

Metodi per la produzione di proteine ricombinanti

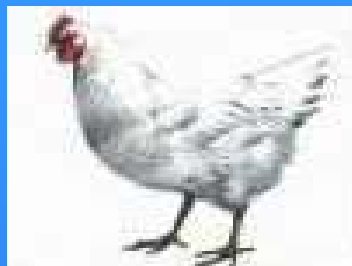
- Lo sviluppo di tecnologie per la produzione di proteine ricombinanti ha dato un impulso enorme alla ricerca sulle proprietà strutturali e funzionali delle proteine

- La produzione di proteine ricombinanti ha ricadute industriali e farmaceutiche importanti

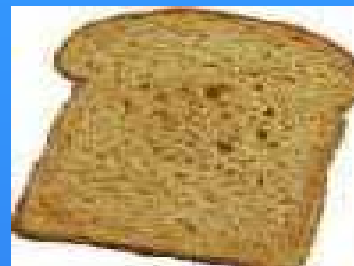
Processi industriali che utilizzano proteine



Agriculture



ANIMAL FEED



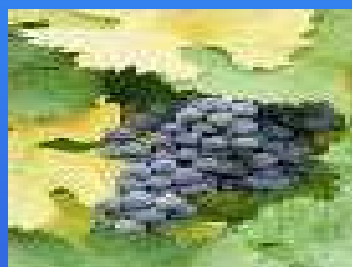
Baking



BREWING



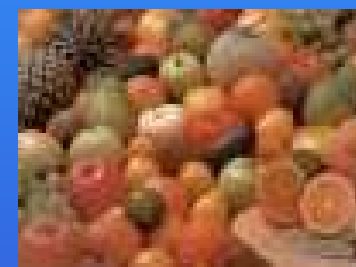
DETERGENTS



Fermented Products



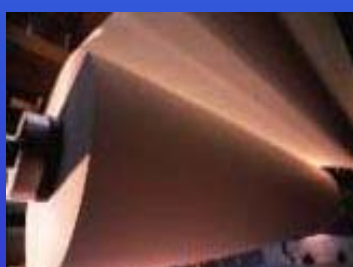
FOOD



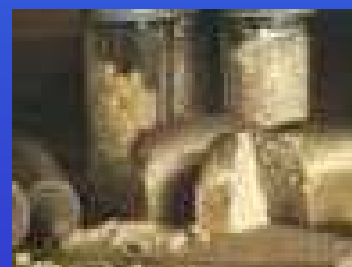
Fruit Juices



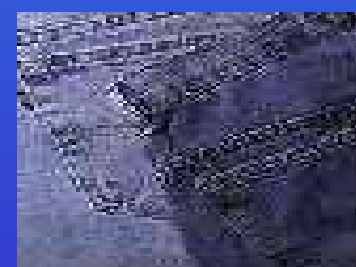
PHARMACEUTICALS



Pulp and Paper



Starch Processing



Textiles

Alcune proteine umane ricombinanti da tempo approvate per uso medico

Insulin (1987)

Interleukin 2 (1989)

Human growth hormone (1991)

Glucagon (1992)

Interferon gamma (1992)

Erythropoietin (1992)

Factor VIII (1993)

Human DNase (1994)

Follitropin (1995)

Calcitonin (1997)

.....

Recombinant Vaccines:

Pertussis

Hepatitis B

Difteria

Lyme disease

Table 1.8. Summary categorization of biopharmaceuticals approved for general medical use in the EU and/or USA by August 2002. Refer to Appendix 1 for further details

Product type	Examples	Number approved	Refer to Chapter
Blood factors	Factors VIII and IX	7	9
Thrombolytic agents	Tissue plasminogen activator (tPA)	6	9
Hormones	Insulin, growth hormone, gonadotrophins	28	8
Haemopoietic growth factors	Erythropoietin, colony stimulating factors	7	6
Interferons	Interferons- α , - β , - γ	15	4
Interleukin-based products	Interleukin-2	3	5
Vaccines	Hepatitis B surface antigen	20	10
Monoclonal antibodies	Various	20	10
Additional products	Tumour necrosis factor, therapeutic enzymes	14	Various

Table 1.9. Some recombinant (r) biopharmaceuticals recently approved for veterinary application in the EU

Product	Company	Indication
Vibragen Omega (r feline interferon omega)	Virbac	Reduction of mortality/clinical symptoms associated with canine parvovirus
Fevaxyl Pentafel (combination vaccine containing r feline leukaemia viral antigen as one component)	Fort Dodge Laboratories	Immunization of cats against various feline pathogens
Porcilis porcoli (combination vaccine containing r <i>E. coli</i> adhesins)	Intervet	Active immunization of sows
Porcilis AR-T DF (combination vaccine containing a recombinant modified toxin from <i>Pasteurella multocida</i>)	Intervet	Reduction in clinical signs of progressive atrophic rhinitis in piglets
Porcilis pesti (combination vaccine containing r classical swine fever virus E ₂ subunit antigen)	Intervet	Immunization of pigs against classical swine fever
Bayovac CSF E2 (combination vaccine containing r classical swine fever virus E ₂ subunit antigen)	Intervet	Immunization of pigs against classical swine fever

Produzione di proteine utilizzabili come farmaci

- Svariate centinaia di proteine umane ad uso terapeutico sono state prodotte tramite la tecnologia rDNA
- Il loro valore commerciale è enorme
 - Si stima che il loro mercato valga oltre 150 miliardi di \$
 - Ormone crescita Genentech 250 milioni \$

Insulina	Eli Lilly	277 milioni \$
Erytropoietina	Amgen	2.15 miliardi \$

Proteine umane ricombinanti approvate dalla FDA

Proteine	Industrie	Malattia
DNase I	Genentech	Fibrosi cistica
Eritropoietina	Amgen	Anemia
Ormone crescita	Genentech	Deficienza di GH
Insulina	Eli Lilly	Diabete
IFN- α 2a	Hoffmann-La Roche	Leucemia
Interleukin-2	Chiron	Carcinoma renale
t-PA	Genentech	infarto
E altre....		

Biopharmaceutical Proteins

- **Strong demand – sales of biopharmaceuticals represent 10-30% of all new pharmaceuticals in USA in recent years(1)**
- **Large number (hundreds) of proteins in development**
- **Sales of ca.\$ 30bn in 2003 (2)expected to grow to \$59bn by 2010 (Datamonitor)**
- **Mammalian cell products account for ca. 60% of market (1)**
- **Mabs are the fastest growing category (from 1% of biopharmaceutical market in 1995 to 14% by 2001)(1)**

Proteine Ricombinanti

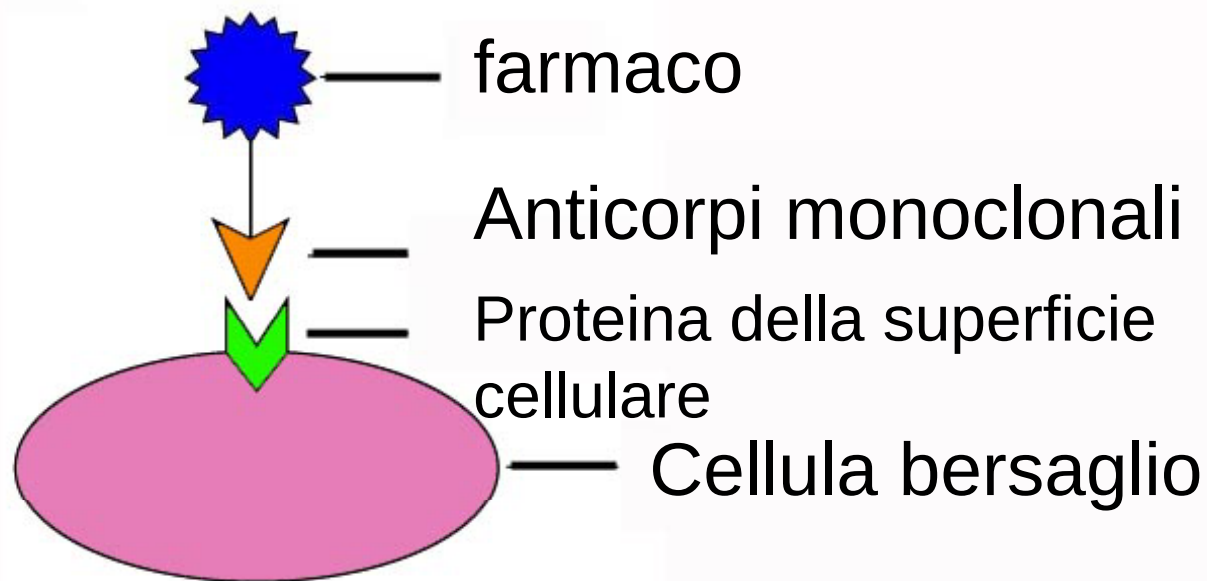
Ci sono differenze tra le proteine prodotte per usi industriali e quelle prodotte per uso terapeutico

Queste riguardano la **SICUREZZA** (identità con il prodotto atteso, assenza di contaminazioni, riproducibilità della strategia di produzione) e i **COSTI DI PRODUZIONE** (devono essere bassi per PI, ma possono essere molto alti per PT)

Alcuni obiettivi di interesse biotecnologico

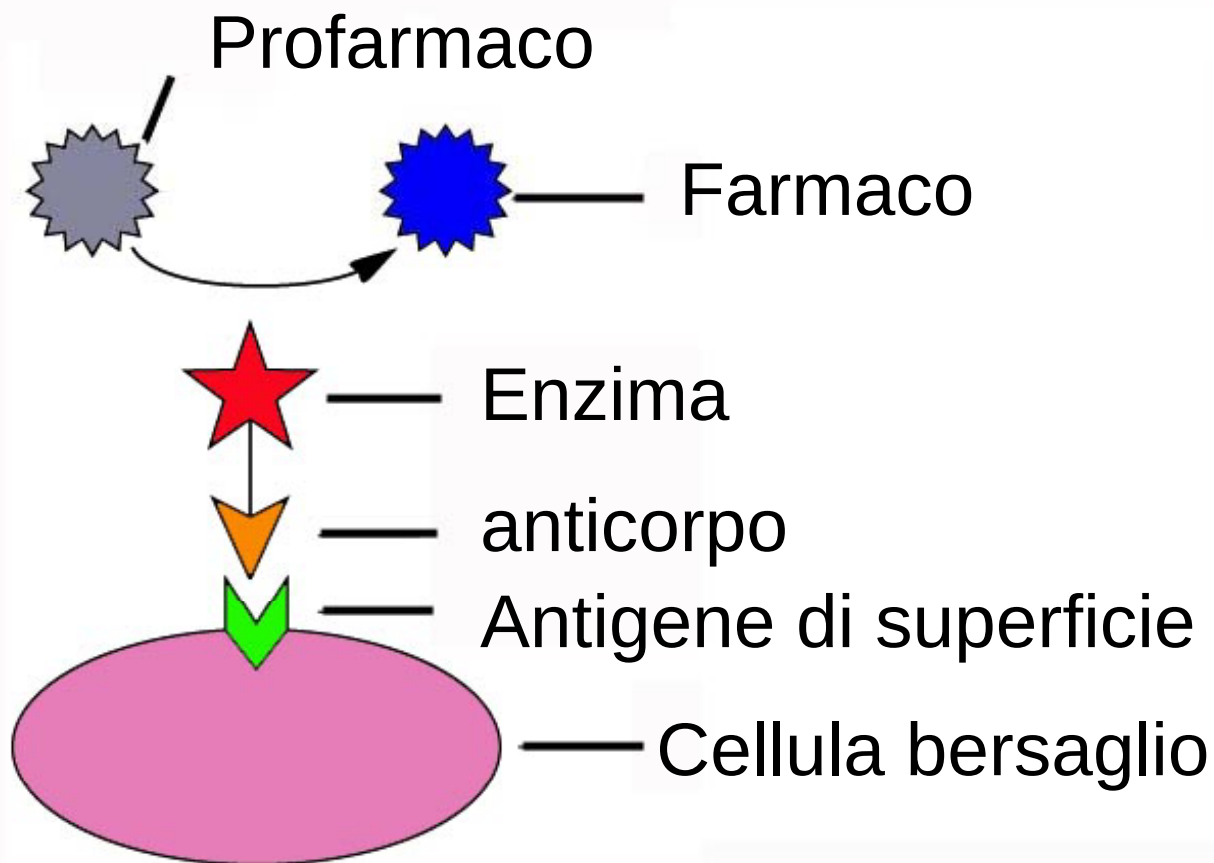
- Riuscire a produrre nuove proteine di interesse medico o industriale
- Massimizzare la produzione di proteine ricombinanti (un'aumentata efficienza di produzione aumenta i profitti)
- Facilitare i processi di purificazione delle proteine
- Costruire proteine diverse da quelle presenti in natura, dotate di nuove e vantaggiose proprietà

Veicolazione di farmaci tramite rMAb



La cellula fagocita il complesso proteina-anticorpo

Veicolazione di farmaci tramite rMAb



Strategie per la produzione di proteine ricombinanti

Qual è l'obiettivo dell'esperimento?

