

TERMINATORI

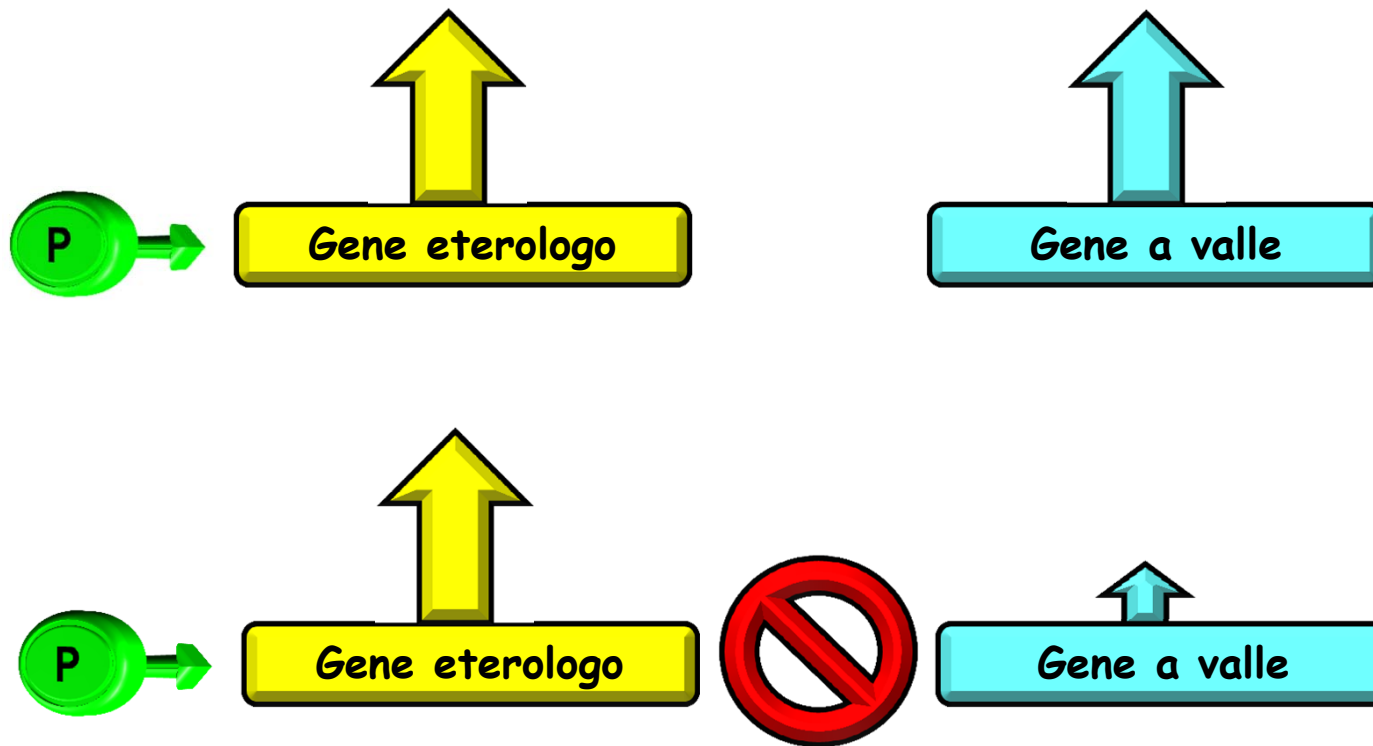
A valle del MCS, sui vettori di espressione, c'è spesso un terminatore forte, rho indipendente, che garantisce il messaggero corretto rilascio dal ribosoma

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

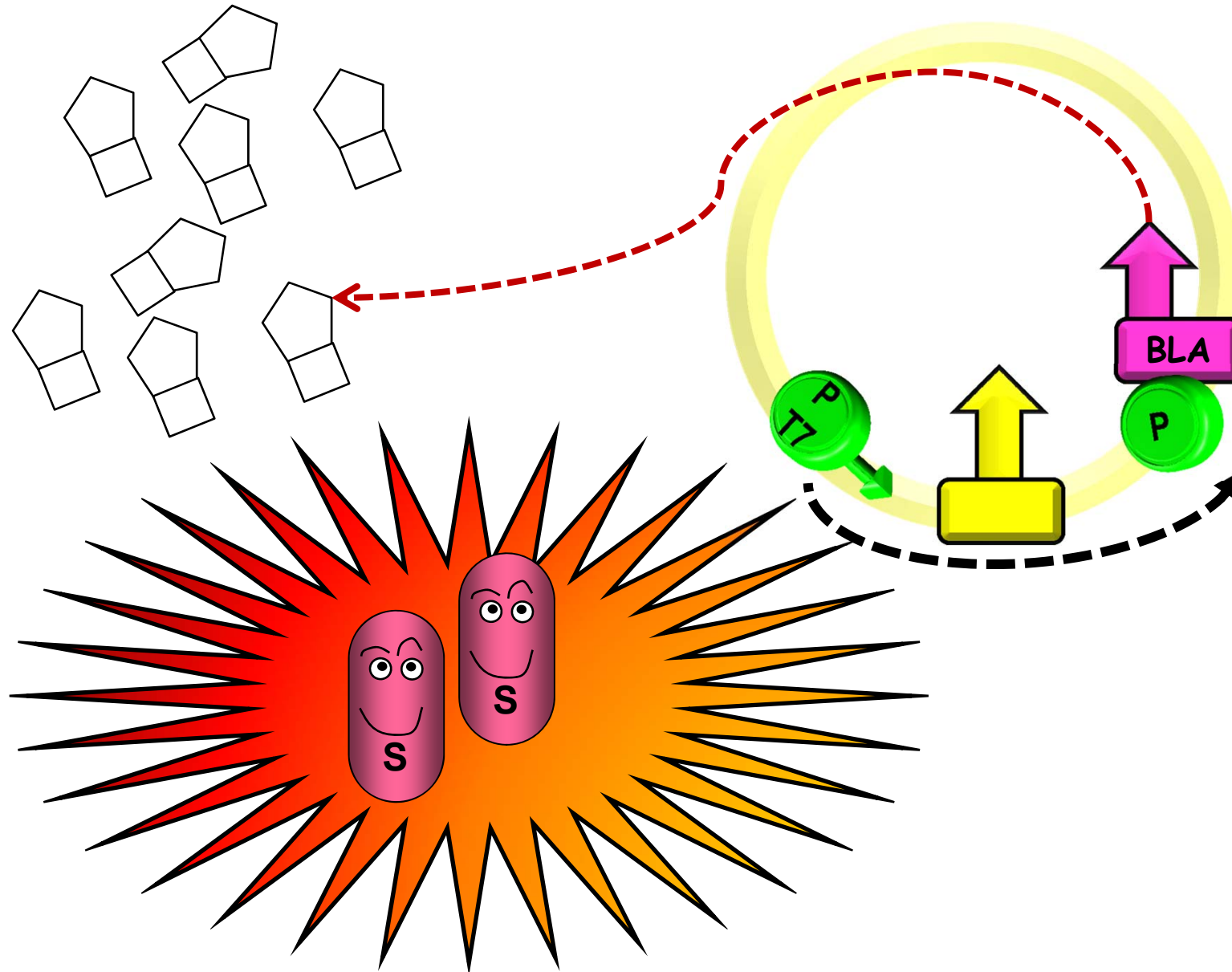
T7 <<<<<<<::<:<<:-:-:-:->>:>:::>>>>>>>
AACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

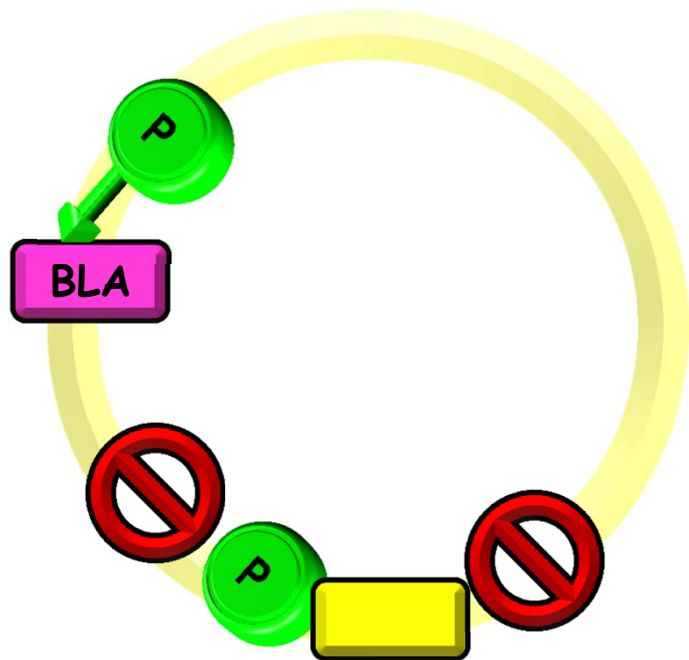
rrnD <<<<<<<<<<<<<<<<<- - - ->>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
AAAACAAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTTGT

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



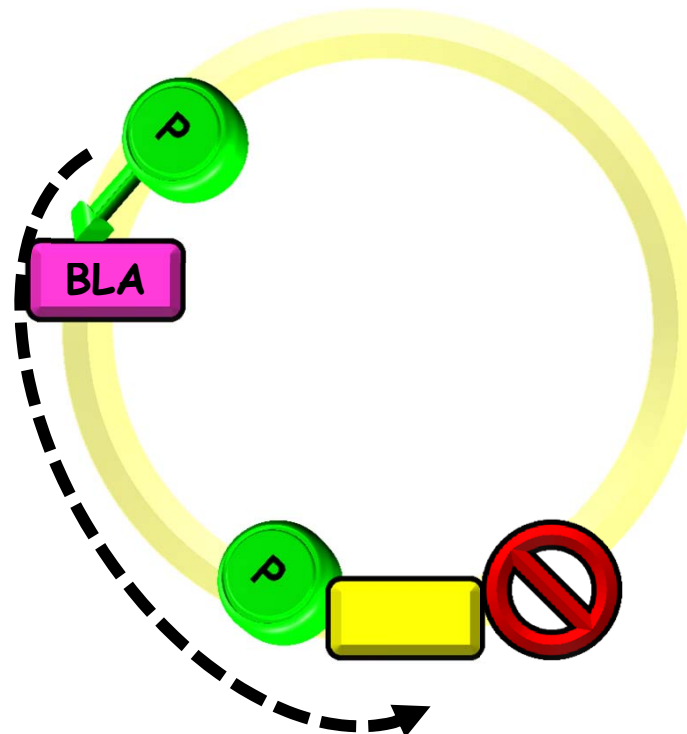
In alcuni plasmidi, per esempio, il gene che codifica la β -lattamasi, può essere trascritto dal promotore T7



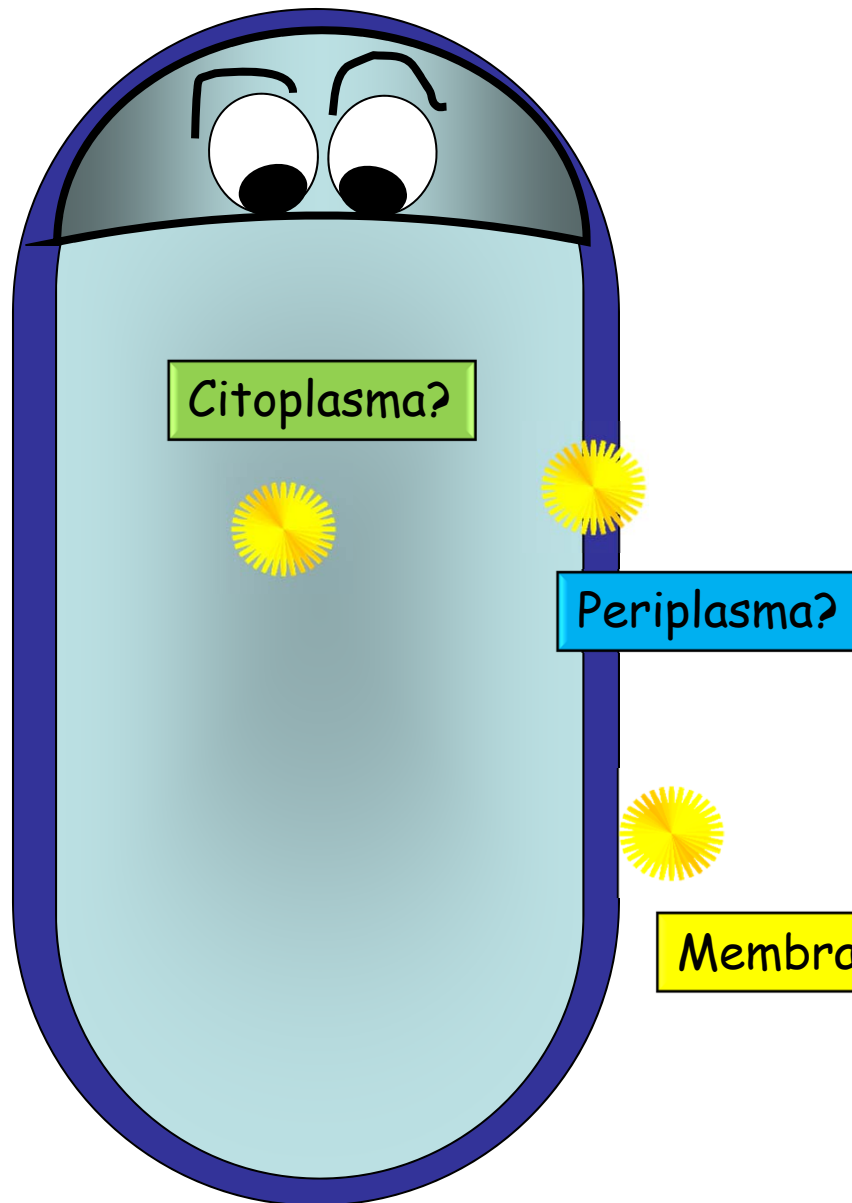


può essere conveniente avere un terminatore forte anche a monte della cassetta di espressione, per evitare che trascrizioni indebite coinvolgano il gene di interesse

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



DOVE CONVIENE LOCALIZZARE IL PRODOTTO?

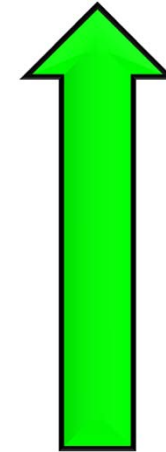


OGNI COMPARTO HA I SUOI
PREGI E I SUOI DIFETTI

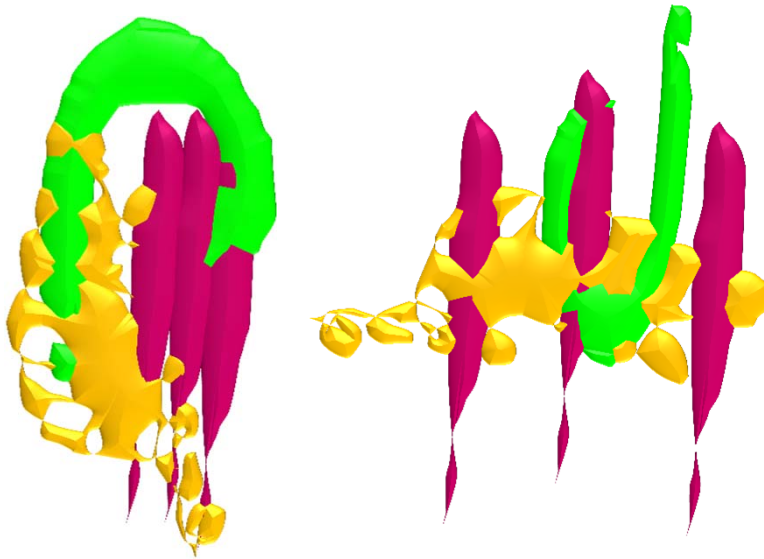
LE DESTINAZIONI Più
FREQUENTI SONO
CITOPLASMA E
PERIPLASMA

CITOPLASMA:
Ambiente riducente

Vantaggi
RESE MOLTO ALTE

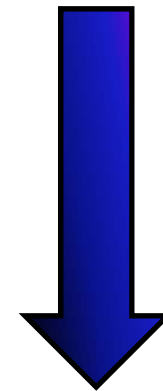


ERRORI DI FOLDING



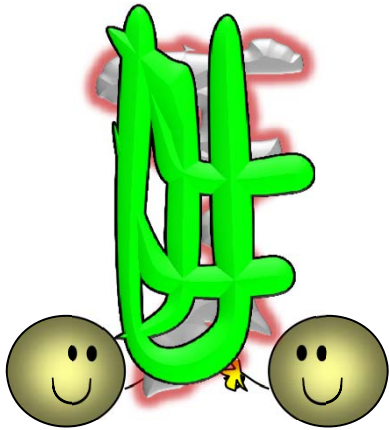
MANCANZA DI ATTIVITA'
BIOLOGICA

Svantaggi
FORMAZIONE DI CORPI
D'INCLUSIONE

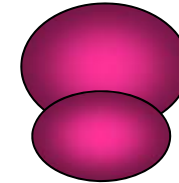


POSSIBILE MANCATO O
INCOMPLETO REFOLDING
IN VITRO

IN VIVO IL FOLDING FISIOLOGICO DELLE PROTEINE È ASSISTITO DA CHAPERONINE



fattore d'innescio
associato al ribosoma

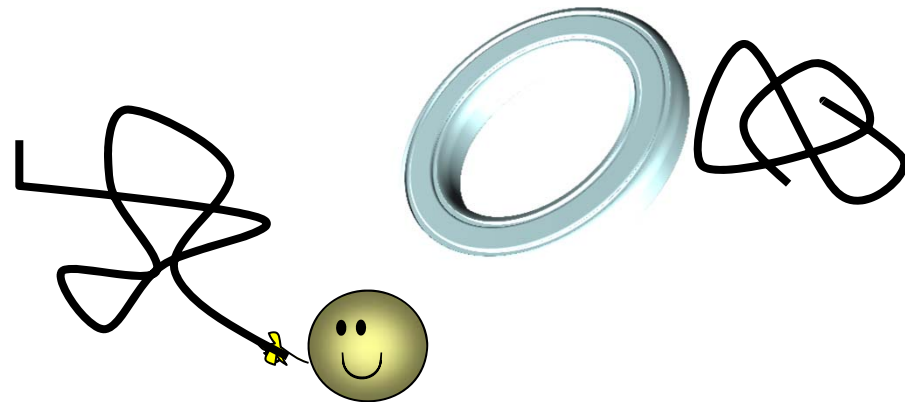


Ruota in modo corretto i
legami dei residui di prolina

Fuori dal ribosoma DnaK rimuove
piccole zone idrofobiche ripiegate
in modo sbagliato

GRO E-L formano camere
molecolari di ripiegamento

GRO S controlla l'ingresso



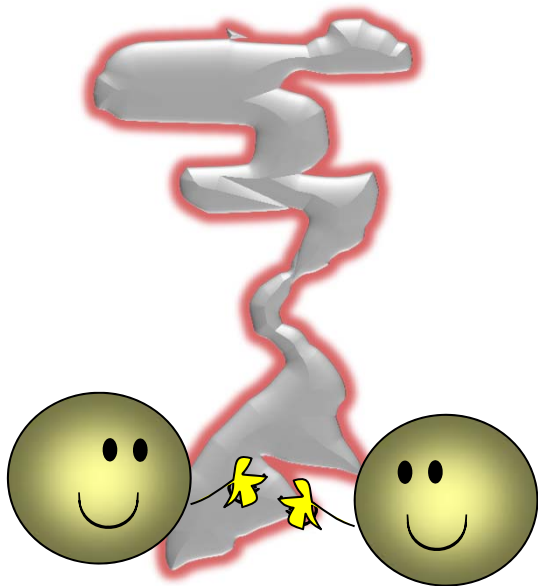
su alcuni vettori, sono
presenti i geni che codificano
DnaK/DnaJ o GroEL/GroES,

Che promuovono
l'isomerizzazione e istradano
al comparto di destinazione

Le probabilità di successo però dipendono
strettamente dalla natura della proteina eterologa

?

?



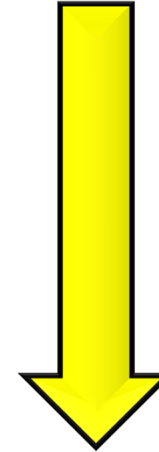
Altri problemi:

- ✓ mancata formazione di ponti disolfuro
- ✓ esposizione all'azione delle proteasi

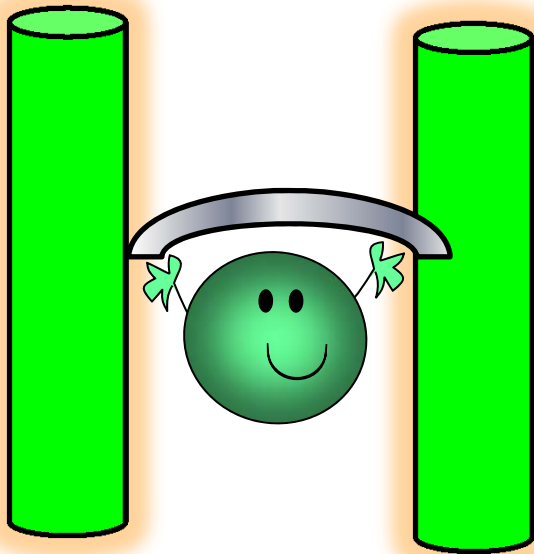
**MANIPOLARE IL GENOTIPO
DELL'OSPITE PIU' CHE LE
CARATTERISTICHE DEL VETTORE**

PERIPLASMA
Molto ossidante

Sono presenti enzimi che catalizzano la formazione
e il riarrangiamento dei ponti disolfuro



destinazione idonea per le
proteine che possono essere
secrete

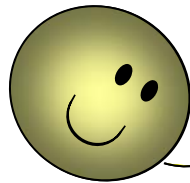


ALTRI VANTAGGI:

MINORE CONCENTRAZIONE DI
PROTEINE

MINORE INCIDENZA DI
PROTEOLISI

NELLA MAGGIOR PARTE DEI VETTORI DI ESPRESSIONE PER
E. coli E' PRESENTE UNA SEQUENZA SEGNALE

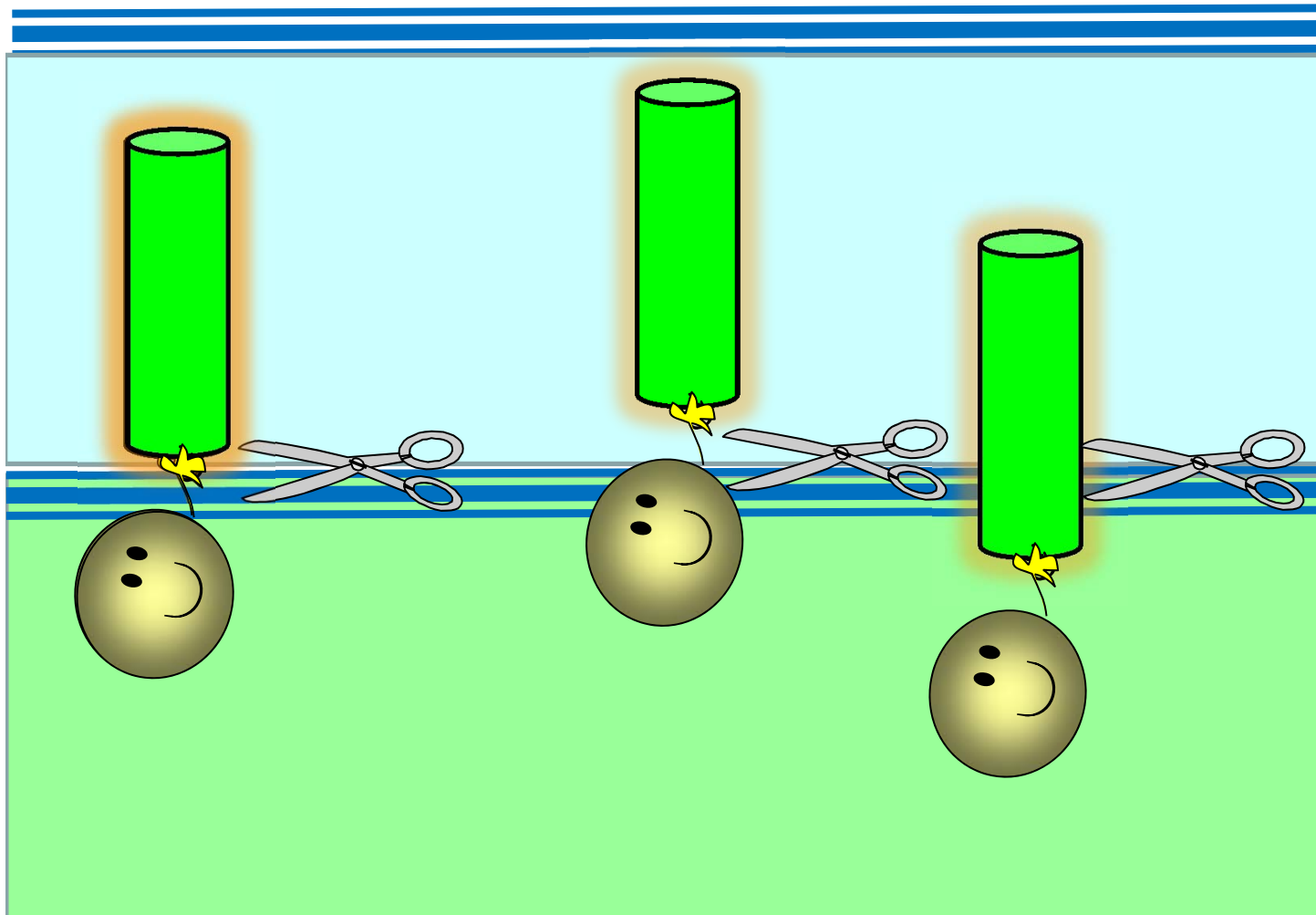


PROTEINA ETEROLOGA

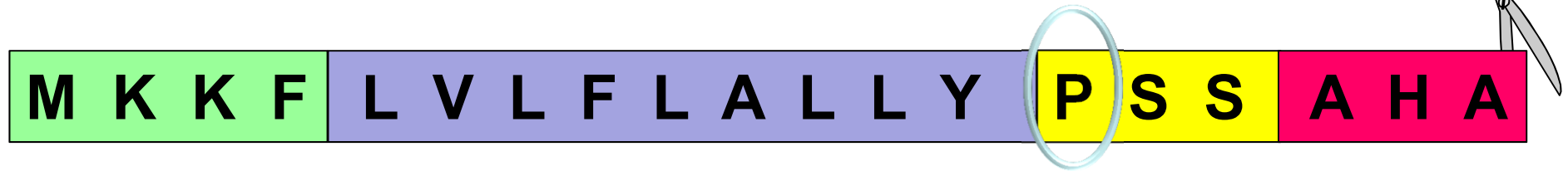
SEQUENZE SEGNALE DIDERMICHE

CIRCA 25 AA (17-18 → 25-27)

LA LUNGHEZZA DEL PEPTIDE E' CRITICA



E' CRITICA ANCHE LA STRUTTURA



ALMENO 1 RESIDUO AA+ (K,R) NEI PRIMI 7

ZONA CENTRALE MODERATAMENTE
IDROFOBICA: L,V,I

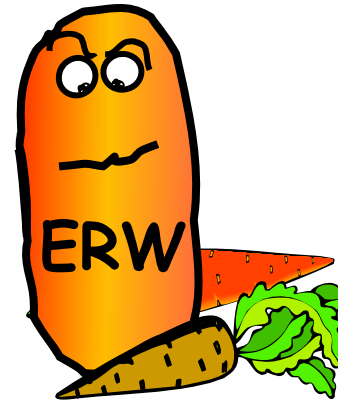
C-TER: RICCA IN S e A

FREQUENTE P (-6)

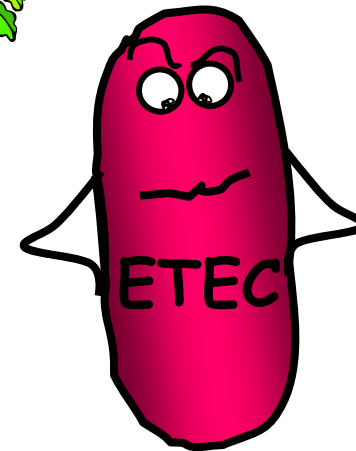
TIPICO A (-3, -1) = SEGNALE PER LA
PEPTIDASI A-X-A PIU' RARO S/G

MOLTO USATE

PEL B (PECTATO LIASI)



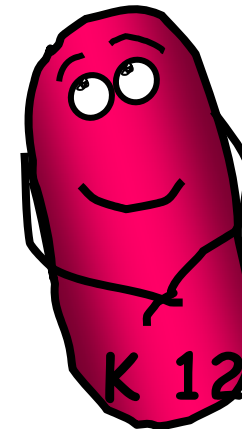
ST-II (TOSSINA TERMOSTABILE)



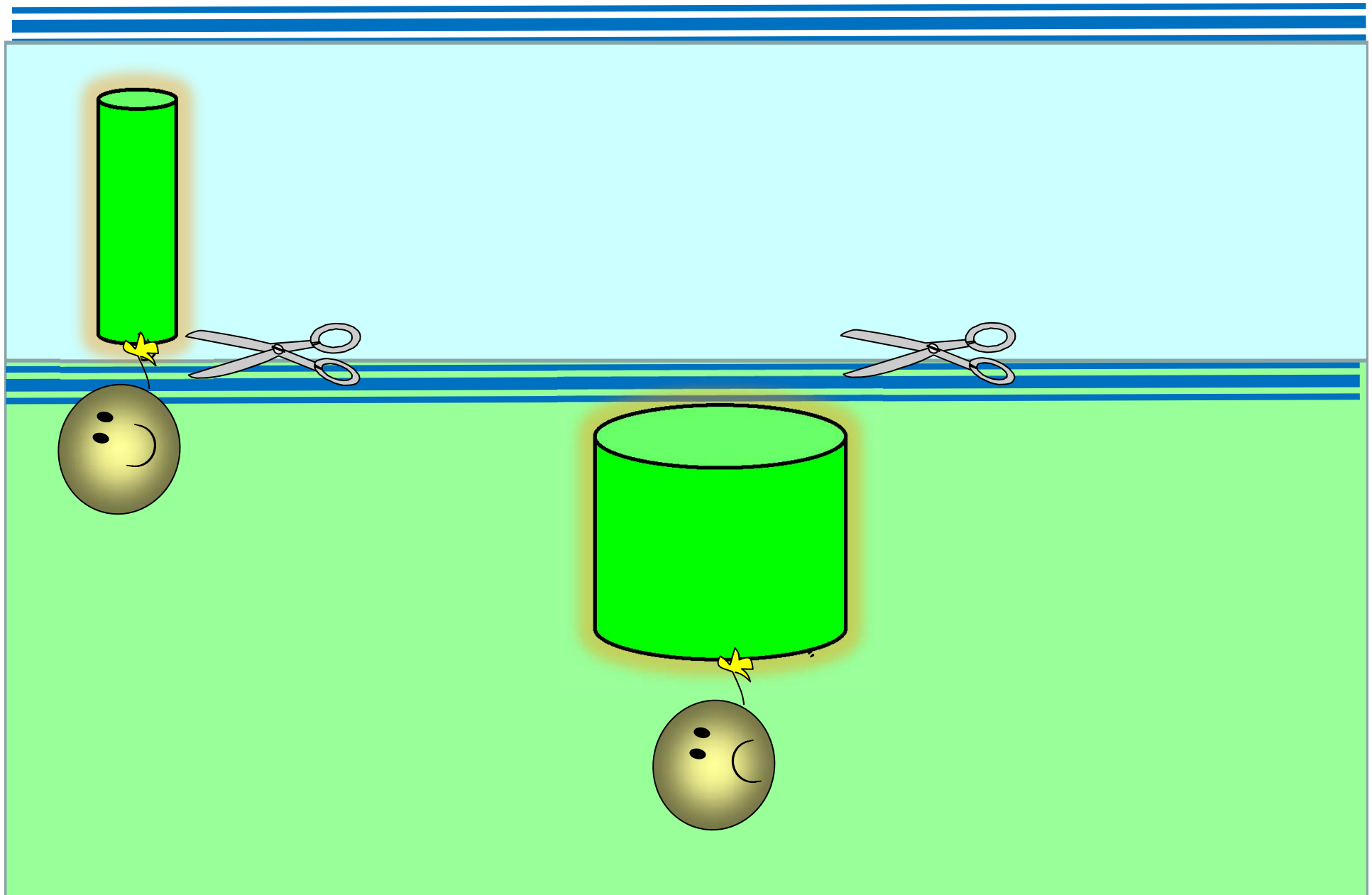
DSBA (OSSIDO-REDUTTASI)

OMPT (PROTEASI DI MEMBRANA)

PHO A (FOSFATASI ALCALINA)



Grandi proteine citoplasmatiche o mutanti da approcci combinatoriali possono essere non traslocabili attraverso la membrana e restano intrappolate



MA SI POSSONO ANCHE USARE LEADER ARTIFICIALI

mia1	M	K	K	T	F	L	V	L	F	L	A	L	L	Y	A	S	S	A	H	A
	ATG	AAA	AAG	ACC	TTC	CTT	GTT	CTG	TTT	CTT	GCA	CTT	CTG	TAT	GCA	TCT	TCT	GCT	CAC	GCT
mia2	M	K	K	T	F	L	V	L	F	L	A	L	L	Y	A	S	S	A	H	A
	ATG	AAA	AAA	ACT	TTT	TTA	GTG	CTT	TTC	CTG	GCT	CTG	CTT	TAC	GCT	TCT	AGC	GCA	CAT	GCA
miamax	M	K	K	F	L	V	L	F	L	A	L	L	Y	A	S	S	A	H	A	
	ATG	AAA	AAA	TTC	CTG	GTT	CTG	TTC	CTG	GCT	CTG	CTG	TAC	GCT	TCT	TCT	GCT	CAC	GCT	
miaperC	M	K	K	F	L	V	L	F	L	A	L	L	Y	A	S	S	A	M	A	
	ATG	AAA	AAA	TTC	CTG	GTT	CTG	TTC	CTG	GCT	CTG	CTG	TAC	GCT	TCT	TCT	GCC	ATG	GCT	

MIA-1/MIA-2: STESSA LEADER NUCLEOTIDI DIVERSI CON STESSO CAI (COESPRESSIONE SULLO STESSO VETTORE)

MIAMax: LA PIU' BELLA CHE CI SIA..

MIAPER C: PERCHE' HO FATTO QUESTO?

VANNO EVITATE LE AMBIGUITA' NELLA LEADER CHE POTREBBERO
CAUSARE VARIABILITA' NELLA PROTEINA ESPRESSA

MRTLTTTLGLALLLAQPAVAAQAVLPQLQPYTAPAAWLTPVAPLRIADN

MRTLTTTLGLALLLAQP- - -AQAVLPQLQPYTAPAAWLTPVAPLRIADN

MRTLTTTLGLALLLAQPAVA AQAVLPQLQPYTAPAAWLTPVAPLRIADN

?

MRTLTTTLGLALLLAQPAVAAQA VLPQLQPYTAPAAWLTPVAPLRIADN

?

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

MRTLTTTLGLALLLAQPAQA

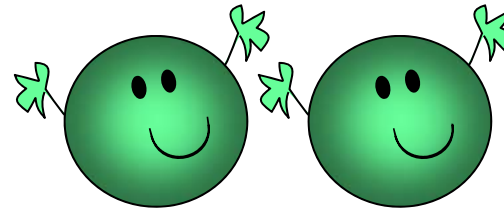
VLPQLQPYTAPAAWLTPVAPLRIADN

Controllare amino OK di POT

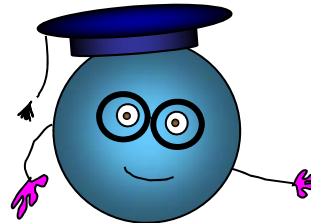
SI PUO' FARE QUALCOSA PER
MIGLIORARE LA SECREZIONE?

PER ESSERE TRASLOCATI, I PEPTIDI DEVONO ARRIVARE
VICINO ALLA IM IN RIPIEGAMENTO LASSO

CHAPERONINE GENERICHE (GroE-L, DnaK)



CHAPERONINE SPECIFICHE (SecB)



LE TRAFERISCONO A SecA → SecYEG

Tentativi di inserire i geni per SecB, DnaK-J
e GroEL-ES sui vettori:
RISULTATI VARIABILI

INFLUENZA
SEQUENZA SEGNALE

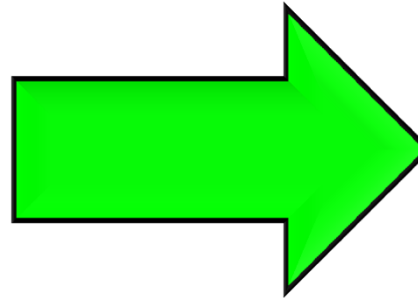


STRUTTURA
SECONDARIA E
TERZIARIA



RICONOSCIMENTO
DALLE CHAPERONINE

PROVARE DIVERSE
LEADER +
CHAPERONINE



IPERESPRIMERE DsbC
DISOLFURO-ISOMERASI

IPERESPRIMERE Skp/OmpH: CHAPERONINA
A LARGO SPETTRO DI SUBSTRATO

**SOVRACCARICO DELL'APPARATO DI
ESPRESSIONE**



**DIMINUIRE
L'ESPRESSIONE**

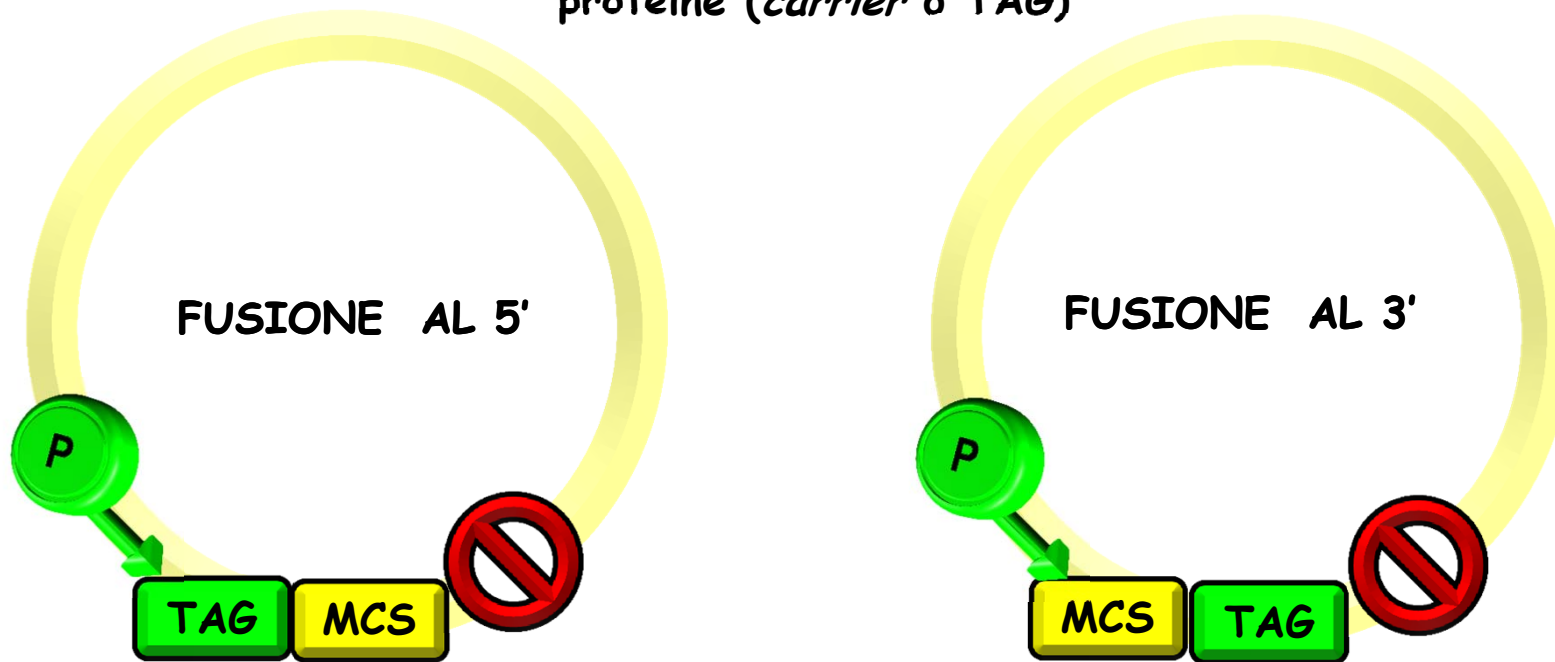
**AUMENTARE COMPONENTI
LIMITANTI PER IL PROCESSO
DI ESPORTAZIONE**



**Trasformare con prlA4 e secE, su plasmide
(geni per le principali proteine di trasporto)**

UNA VOLTA PRODOTTA, LA
PROTEINA VA PURIFICATA

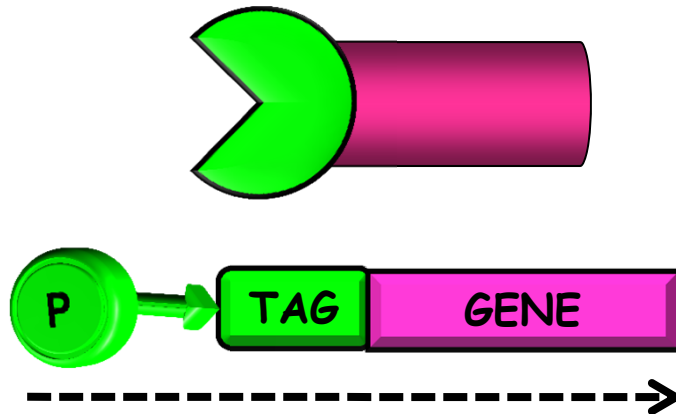
Per facilitare la purificazione delle proteine eterologhe
si è pensato di fonderle con altre proteine o parti di
proteine (*carrier* o TAG)



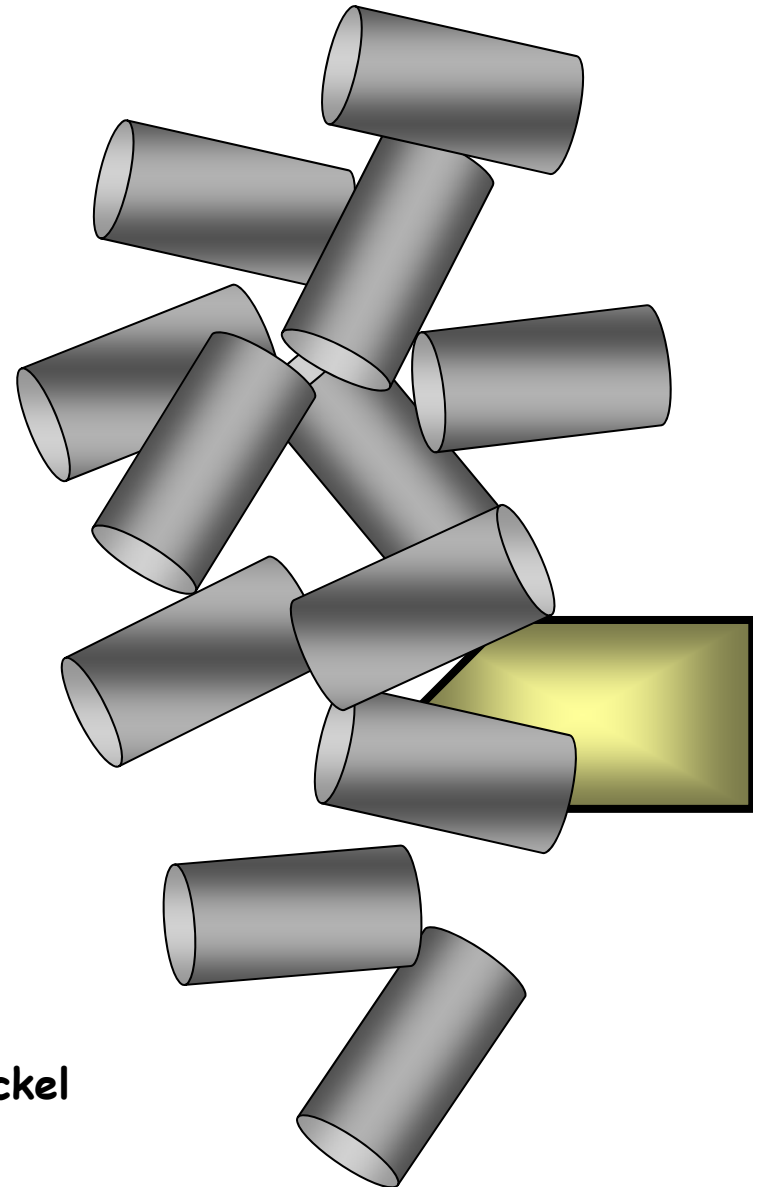
Diversi vettori commerciali contengono già la sequenza che
codifica il TAG, preceduta o seguita da siti di restrizione
per clonare il gene di interesse in *frame* con il TAG

il TAG si sceglie in base alle esigenze e alla strategia di purificazione

AFFINITA' PER UN LIGANDO
Permette di purificare il TAG, che porta con sé la proteina



- ✓MBP: proteina che lega il maltosio
- ✓CBP proteina che lega la chitina
- ✓GST glutatione transferasi
- ✓Poly-HIS "coda" di istidine, si lega al Nickel



CARATTERISTICHE CROMATOGRAFICHE

migliorare la risoluzione nel corso di
tecniche di separazione particolari; è
composto di aminoacidi polianionici



IMMUNOREATTIVITA'

Epitopi scelti in base alla facile disponibilità di
anticorpi con elevata affinità che li possano legare

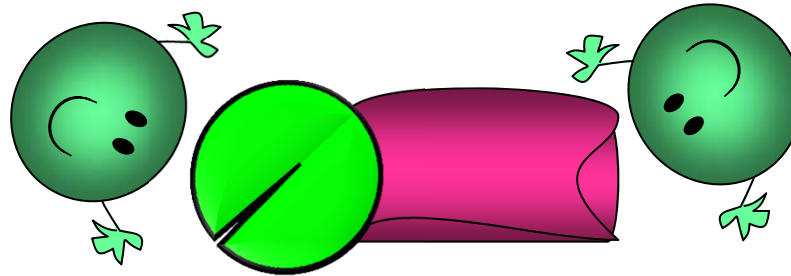
soprattutto peptidi corti, spesso di origine virale

particolarmente utili per l'allestimento di
western blot e per l'immunoprecipitazione

INFLUENZA SULLA SOLUBILITA'

alcune proteine carrier influiscono positivamente sulla solubilità di proteine eterologhe

i TAG raggiungono rapidamente la propria conformazione nativa, aiutando anche il folding della proteina fusa



E reclutando le chaperonine necessarie

TRX
(tioredoxina)

MBP

GST

TAG per solubilizzazione più usati

Efficienza nel limitare la formazione di I.B.

