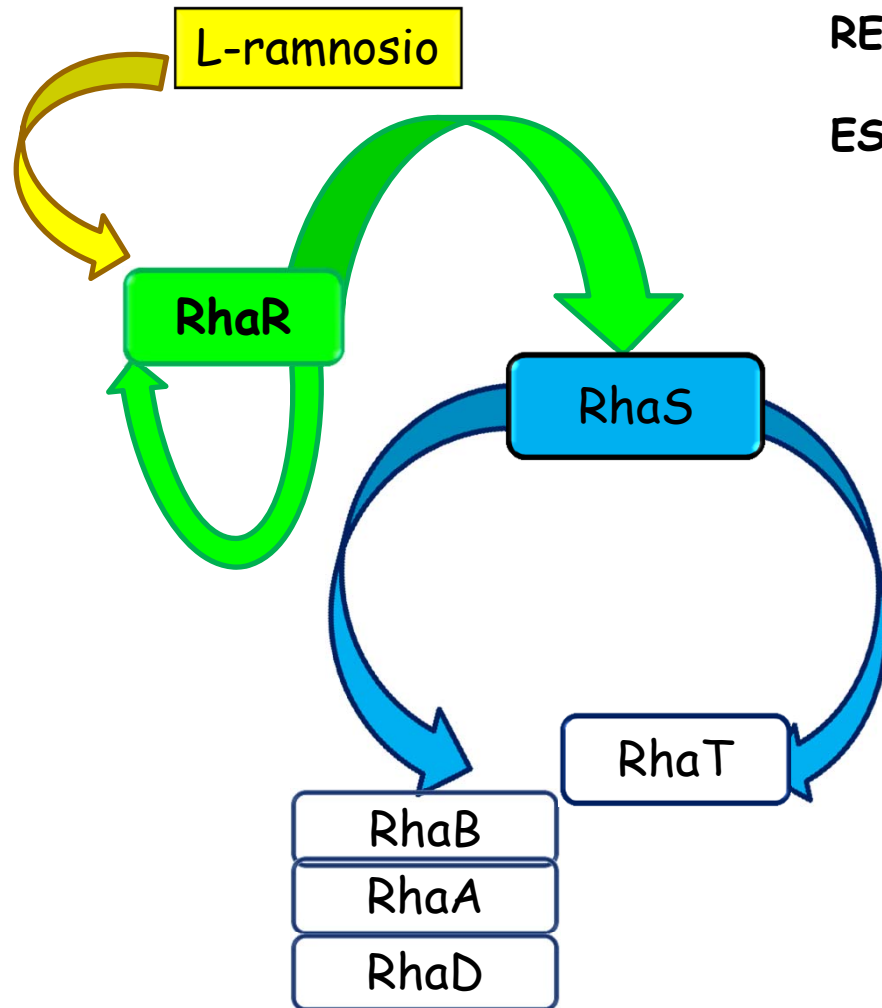
$rhaP_{BAD}$

INDUZIONE: RAMNOSIO

RESA: MEDIA

REGOLAZIONE: COMPLESSA E STRETTA

ESPRESSIONE BASALE: BASSA



RhaR attivatore trascrizionale 1,
RhaS regola positivamente tutto il
regulone (catabolismo: BAD e trasporto
RhaT)