Come scegliere l'ospite in cui produrre la proteina?

Quanta proteina serve?

Come esprimere la proteina (espressione costitutiva, inducibile..)?



Clonaggio molecolare

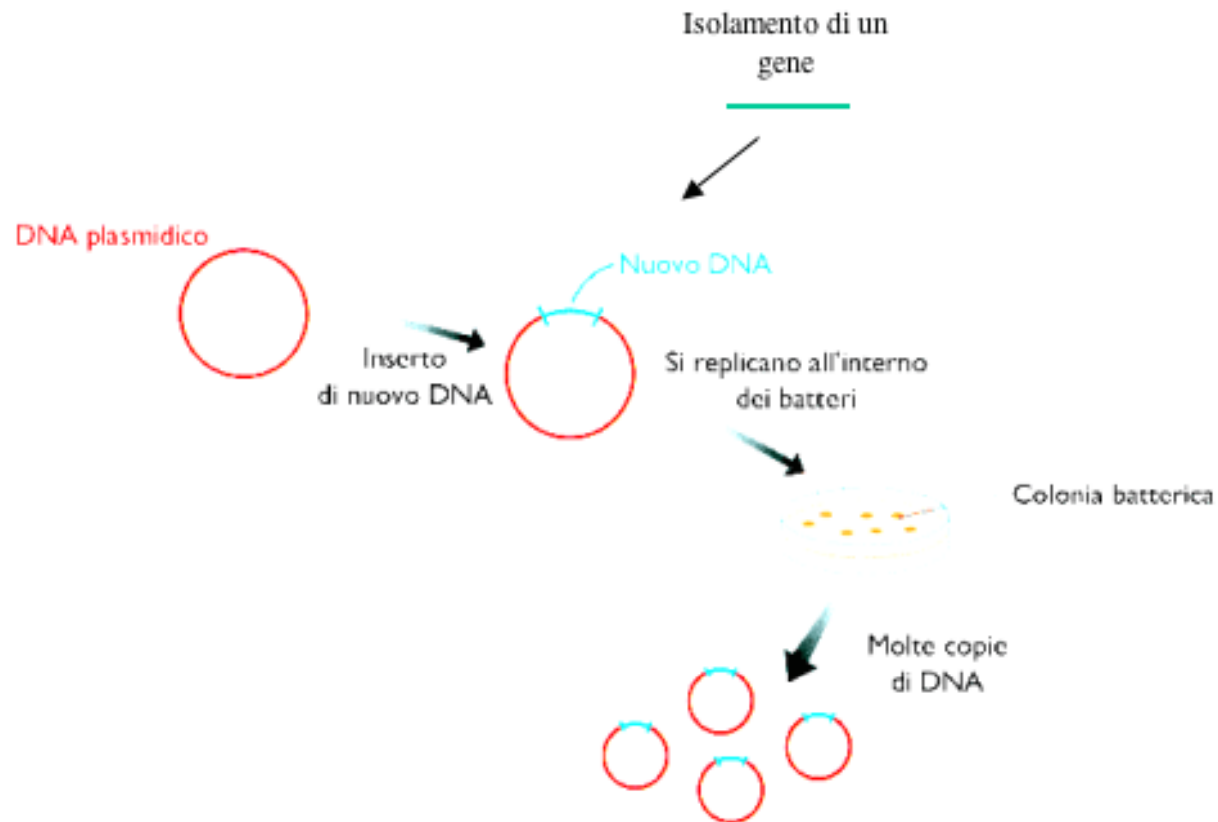


table 29–1

Some Enzymes Used in Recombinant DNA Technology

Enzyme(s)	Function
Type II restriction endonucleases	Cleave DNAs at specific base sequences
DNA ligase	Joins two DNA molecules or fragments
DNA polymerase I (<i>E. coli</i>)	Fills gaps in duplexes by stepwise addition of nucleotides to 3' ends
Reverse transcriptase	Makes a DNA copy of an RNA molecule
Polynucleotide kinase	Adds a phosphate to the 5'-OH end of a polynucleotide to label it or permit ligation
Terminal transferase	Adds homopolymer tails to the 3'-OH ends of a linear duplex
Exonuclease III	Removes nucleotide residues from the 3' ends of a DNA strand
Bacteriophage λ exonuclease	Removes nucleotides from the 5' ends of a duplex to expose single-stranded 3' ends
Alkaline phosphatase	Removes terminal phosphates from either the 5' or 3' end (or both)



Esempi di enzimi di restrizione

Microrganismo	Enzima di restrizione	Sequenza bersaglio
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Ava</i> I	CPyCGPuG
<i>Bacillus amyloliquefacens</i> H	<i>Bam</i> HI	GGATCC
<i>Bacillus albinum</i>	<i>Bg</i> /II	AGATCT
<i>Brevibacterium albinum</i>	<i>Ba</i> I	TGGCCA
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>Eco</i> RI	GAATTC
<i>Escherichia coli</i> R245	<i>Eco</i> RII	CCAGG
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> II	PuGCGCPy
<i>Aemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> III	GGCC
<i>Haemophilus haemophilus</i>	<i>Hha</i> I	GCGC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>Hind</i> II	GTPyPuAC
<i>Haemophilus influenzae</i> RD	<i>Hind</i> III	AAGCTT
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> I	GTTAAC
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hpa</i> II	CCGG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Kpn</i> I	GGTACC
<i>Moraxella bovis</i>	<i>Mbo</i> I	GATC
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pst</i> I	CTGCAG
<i>Streptomyces albus</i>	<i>Sa</i> I	GTCGAC
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sma</i> I	CCCGGG
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	<i>Xma</i> I	CCCGGG



Enzimi di restrizione

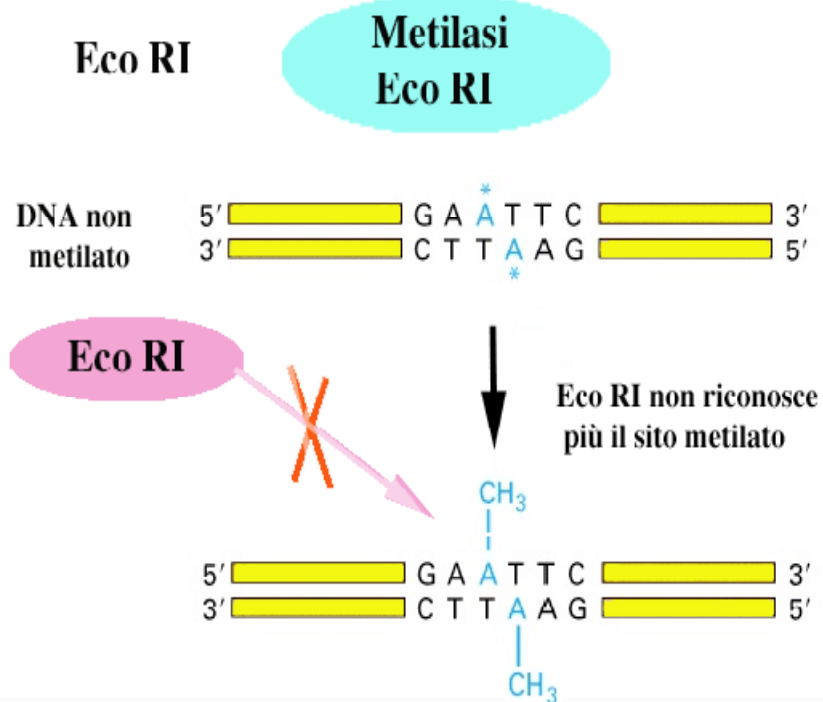
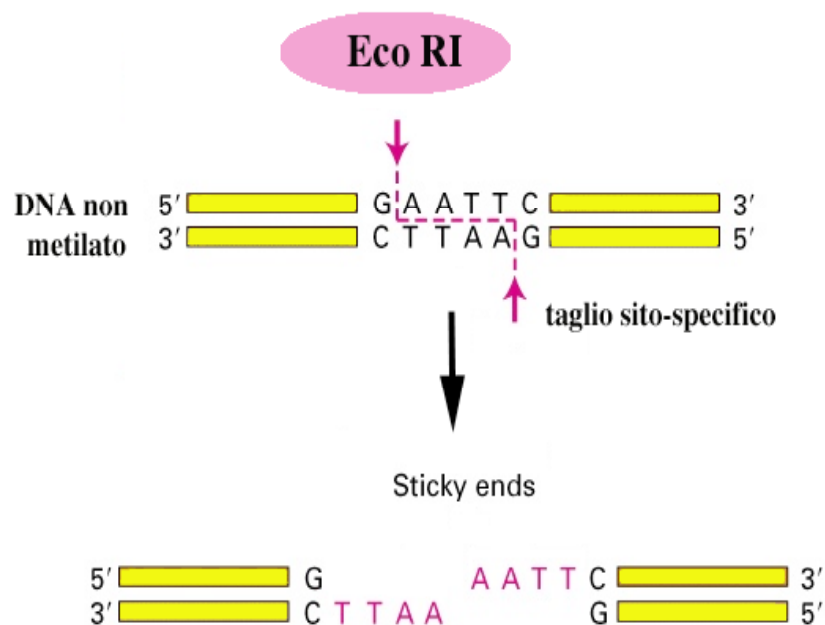


table 29-2

Recognition Sequences for Some Type II Restriction Endonucleases			
<i>Bam</i> HI	$ \begin{array}{c} \downarrow \quad \quad * \\ (5') \text{ G G A T C C } (3') \\ \text{C C T A G G} \\ \quad \quad * \quad \uparrow \end{array} $	<i>Hind</i> III	$ \begin{array}{c} (5') \text{ A A G C T T } (3') \\ \text{T T C G A A} \\ \quad \quad \quad \uparrow \end{array} $
<i>Cl</i> I	$ \begin{array}{c} \downarrow \quad \quad * \\ (5') \text{ A T C G A T } (3') \\ \text{T A G C T A} \\ \quad \quad * \quad \uparrow \end{array} $	<i>Not</i> I	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G C G G C C G C } (3') \\ \text{C G C C G G C G} \\ \quad \quad \quad \uparrow \end{array} $
<i>Eco</i> RI	$ \begin{array}{c} \downarrow \quad \quad * \\ (5') \text{ G A A T T C } (3') \\ \text{C T T A A G} \\ \quad \quad * \quad \uparrow \end{array} $	<i>Pst</i> I	$ \begin{array}{c} \quad \quad * \downarrow \\ (5') \text{ C T G C A G } (3') \\ \text{G A C G T C} \\ \quad \uparrow * \end{array} $
<i>Eco</i> RV	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G A T A T C } (3') \\ \text{C T A T A G} \\ \quad \quad \uparrow \end{array} $	<i>Pvu</i> II	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ C A G C T G } (3') \\ \text{G T C G A C} \\ \quad \quad \uparrow \end{array} $
<i>Hae</i> III	$ \begin{array}{c} \downarrow * \\ (5') \text{ G G C C } (3') \\ \text{C C G G} \\ \quad \quad * \uparrow \\ \downarrow \end{array} $	<i>Tth</i> 111I	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{ G A C N N N G T C } (3') \\ \text{C T G N N N C A G} \\ \quad \quad \quad \uparrow \end{array} $

Arrows indicate the phosphodiester bonds cleaved by each restriction endonuclease. Asterisks indicate bases that are methylated by the corresponding methylase (where known). N denotes any base. Note that the name of each enzyme consists of a three-letter abbreviation of the bacterial species

from which it is derived (e.g., *Bam* for *Bacillus amyloliquefaciens*, *Eco* for *Escherichia coli*). The Roman numerals included in the enzyme names (e.g., *Bam*HI) distinguish different restriction endonucleases isolated from the same bacterial species rather than the type of restriction enzyme.