MBP

>

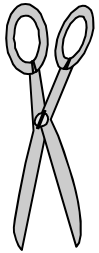
TRX

GST

SVANTAGGI



Necessità di proteasi costose (Fattore Xa - fattore di coagulazione o enterokinasi, da intestino bovino)



L'efficienza del taglio, non raggiunge mai il 100% e limita la resa

necessità frequente di ulteriori trattamenti (es. formazione e isomerizzazione di ponti disolfuro) per ottenere un prodotto attivo

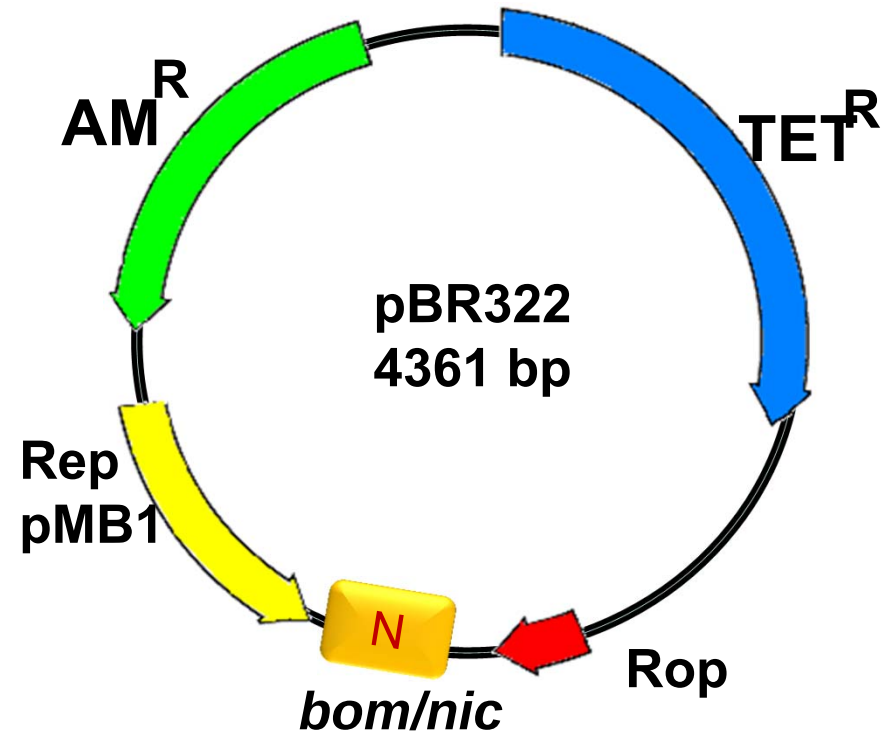
la mancanza di indicazioni preliminari sulla possibilità di ottenere la solubilizzazione, che può essere determinata solo sperimentalmente

QUALCHE ESEMPIO DI PLASMIDE VETTORE

pBR322

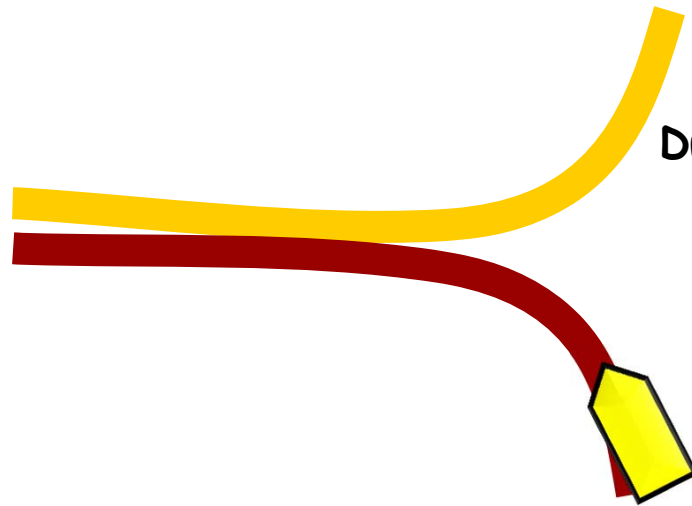
primo vettore progettato "a tavolino"

marcatori di selezione *tet* (fonte
pSC101) e *bla*_{TEM} (fonte Tn3)
replicone: pMB1



Su pBR322 manca *mob*, ma sono presenti i siti *nic/bom* che potrebbero permetterne la mobilizzazione in presenza di un plasmide helper

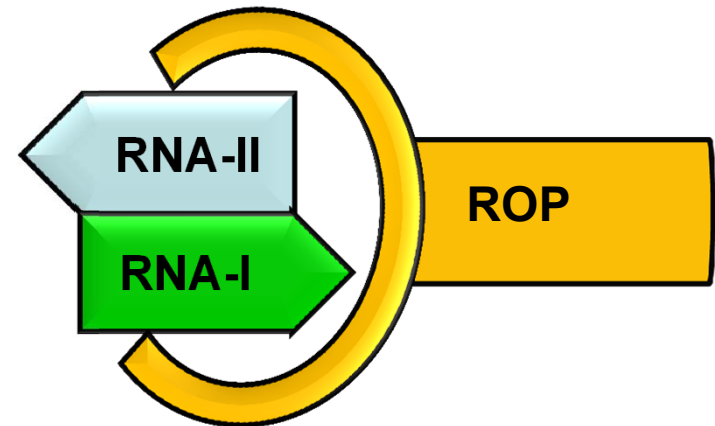
Il numero di copie è mantenuto basso, non oltre 15-20, dai geni RNAI e *rop*



Durante la replicazione l'innesco di RNA (RNAII) si appaia con il filamento guida formando il sito di attacco per la DNA polimerasi

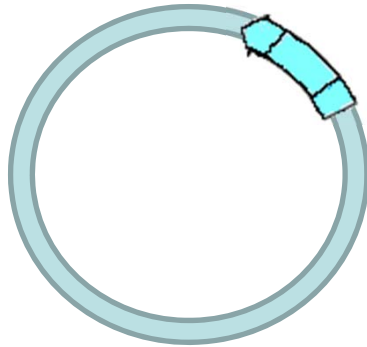
RNAI ha una sequenza complementare a quella di RNAII

La proteina ROP agevola il legame RNAI/RNAII, favorendo il sequestro di quest'ultimo



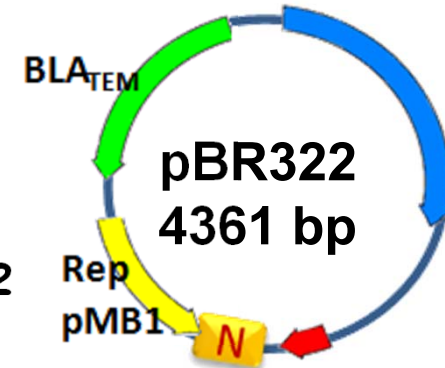
Puc18/19

plasmidi piccoli, molto maneggevoli, a numero di copie molto elevato, fino a 500-700/cellula



Per via di una mutazione in RNAI e alla mancanza di *rop*

pMB1 e BLA_{TEM} provengono da pBR322



Il marcatore è *lacZ*; *lacI* non è sul plasmide e l'attività basale è alta, contenuta in parte nei ceppi *lacI*^q

Oltre a *mob* manca anche *bom/nic*: il plasmide non può essere mobilizzato da un plasmide helper

pUC18 e pUC19 differiscono solo per l'orientamento del polilinker

pBluescript II SK/KS (+)/(-)

simili ai pUC per replicone ColE1; selezione
BLATEM; marcatore *lacZ*

Elementi di derivazione fagica → FAGEMIDI

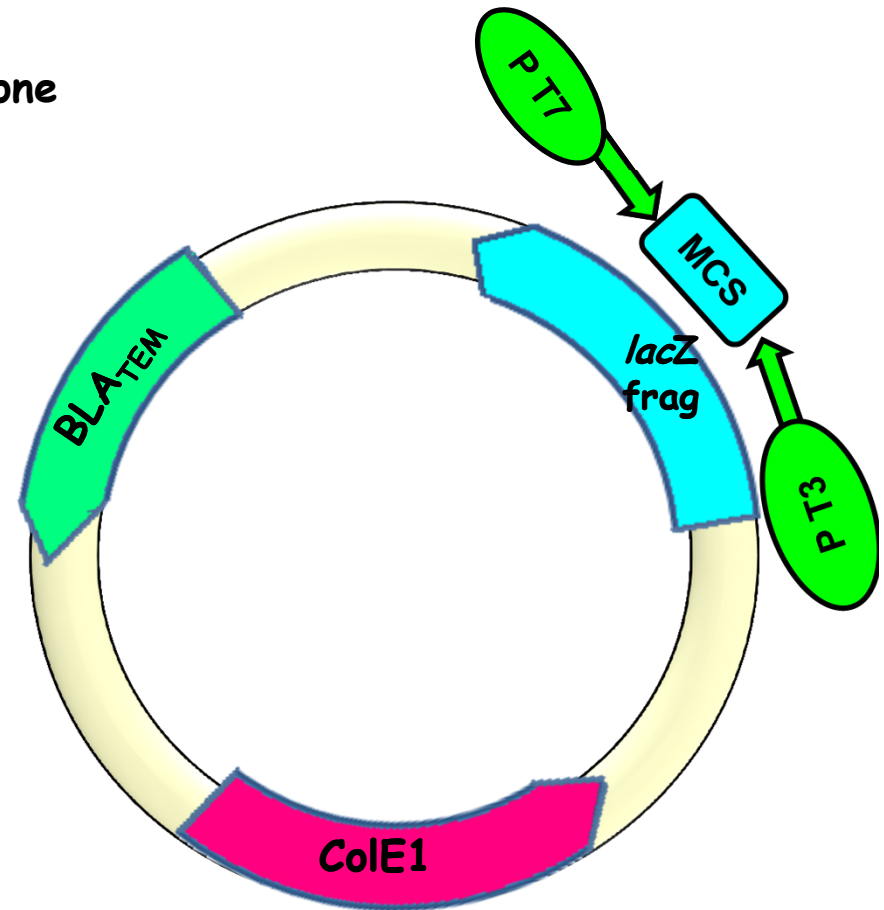
Possibilità di mutagenesi
e di trascrizione in vitro

MCS= KpnI → SacI (KS) o SacI → KpnI (SK)
all'interno di α-peptide β-galattosidasi

Promotori fagici T3 e T7
ai lati del polilinker



+ polimerasi fagica → trascrizione in vitro

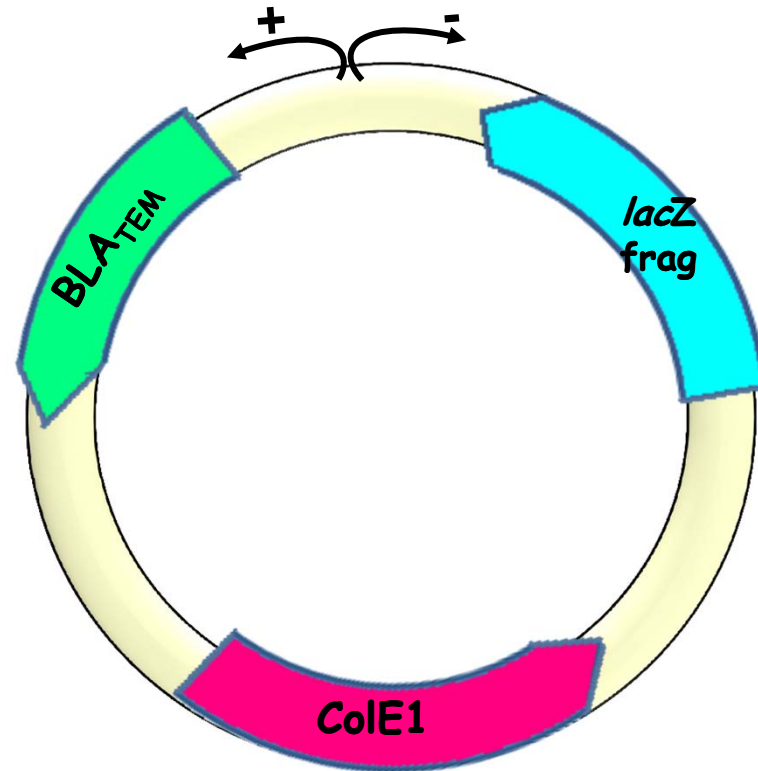


Origine del fago filamentoso f1
(+) o (-)

Infezione delle cellule
trasformate con un mutante del
fago M13 (M13K07)

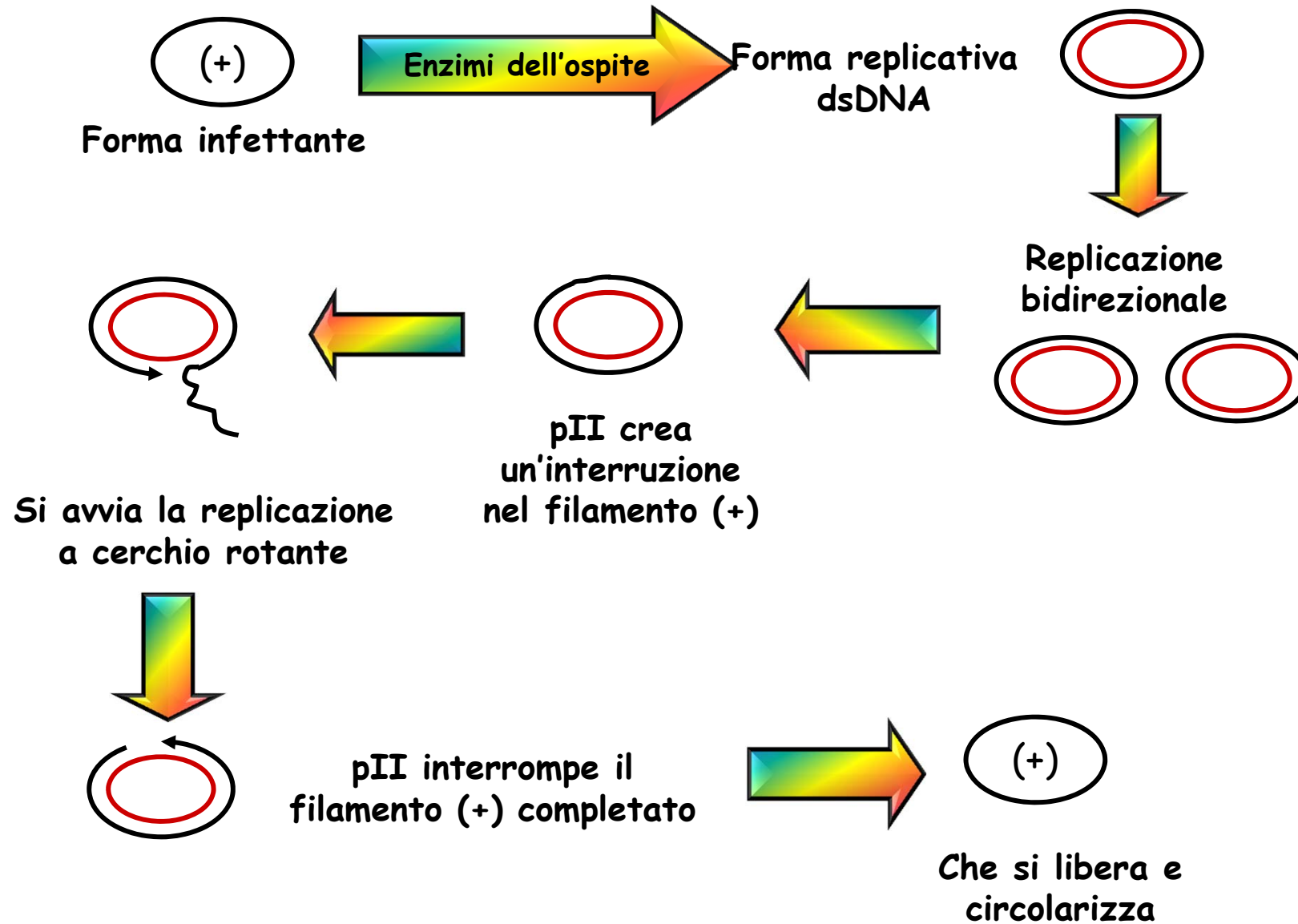


Copia ssDNA di uno dei due filamenti
a seconda dell'orientamento (+) o (-)



I filamenti impaccati nelle particelle virali possono essere isolati e impiegati
come sonde o per la mutagenesi mirata di nucleotidi

Ciclo biologico di M13

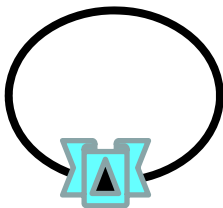


M13K07 + fagemide

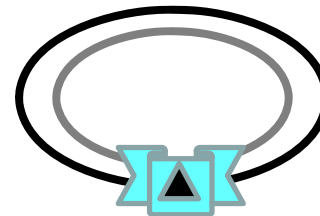
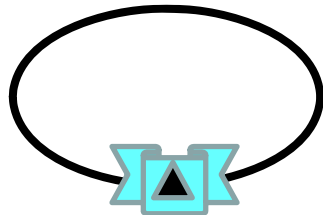
M13K07 è stato
ottenuto da un M13
mutante in pII



ha un replicone p15 e
un marcatore Kan



Il replicone originale del
fago è stato alterato
(inserzioni lacZ)

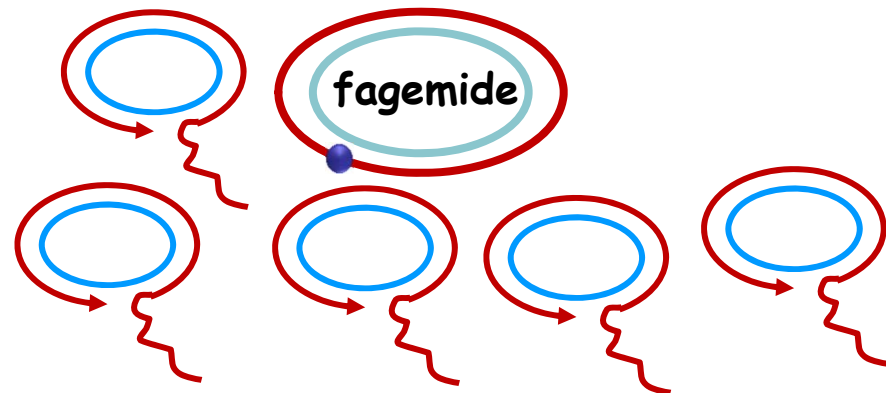


Forma
replicativa

pII mut riconosce male
l'ori ingegnerizzata

E replica di preferenza
il fagemide

Che viene
impaccato nel
fago

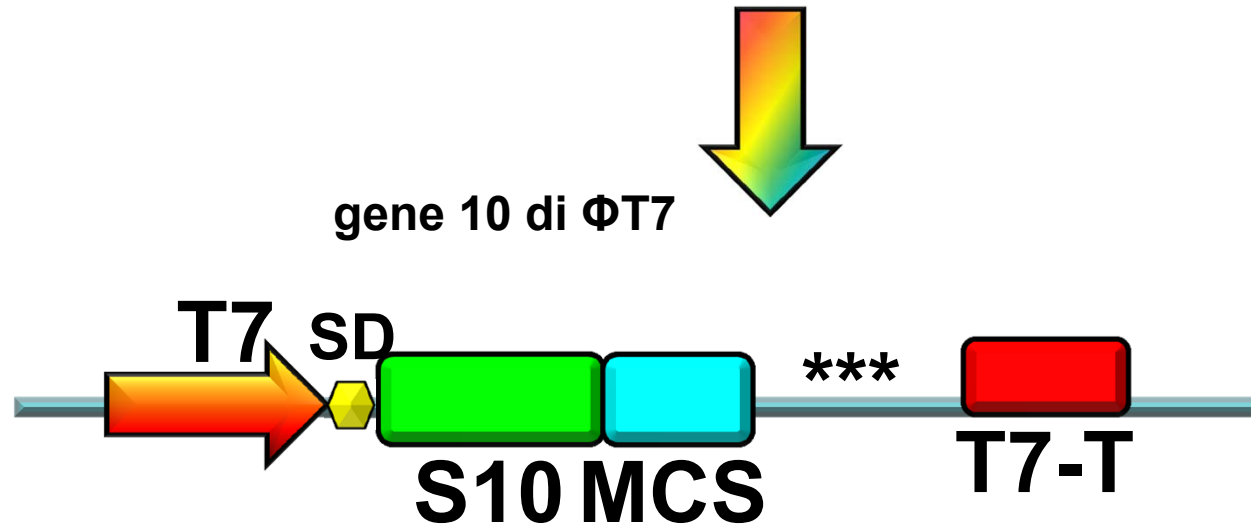


La serie dei vettori PET

Costruiti a partire da pBR322

Vettori di trascrizione

Vettori di espressione



il gene clonato si fonde con l'N-terminale di S10;
T7 è indotto a seconda della natura del ceppo ospite

La serie è molto ricca

La lettera minuscola (a,b,c o d) dopo il nome indica il frame di lettura di S10, riferito al sito di clonazione BamHI, posto al 3' della sequenza segnale

- a) GGT CGC **GGA TCC**
- b) GGT **CGG GAT CCG**
- c) GGT **CGG ATC CGG**
- d) Frame come "c" ma NcoI (**CCATGG**) invece di NdeI (**CATATG**) a monte della sequenza segnale

Selezione: AMP tranne nella serie 9 (kana)

Serie 11: T7/lac + lacI sul plasmide

Serie 3x: S10 più lunga

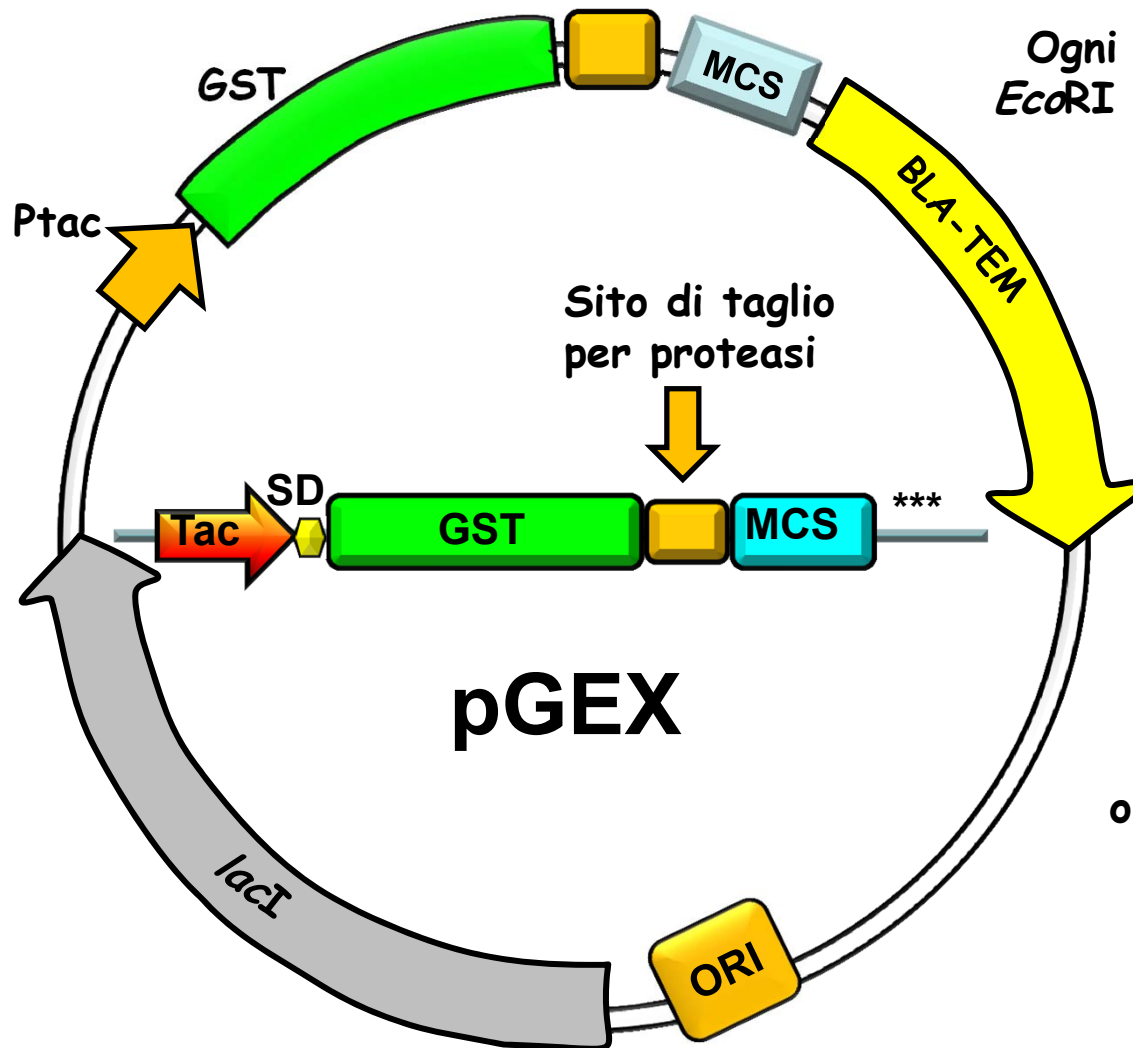
Serie 12: dopo S10 c'è la leader di OmpT per secrezione

Serie 5: senza terminatore

Nel tempo altre "variazioni" si sono aggiunte a questa popolare serie, variando la selezione, aggiungendo TAG come code di istidina e/o elementi fagici

La serie dei vettori GEX

predisposta per la fusione con Glutathione-S-Transferasi;
promotore = tac; selezione = BLA_{TEM} ; *lacI* è sul vettore