Il regulone, però, è anche soggetto
alla repressione da catabolita

i tempi per l'induzione e la raccolta del
prodotto vanno scelti accuratamente

tetA

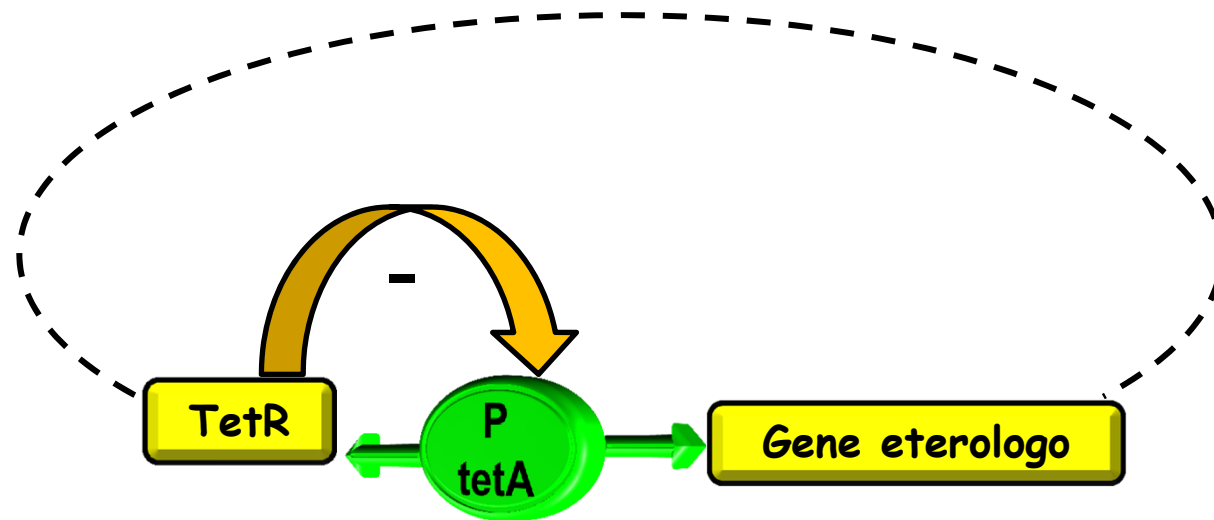
**INDIPENDENTE DAL CEPPPO E DALLO STATO
METABOLICO/ INDUTTORE POCO COSTOSO**

INDUZIONE: ANIDROTETRACICLINA

RESA: MEDIO-ALTA

REGOLAZIONE: STRETTA

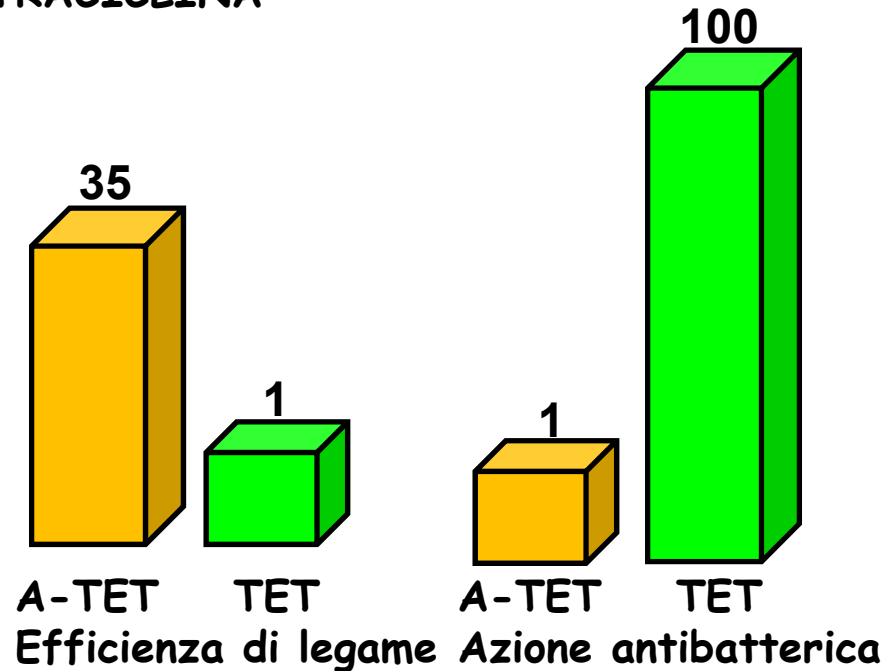
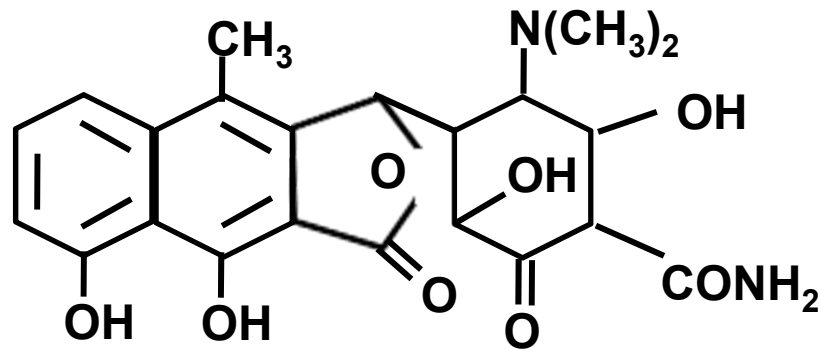
ESPRESSIONE BASALE: BASSA



regolazione molto stretta + livelli di espressione alti

**Il gene del repressore è sul plasmide: il sistema è indipendente
dal tipo di ceppo**

L'induzione avviene con basse concentrazioni di
ANIDROTETRACICLINA



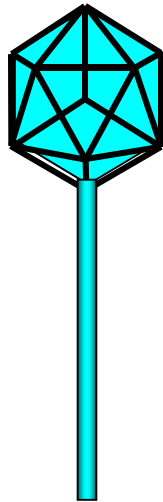
la piena induzione (~50 ng/ml) non ha effetto sulla crescita di *E. coli*

Sistema usato con successo per la produzione di
molte proteine (Fab, tossine..)

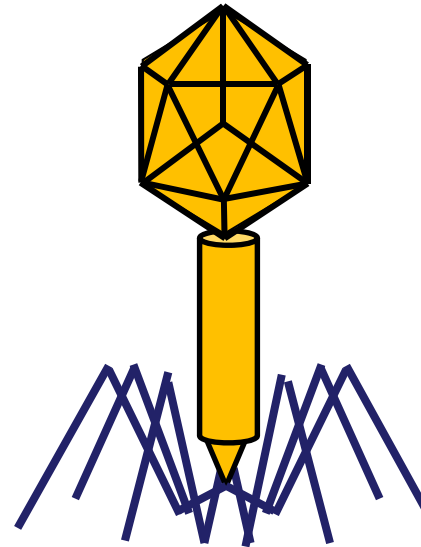
$$\frac{\text{Cellule non indotte}}{\text{Cellule indotte}} = \frac{1}{100}$$

PROMOTORI FAGICI

Un'alternativa ai promotori regolati di geni metabolici è stata cercata nei promotori fagici