Vettori di clonaggio

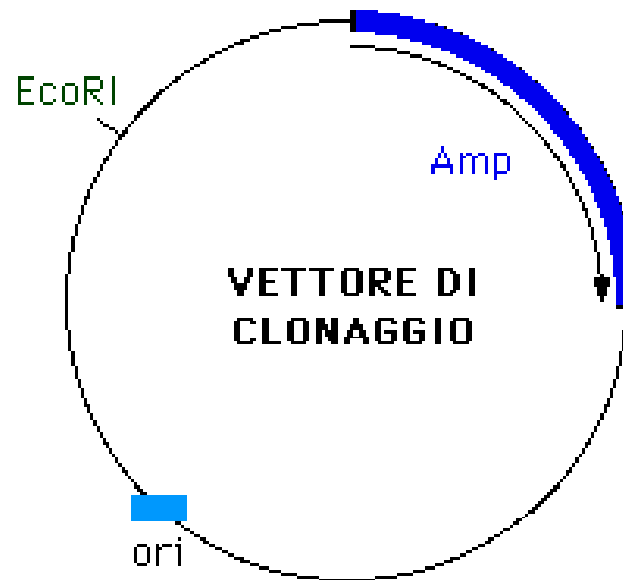
	naturali	Col E1 pSC101	Vettori procariotici
● Plasmidi (da 0,1 a 10-15 Kb)	artificiali	pBR322 pUC8 pEMBL8	
● Fagi (da 8 a 22 kb)	lambda M13		
● Cosmidi (da 32 a 45 kb)			
● Minicromosomi artificiali (es. YAC; da 100 a 2000 kb)			



VETTORI DI CLONAGGIO

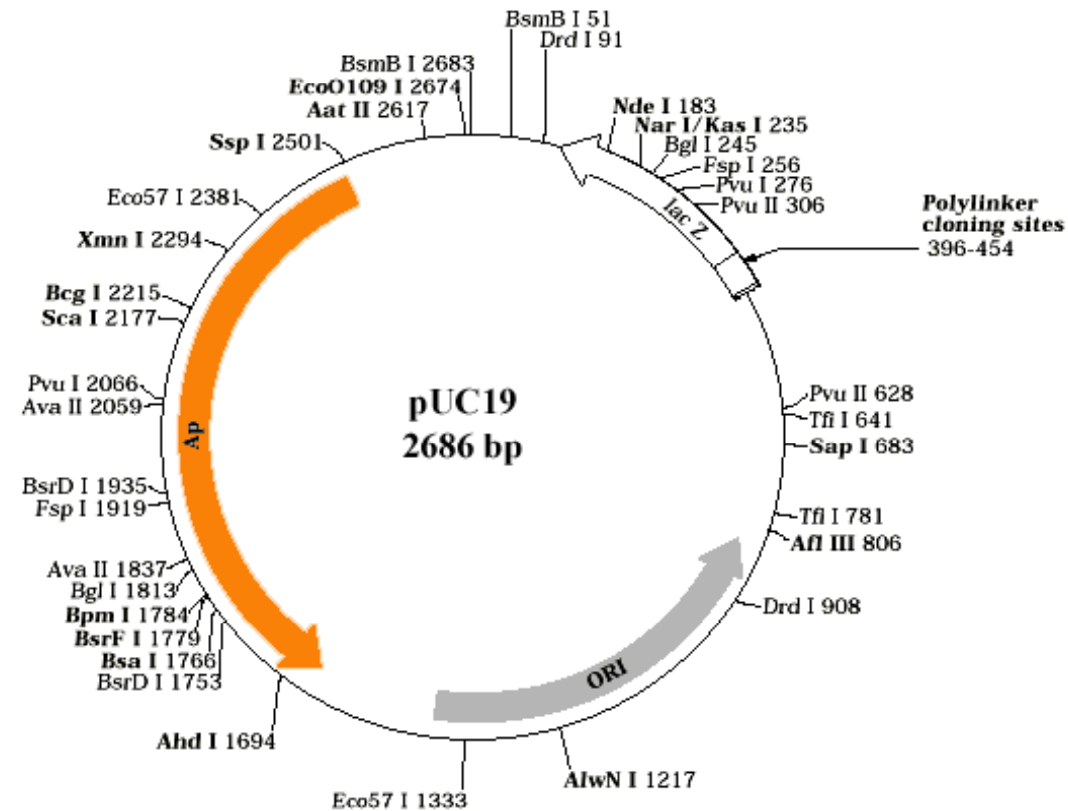
Dai plasmidi batterici naturali sono derivati i vettori di clonaggio, le cui caratteristiche essenziali sono:

- Origine di replicazione
- Marcatore selezionabile
- Siti di restrizione unici

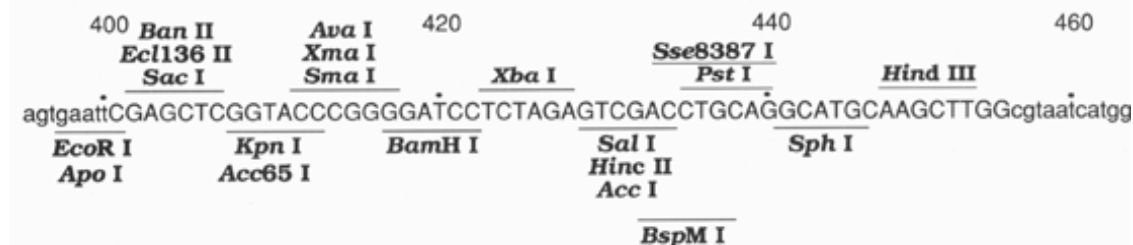


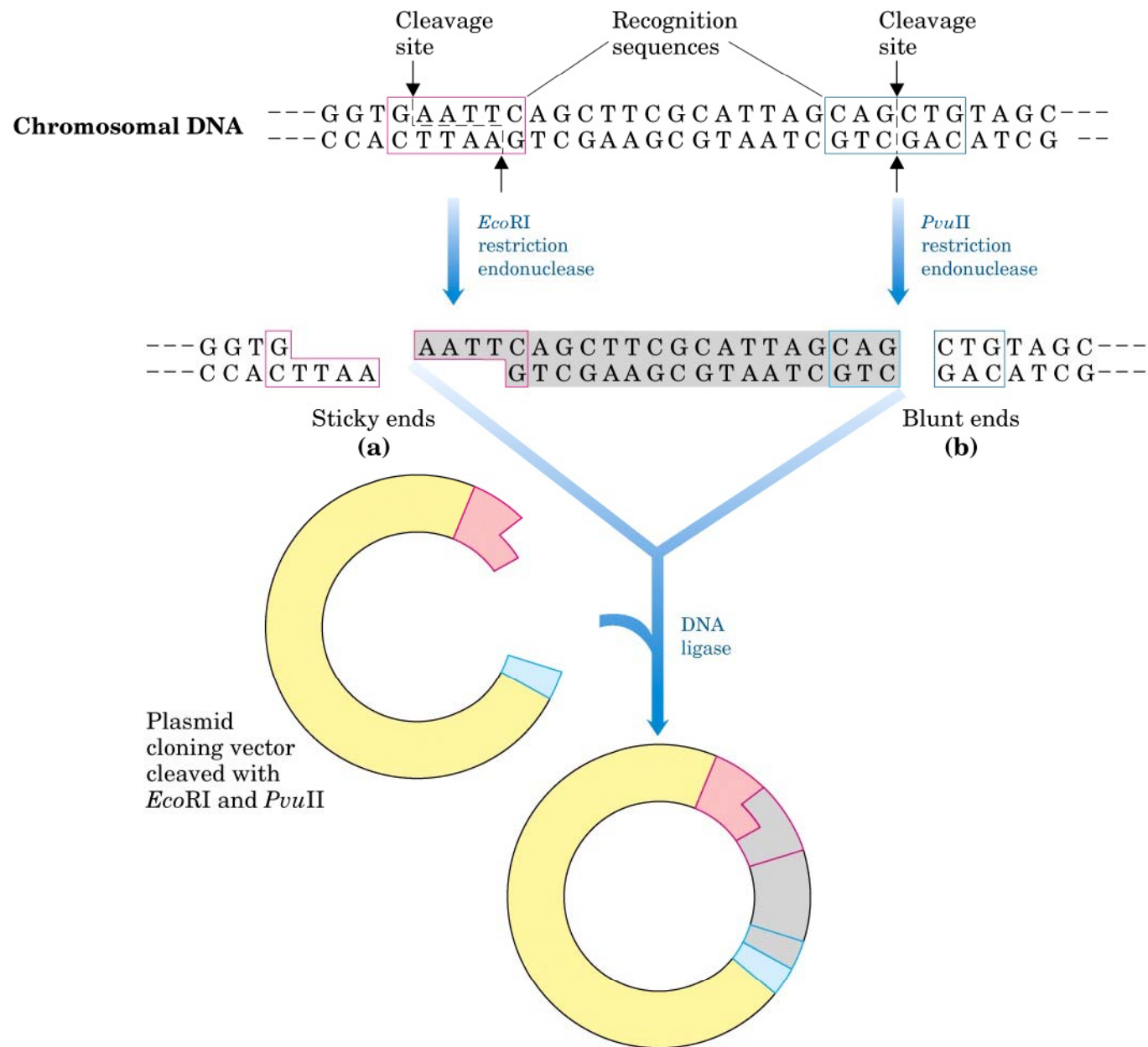


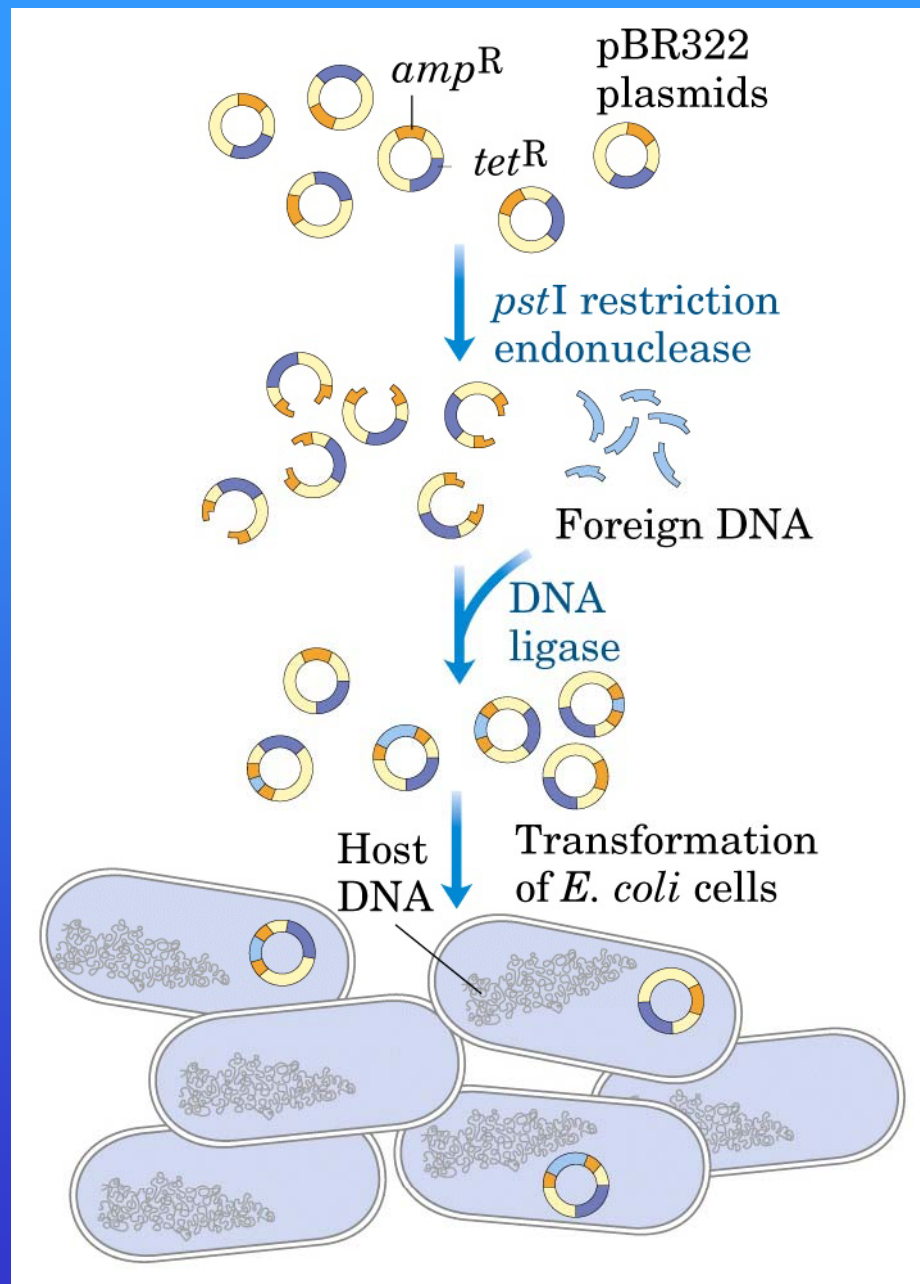
Vettore plasmidico

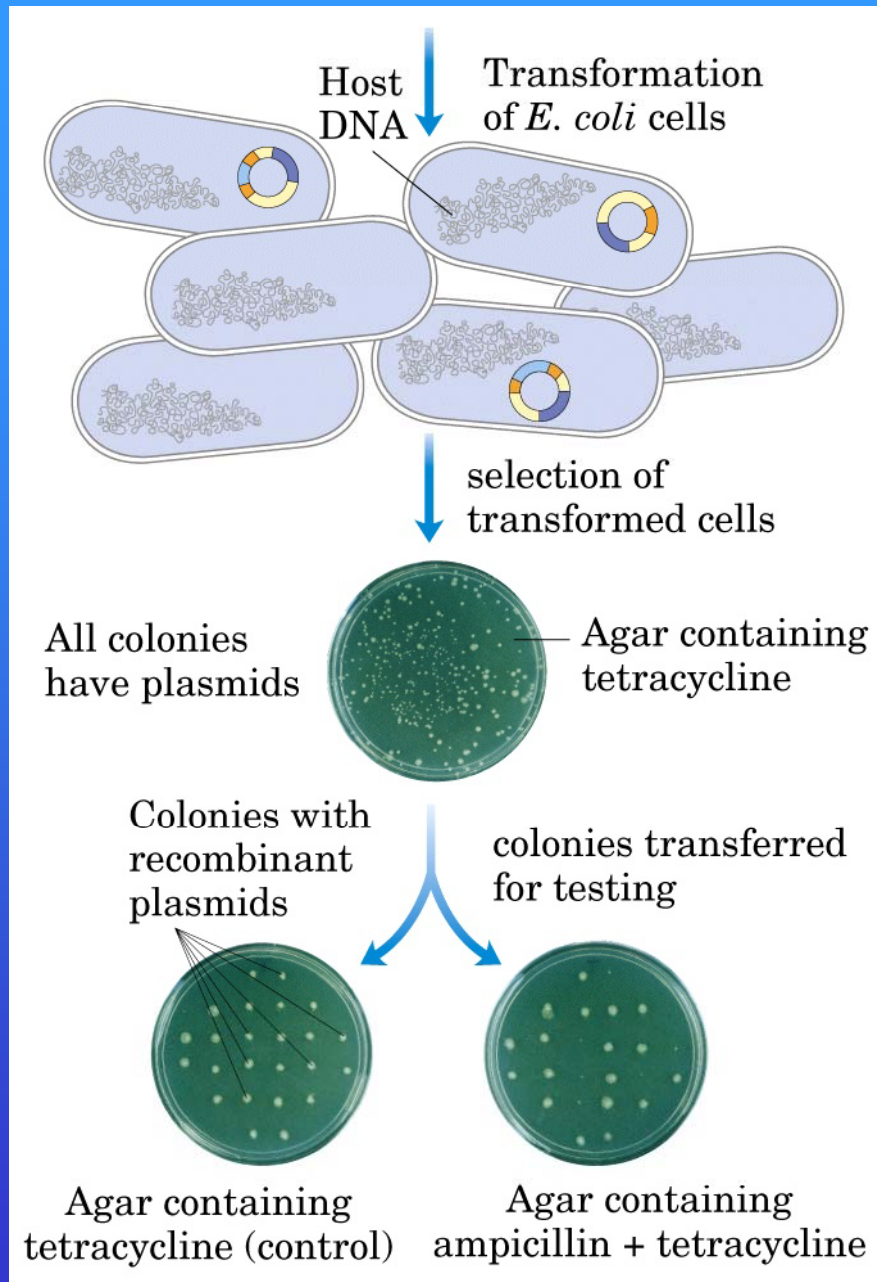


polylinker region

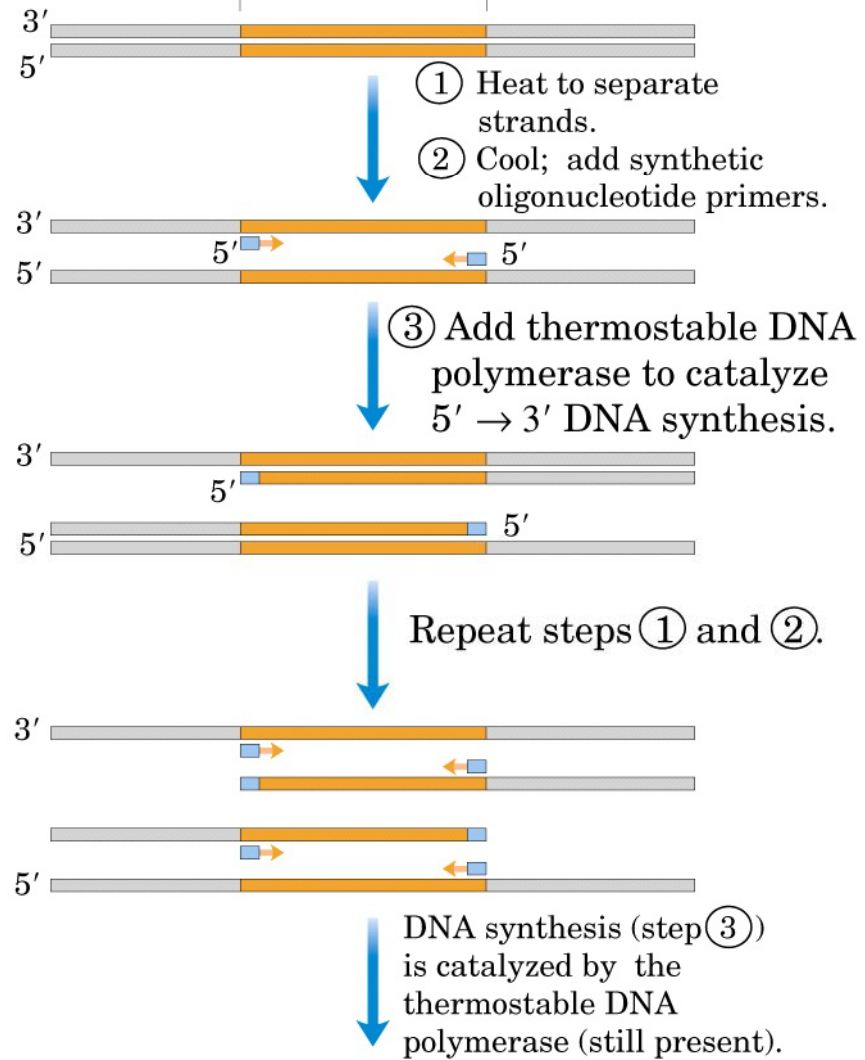




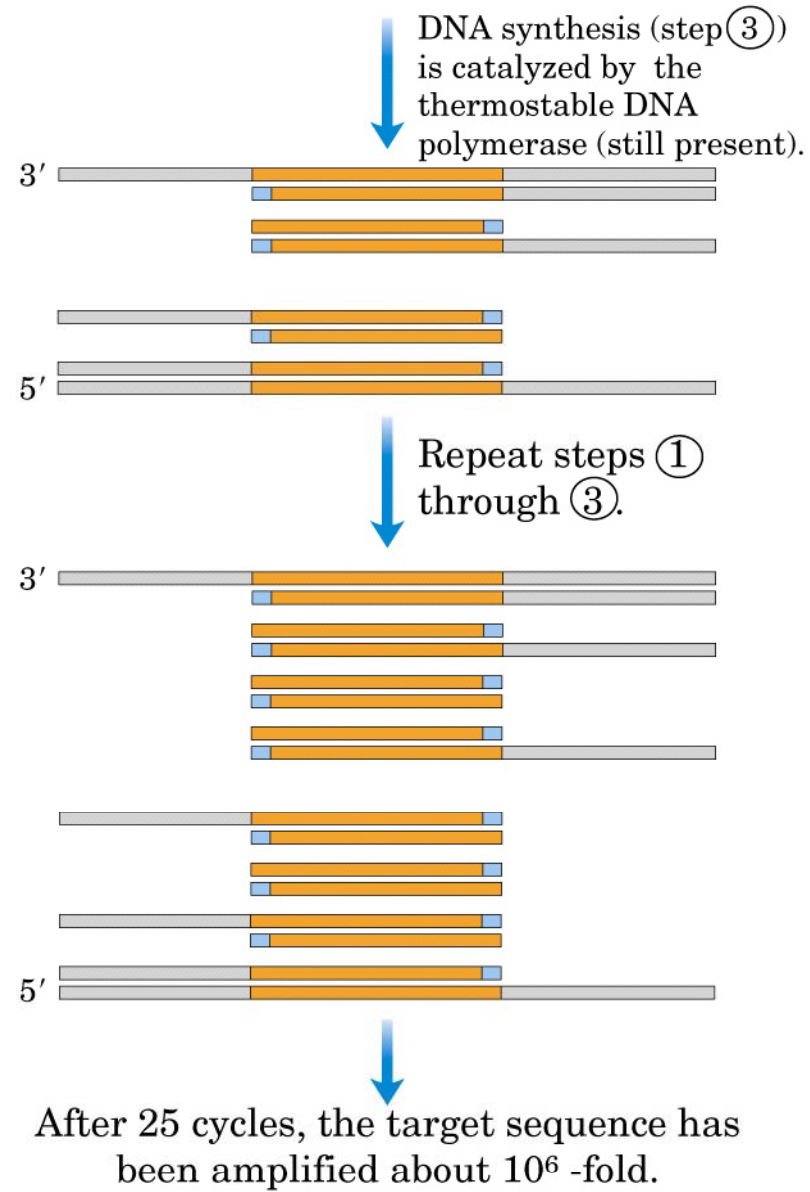




Region of target DNA
to be amplified



(a)



(a)

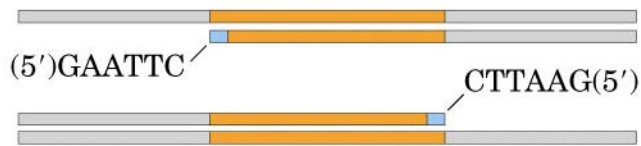


① Heat to separate strands.

② Anneal primers containing noncomplementary regions with cleavage site for restriction endonuclease.



Replication



PCR



*Eco*RI endonuclease



Clone by insertion
at an *Eco*RI site
in a cloning vector.

(b)

È possibile scegliere tra diversi sistemi di espressione per la produzione efficiente di proteine ricombinanti

Batteri (*E. coli*)

Lieviti (*S. cerevisiae*; *P. pastoris*)

Cellule in coltura (cellule di insetti e mammiferi)

Modelli animali (mucche, pecore) o vegetali

La scelta deve tenere conto di diversi fattori:

- modificazioni post-traduzionali delle proteine
- problemi a livello di regolazione genica
- costi e possibilità di scaling up

I microrganismi sono:
facilmente manipolabili, economici, modificabili in
tempi rapidi

Tuttavia, le proteine prodotte nei batteri sono prive di
modificazioni post-traduzionali

Le cellule di lievito e di insetto consentono di ottenere
glicosilazioni, ma queste sono spesso specie-specifiche

Le coltivazione di cellule di mammifero è lenta, costosa e
difficilmente consente l'ottenimento di proteine in alta
resa

L'uso di animali come bioreattori ha alcuni vantaggi, ma
notevoli limitazioni

Microbial expression hosts – *E. coli*

First choice for medium-small proteins !

ADVANTAGES

- Numerous specific vectors
- Very high transformation efficiencies
- Genetics well established
- Very fast and cheap growth
- High expression levels
- Very well understood fermentations
- Simple cell recovery and lysis
- Easy scale up procedures

DISADVANTAGES

- Not naturally competent
- Low expression yields (sometimes)
- No post-translational modification of rProtein (glycosylations, acetylation, phosphorylation)
- Often proteins are denatured (need refolding)
- Problems with multimeric proteins and S-S bridges
- proteolysis
- rProtein not exported

Microbial expression hosts – *Saccharomyces cerevisiae*

ADVANTAGES

- Moderate/high expression yields
- rProtein glycosylated
- Cheap and fast growth
- rProtein exported
- Very well understood fermentations
- Easy scale-up
- Simple cell recovery

DISADVANTAGES

- Low-medium transformation efficiency
- Limited range of vector systems
- rGenes must be stably incorporated
- Limited post-translational modifications
- Cell lysis

Microbial expression hosts – *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces sp.*

ADVANTAGES

- Moderate expression yields
- rProtein glycosylated
- rProtein exported
- Simple cell recovery

DISADVANTAGES

- Low-medium transformation efficiencies
- Difficult fermentations
- Limited range of vector systems
- rGenes must be stably incorporated
- Unusual codon usages

Alternative microbial expression hosts – *Bacillus*

ADVANTAGES

- Very high expression yields (>10 g/L)
- Simple fermentations
- rProtein exported
- Simple cell recovery
- Naturally competent

DISADVANTAGES

- Limited range of vector systems
- Optimised vector systems are proprietary
- No glycosylation
- Variable transformation efficiencies

Insect cell expression

(Specific host-vector system; Sf9 cultured insect cells and Baculovirus vectors)

- **Advantages**

- Higher eukaryote-like glycosylation
- Protein export
- Scaleable to large volumes

- **Disadvantages**

- Highly specific transformation system (Baculovirus)
- Quite new expression system
- Fastidious culture
- Very slow doubling time (20h)
- More expensive than microorganisms
- Not so easy to scale up

Animal cell culture

- **Advantages**

- Exact glycosylation
- Can be transformed to continuous cell lines
- Some (e.g., CHO cells) grow in suspension culture
- Some carcinoma-derived cells (e.g., HeLa cells) have rapid growth rates
- Extracellular expression

- **Disadvantages**

- Some grow as adherent layer (anchorage dependent)
- Fastidious growth requirements
- Very slow doubling time (15-25h)
- Very susceptible to contamination
- Very sensitive to shear stress
- Very expensive media
- Low yields

Plant cell culture

- Advantages

- Suspension cultures
- Low aeration required
- rProtein directed to vacuole

- Disadvantages

- Restricted range of transformation systems
 - *Agrobacterium* for dicots
 - Biolistics for monocots
 - Specific plant viruses
- Very slow doubling times (15h – 48h)
- Very sensitive to shear stress
- Grow heterotrophically but require light for optimum growth

Other expression systems

Whole animal expression

- Transformation of unfertilized embryo
- Use of tissue-specific promoters (e.g., lactose-specific promoter for expression of proteins in milk)
- Be careful of post-translational modification identity



Escherichia coli è il modello di scelta per tutte le proteine di medie dimensioni (100-250 aminoacidi) prive di modificazioni post-traduzionali.