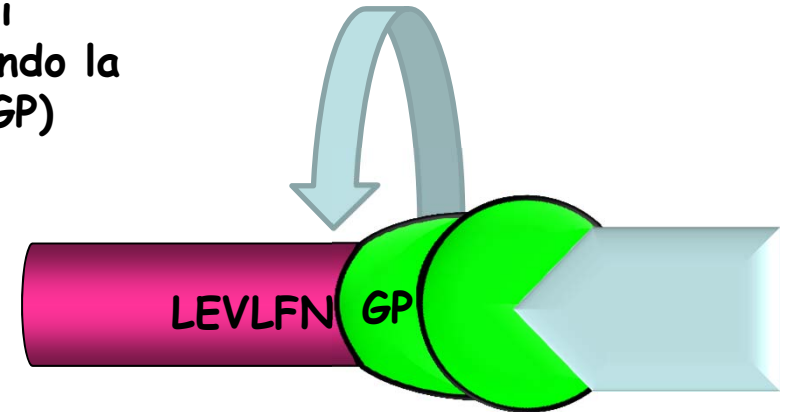


Ogni serie ha diversi tipi con il sito *EcoRI* in vari frame in modo da creare facilmente le fusioni

La rimozione di GST si ottiene con la trombina
LVPR↓GS

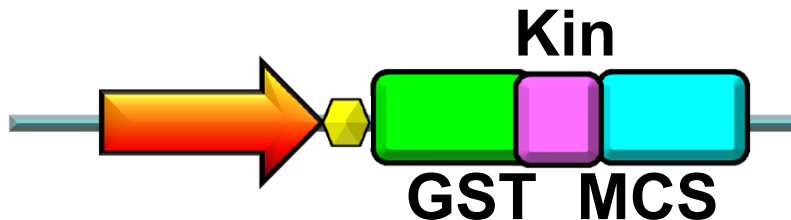
o con il fattore Xa (trombochinasi)
I[EN]GR↓

Nel tipo pGEX-6P, la GST è staccata da una proteasi ingegnerizzata (Prescission protease) ottenuta fondendo la proteasi 3C del rhinovirus umano e la GST (LEVLFN↓GP)



Il vantaggio è il distacco di GST, contemporaneo alla rimozione della proteasi dal sistema

pGEX-2TK ha il sito di riconoscimento per la proteino chinasi, inserito al 3' di GST, prima del MCS

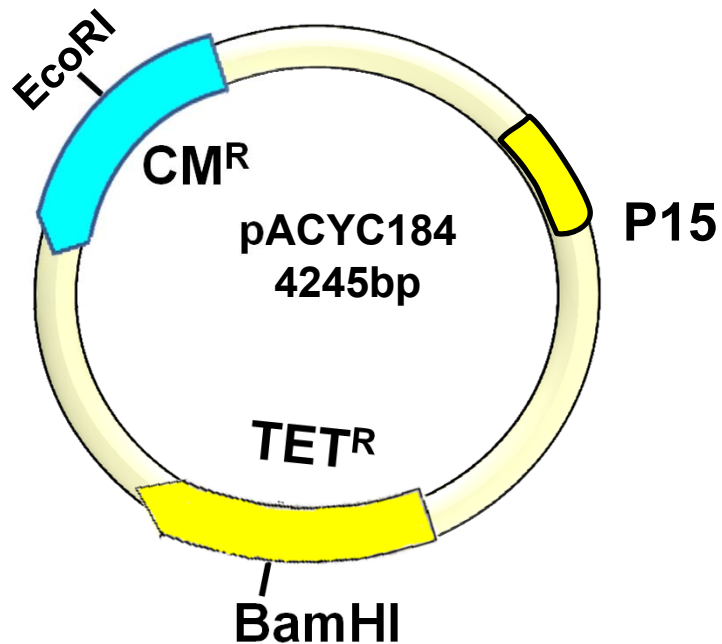


La proteina espressa può essere così direttamente marcata usando proteino-chinasi + $[\gamma\text{-P32}]\text{ATP}$ per seguirla con tecniche autoradiografiche o radiometriche

VETTORI CON REPLICONI $\neq$ ColE1

pACYC184

REPLICONE P15 - MARCATORI TET/CM - NO MCS



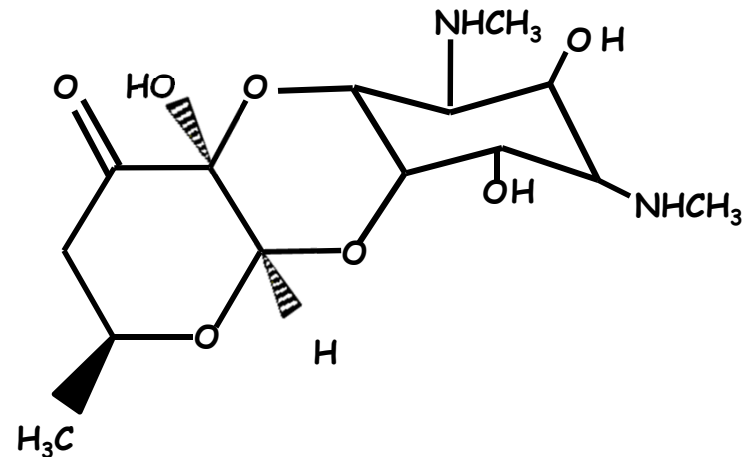
Compatibile con ColE1
Inattivazione inserzionale in
TET (pSC101) o CM (Tn9)

numero di copie 15-20

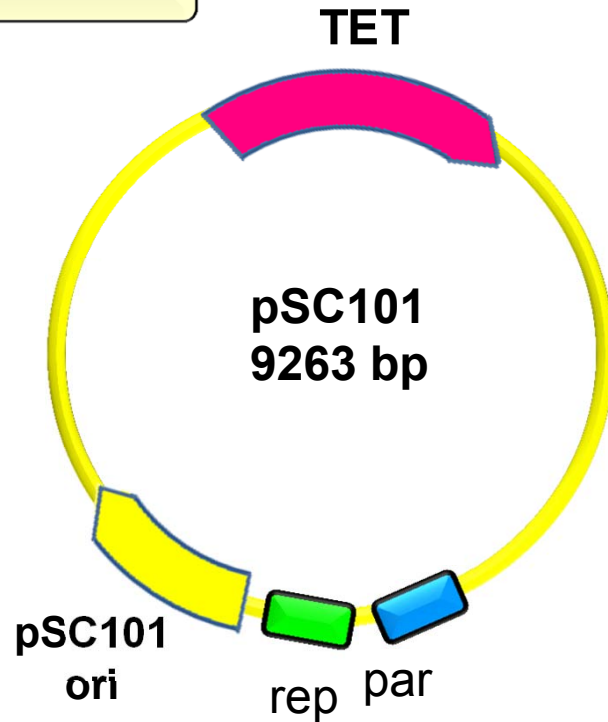
può essere amplificato con la
SPECTINOMICINA (aminociclitololo)

Simile agli aminoglicosidi , inibisce la la sintesi
proteica legandosi alla subunità 30S

pAcyc177 ha le stesse caratteristiche ma i
marcatori sono kanamicina e ampicillina



pSC101



**pSC101
9263 bp**

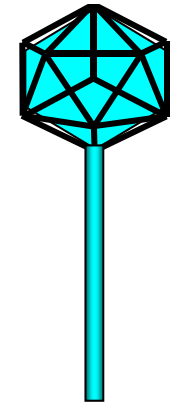
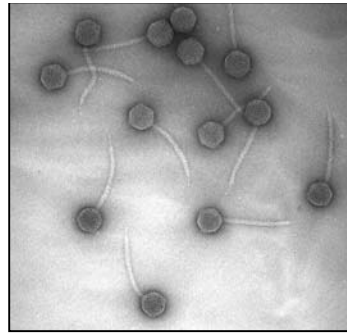
Plasmide storico, adatto per applicazioni
che prevedono un numero di copie
particolarmente basso (~5 copie/cellula)

primo vettore di clonazione (1973) descritto
e poi modificato e brevettato (1980)

La replicazione dipende, oltre che dagli
enzimi dell'ospite, dalla presenza di una
proteina codificata dal plasmide stesso

non può quindi essere amplificato con l'uso di
cloramfenicolo o spectinomicina

**COSMIDI: COME SFRUTTARE
LE PROPRIETA' DI LAMBDA**

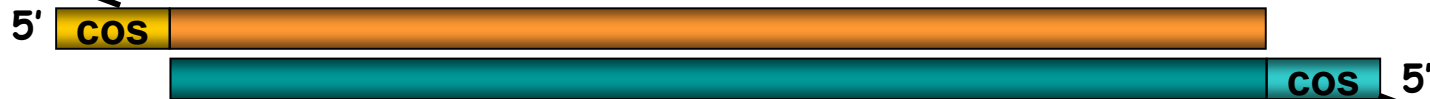


testa icosaedrica
64 nm

coda non contrattile
150 nm

GGGCGGCGACCT

Nel virione, il genoma è lineare, con due regioni complementari
(cohesive ends) a singolo filamento alle estremità



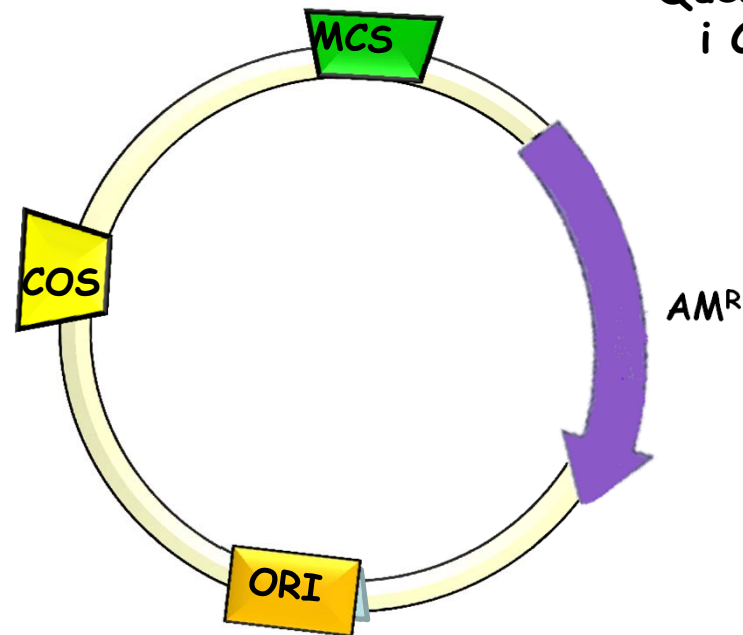
GGGCGGCGACCT

CCCGCCGCTGGA

CCCGCCGCTGGA

subito dopo l'ingresso nella cellula i siti cos si
associano e il genoma fagico diventa circolare

Particelle di Lambda, delete per circa il 30% del genoma,
possono efficacemente impaccare DNA batterico nel capsid

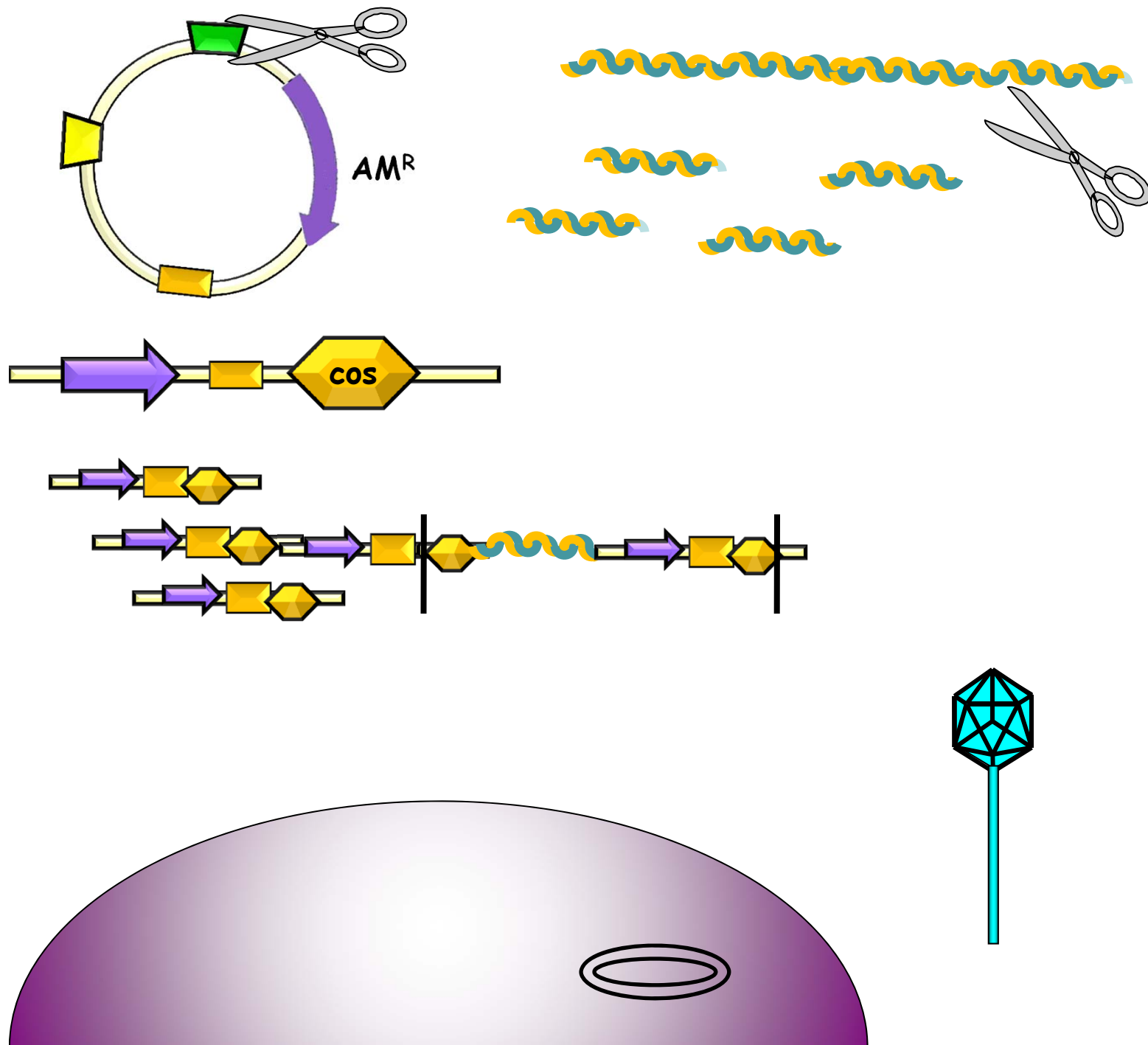


Queste caratteristiche sono state utilizzate per creare i COSMIDI: plasmidi ibridi con i siti *cos* di Lambda

La presenza dei *cos* permette di far impaccare nel capsido di lambda solo DNA batterico oltre al cosmide

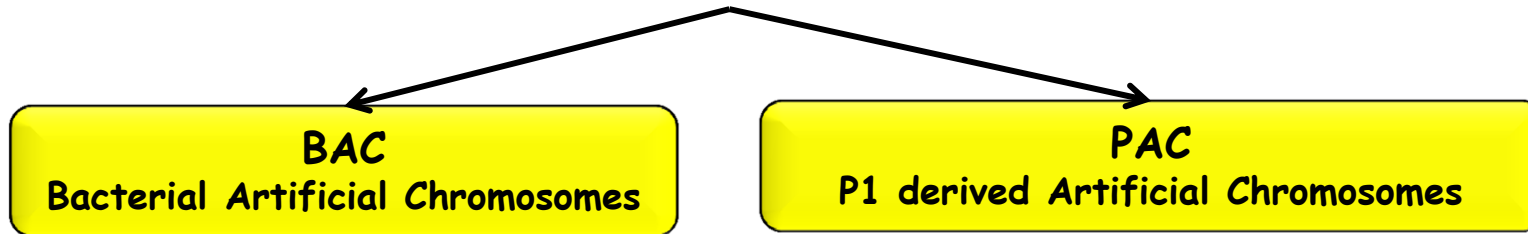
I siti *cos*, ~ 200 bp, sono essenziali per l'impaccamento: sul loro sito *cosN* agisce la terminasi, che linearizza il cosmide e lascia due estremità coesive di 12 bp

le dimensioni del DNA eterologo che può essere impaccato in un capsido di lambda è di circa 40 kb



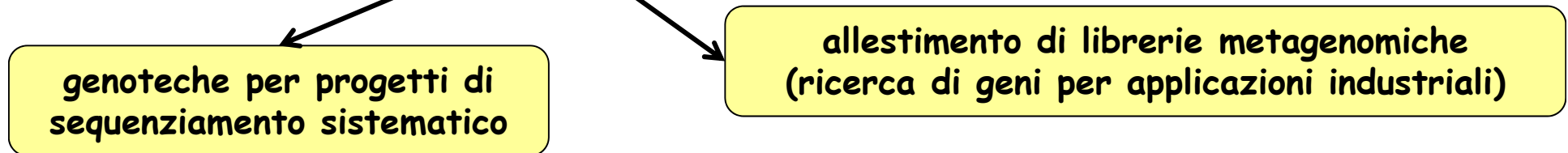
Nonostante le buone prestazioni il procedimento di allestire una libreria fagica è relativamente complessa

Per molte applicazioni, quindi, i cosmidi sono stati sostituiti dai cromosomi artificiali



Capaci di mantenere stabilmente anche frammenti di 300 kb

BAC e PAC sono vettori di clonazione

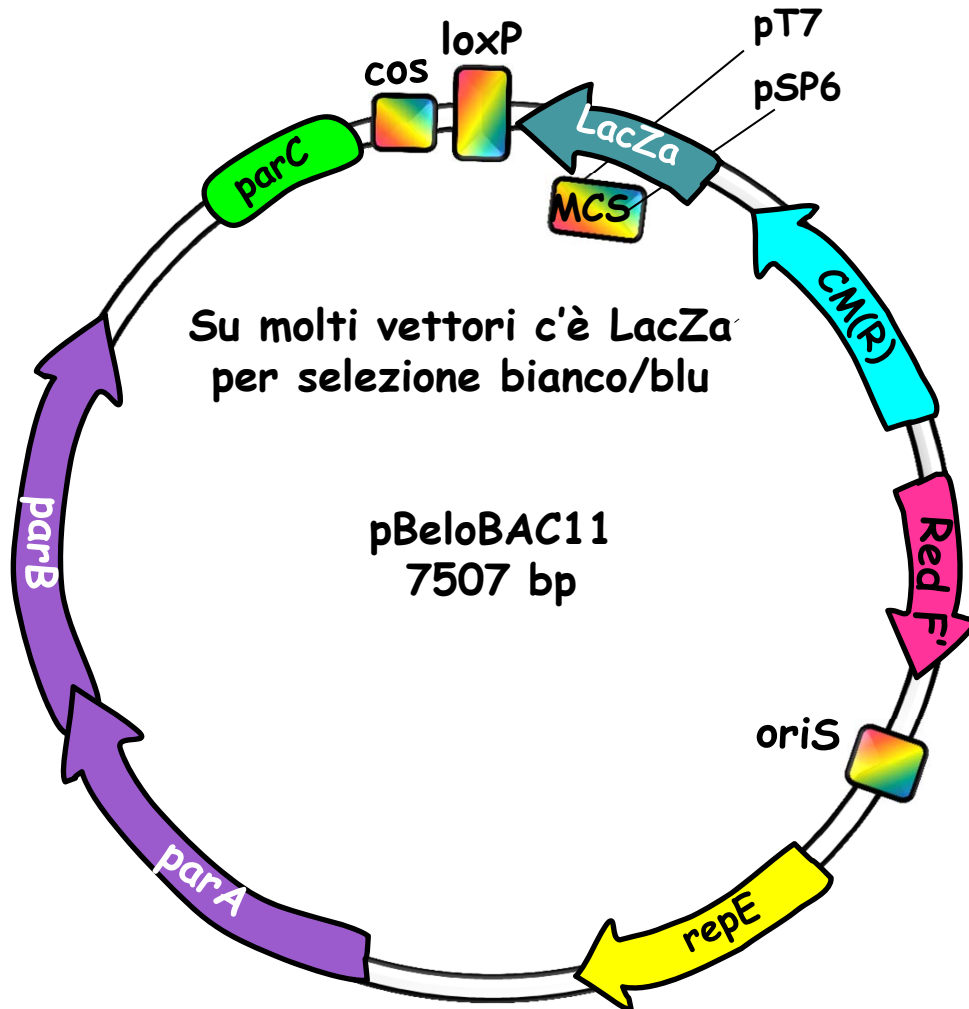


Origine F o P1 → 1 copia per cellula

Un numero maggiore potrebbe causare instabilità degli inserti (delezioni e riarrangiamenti per ricombinazione omologa)

marcatore di antibiotico
resistenza per la prima selezione

MCS fiancheggiato dai promotori P_{T7}
e P_{SP6} per sequenziamento e
trascrizione in vitro (sonde di DNA)



oriS, repE , replicone di F
Controllano il numero di copie

repE media la formazione di un
complesso replicativo su oriS

parA,B garantiscono la ripartizione
uniforme tra le cellule figlie

agendo sul sito parC

redF' gene tronco per una
ricombinasi sito specifica
(funzionale?)

Cos: possibilità di impaccare in Lambda

loxP sito specifico di taglio
per una ricombinasi di P1

In pBAC3, pBAC6 e nei PAC

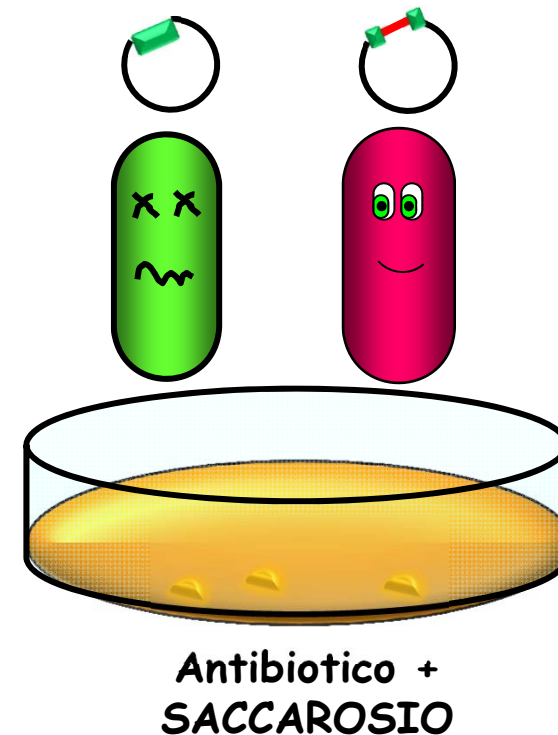
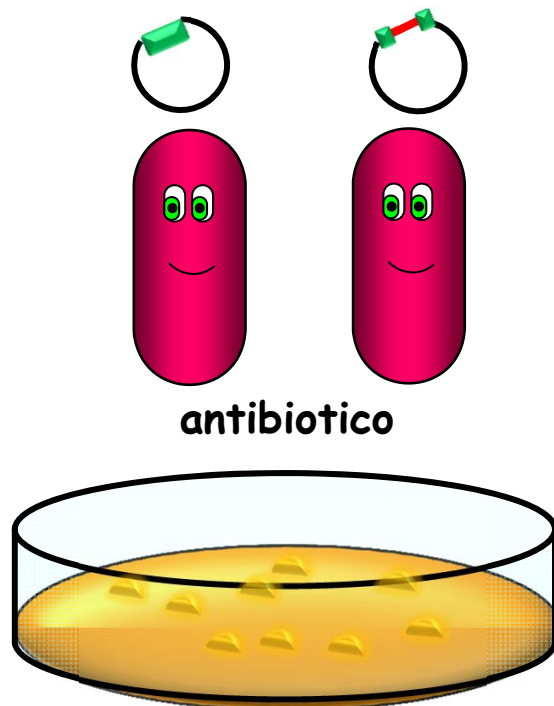
l'MCS si trova all'interno
del gene *sacB*

Il prodotto di *sacB* è una levansaccarasi, che
produce metaboliti tossici dal saccarosio



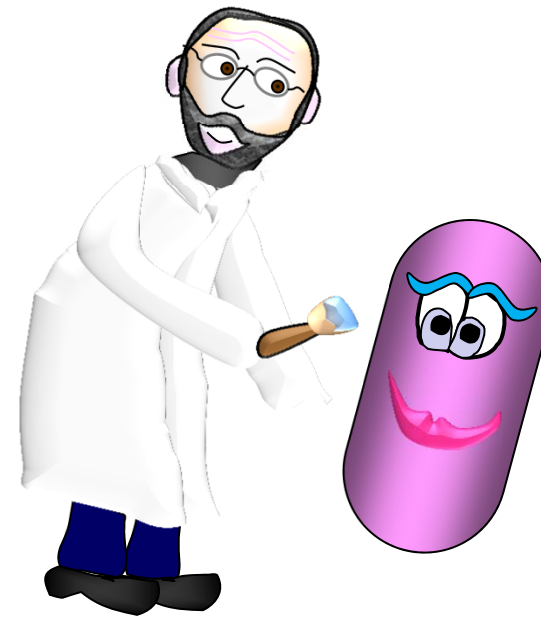
I batteri trasformati con il vettore
scarico non possono crescere su piastre
con antibiotico + saccarosio