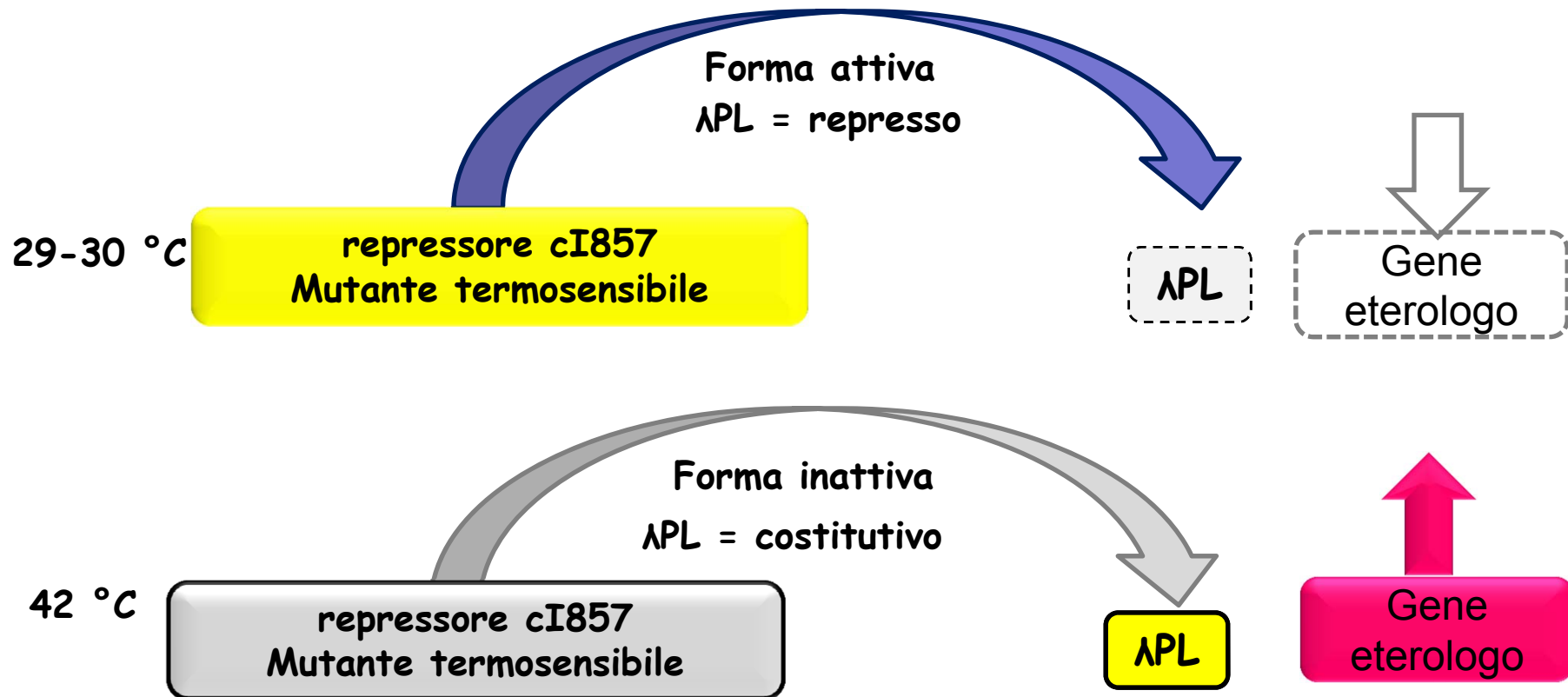
LAMBDA



T 7

λP_L

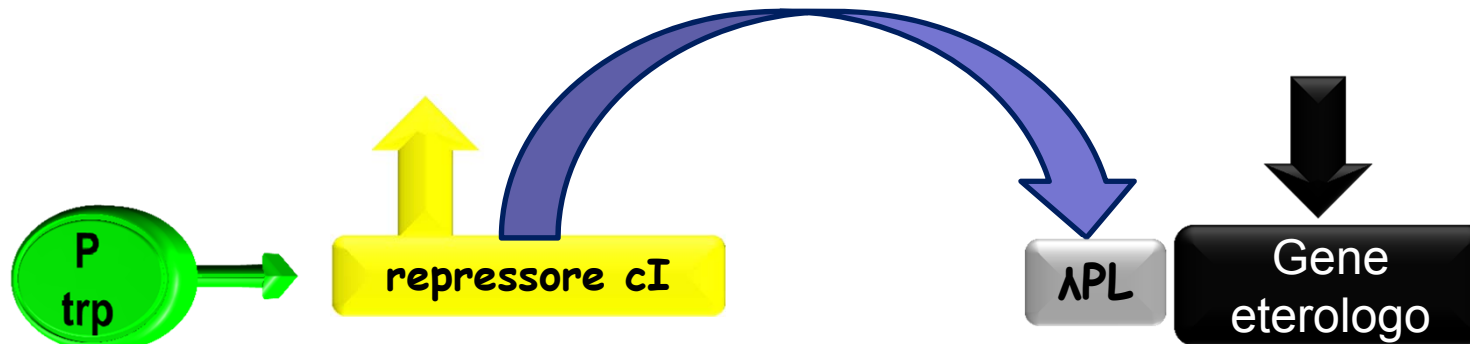
il promotore-operatore del fago Lambda OL/PL, assicura livelli di espressione medio-alti; E' RICONOSCIUTO DALLA POLIMERASI BATTERICA. Un modo di controllarlo è attraverso un mutante termosensibile (C→T in 37742) del repressore di lambda:



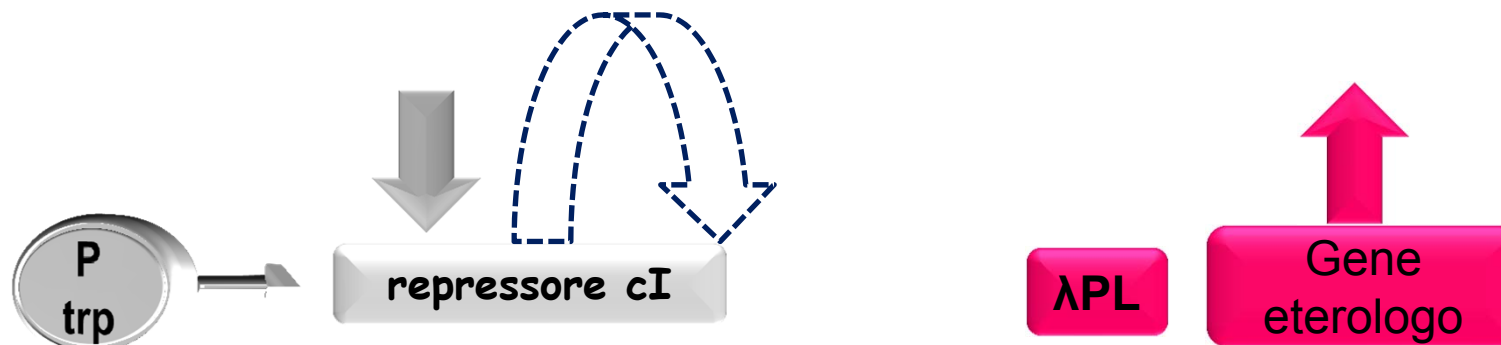
può essere impiegato per le proteine suscettibili alla proteolisi che sarebbero degradate a temperature più vantaggiose per la crescita

Un'alternativa all'uso del mutante termosensibile è mettere cI (wild) sotto il controllo del promotore P_{Trp}

Si usa un terreno a base di melassa e idrolisato acido di caseina
Economico e praticamente privo di triptofano
Assenza di triptofano: espressione di cI , repressione di λPL



Aggiunta di triptone al mezzo di coltura
(digesto triptico di caseina, particolarmente ricco di triptofano)
Presenza di triptofano $\rightarrow$ repressione dell'espressione di cI $\rightarrow$ derepressione di λPL

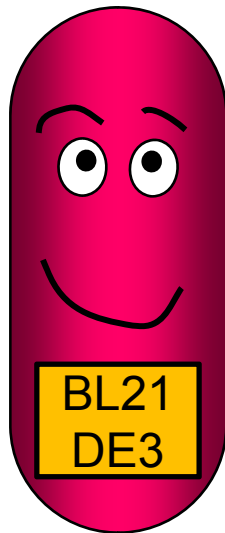


$\rightarrow$ espressione del gene eterologo

T7 RNA polimerasi

LA RNA POLIMERASI DI T7 E' PIU' VELOCE DI QUELLA DI *E.coli* E RICONOSCE PROMOTORI DEL TUTTO DIVERSI

Per questo sistema serve un ospite che esprima la T7 RNA polimerasi, in modo regolato