In ogni caso è utile per valutare la funzione delle modificazioni e per la preparazione di antigeni

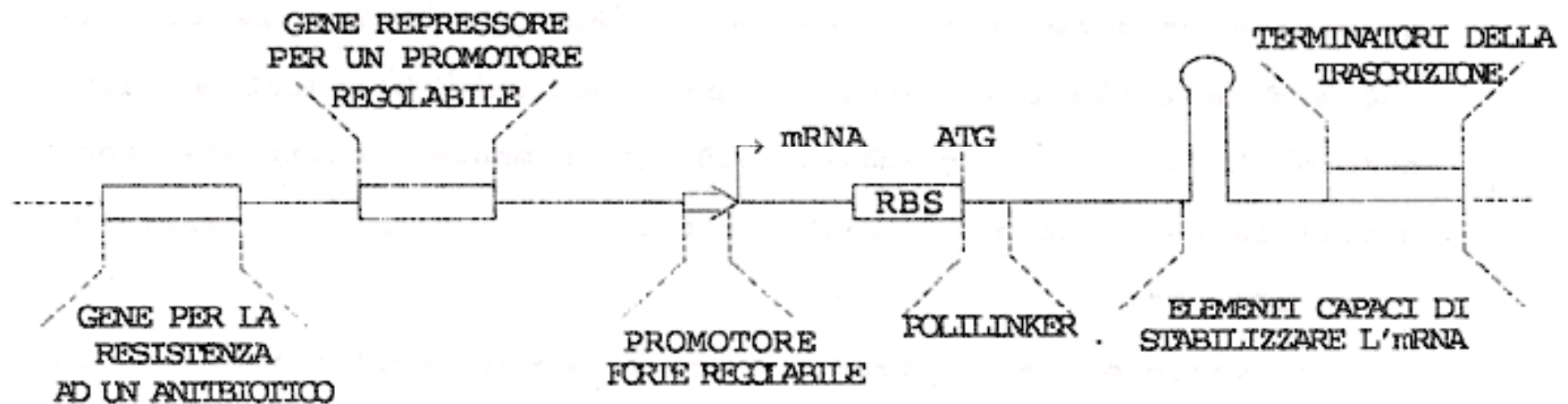
E possibile esprimere la proteina in diversi modi:

- a) Espressione diretta citoplasmatica
(proteina solubile nel citoplasma)
- b) Espressione diretta periplasmatica
proteina solubile nel periplasma
- c) Espressione di una fusione.

Manipolazione dell' espressione genica nei procarioti

- Clonare un gene non è sufficiente per garantire l'espressione ad alti livelli della proteina codificata
- Spesso è necessario introdurre modifiche al vettore d'espressione, al gene stesso o modificare l'ospite.

Le caratteristiche di un vettore d'espressione



Proprietà modificabili del sistema di espressione

- 1) Promotore
- 2) Sequenza di Shine Dalgarno-
ribosome binding site (RBS)
- 3) Efficienza di traduzione
- 5) Localizzazione della proteina (secreta?)
- 6) Numero di copie del plasmide

Plasmide vs. cromosoma
tante vs. 1

- 7) Organismo ospite

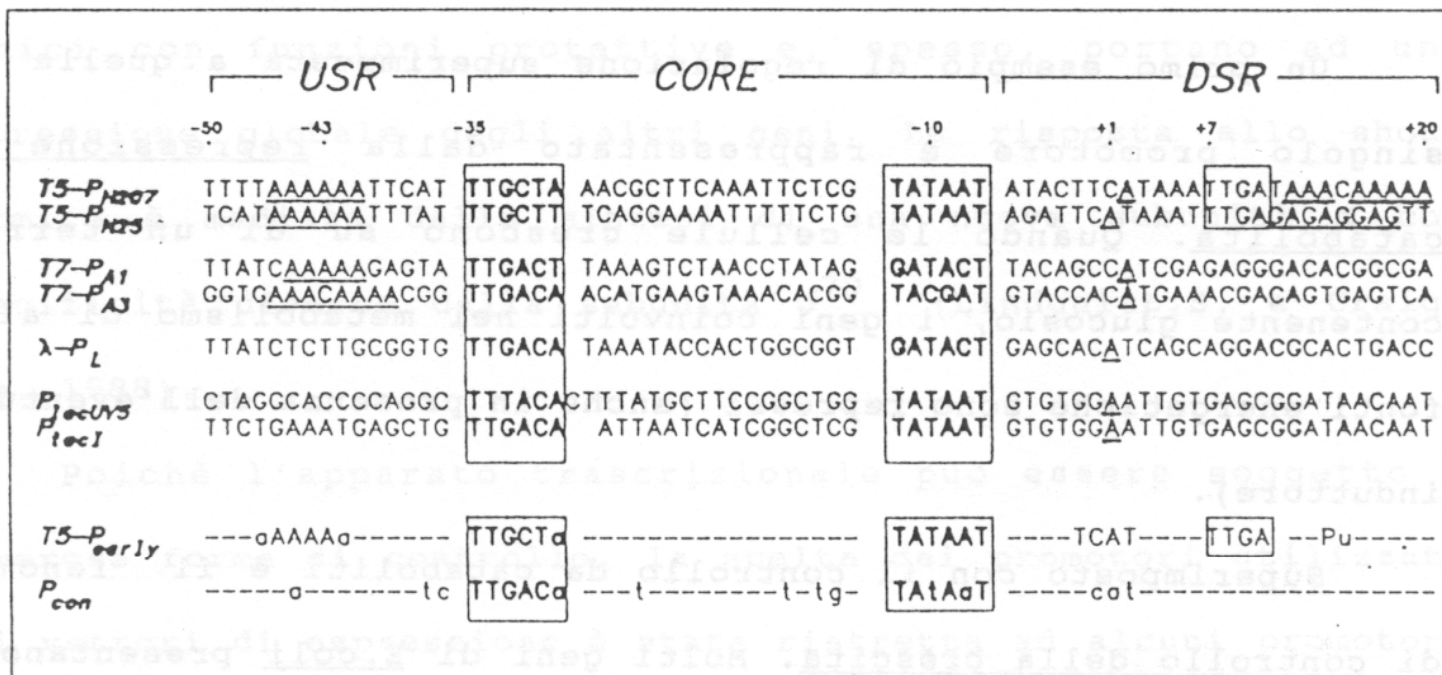
Problemi legati alla proteina (vedi oltre)

Esprimere proteine in un sistema eterologo non è sempre banale!

- Nessuna strategia funzionerà in tutti i casi
- Ogni proteina è unica
- Può essere necessario apportare più modifiche alle strategie standard

Gene Exp da un promotore forte e regolabile

- La trascrizione è spesso il punto di controllo più importante per la regolazione dell'espressione genica
- La trascrizione è controllata dal promotore
- I promotori devono essere
 - Forti
 - Possibilmente Regolabili



Promotori forti e regolabili

- Forti

- Alta affinità per l'RNA polimerasi
- Legame forte – trascritto ad alta frequenza
- Legame debole- RNA Pol si stacca, no trasc.

Regolabile

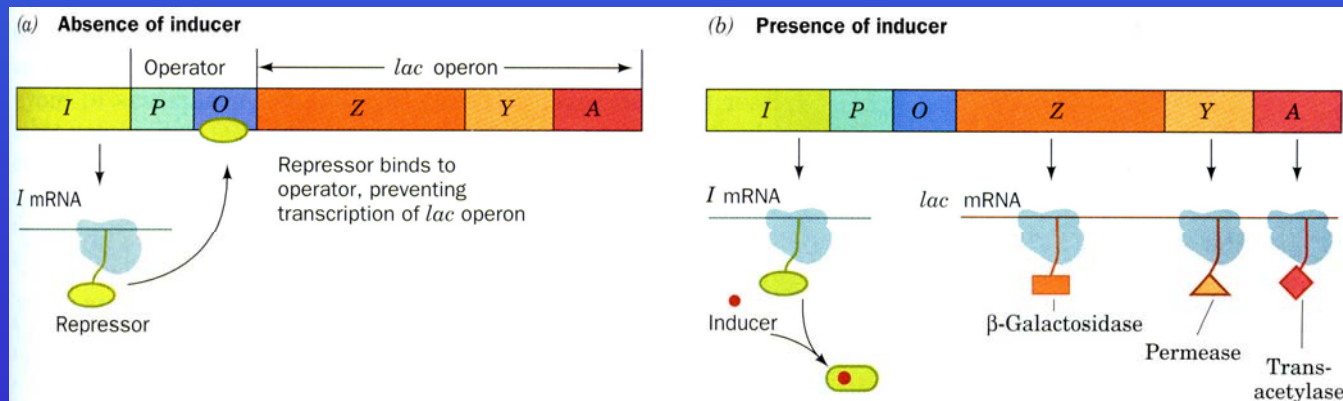
- L'espressione può essere controllata dal ricercatore, tramite induttori e represso

Alcuni promotori usati frequentemente

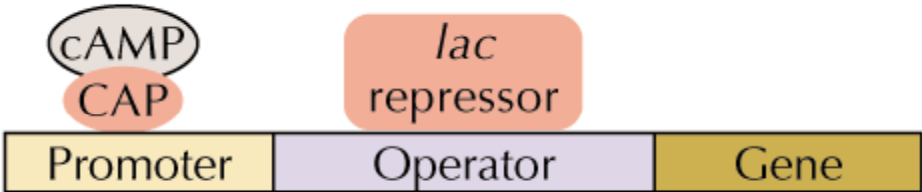
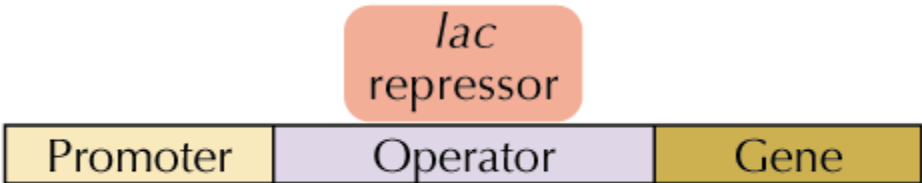
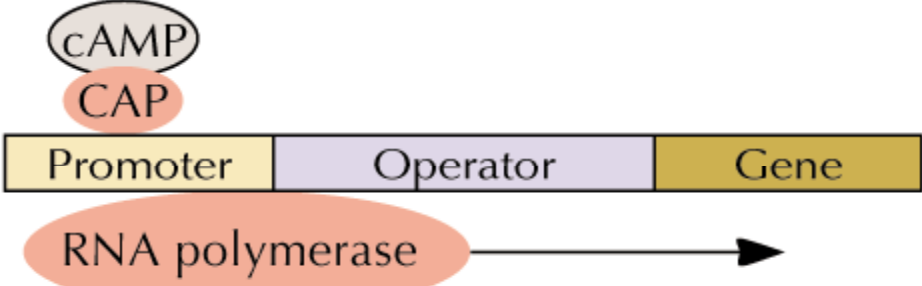
- lac
- trp
- tac
- λ p^L
- gene 10 el fago T7

Promotore lac

- Operone lac
- Regolazione negativa
 - Il repressore di lac si lega alla sequenza operatore
 - Induttore si lega al repressore, rendendolo non funzionale
 - Induttore = analogo del lattosio, IPTG



Regolazione dell'operone lac

Glucose conc	Lactose conc	cAMP conc	<i>lac</i> promoter-operator region			Level of transcription
Low	Low	High				Low
High	Low	Low				Low
High	High	Low				Low
Low	High	High				High

promotore λ p^L

- p^L promotore è regolato dal repressore λ
- Il repressore λ è codificato dal gene cI
- Si usano mutanti di cI
 - Mutanti temperatura sensibili
 - 28-32°C temp permissiva
 - Fenotipo wt, I geni sotto il controllo di cI non sono espressi
 - 42°C
 - Fenotipo mutantet, espressione dei geni sotto il controllo di cI

Promotori “Leaky”

- Alcuni promotori (lac, ad esempio) non riescono ad essere controllati in modo molto stringente.
- Si ha quindi sempre un basso livello di espressione.