Se il DNA eterologo ha interrotto *sacB*,
invece, sono in grado di farlo e sono
selezionati positivamente



L'altra possibilità di manipolazione
è, ovviamente, sui ceppi

Le modificazioni apportate ai ceppi
servono a ottenere vantaggi; le più
comuni sono quelle destinate a



**GARANTIRE LA STABILITA'
DEL PLASMIDE**

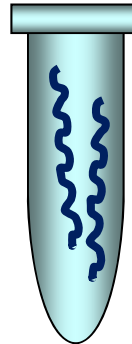
**GARANTIRE L'INTEGRITA' DEL
DNA ETEROLOGO**

MIGLIORARE L'ESPRESSIONE

GARANTIRE L'INTEGRITÀ DEL PLASMIDE

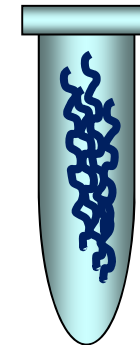
endA

EndA1 è una endonucleasi
periplasmica aspecifica



Le preparazioni di plasmidi
propagati in ceppi endA+
sono soggette a degradarsi

E' possibile ottenere preparazioni plasmidiche stabili anche
dai ceppi endA+ attraverso protocolli modificati



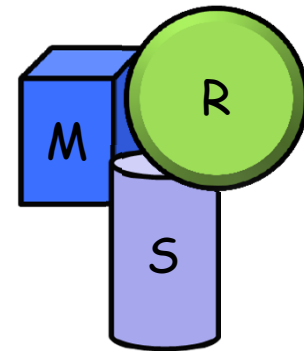
Ma l'uso dei mutanti endA1, che producono una proteina
inattiva, ne migliora nettamente la stabilità

SISTEMI DI MODIFICAZIONE-RESTRIZIONE

Proteggono i batteri da DNA estraneo (es batteriofagi)

TIPO I- codificato da *hsdR*, *hsdM* e *hsdS*,

I prodotti formano un enzima con diverse subunità che possiedono attività di endonucleasi e di metilasi

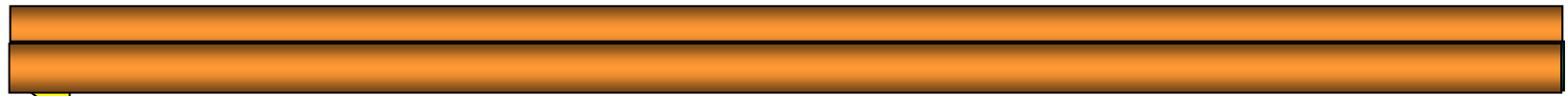


M: attività metilasica; R: restrizione, S: specificità

prodotti di *hsdM* e *hsdS* formano un complesso capace di modificare specifiche sequenze di DNA bersaglio:

EcoKI riconosce 5'.. AA*C[N₆]GTGC o GCA*C[N₆]GTT;

EcoBI riconosce 5'-TGA*[N₈]TGCT-3' o 5'-AGCA*[N₈]TCA-3'



M+

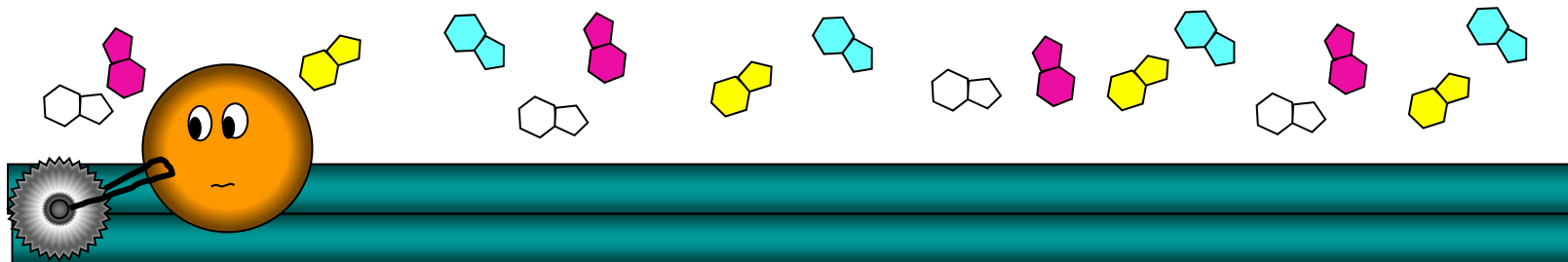
M+



Se la sequenza è emimetilata

l'enzima metila il filamento non modificato

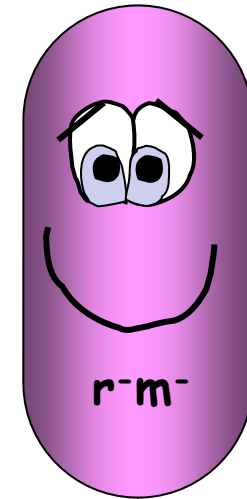
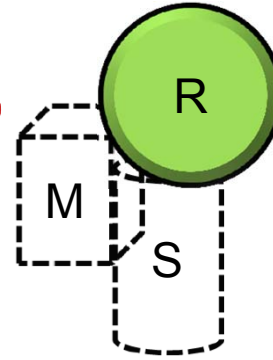
se il sito non è modificato, l'enzima
agisce da endonucleasi e lo taglia



MUTANTI hdsS/M

**NON MODIFICANO
NON RESTRINGONO**

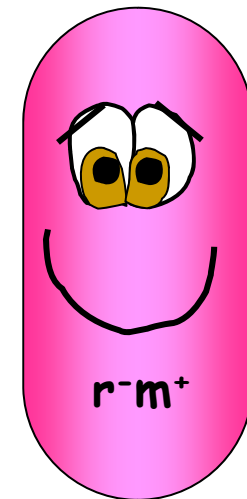
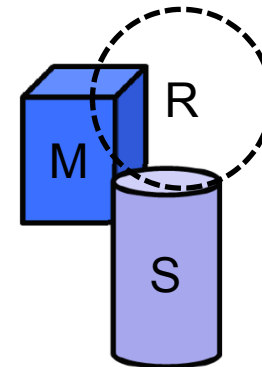
- ✓ Il loro DNA è PRIVO delle signature di riconoscimento di *E. coli*
- ✓ Accettano senza degradarlo DNA metilato di altri organismi

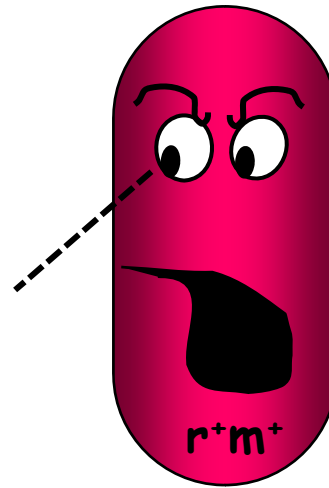
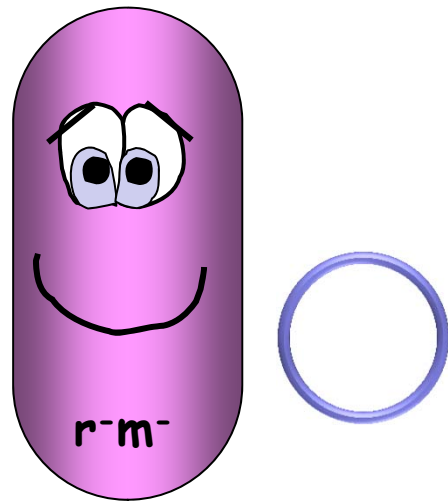


MUTANTI hdsR

**MODIFICANO
NON RESTRINGONO**

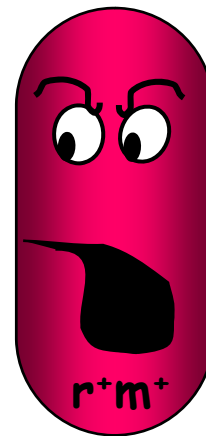
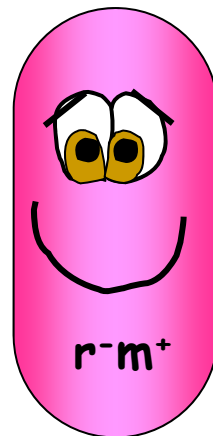
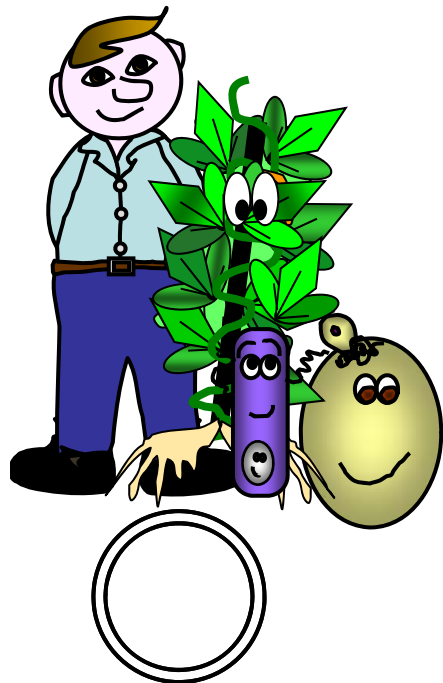
- ✓ Il loro DNA POSSIEDE le signature di riconoscimento di *E. coli*
- ✓ Accettano senza degradarlo DNA metilato di altri organismi





✓ DNA propagato in ceppi $r-m-$ è degradato dai ceppi wild $r+m+$

✓ Viene tagliato senza problemi nelle procedure biotecnologiche



✓ Accettano DNA non metilato e DNA con signature estranee

✓ Il DNA propagato NON è degradato dai ceppi wild $r+m+$

✓ Il DNA propagato potrebbe non essere tagliato da alcune endonucleasi

DAM/DCM

Metilano Adenine (Dam) o citosine (Dcm)
all'interno di sequenze specifiche

DAM = 5' - G~~A~~TC - 3'

DCM = 5' - C~~C~~[A/T]GG - 3'

queste modificazioni impediscono ad alcune endonucleasi di riconoscere il loro sito se si sovrappone alla sequenza di metilazione

BclI TGATCA

È sempre bloccato da Dam

XbaI TCTAGAT~~c~~

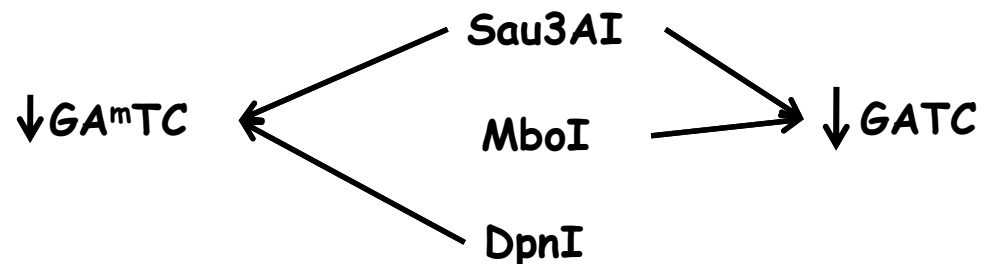
ClaI ~~g~~ATCGAT

Dam-sensibili ma bloccati solo in alcuni contesti

BamHI GGATCC

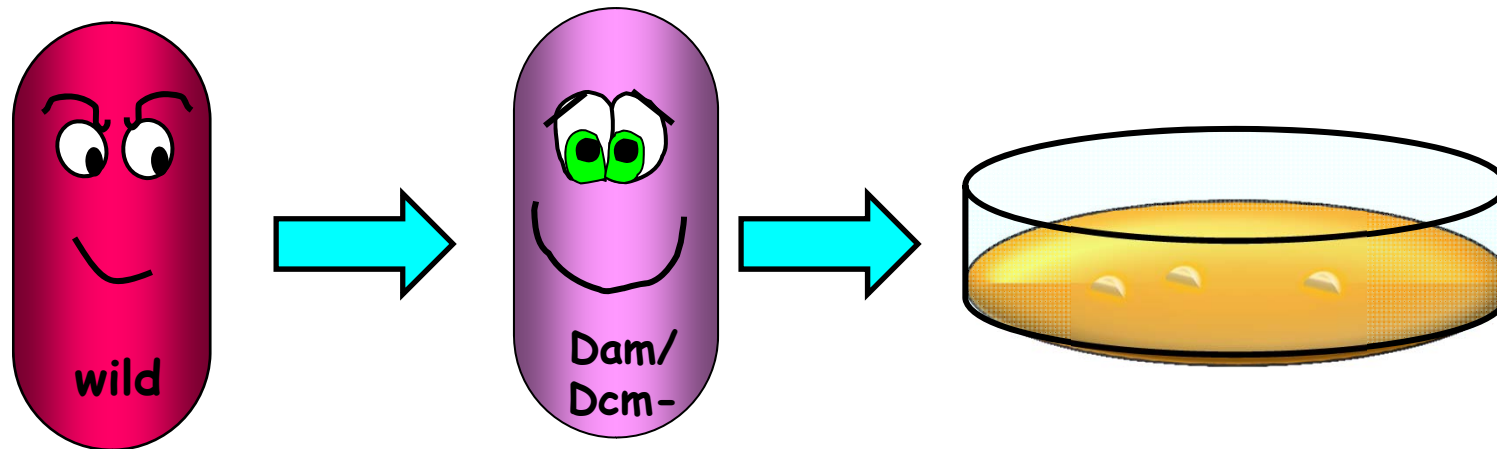
Taglia anche se la sequenza è metilata

Prima di progettare un costrutto va considerata la sensibilità dell'endonucleasi alla metilazione

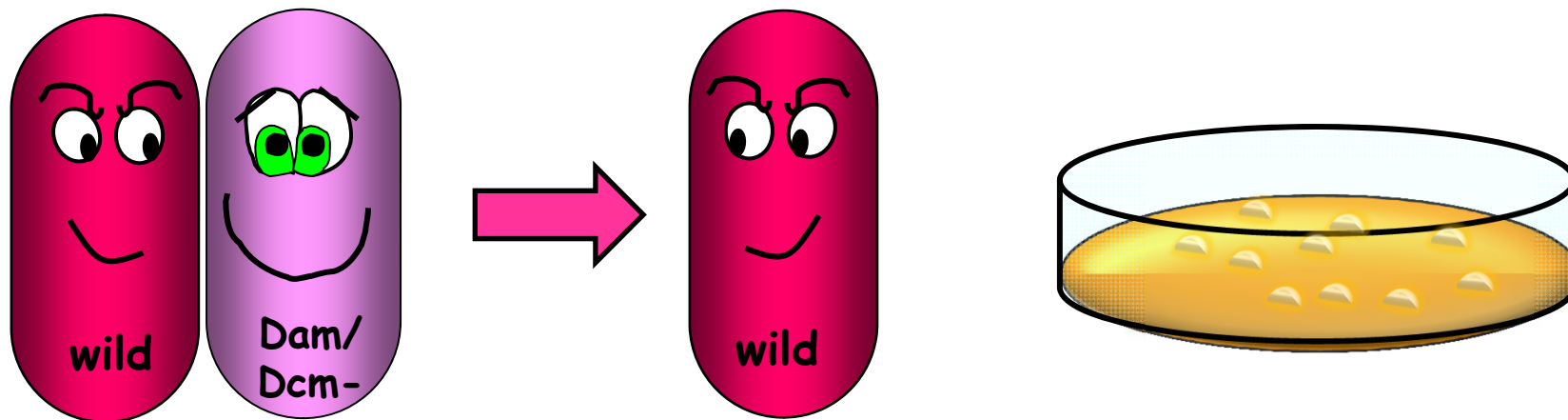


I mutanti Dam o Dcm possono essere usati per preparare il DNA che deve essere tagliato con endonucleasi sensibili alla metilazione

I plasmidi con replicone pMB1/ColE1 e modificati da Dam trasformano con efficienza molto bassa i ceppi dam



Lo stato del plasmide è influente nei ceppi wild



SISTEMI MCR e MRR

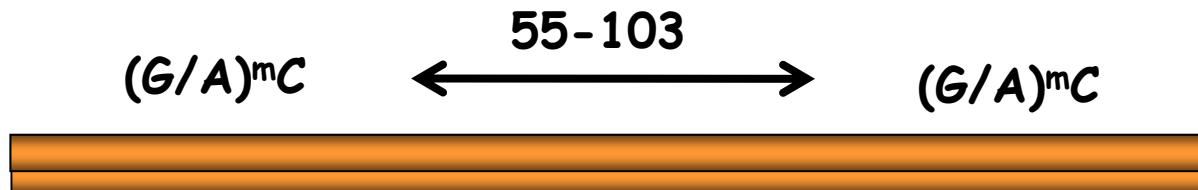
I sistemi McrA e McrBC restringono sequenze in cui siano presenti particolari basi metilate

McrA restringe le sequenze C^mCGG

Il gene che lo codifica si trova nel profago difettivo (e14)

Viene perso dal cromosoma quando si induce il sistema SOS → (e14) si escinde in modo abortivo

McrBC è codificato da due geni adiacenti e taglia nella regione compresa tra due siti $(G/A)^mC$ separati da 55-103 bp



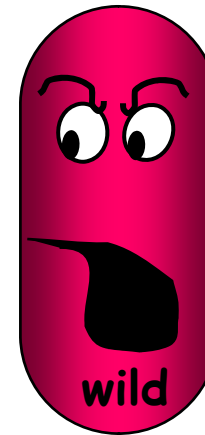
La base metilata può essere 5-idrossimetilcitosina, N^4 -metilcitosina or 5-metilcitosina

Mrr Methylated adenine recognition and restriction

Anche il sistema Mrr taglia sequenze che contengono
N⁶-metiladenina e 5-metilcitosina

Ma la sequenza consensus non è stata identificata

Il DNA dei mammiferi (C*G) e quello delle piante
(C*NG) sono facilmente ristretti dal sistema Mcr



Nei ceppi wild il DNA animale e vegetale clonato rischia di essere
degradato ed è necessario l'uso di mutanti inattivati

RecA, RecBCD

I sistemi dell'ospite possono catalizzare la ricombinazione dei costrutti clonati

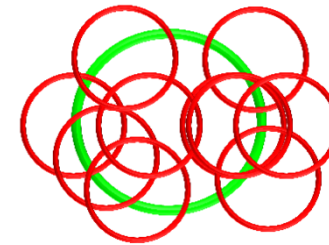


Specie in presenza di sequenze ripetute (dirette o invertite)



inversioni, delezioni, duplicazioni

Se il prodotto risultante è più piccolo dell'originale, si replica più velocemente prendendo il sopravvento



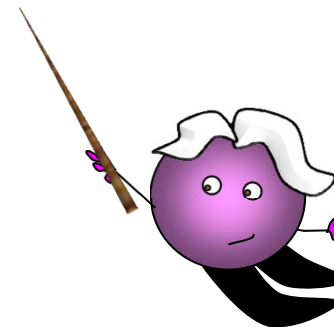
Sistemi di ricombinazione di *E. coli*

recBCD

recE

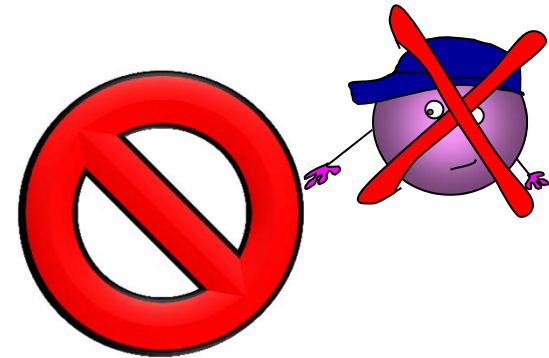
recF

Praticamente tutti dipendono dal prodotto di RecA



RecA- è la condizione più stringente

La mutazioni in *recA* portano alla sintesi di peptidi inattivi e prevengono eventi di ricombinazione a carico del plasmide



**RecA1: mutazione puntiforme $P_{160} \rightarrow D$
riduce la ricombinazione di ~10.000 volte**

**RecA13: mutazione non caratterizzata,
meno efficiente di *recA1***

I Plasmidi con palindromi, anche interrotte,
sono molto instabili in *E. coli* WT

I mutanti *recBCD* stabilizzano le
palindromi nei vettori derivati da Lambda

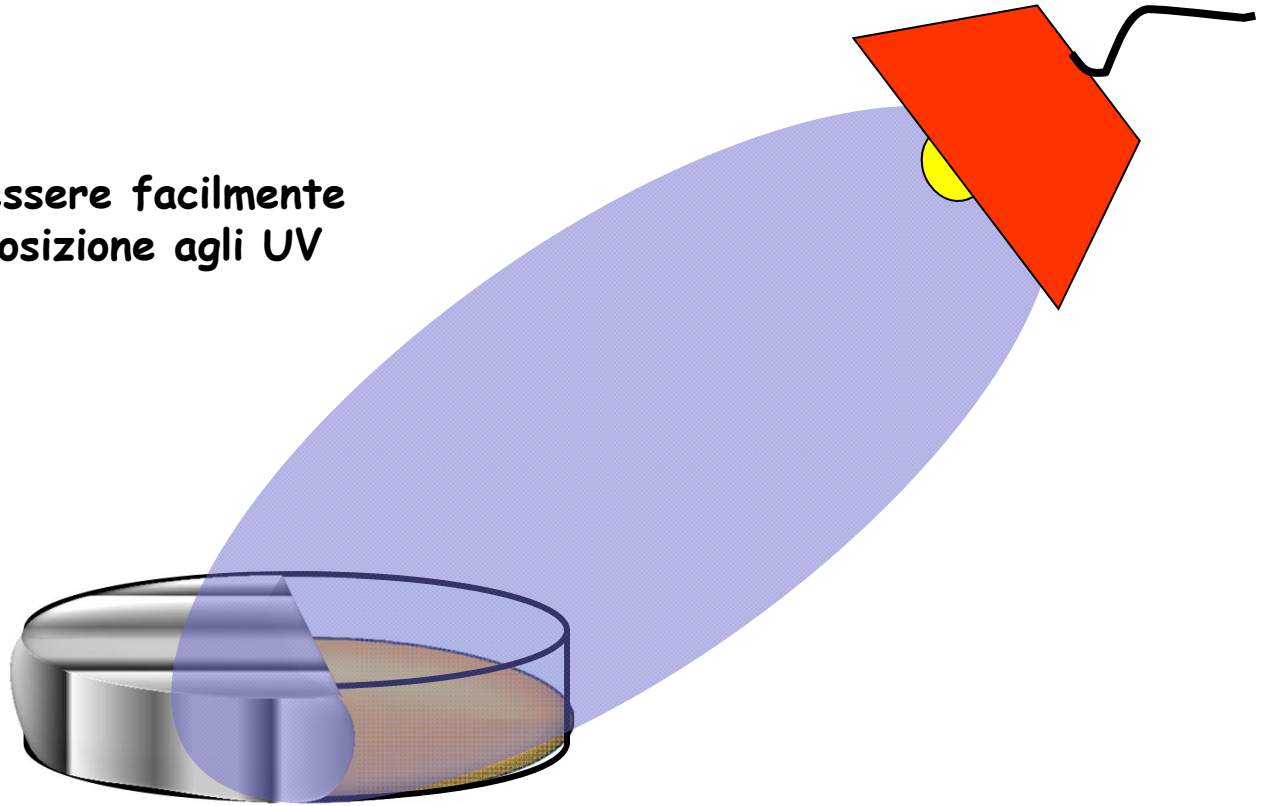
Ma alcuni plasmidi sono instabili, specialmente
i vettori ColE1 ad alto numero di copie

probabilmente per l'avvio di una replicazione a cerchio rotante →
formazione di multimeri lineari che non segregano correttamente

Una concomitante mutazione in *recA* è in grado di
sopprimere questo effetto

I mutanti *rec* crescono più lentamente, sono più esposti agli agenti che danneggiano il DNA e le cellule non vitali si accumulano più rapidamente

Lo stato di *rec* può essere facilmente controllato con l'esposizione agli UV



DH1 (K12)