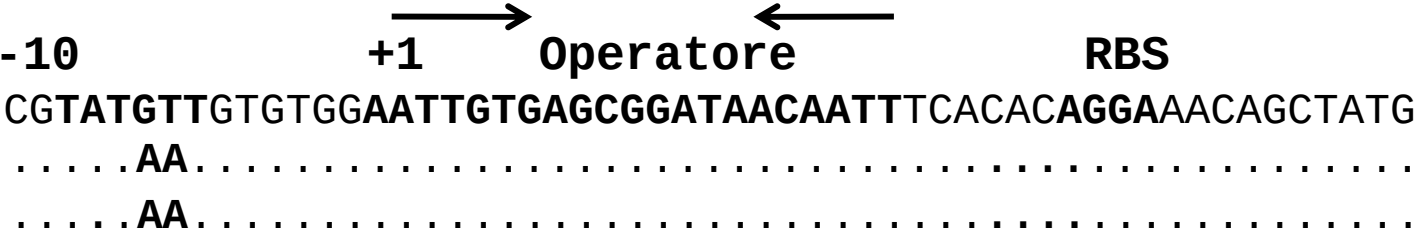


Il più usato è BL21 (DE3)

Un ceppo reso lisogeno con il mutante DE3 di Lambda

Nel λ DE3 la T7 polimerasi è sotto il controllo del promotore L8-UV5
con una mutazione puntiforme (-66) nel sito di legame a CAP

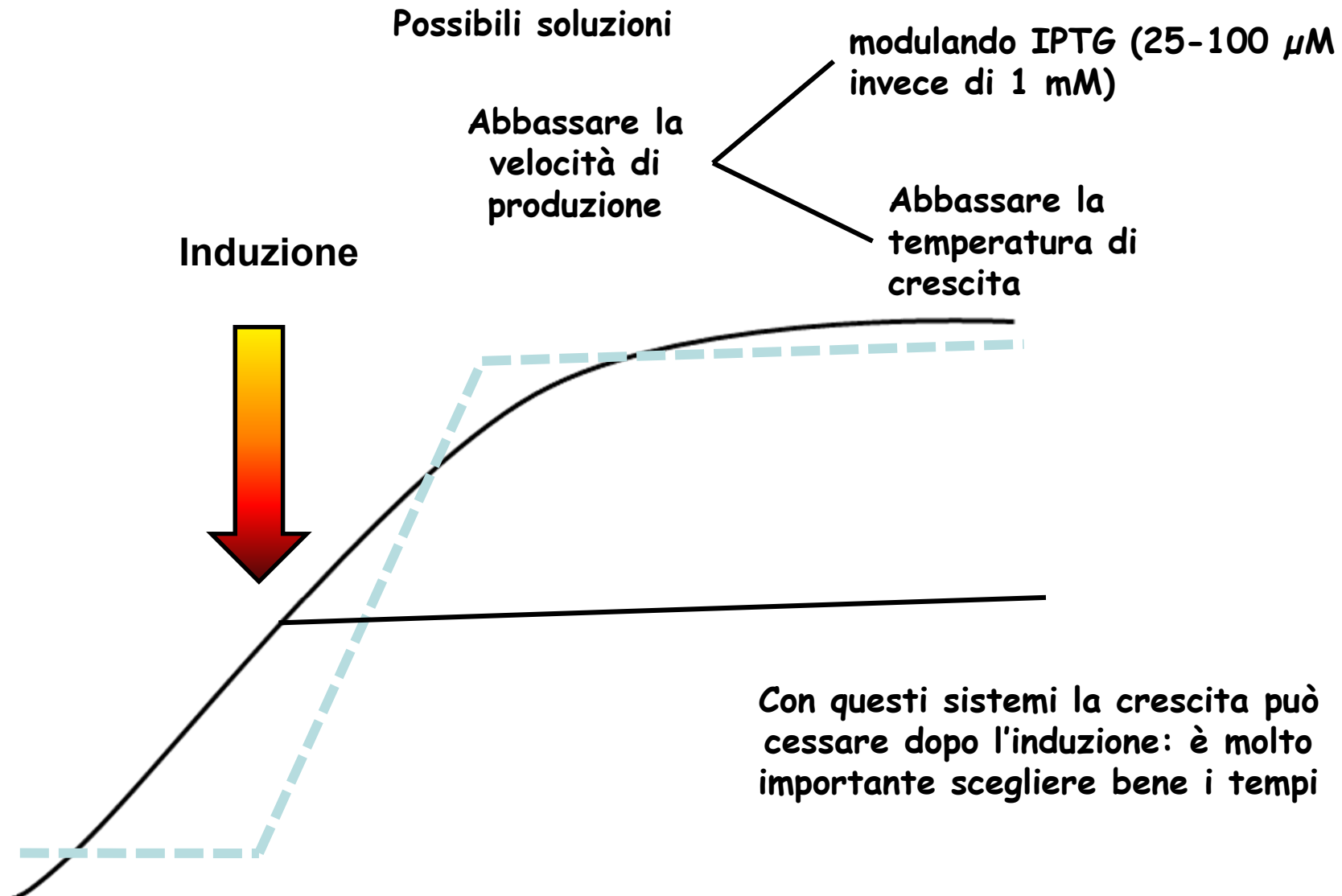
questa mutazione diminuisce l'influenza del livello di cAMP
e rende il promotore meno sensibile al glucosio

	-65		-35
WILD	TGT G AGTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTT A CACTTTATGCTTCCGGCT		
L8-UV5	... G		
UV5	... A		
			
	-10	+1	RBS
WILD	CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG		
L8-UV5	AA.....		
UV5	AA.....		

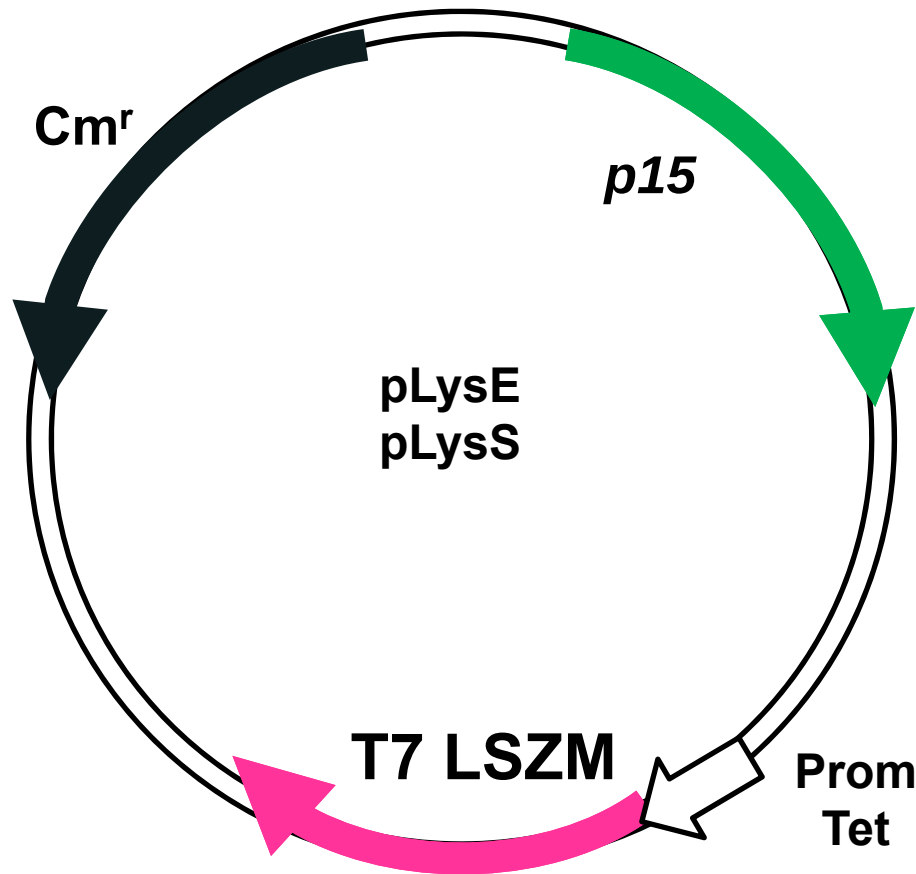
Il livello di cAMP aumenta con la densità della coltura: la mutazione rende il
promotore anche meno "leaky" in fase stazionaria