Una possibile soluzione

- **Lac** controlla l'espressione e della polimerasi del fago T7. Il gene per la proteina di interesse è sotto il controllo del promotore T7
- Il repressore Lac controlla anche l'espressione del gene target
- Il lisozima del fago T7 inibisce la polimerasi T7 in cellule che possiedono i plasmidi pLysS o pLysE

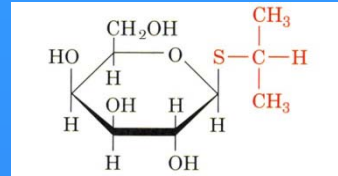
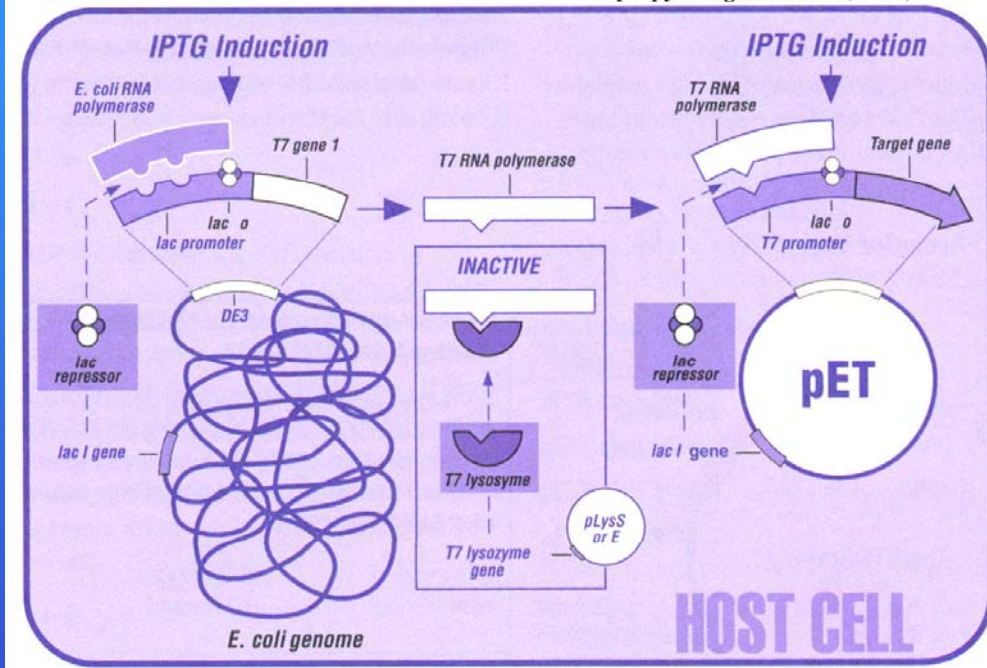
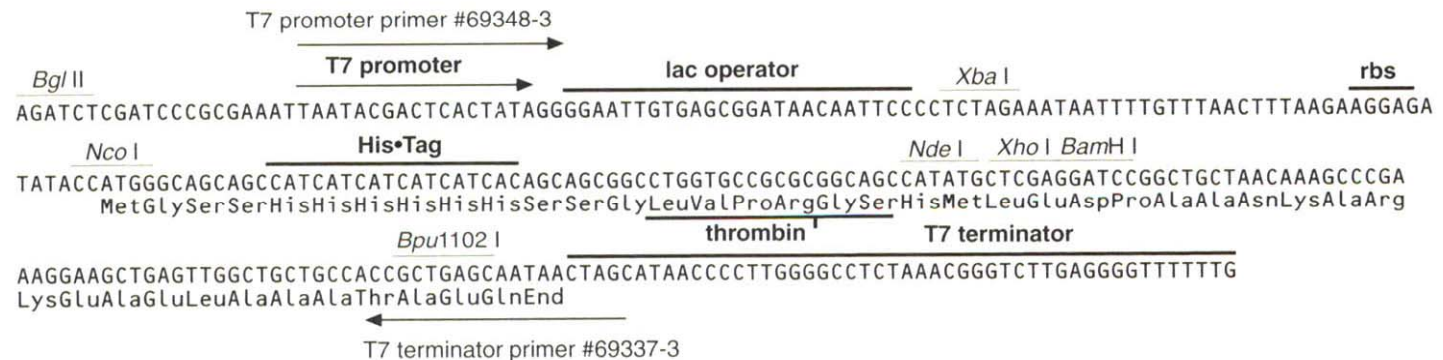


Figure 1. Control elements of the pET System

Isopropylthiogalactoside (IPTG)

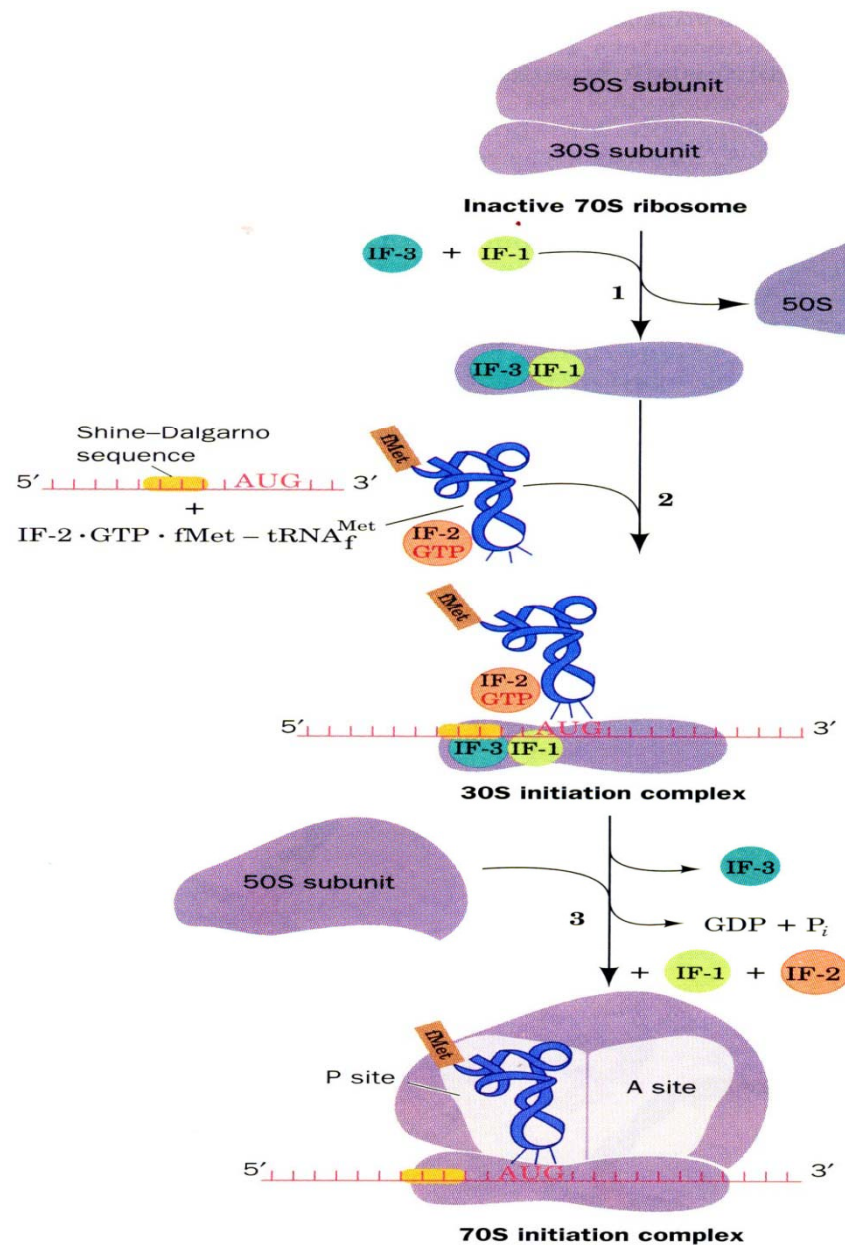


pET-15b



Migliorare la Traduzione

- I promotori forti producono grandi quantità di mRNA
- E' però necessario che la traduzione del messaggero sia efficiente
- DNA $\longrightarrow$ RNA $\longrightarrow$ Protein



The translation initiation pathway in *E. coli* ribosomes.

La sequenza di Shine e Dalgarno

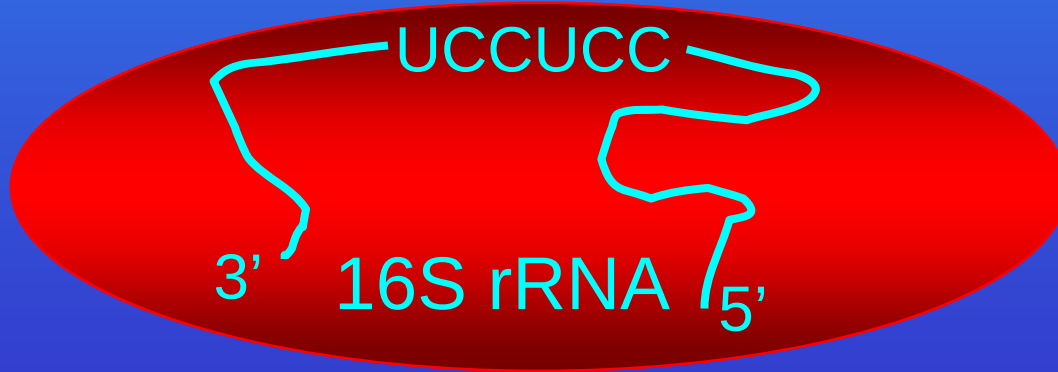
mRNA

5' ————— AGGAGG ————— AUG ————— 3'

UCCUCC

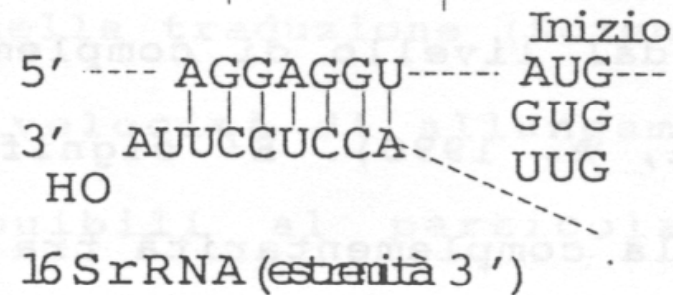
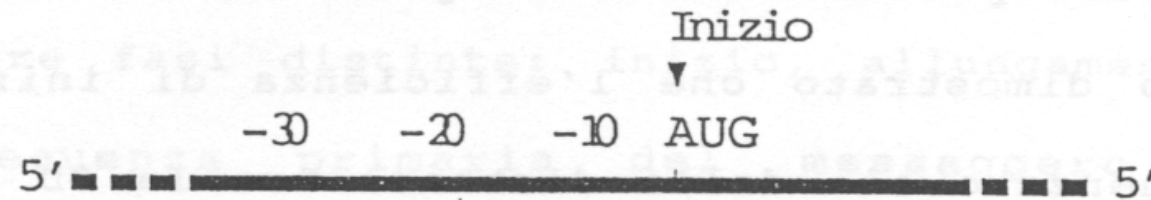
3' 16S rRNA 5'

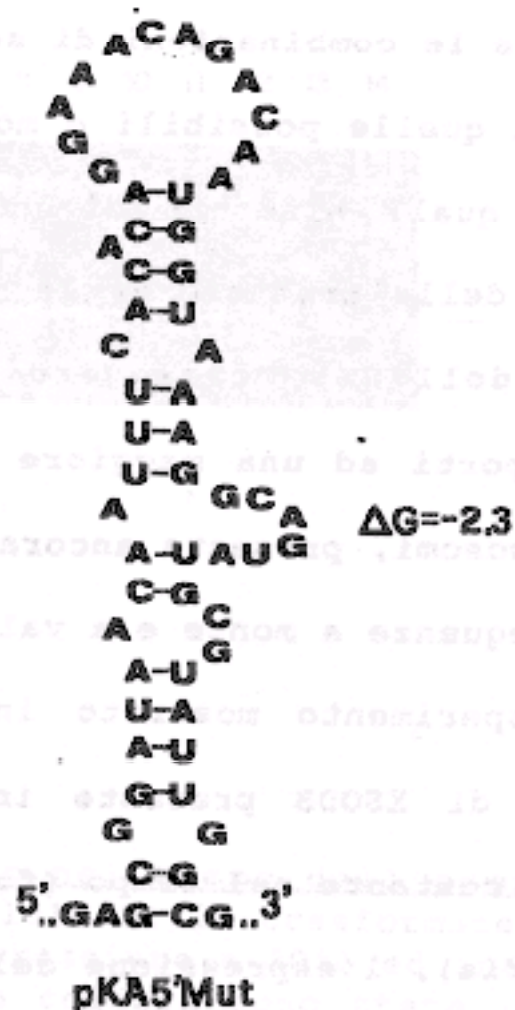
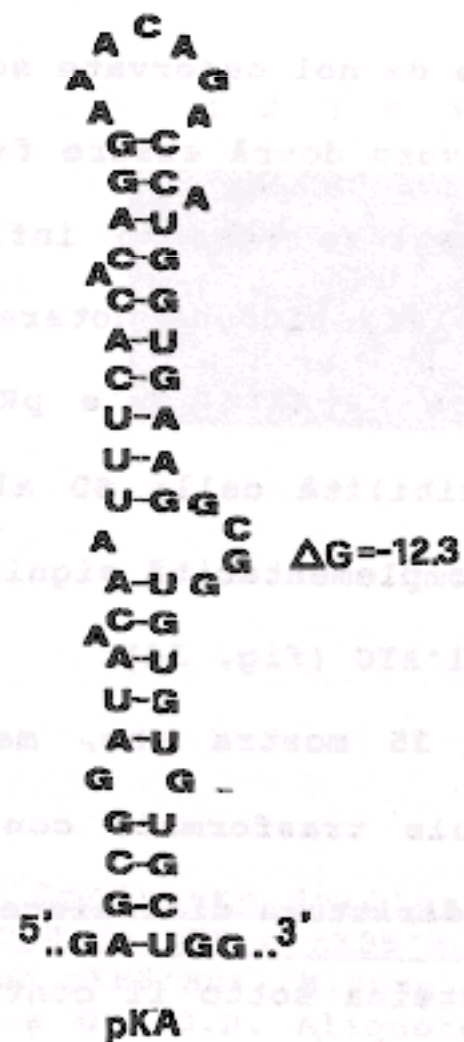
small ribosomal subunit