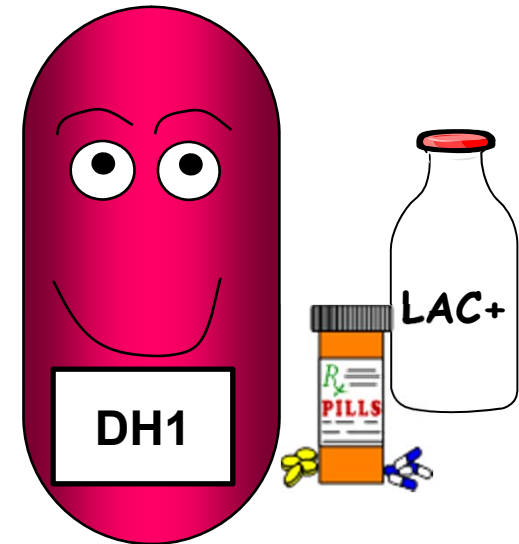
endA1 gyrA9, thi-1, hsdR179(rK-,mK+), supE44, relA1

fermenta il lattosio (INADATTO ALLA SELEZIONE BIANCO/BLU)

Si trasforma facilmente con plasmidi grandi

rK- mK+, endA1- |RecA, Mcr,Mrr,Dam, Dcm +

auxotrofo per la tiamina (*thi-1*)



gyrA96, Nal^R

glnV44 (*supE44*) sopprime le mutazioni nonsense amber (UAG) → si può usare per propagare batteriofagi con mutazioni amber in geni essenziali

relA1: mutazione nella GDP/GTP pirofosfochinasi, → le cellule sono meno sensibili alla privazione in aa (RNA sintetizzato anche quando la sintesi proteica è bloccata)

praticamente non più impiegato nelle procedure standard,
sostituito dal discendente DH5a

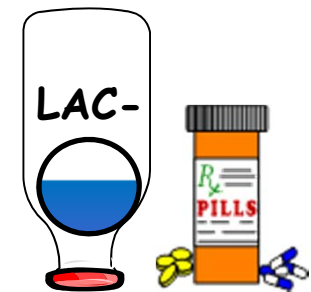
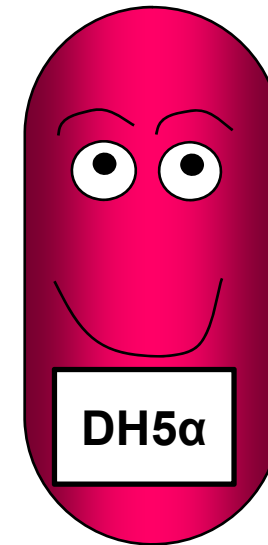
DH5α (K12-derivato da DH1)

Δ80 Δ(lacZ)M15 Δ(argF-lacZ)U169 recA1 phoA deoR glnV44
gyrA96 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

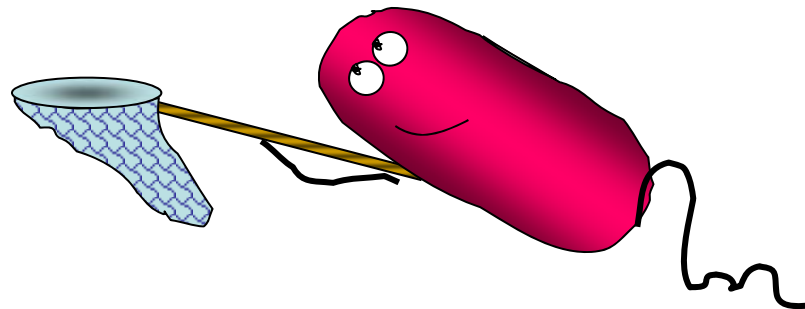
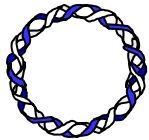
Non fermenta il lattosio
È auxotrofo per tiamina e arginina
ADATTO ALLA SELEZIONE BIANCO/BLU

RecA1, EndA1, hsdR -
Dam/Dcm, Mcr +

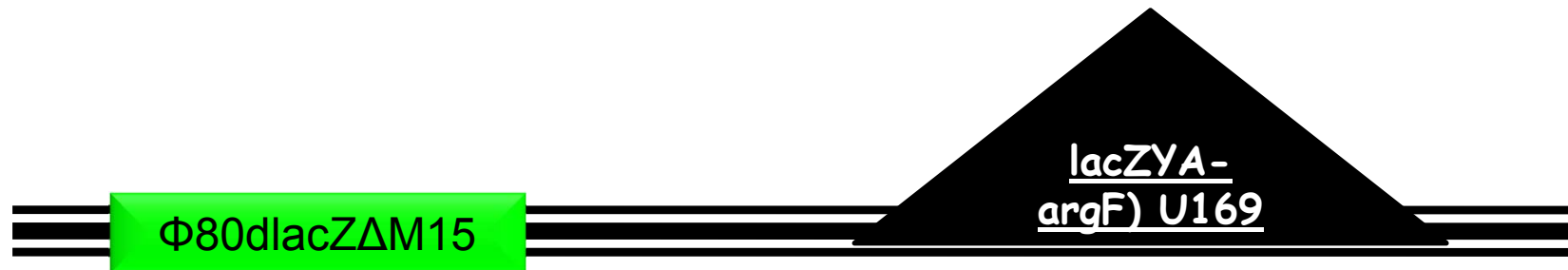
Alta efficienza di trasformazione



manca il repressore dell'operone per la biosintesi del ribosio (deoR) →
maggiore efficienza di trasformazione, specialmente con plasmidi grandi



(lacZYA-argF) U169: l'intero operone lac sul cromosoma è stato eliminato



$\Phi 80dlacZ\Delta M15$ il ceppo porta un profago con l'allele lacZ $\Delta M15$ in cui mancano gli a.a. 11-41; questa mutazione può essere complementata dal vettore

La delezione di lac coinvolge anche *argF* → in terreni minimi va aggiunta arginina
Per lo stesso motivo il ceppo non esprime la fosfatasi alcalina (*phoA*)

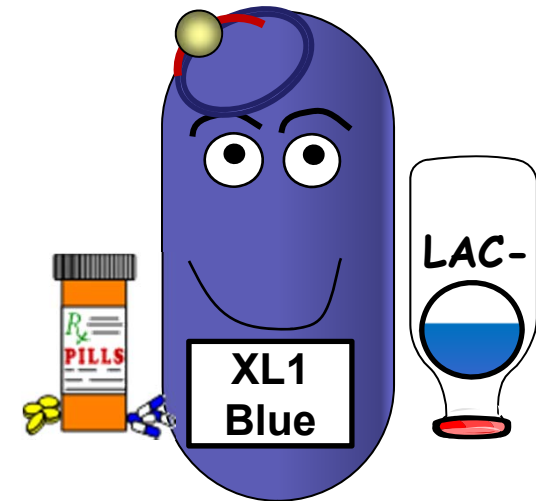
DH5a è adatto per clonazioni di routine e per le sub-clonazioni agevolate dalla possibilità di screening

XL1 Blue

XL1-blue: endA1 gyrA96 thi1 recA1 relA1 lac glnV44
hsdR17 F'[::Tn10 proAB+ lacI^q Δ(lacZ)M15]

Caratteristiche generali simili a DH5α

è dotato di un plasmide F' con geni cromosomici
provenienti da precedenti eventi di ricombinazione



TET^R (Tn10)

Δ(lacZ)M15, sul trasposone in F',
permette la selezione bianco-blu

allele mutato del repressore lacI
→ Fenotipo LacI^q

I caratteri su F' possono essere trasferiti per
coniugazione ad altri ceppi

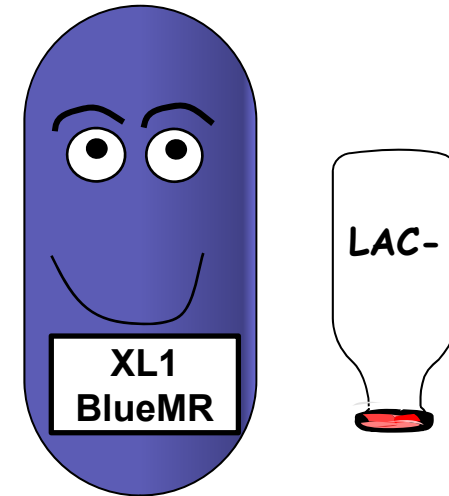
La presenza di Tn10 su F' può occasionalmente creare problemi: in qualche caso
il trasposone si è spostato, interrompendo l'espressione di un gene eterologo

XL1-blue è adatto per clonazioni di routine e per le
sub-clonazioni agevolate dalla possibilità di screening

XL1 Blue MR

XL1-Blue MR Genotype: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac*

Derivato da XL1-Blue ma privo di sistemi di restrizione

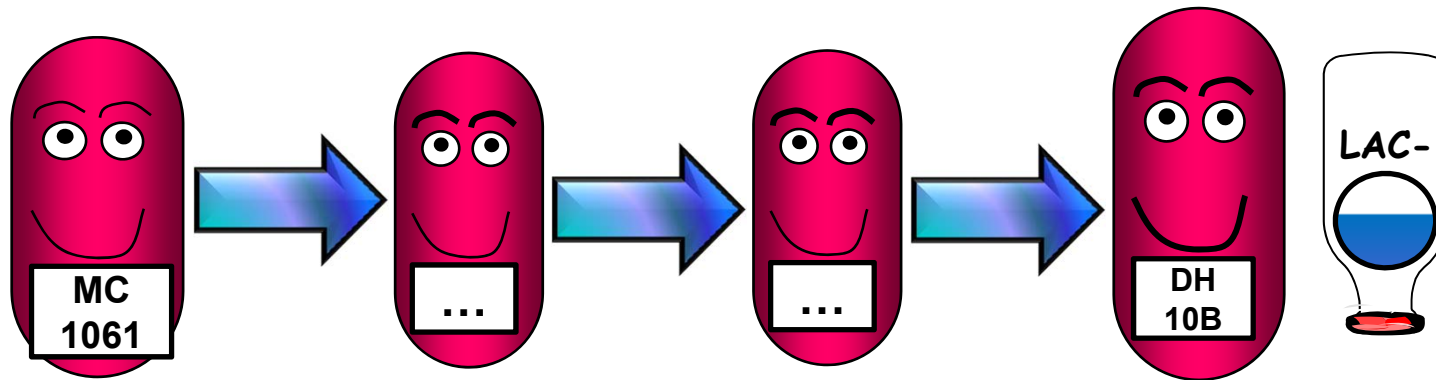


A differenza del ceppo parentale non ha l'episoma F' e non supporta la selezione bianco-blu

DH10 B

endA1 recA1 (galE15 galK16) nupG rpsL Δ lacX74 Φ 80lacZ Δ M15 araD Δ (ara,leu)7697
mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)

Ceppo creato attraverso una serie di passi, dal parentale MC1061



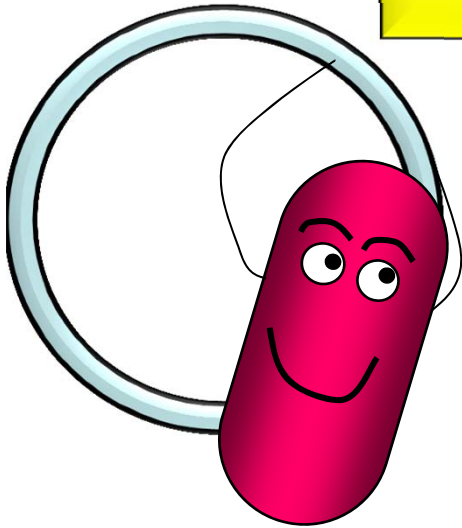
EndA1, RecA hsd,Mcr,Mrr - | Dam, Dcm +

Δ (lac)X74 = delezione dell'intero operone lac e alcune regioni fiancheggianti
allele difettivo sul profago $\rightarrow$ selezione bianco blu

araD139 mutazione nel gene *araD* $\rightarrow$ il ceppo non metabolizza l'arabinosio (parentale)
 Δ (ara,leu) 7697 delezione negli operoni per il catabolismo dell'arabinosio (parziale)
e la sintesi della leucina (entrambe parentali)
rpsL mutazione nella subunità 30S del ribosoma, $\rightarrow$ STREPR (parentale)

nupG elimina una delle permeasi per il trasporto dei nucleosidi, l'effetto è simile a deoR, con una maggiore stabilità di plasmidi di grandi dimensioni

E' usato per clonazioni che richiedono grande efficienza di trasformazione (es librerie genomiche) e mantenimento di grandi plasmidi (BAC, PAC)



ha un numero di IS molto superiore a quello di MG1655, che comporta un tasso di mutazione di circa 13 volte più alto di quest'ultimo

Il DNA propagato in DH10B è degradato nei ceppi r+m+
Per le subclonazioni vanno scelti ceppi r-m+

Il cromosoma di DH10B è stato sequenziato

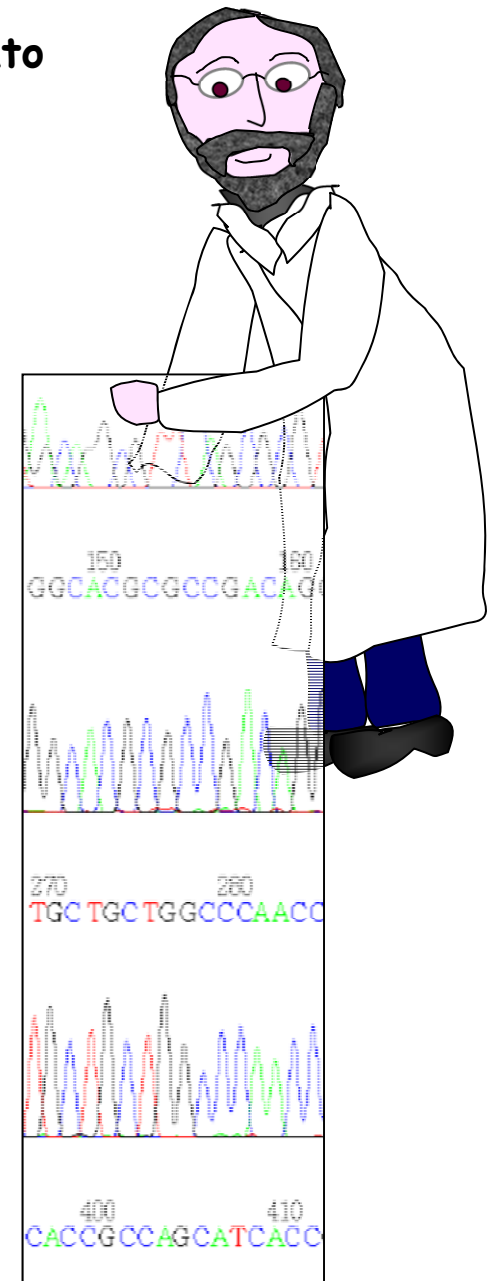


**il ceppo è wildtype per
galEK, e per deoRc**

**Che si pensava fossero mutati
già nel parentale MC1061**

**Il motivo per cui DH10B si trasforma con
tanta efficienza, quindi, non è la mutazione
deoR e resta da comprendere**

**galEK → mancato metabolismo del galattosio, maggior
resistenza al fago P1: queste mutazioni mancano in
DH10B (probabilmente anche nel parentale)**



JM-110

rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galk galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]

E' usato per preparare DNA da plasmidi e fagemidi senza le signature dam o dcm, per poterlo digerire senza problemi con enzimi sensibili a queste metilazioni

Sull'episoma F' proAB complementano la delezione in cui sono coinvolti i corrispondenti geni cromosomici

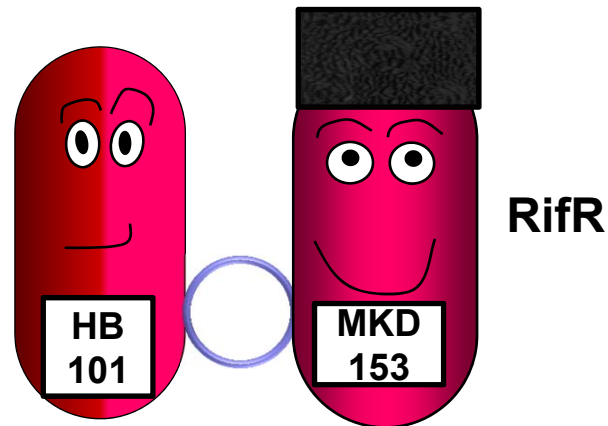
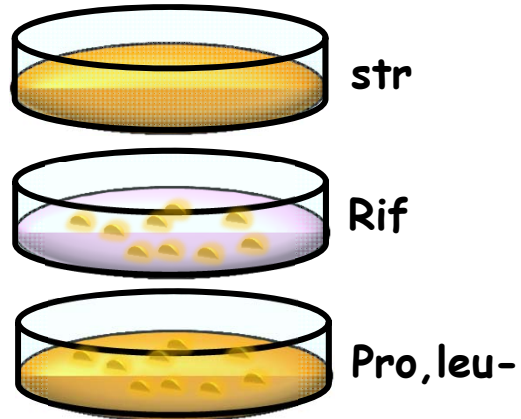
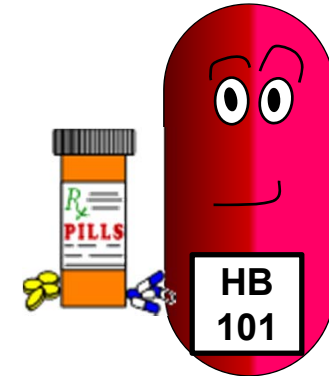
È presente l'allele difettivo di lacZ che permette la selezione bianco-blu

HB 101

thi-1, *hsdS20*, *glnV*, *recA13*, *ara-14*, *leuB6*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20(str^r)*, *xyl-5*, *mtl-1* (*mcrB mrr-* non riportati da tutti i fornitori)

Ceppo ibrido *E. coli* K12/*E. coli* B
(ma a maggioranza K)

non metabolizza arabinosio (*ara-14*), galattosio (*galK2*), xilosio (*xyl-5*) e mannitolo (*mtl-1*)



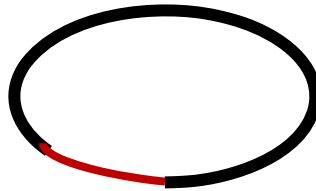
L'auxotrofia per leucina (*leuB6*) e prolina (*proA2*) e la resistenza alla streptomicina (*rpsL20, strR*), sono marcatori utili per le prove di coniugazione

usato nella costruzione di librerie fagiche
basate sull'uso del fago lambda e di cosmidi

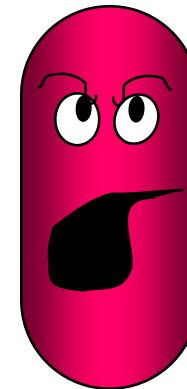
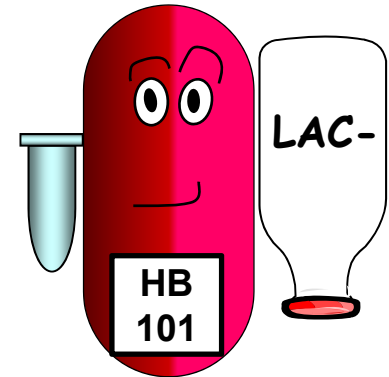
Il DNA propagato in HB101 è degradato nei ceppi r^+m^+
Per le subclonazioni vanno scelti ceppi r^-m^+

Fenotipo lac^- a causa di una mutazione nella permeasi
 $LacY \rightarrow$ NON IDONEO ALLA SELEZIONE BIANCO/BLU

$recA13$ non garantisce la stabilità
dei costrutti quanto $recA1$

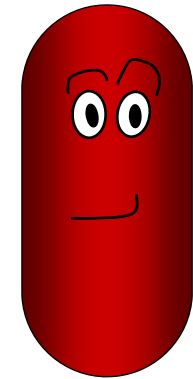


sono necessari accorgimenti particolari per garantire la
qualità delle preparazioni plasmidiche ($endA^+$)

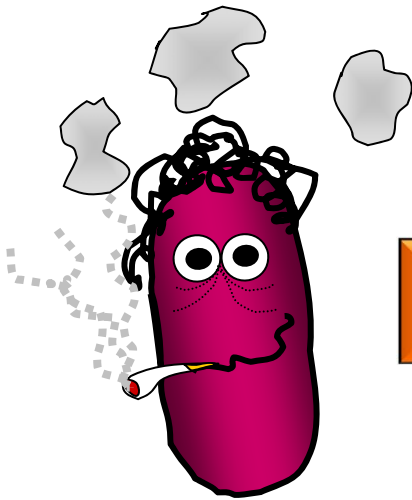


E. coli "B"

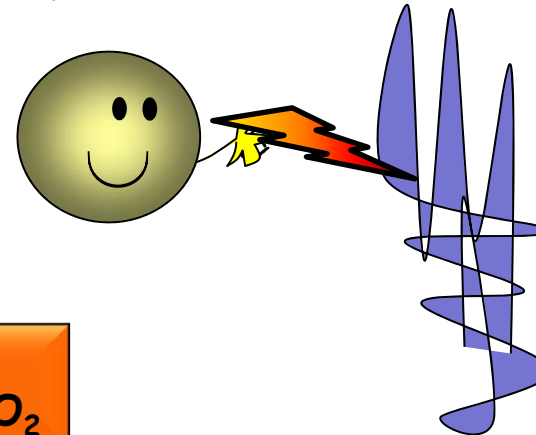
mancano naturalmente della proteasi Lon



nei ceppi K-12 Lon degrada le proteine con un folding scorretto ed elimina le proteine a vita breve, specifiche di alcuni momenti del ciclo cellulare



le cellule "lon" muoiono più rapidamente in carenza di O_2



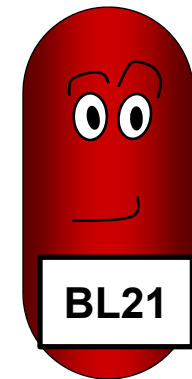
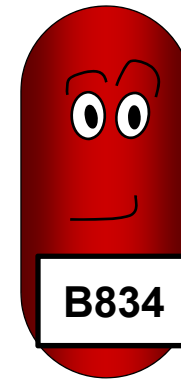
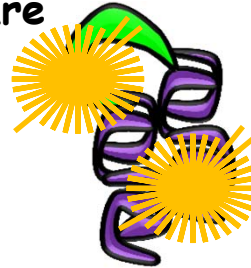
L'assenza di Lon provoca un accumulo della proteina Sula, responsabile dell'arresto della crescita durante la risposta SOS. Mutazioni nel gene *sulA* minimizzano i difetti di crescita dei ceppi lon

B-834/BL21

met dcm, gal, hsdS, ompT, F-

B834 è auxotrofo per Met, usato per marcare le proteine con [35S]-Met o per incorporare selenometionina per la cristallografia

BL21 è stato ottenuto eliminando l'auxotrofia per la metionina da B834



E' uno dei coli "B" più impiegati come ospite per le espressioni

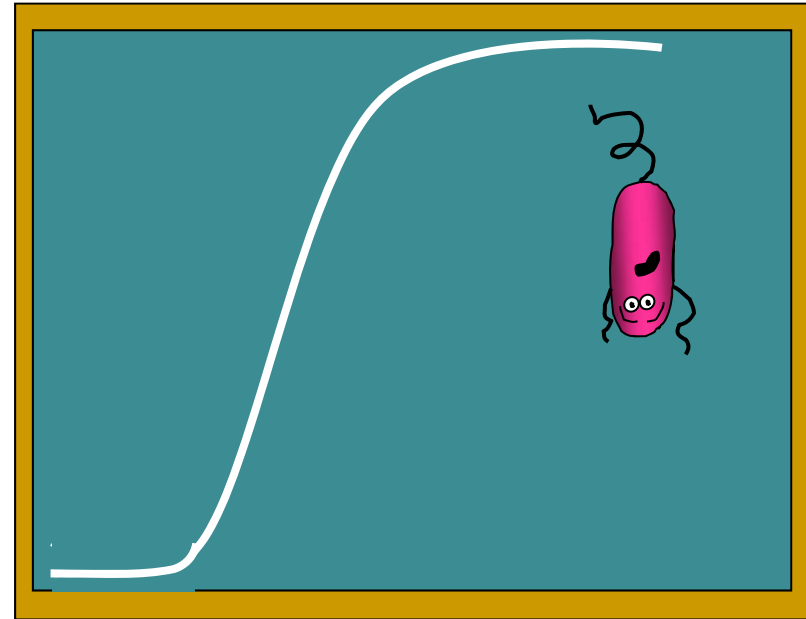
Entrambi i ceppi sono difettivi per la proteasi
OmpT oltre che Lon (tipica di tutti i coli B)