Inducendo con IPTG è' possibile ottenere una buona resa
anche se c'è glucosio nel terreno

L'espressione guidata da T7 può provocare a volte un certo grado di aggregazione delle proteine prodotte



Nonostante la regolazione stretta, una certa attività basale può sfuggire, specialmente in terreni ricchi



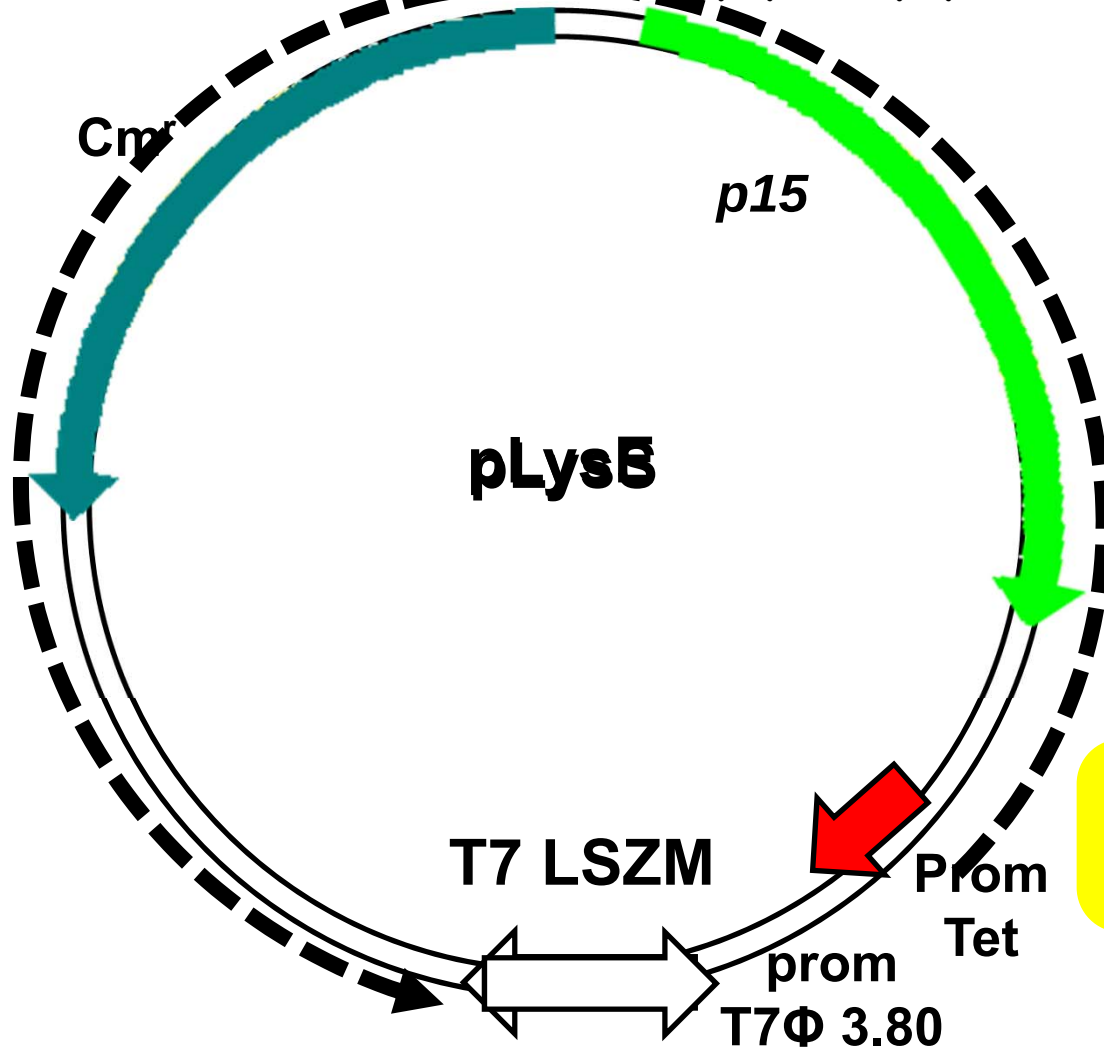
Un controllo ulteriore si può esercitare con il gene del lisozima di T7

inserito su pLysE e pLysS

Il lisozima si lega direttamente alla T7 RNA polimerasi, abbassandone l'attività

Ma rallenta la crescita dell'ospite perché taglia un legame specifico nel peptidoglicano e rende le cellule più fragili