Regione d'inizio della traduzione (IR)

Sito di legame di ribosomi





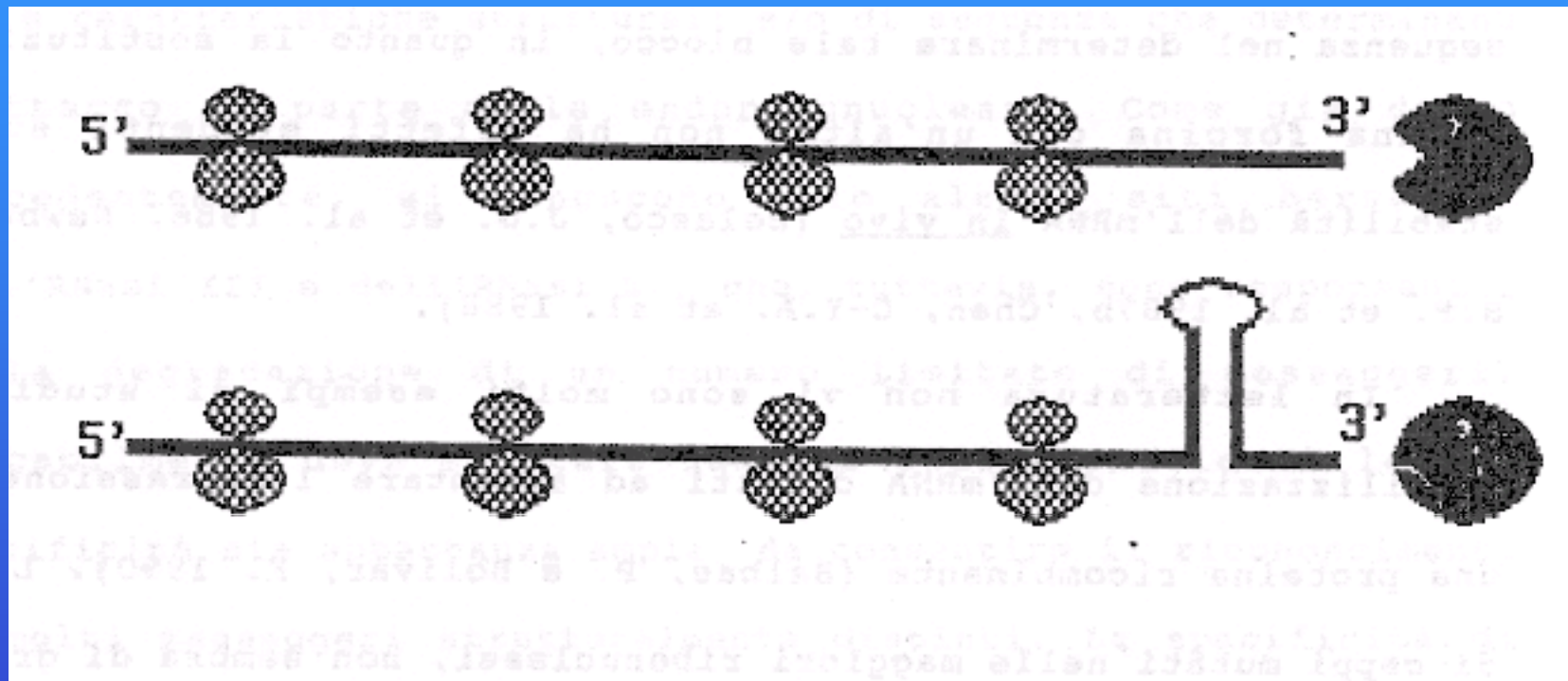
Migliorare la traduzione

- Uso dei codoni
 - Molti codoni per lo stesso aminoacido
 - Alcuni sono usati di rado
 - poco tRNA corrispondente
- Differenti organismi usano il codice in modo diverso
- Obiettivo: Ottimizzare i codoni

Table 3.2 The genetic code and codon usage in *E. coli* and humans

Codon	Amino acid	Frequency of use in:	
		<i>E. coli</i>	Humans
GAG	Glutamic acid	0.30	0.59
GAA	Glutamic acid	0.70	0.41
CGG	Arginine	0.08	0.19
CGA	Arginine	0.05	0.10
CGU	Arginine	0.42	0.09
CGC	Arginine	0.37	0.19
AGG	Arginine	0.03	0.22
AGA	Arginine	0.04	0.21
CCG	Proline	0.55	0.11
CCA	Proline	0.20	0.27
CCU	Proline	0.16	0.29
CCC	Proline	0.10	0.33
UGA	Stop	0.30	0.61
UAG	Stop	0.09	0.17
UAA	Stop	0.62	0.22

Stabilizzare il messaggero



Problemi legati alla proteina

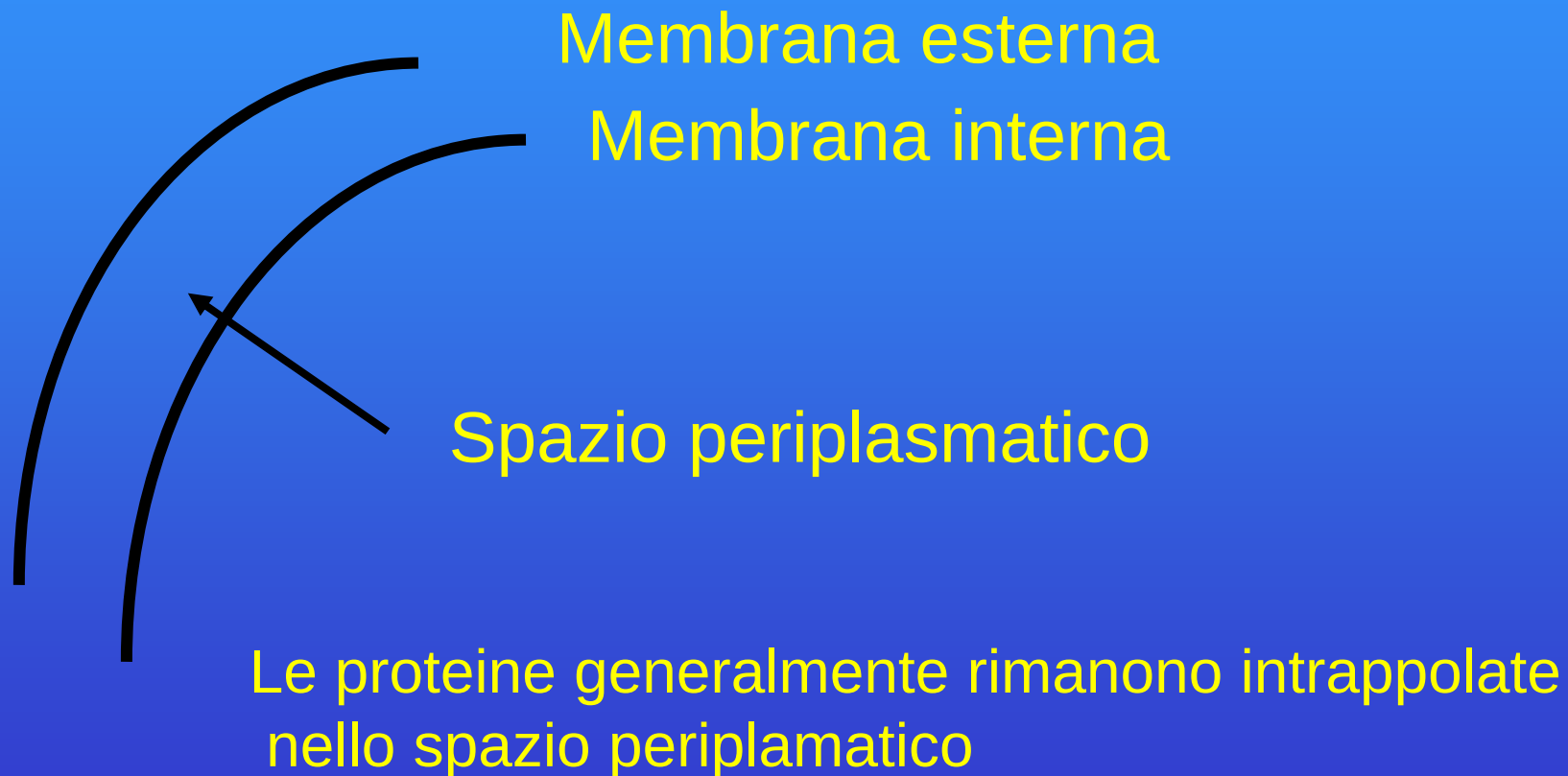
- 1) Incapacità della proteina di assumere la corretta struttura 3D nell'ambiente batterico
- 2) Assenza di cofattori essenziali
- 3) Mancata modificazione post-traduzionale
- 4) Degradazione proteolitica
- 5) Tossicità della proteina

Esporto della Proteina

La stabilità della proteina può aumentare
(meno proteasi, differenze nella
formazione dei legami disolfuro)

La proteina può essere isolata più
facilmente

Esporto nei batteri Gram-



Esporto della Proteina

- Cosa è richiesto per l'esporto?
 - Peptide segnale
 - Questo va aggiunto all'estremità NH_2 della proteina (5' del gene)

NH_2 —  Proteina di interesse — COOH

↖ Deve essere in frame!

Stabilità della proteina

- La vita media è variabile
 - Da pochi minuti a >24 ore
- Fattori che influenzano la stabilità
 - NH₂ terminale
 - Sequenze PEST

Table 6.4 Stability of β -galactosidase with certain amino acids added to its N terminus

Amino acid added	Half-life
Met, Ser, Ala	>20 h
Thr, Val, Gly	>20 h
Ile, Glu	>30 min
Tyr, Gln	~10 min
Pro	~7 min
Phe, Leu, Asp, Lys	~3 min
Arg	~2 min

Adapted from Bachmair et al., 1986, *Science* **234**: 179–186.

Stabilità della proteina

- Sequenze PEST
 - Interne alla sequenza aminoacidica
 - Aumentano la suscettibilità alla proteolisi
 - P = Pro
 - E = Glu
 - S = Ser
 - T = Thr

Proteine di fusione

- Ci sono diversi problemi con le proteine, tra cui:
 - Degradazione
 - Purificazione

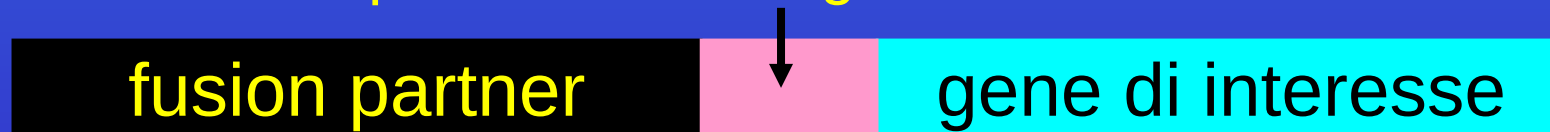
Proteine di fusione

- La degradazione porta a bassi livelli di espressione e difficoltà nel purificare la proteina.
- Una soluzione frequente:
 - Attaccare la proteina a un partner proteico stabile. Può essere utile rimuovere il “Tag”