OmpT è una proteasi localizzata sulla superficie della cellula, la cui funzione è probabilmente quella di facilitare l'assunzione di aminoacidi dall'ambiente esterno

La mancanza di OmpT riduce le possibilità di degradazione delle proteine eterologhe

Ma rende le cellule fragili, specialmente in fase stazionaria

B834 e BL21 non hanno mutazioni che bilancino questo effetto secondario delle mutazioni Lon e OmpT



Sono RecA⁺ EndA⁺ sono quindi più adatti come ospiti terminali per l'espressione di singole ORF che per clonazioni dirette o passaggi intermedi

La trasformazione con DNA preparato in ceppi m⁺ può avere una bassa efficienza

B834 può dare una resa maggiore, rispetto al più usato BL21 con proteine tossiche per l'ospite

BL21/B834 (DE3)

BL21 e B834 sono spesso usati nella forma (DE3)
resa lisogena con il batteriofago λ DE3, che permette che
l'espressione dei geni eterologhi sia diretta dal promotore T7

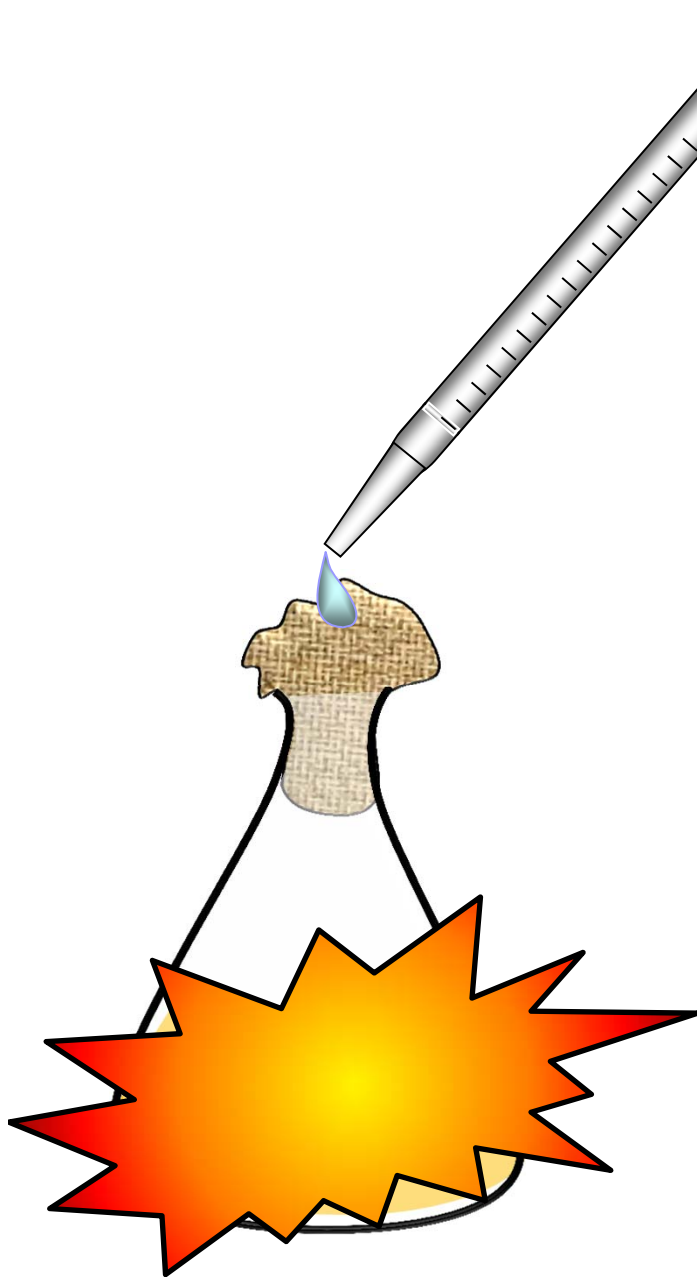
E possono essere trasformati con pLysS per
ottenere una maggiore stringenza della regolazione

BL21-SI

La T7 RNA polimerasi, nel fago DE3, è posta sotto
il controllo del promotore *prdU*, inducibile con NaCl



Per evitare l'induzione precoce BL21-SI va coltivato nel terreno LBON (LB privo di sale) a 30 °C



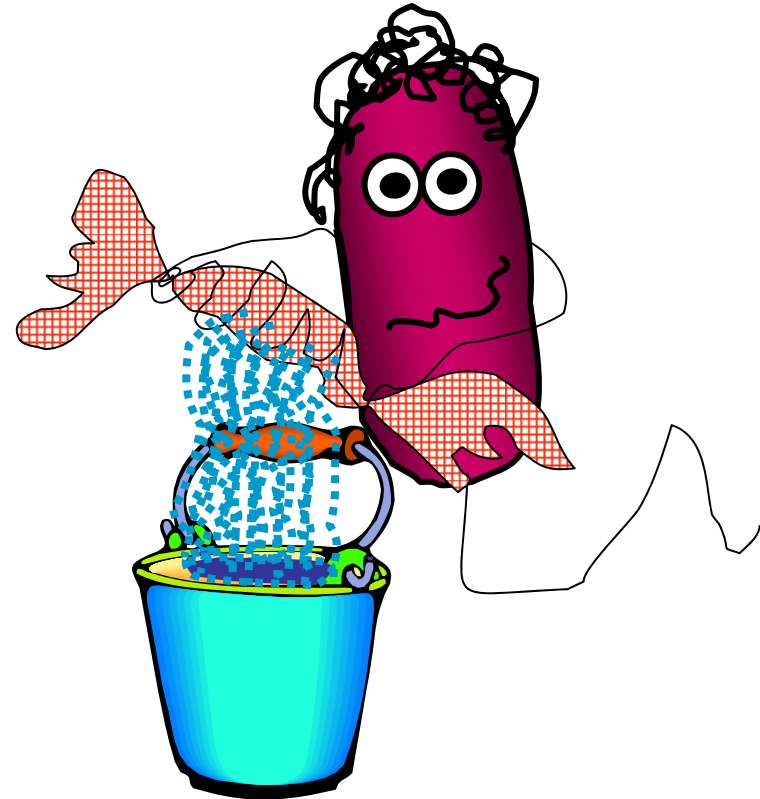
al momento opportuno si aggiunge una soluzione di NaCl sterile per avere una concentrazione finale, di circa 0,3 M; (intervallo 0,1-0,5 M)

L'acqua è indispensabile per i batteri ma non può essere trasportata e deve entrare nella cellula per diffusione

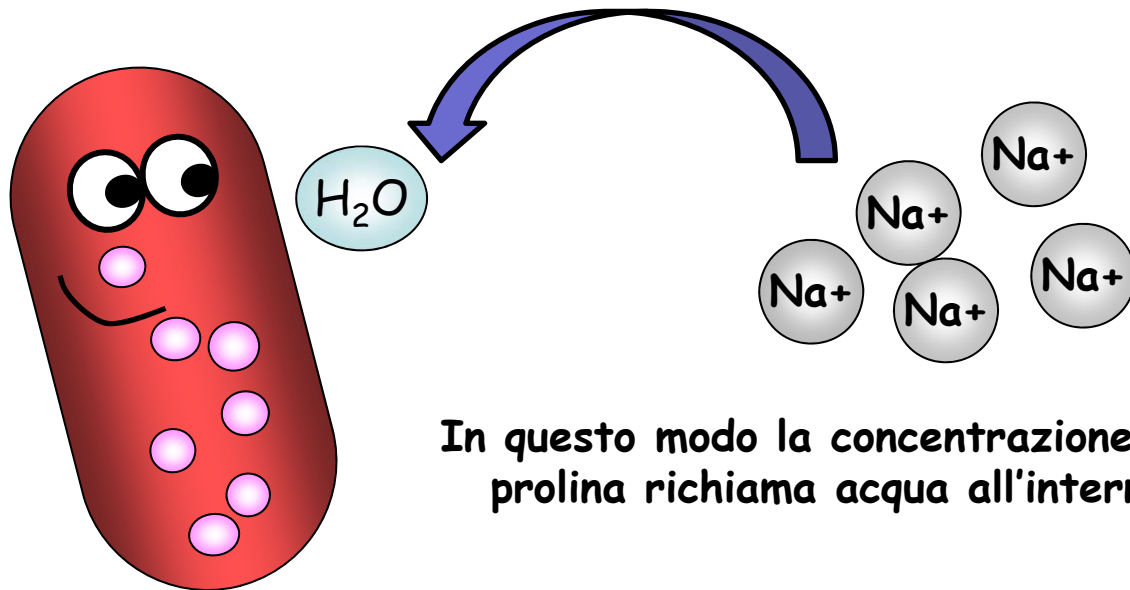
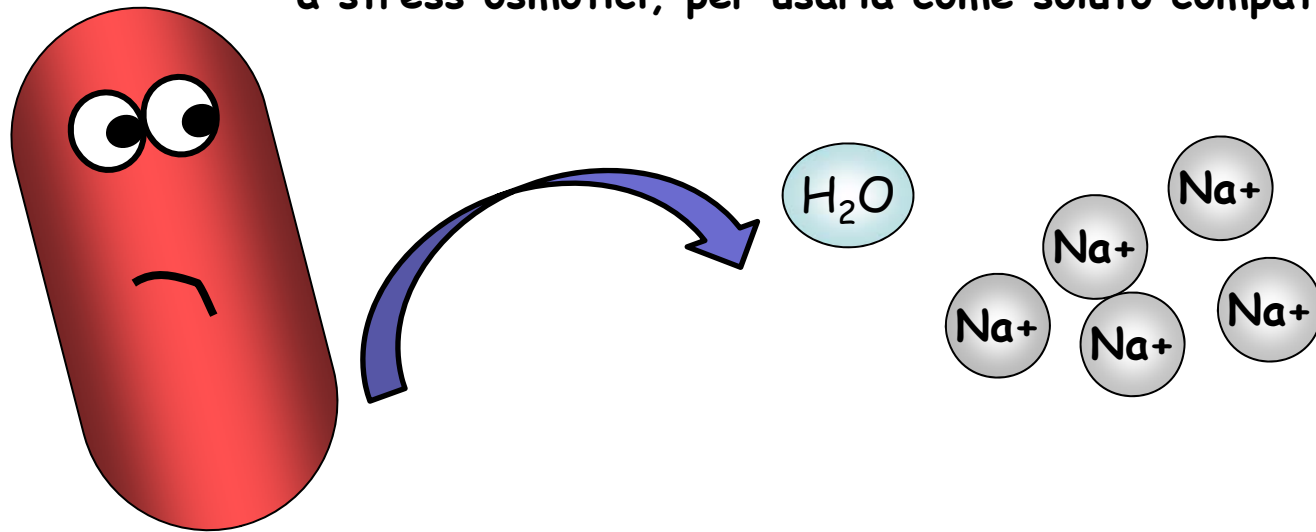
Se la pressione osmotica dell'ambiente aumenta l' H_2O deve essere "estratta" dall'esterno e richiamata alla cellula

questo scopo può essere raggiunto giocando con la concentrazione e il trasporto di ioni e soluti

sintetizzando o concentrando soluti organici ("soluti compatibili")
che non danneggino i processi biochimici interni



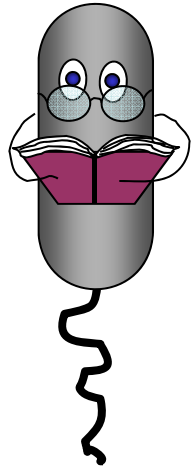
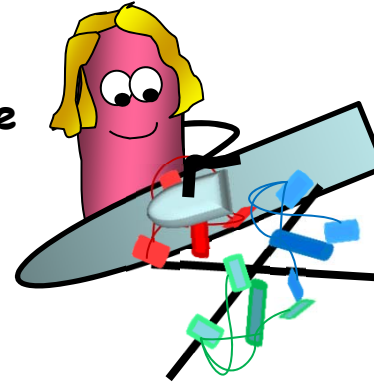
Il gene *proU*, in *E. coli*, avvia la sintesi di prolina in risposta a stress osmotici, per usarla come soluto compatibile



In questo modo la concentrazione intracellulare di prolina richiama acqua all'interno della cellula

A questi ceppi se ne sono aggiunti altri,
con caratteristiche nuove, per

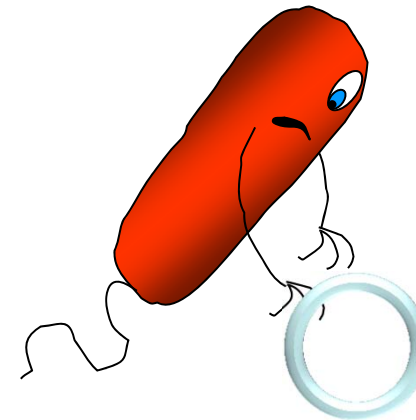
migliorare il folding delle proteine
eterologhe



minimizzare gli inconvenienti
associati ai codoni rari

La clonazione di plasmidi instabili

Ridurre i geni superflui



LA SCOPERTA DI FA113

La produzione di proteine nel citoplasma è sfavorita dallo stato fortemente ridotto in cui questo comparto si trova

I doppi mutanti *trxB gor*, che non riducono tioredoxina e glutatione, accumulano una forma ossidata e attiva di fosfatasi alcalina nel citoplasma

In assenza di sostanze riducenti esogene (es. DTT), questi ceppi crescono molto male ($T_{(G)} = \sim 300'$) e tendono ad accumulare soppressioni extrageniche

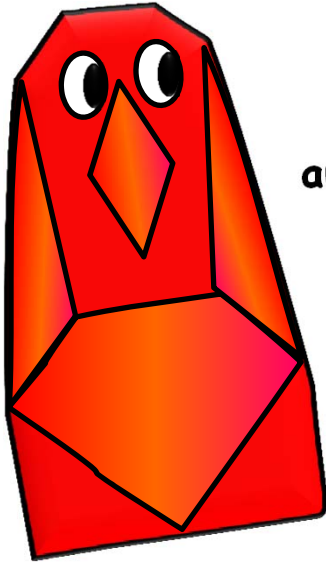
Uno di questi ceppi (FA113) cresceva rapidamente ($T_{(G)} 30'$) quasi come il ceppo parentale ($T_{(G)} 27'$) e mostrava una cinetica più rapida nella formazione di ponti disolfuro nel citoplasma

Il fenotipo era legato a una iperespressione dell'attivatore trascrizionale OxyR, coinvolto nella regolazione della risposta agli stress ossidativi

La % di proteine ripiegate correttamente, recuperata dal citoplasma di FA113 era superiore a quella ottenuta dal periplasma del ceppo parentale

FA113→ORIGAMI

*Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoAphoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac⁺
lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB ::kan (Str^R, Tet^R, Kan^R)*



ceppo K-12 (parentale DH4B) con una doppia mutazione per aumentare la formazione di ponti disolfuro all'interno del citoplasma

nella thioredoxina reduttasi (*trxB*)
e nella glutatione reduttasi (*gor*)

La mancanza di una idroperossido-reduttasi funzionale (*ahpC*) aiuta a mantenere il citoplasma in stato ossidato

Ceppo adatto per l'espressione di ORF già inserite in costrutti preparati in altri ceppi e propagati in ceppi m⁺

Da usare solo per l'espressione di proteine che richiedono la formazione di ponti disolfuro per un folding corretto

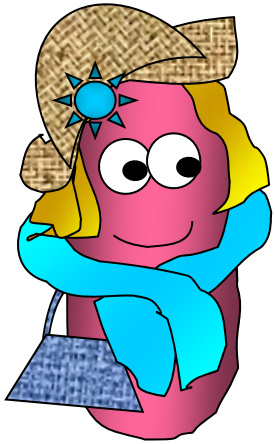
La doppia mutazione *trxB+gor* comporta il rischio della formazione indebita di ponti disolfuro tra molecole diverse nel citoplasma

È necessario applicare la selezione con KAN e TET oltre a quella richiesta dal plasmide

La variante Origami 2 è KAN^S ma TET è ancora necessaria per mantenere *gor*

Origami B è stato ottenuto da un mutante *lacZY* di BL21 e, oltre alle caratteristiche descritte, manca di Lon e OmpT

Questo ceppi sono disponibili anche come (DE3), anche già trasformati con *pLysS* (in questo caso sono anche CM^R)



ROSETTA-2

F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CM^R)

E. coli B, derivato da BL21

contiene il plasmide pRARE2 con un replicone p15
(compatibile con pMB1/ColE1) e selezione cloramfenicolo

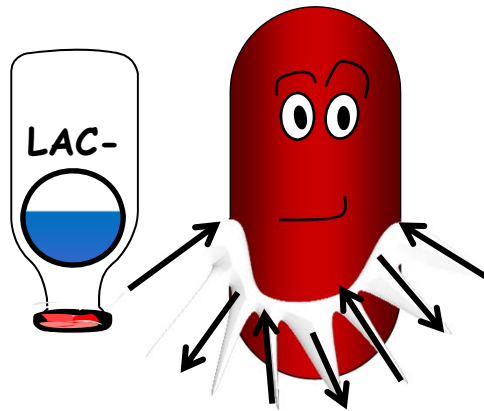
pRARE2 supplisce alla carenza di tRNA per AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA e CGG; i geni-tRNA sono controllati dai promotori naturali

creato per migliorare l'espressione di proteine eucariotiche
codificate da geni con un alto contenuto di codoni rari in *E. coli*

La scelta del plasmide di espressione deve tenere conto della
presenza di pRARE2 (non può p15 o selezione con CM)

SURE (Stop Unwanted Rearrangement Events)

recB, recJ, sbcC201, phoR, uvrC, umuC::Tn5, mcrA, mcrB, mrr, hsdRMS),
endA1, gyrA96, thi, relA1, lac*, supE44, (F'proAB, lacI Z M15, Tn10).



destinate alla clonazione di strutture irregolari
(con inverted repeats o strutture secondarie)

Ottenute rimuovendo o alterando i geni coinvolti
nel riarrangiamento o la delezione di DNA

resistente a TET e KAN

L'allele che permette la selezione
bianco-blu è sull'episoma F'

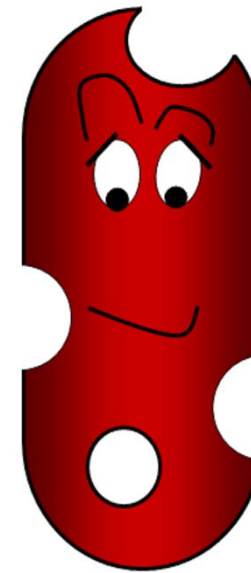
Deficienti nel sistema di riparazione UV (*uvrC*) e SOS (*umuC*), che porta a un aumento di 10-20 volte nella stabilità del DNA con lunghi inverted repeats
Mutazione in *SbcC* e *RecJ* (aumentano la stabilità della struttura dello Z-DNA)
Mutazioni nei sistemi *RecB* e *RecJ* (riduzione della ricombinazione omologa)

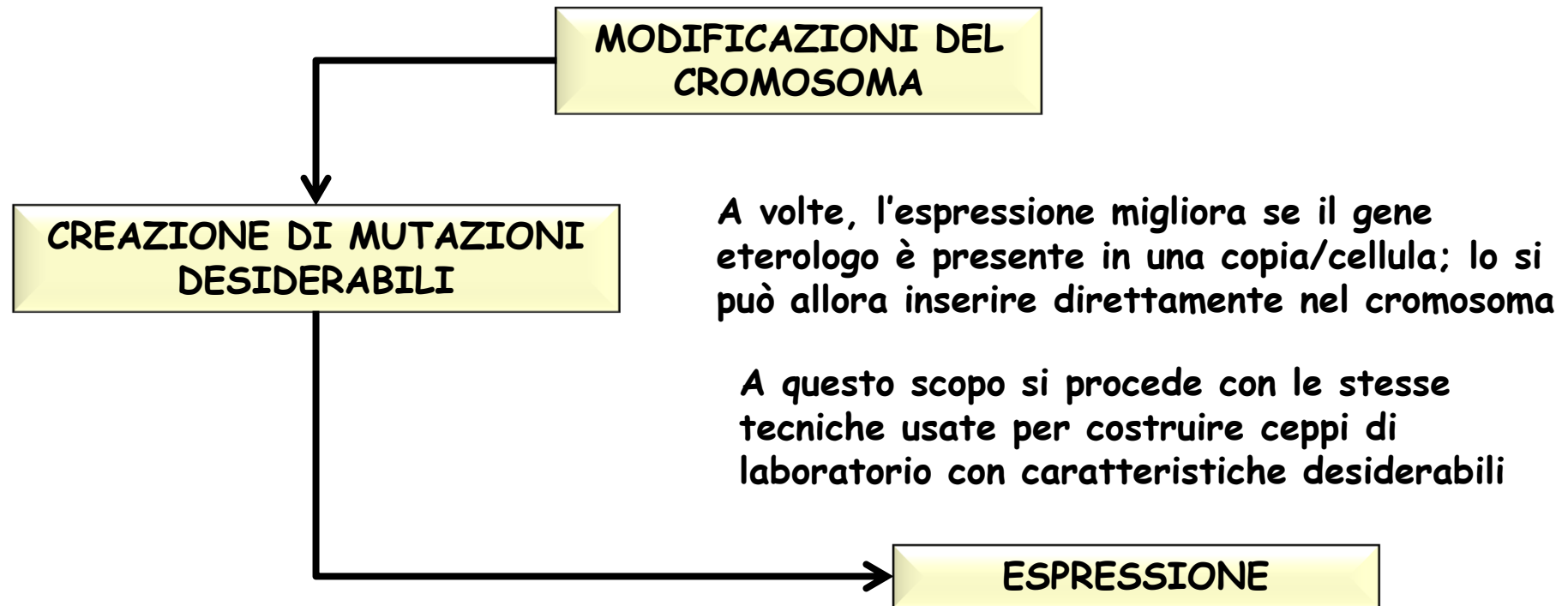
SEMPRE PIU' "MAGRI"

La conoscenza della struttura del genoma di diversi ceppi di *E. coli*, ha recentemente permesso di costruire e commercializzare una serie di ceppi "minimalisti"

ScarabXpress manca di circa il 15% del genoma
ma mantiene tutte le funzioni necessarie per la
crescita e la produzione di proteine

in questo ceppo è presente anche una copia della
T7 RNA polimerasi, sotto il controllo di Plac





ricombinazione omologa
(Successo legato alla specie e al ceppo)



Strategie alternative

Lambda-Red

XerC-XerD

IN-OUT?