L'unica differenza tra pLysE e pLysS è l'orientamento di T7 LSZM



Ma è una differenza importante

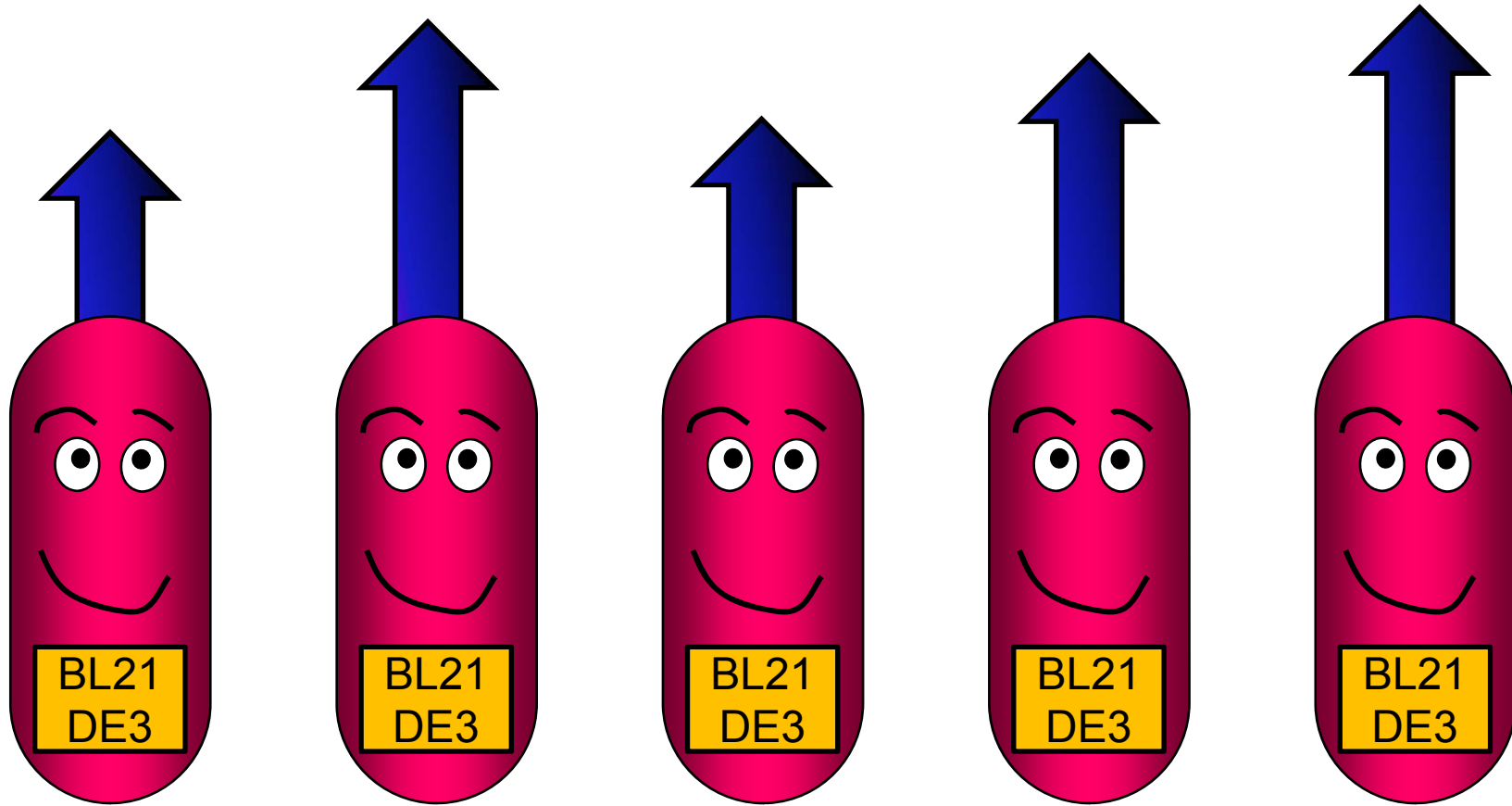
In pLysE il gene è trascritto dal promotore Tet, forte

La quantità di lisozima è eccessiva

In pLysS il gene è trascritto da un promotore debole A VALLE del gene, insieme a tutto il plasmide

La quantità di lisozima è idonea

l'espressione basale di T7 RNA polimerasi non è di solito un problema grave, ma lo può diventare se il prodotto è tossico

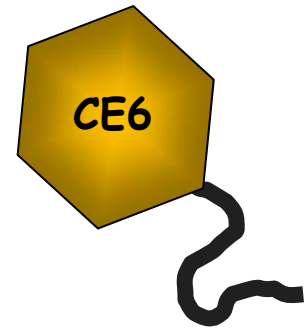


L'altro svantaggio è una certa variabilità dell'espressione dei trasformanti che rende necessario esaminarne un numero elevato

Per risolvere questo problema sono stati proposti alcuni approcci alternativi

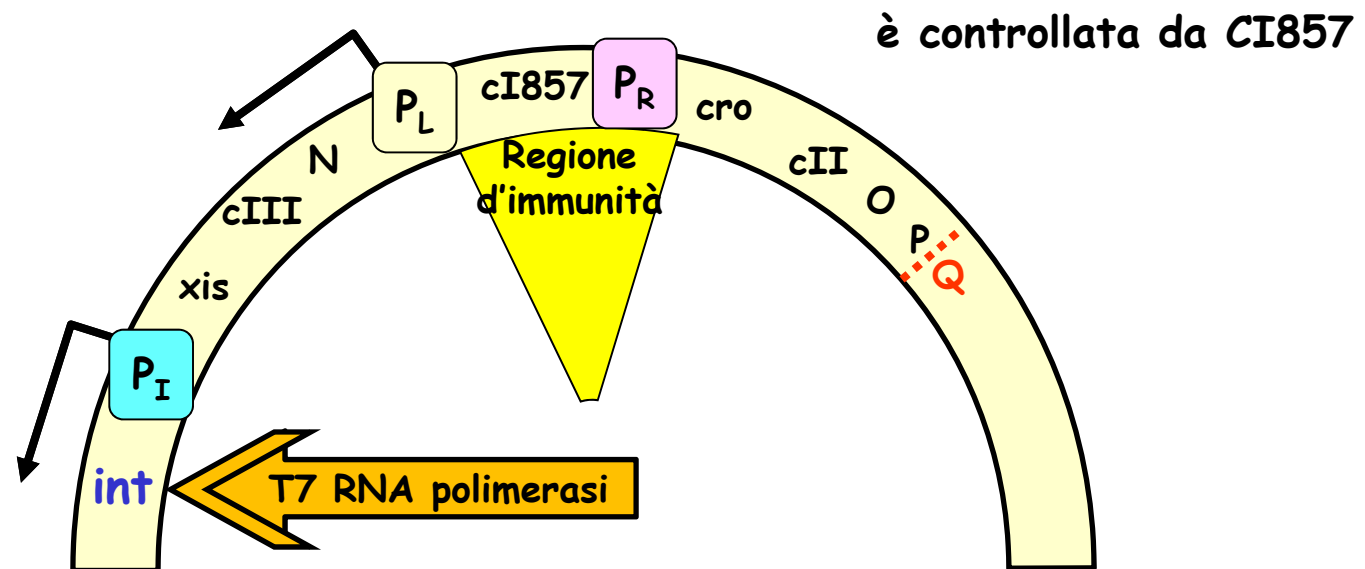
L'IMPIEGO DEL BATTERIOFAGO CE6

Per eliminare del tutto l'espressione basale, si possono usare ospiti **PRIVI** del gene della T7 RNA polimerasi, e infettarli, al momento opportuno, con il fago litico CE6.



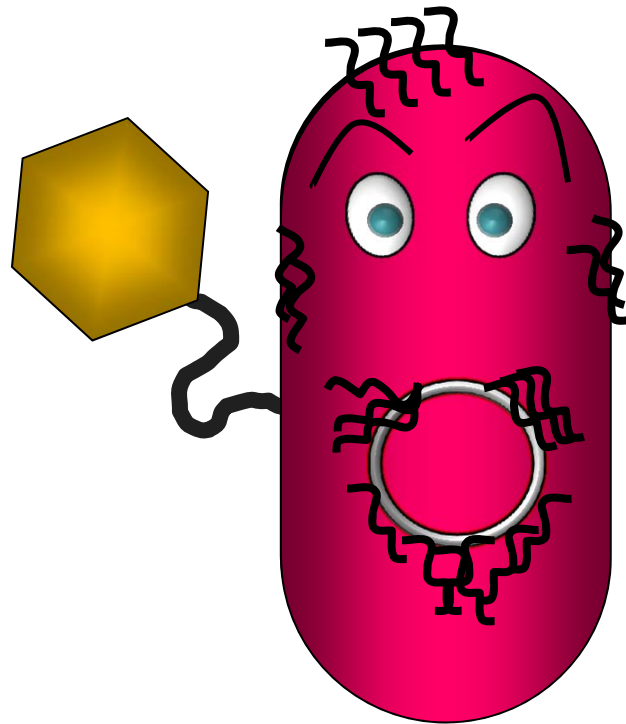
Il processo litico di λ CE6 è ostacolato dalla mutazione "Sam" ($A \rightarrow G$ in 45352) che porta alla perdita di funzionalità della proteina di lisi GPS

La T7 RNA polimerasi è clonata all'interno del gene *int*, in modo che sia diretta da λP_L e λP_I ,



Quando CE6 infetta la cellula, la T7 RNA polimerasi sintetizzata *de novo* trascrive il DNA bersaglio con un'efficienza elevatissima

il sistema è meno efficiente
dell'uso di ceppi lisogeni (DE3)



Ma prima dell'infezione, non c'è una polimerasi
che possa trascrivere il gene bersaglio

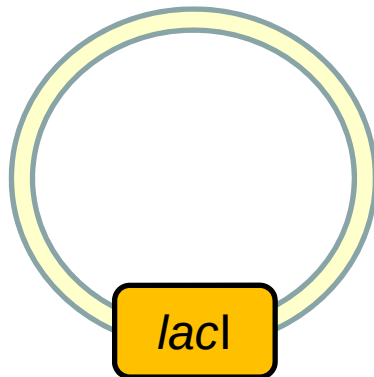
CE6 si propaga nel ceppo LE392 che sopprime la
mutazione Sam7, permettendo che si svolga il ciclo litico

la creazione di un promotore ibrido T7/lac



La trascrizione basale è bloccata da LacI

l'IPTG usato per l'induzione della T7 RNA polimerasi blocca anche l'operatore avviando la trascrizione del gene bersaglio



Nei vettori che impiegano questo sistema, il gene *lacI* si trova spesso sul plasmide, per garantire una regolazione stretta

T7/lac può essere abbinato all'uso di pLysS

TERMINATORI

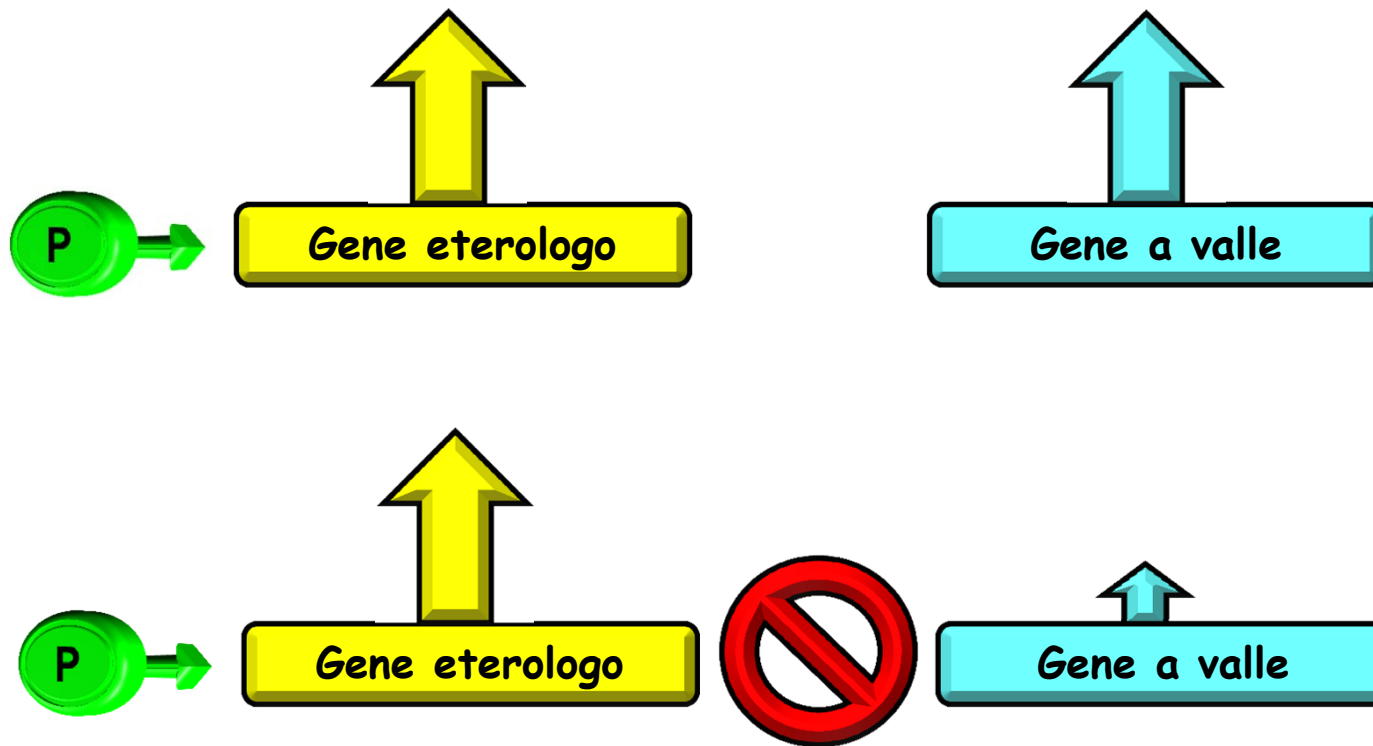
A valle del MCS, sui vettori di espressione, c'è spesso un terminatore forte, rho indipendente, che garantisce il messaggero corretto rilascio dal ribosoma