**Ricombinazione con Lambda-Red
(Datsenko e Wanner, 2000)**

il sistema di ricombinazione Red del fago Lambda è formato da:

exo e β : esprimono un sistema di ricombinazione omologa a cui bastano 35 bp di omologia per promuovere il crossing over

γ : il suo prodotto inattiva la DNAsi RecBC (esonucleasi V) di *E. coli*

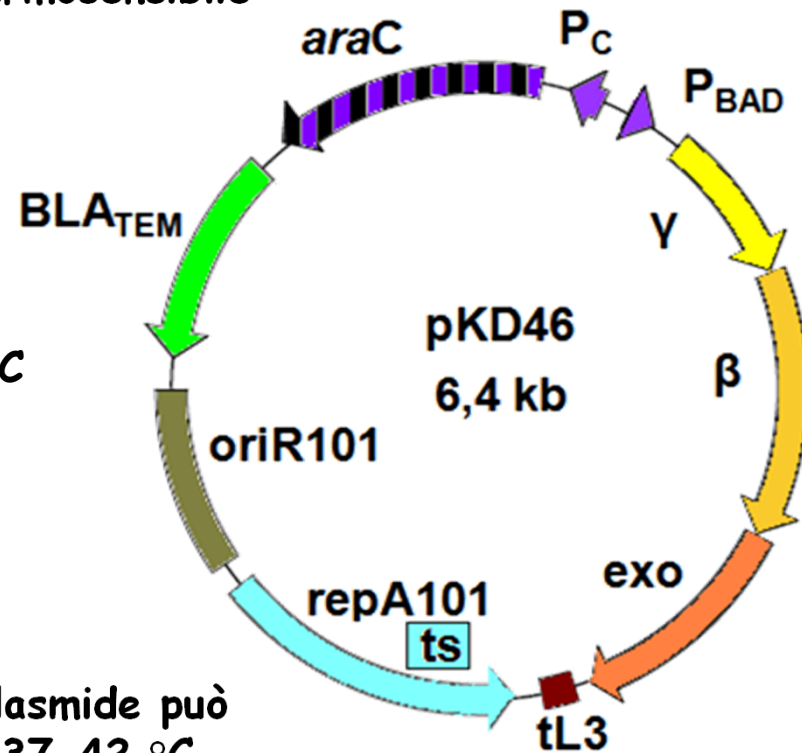
Con questo protocollo sono necessari 6 passi per ottenere una delezione; può essere facilmente adattato per ottenere un'inserzione

1) Trasformazione con pKD46

pKD46 contiene il sistema Red sotto il promotore ParaBAD e possiede un'origine di replicazione termosensibile

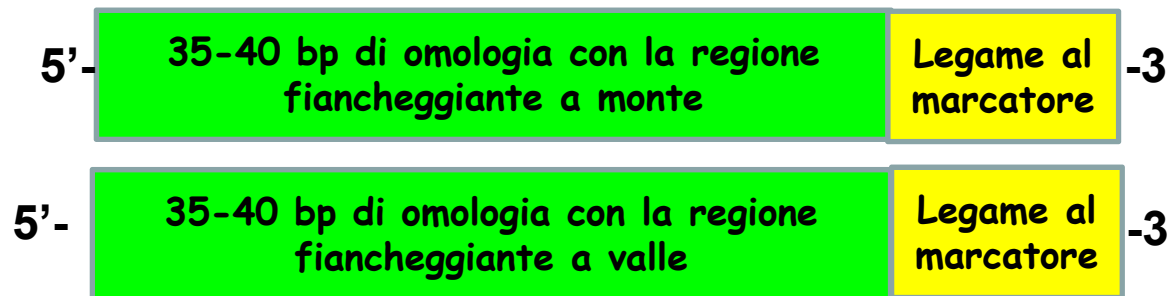
Per mantenere il plasmide dopo la trasformazione il ceppo va tenuto a 30 °C

In assenza di selezione antibiotica, questo plasmide può essere curato coltivando il trasformante a 37-42 °C



2) Preparazione del marcatore per la delezione

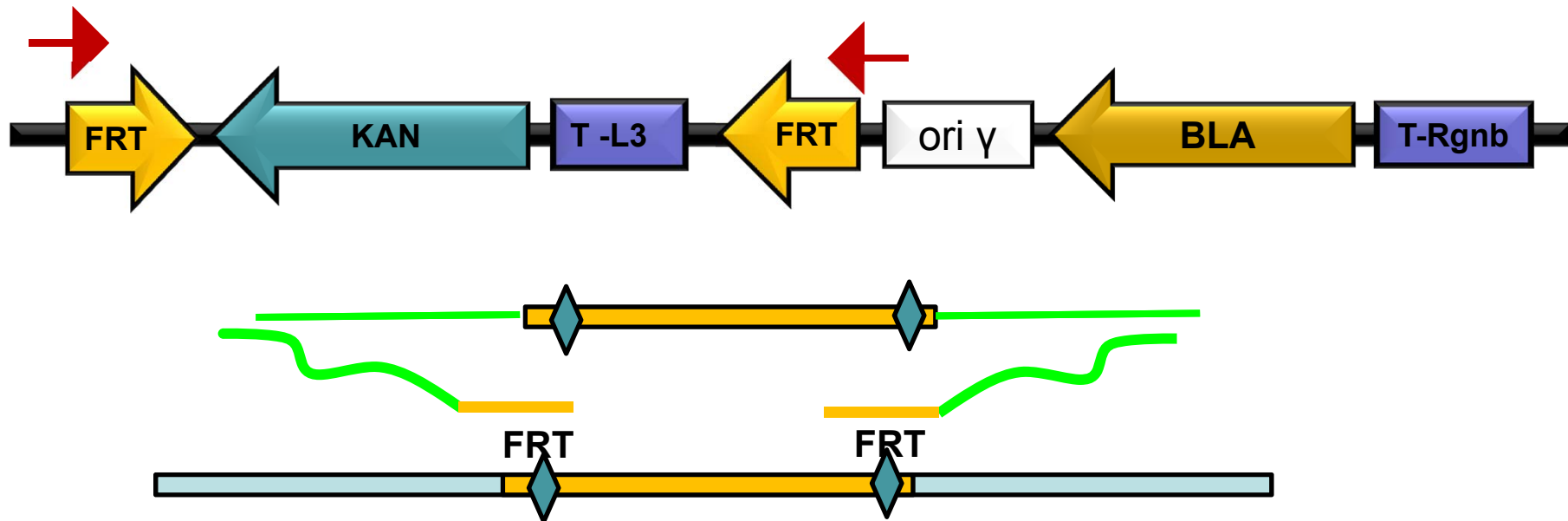
amplificazione, per PCR di un gene di resistenza, fiancheggiato da regioni omologhe a quelle che fiancheggiano il gene da disrompere



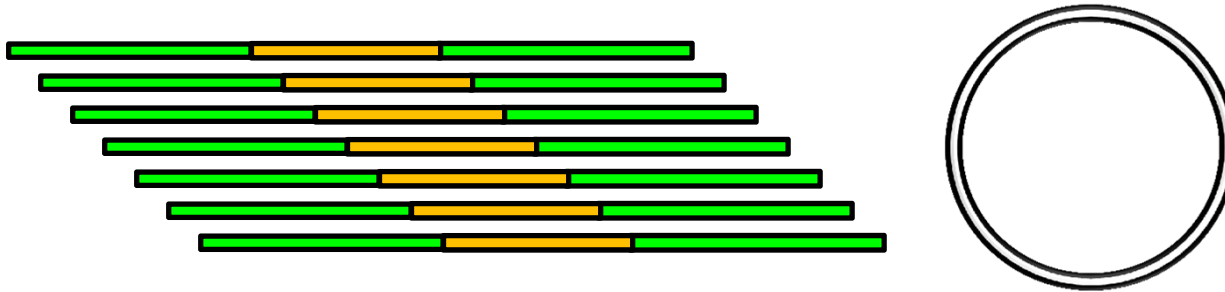
Le cassette di resistenza sono predisposte su plasmidi "template" e sono fiancheggiate da siti di FRT, bersaglio della ricombinasi sito specifica di Lambda (FLP)

I plasmidi template hanno l'origine di replicazione di R6T (ori γ) termosensibile;
questa origine ha bisogno della proteina Π (prodotto del gene *pir*) in trans

nei ceppi *pir*⁺ o *pir*¹¹⁶ (iperespresso) il plasmide mantiene circa 15-
20 copie per cellula



L'amplimero è trattato con DpnI (taglia solo il DNA metilato)



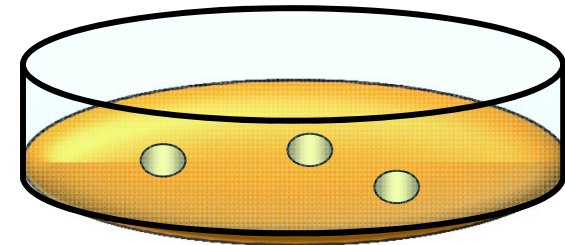
Concentrato e lavato (filtri a taglio molecolare) fino a restare
sospeso in acqua deionizzata purissima

si usa poi per elettroporare le cellule trasformate con pKD46

Preparazione delle cellule competenti

Le cellule competenti del ceppo (pKD46), si preparano inducendo con arabinosio 1-10 mM per almeno un'ora prima di raccogliere la crescita, per far esprimere il sistema Red

si trasforma per elettroporazione; la trasformazione con DNA lineare è resa possibile dalla presenza del gene *gam* su pKD46



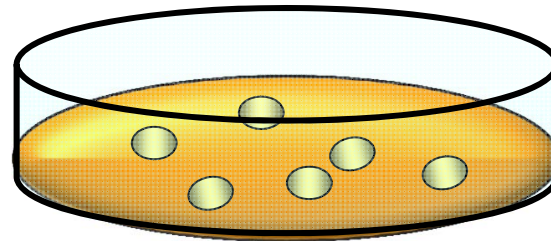
si semina su piastre antibiotate per cercare gli integranti e si controlla l'effettiva avvenuta delezione

" usando primer esterni e interni alla cassetta



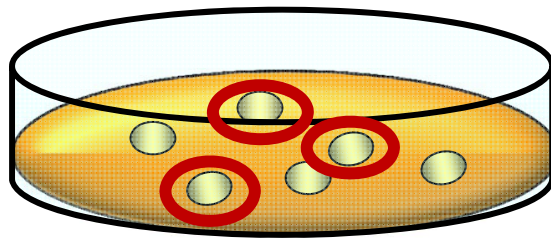
4- Selezione e Curing di pKD46

Una volta controllati, gli integranti sono coltivati a 42 °C, in assenza di selezione, per eliminare il plasmide

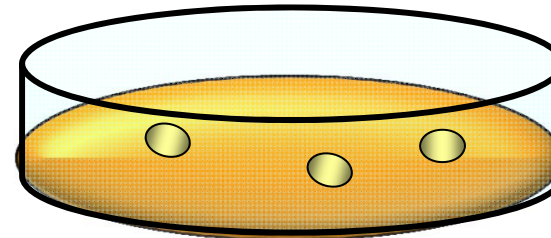


42 °C
No AMP

Si verifica la perdita effettiva del plasmide coltivando a 30 °C e controllando che la resistenza all'ampicillina sia stata persa



30 °C
No AMP



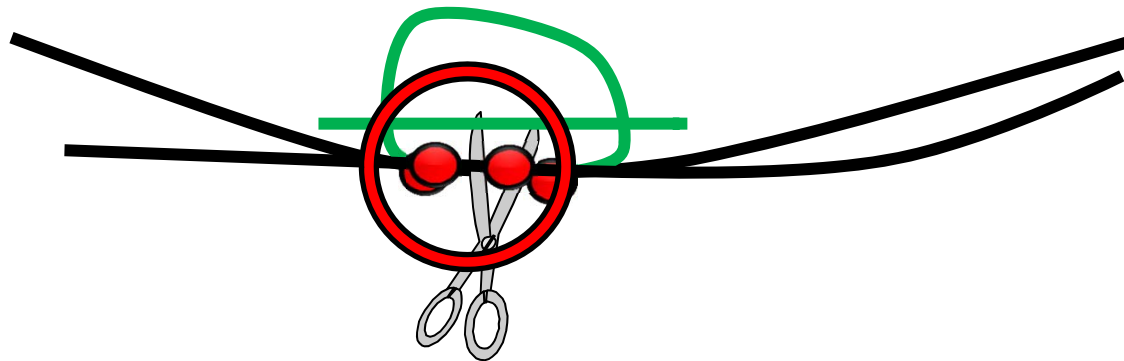
30 °C
AMP

5- escissione della cassetta di resistenza

Si trasforma il ceppo ricombinante con pCP20 (selezione ampicillina, ORI yts), un plasmide che esprime la ricombinasi FLP di Lambda



FLP riconosce i siti FRT che fiancheggiano la cassetta di resistenza, taglia e ricombina al loro interno eliminando la cassetta



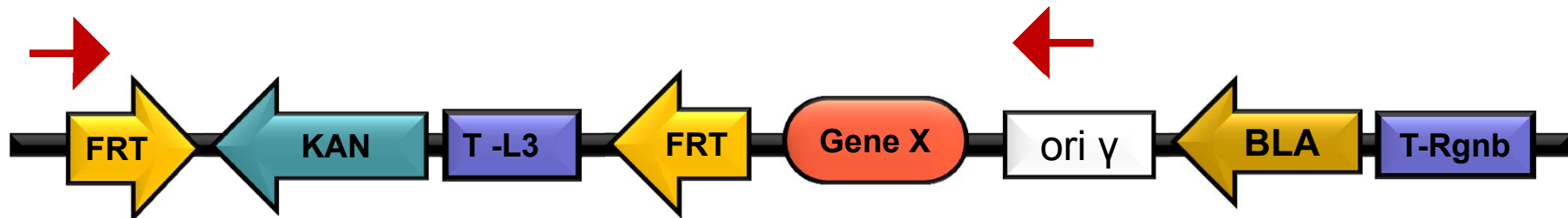
sul cromosoma resta una cicatrice con i due siti FLP adiacenti

6- escissione della cassetta di resistenza

Il passo finale consiste nell'eliminazione di pCP20 dalla cellula

INSERZIONI

Questo protocollo può essere adattato per ottenere delle inserzioni, preparando un costrutto in cui il gene da inserire sia adiacente alla cassetta

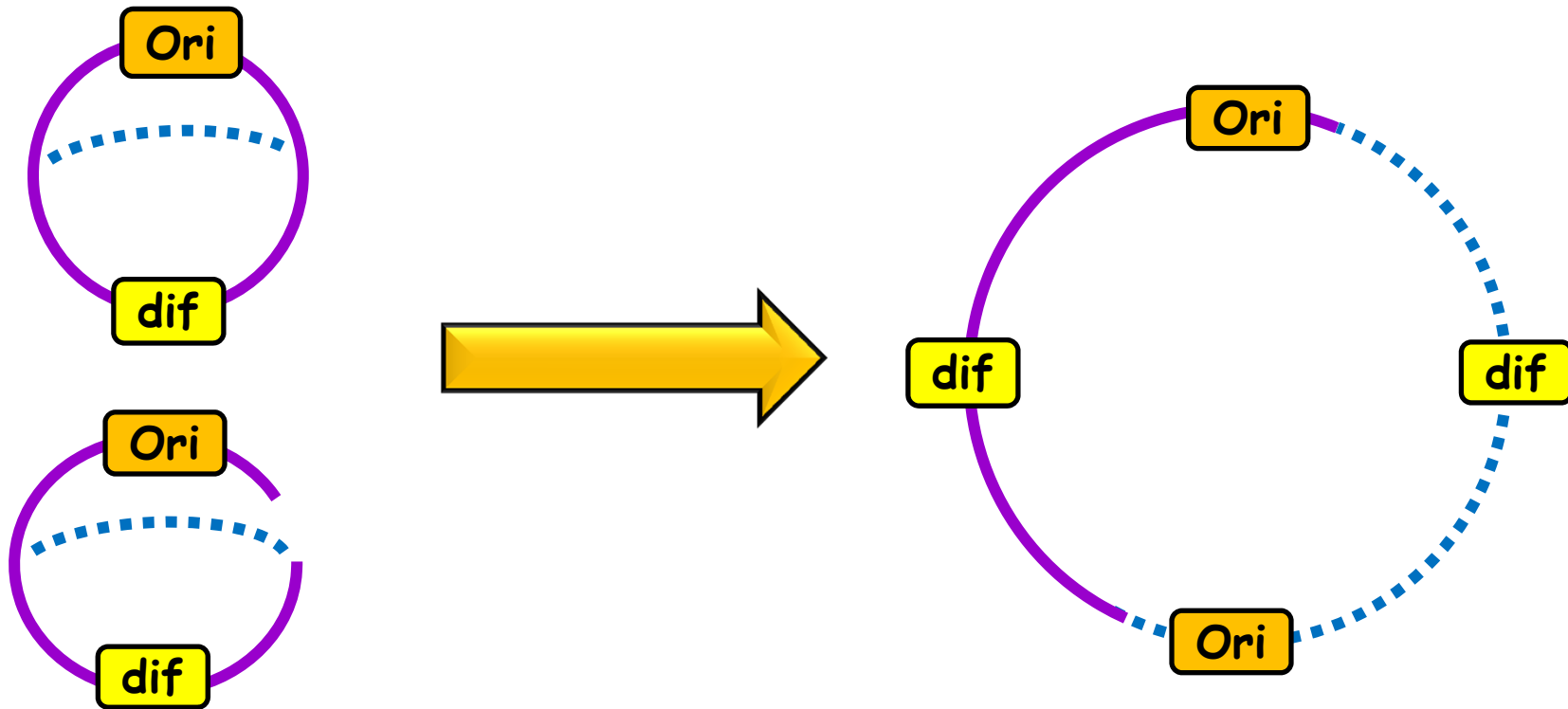


Amplificando da questo template e procedendo come descritto

IL SISTEMA XER

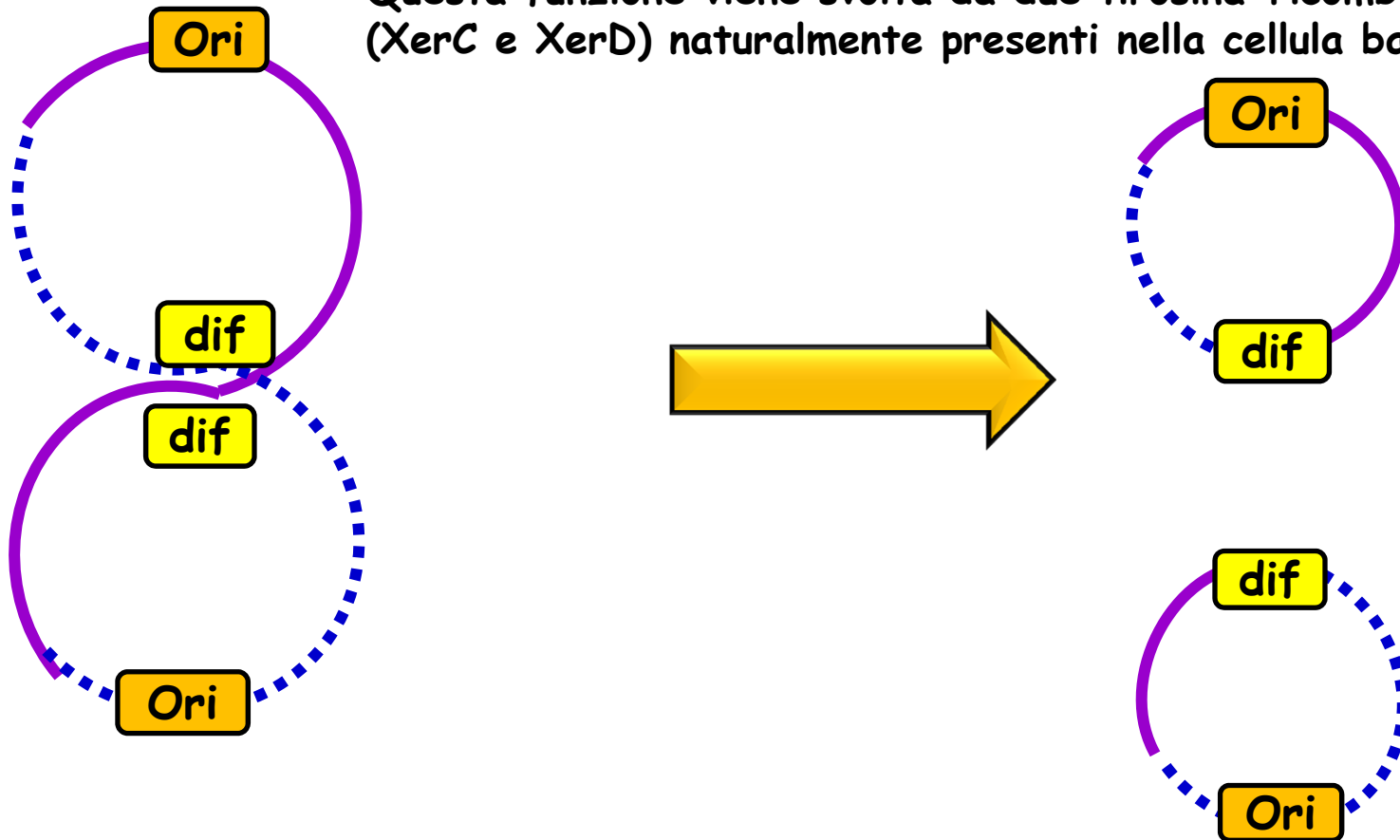
Durante la divisione può accadere che RecA provochi eventi di ricombinazione omologa tra cromosomi fratelli

Quando questo accade (circa il 17% dei casi per generazione) i due cromatidi si legano insieme formando un anello dimerico



Per la corretta segregazione dei cromosomi è necessario che i dimeri siano convertiti in monomeri prima della separazione delle cellule figlie

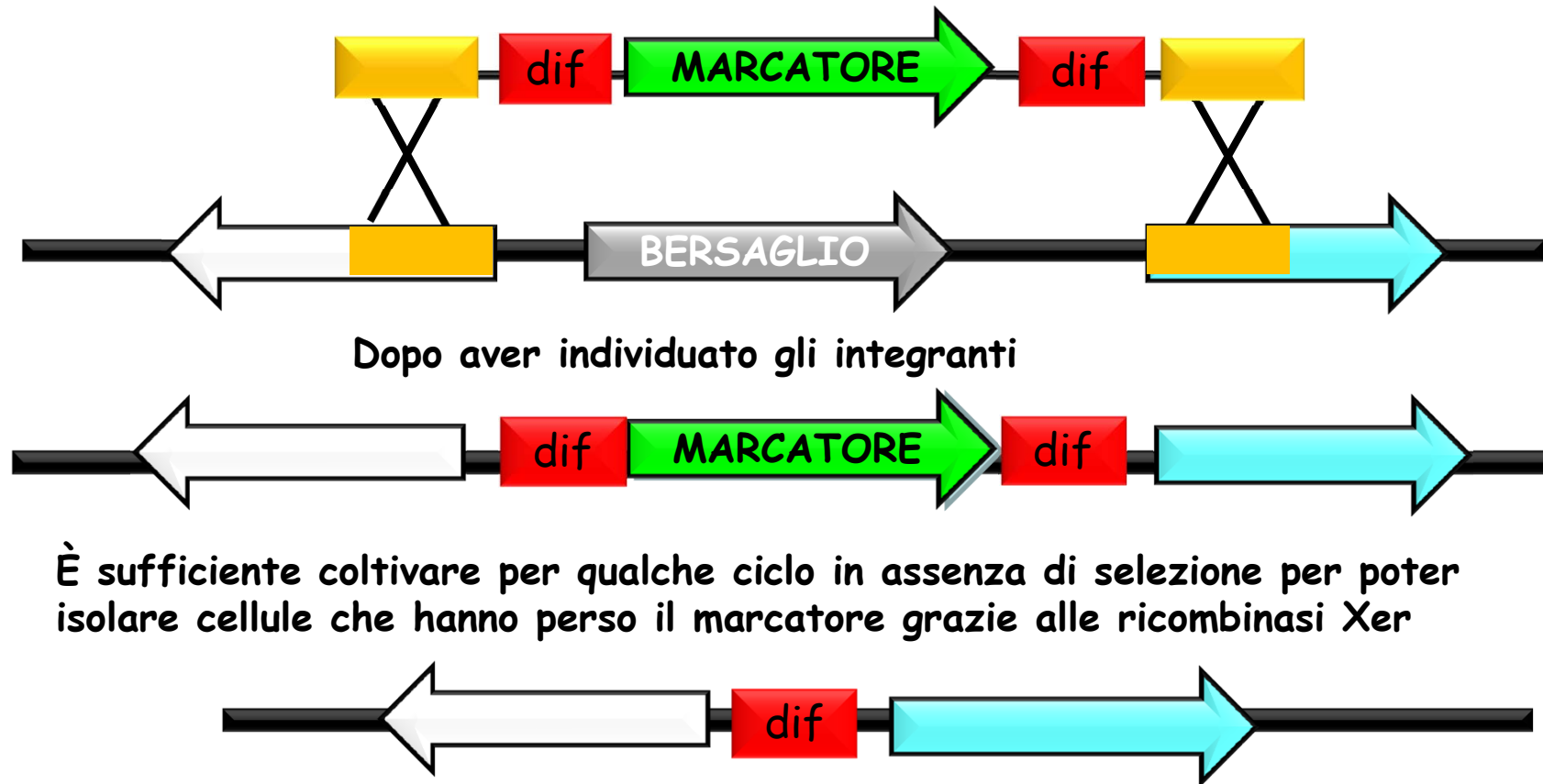
Questa funzione viene svolta da due tirosina-ricombinasi (XerC e XerD) naturalmente presenti nella cellula batterica



Che riconoscono come bersaglio il sito "dif" presente in singola copia sul cromosoma

Per evitare l'uso di ricombinasi esogene, Bloor e Cranenburgh (2006) hanno proposto di impiegare il sistema Xer, già operante nella cellula

Analogamente alla procedura del sistema Lambda Red, il marcatore è amplificato con i siti di riconoscimento dif ai lati e zone di omologia per dirigere l'amplimero al bersaglio sul cromosoma



Per inserire invece geni eterologhi nel cromosoma si prepara un costrutto con il gene e il marcatore, disponendo i siti dif i lati di quest'ultimo