Sono palindromi seguite da una serie di A
(U all'estremità 3' del messaggero)

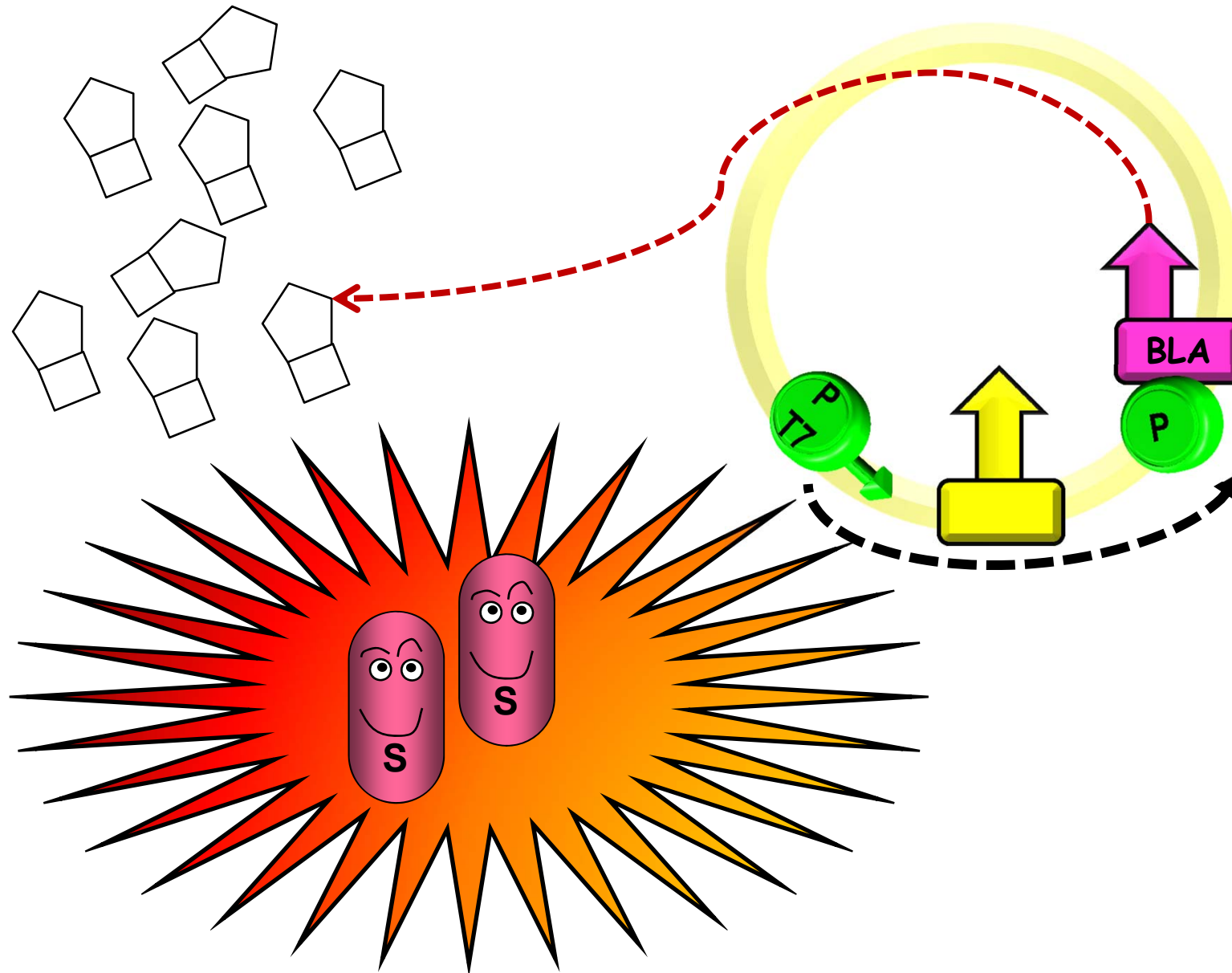
T7 <<<<<<<:::<:<<:-:-:-:-:>>:>:::>>>>>>>
AACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

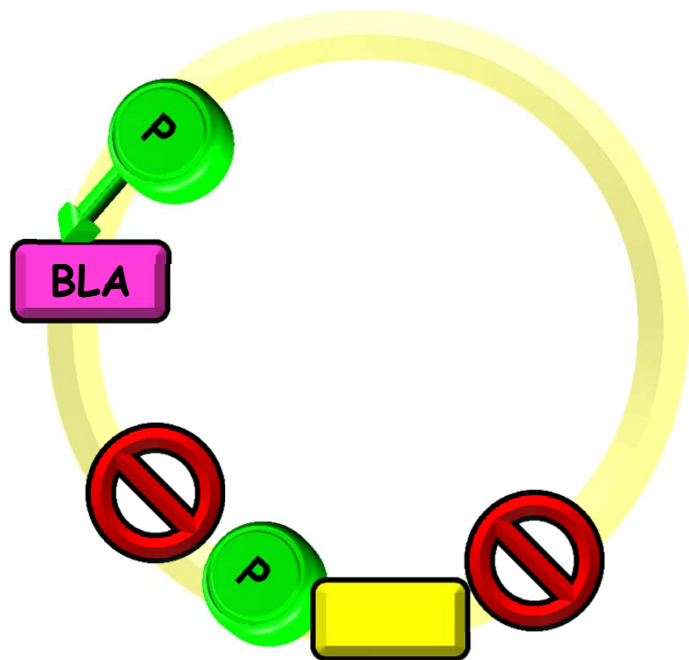
rrnD <<<<<<<<<<<<<<<<<- - - ->>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
AAAACAAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTTGT

Il terminatore impedisce che geni a valle di quello di interesse, e nello stesso orientamento, possano essere trascritti dal promotore forte



In alcuni plasmidi, per esempio, il gene che codifica la β -lattamasi, può essere trascritto dal promotore T7





può essere conveniente avere un terminatore forte anche a monte della cassetta di espressione, per evitare che trascrizioni indebite coinvolgano il gene di interesse

particolarmente consigliabile quando ci sono altri promotori orientati nello stesso senso della ORF da esprimere, anche se lontani