Proteine di fusione

- Servono proteasi per separare le due proteine
 - Se ne conoscono alcune che riconoscono una sequenza altamente specifica
 - Tale sequenza va inserita tra la proteina di interesse e il partner proteico

protease cleavage



Proteine di fusione

Proteasi

derivazione

Fattore Xa

fattore di coagulazione



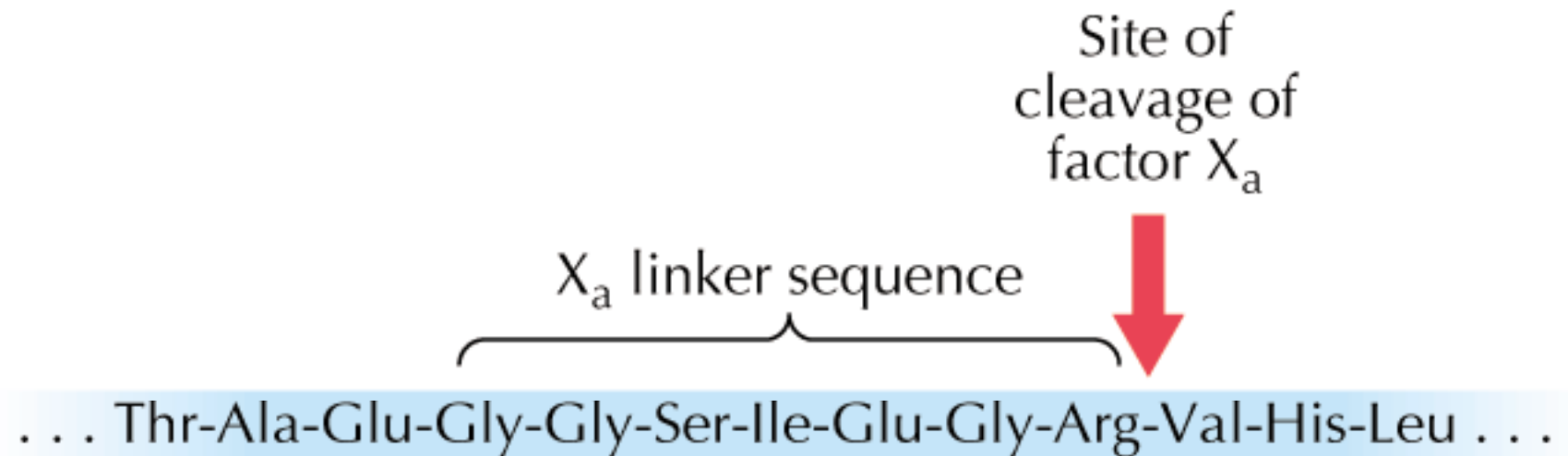
Enterochinasi

intestino bovino

TEV proteasi

tobacco etch virus

Taglio del fattore Xa

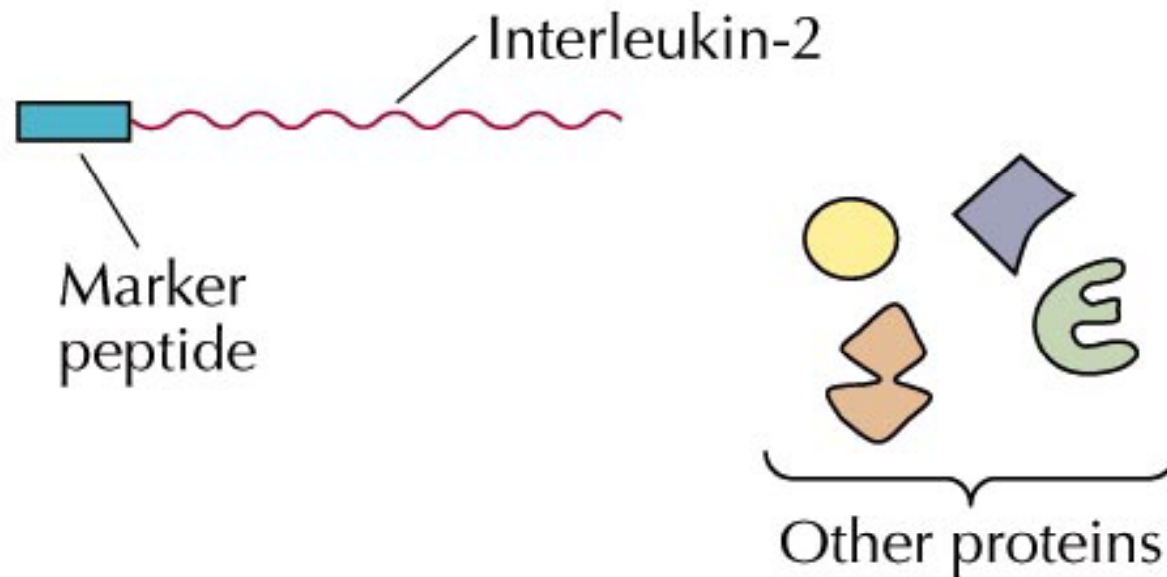


Proteine di fusione

- L'uso primario è per la purificazione
 - In questo caso si usano specifici “tags” per facilitare la purificazione, possibilmente tramite un unico passaggio cromatografico.

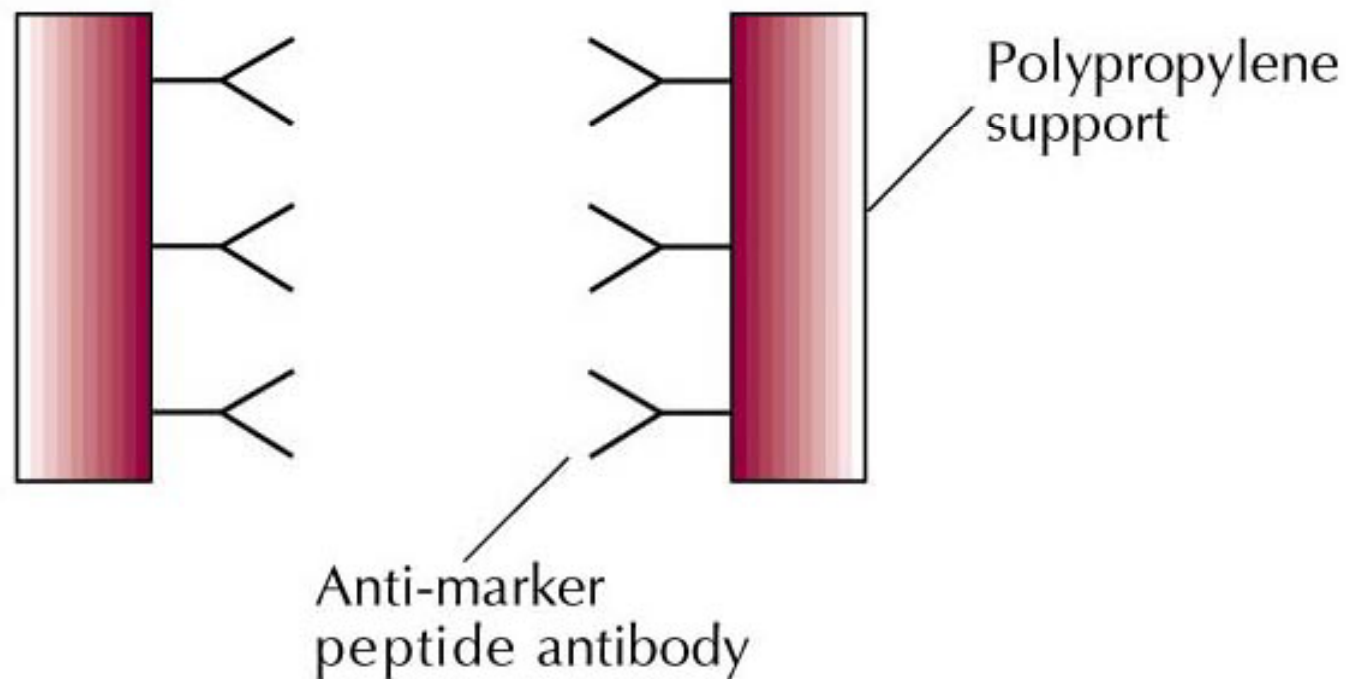
Cromatografia di affinità (a)

1 Concentrate secreted protein mixture



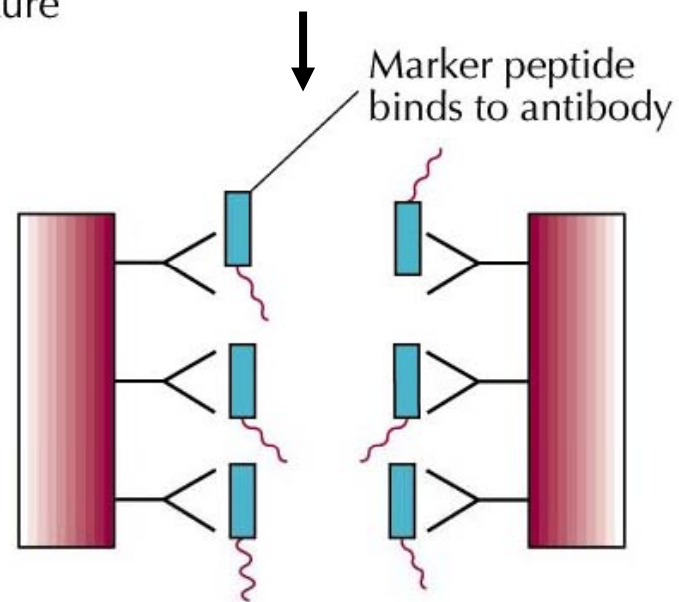
Cromatografia di affinità (b)

2 Prepare immunoaffinity column

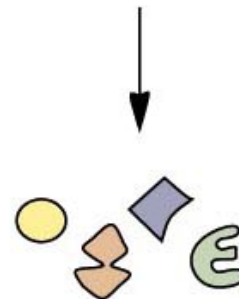


Cromatografia di affinità ©

3 Add secreted protein mixture to the column

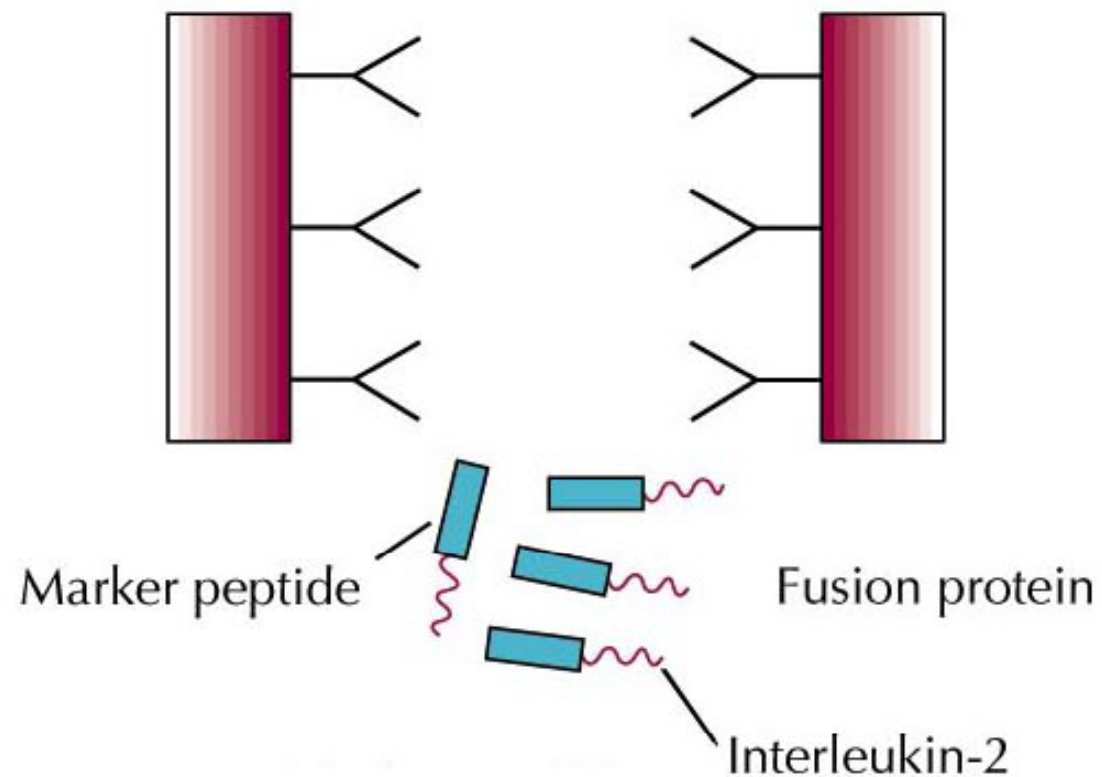


Other proteins pass through the column



Cromatografia di affinità (d)

4 Elute fusion protein



Proteine con His-tag

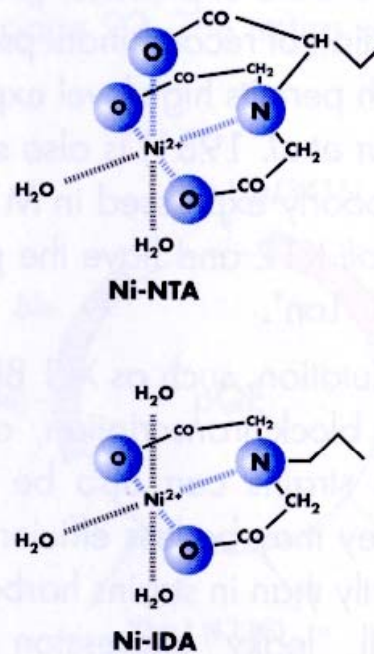


Figure 4. Comparison of the interactions of different metal chelate matrices with nickel ions.

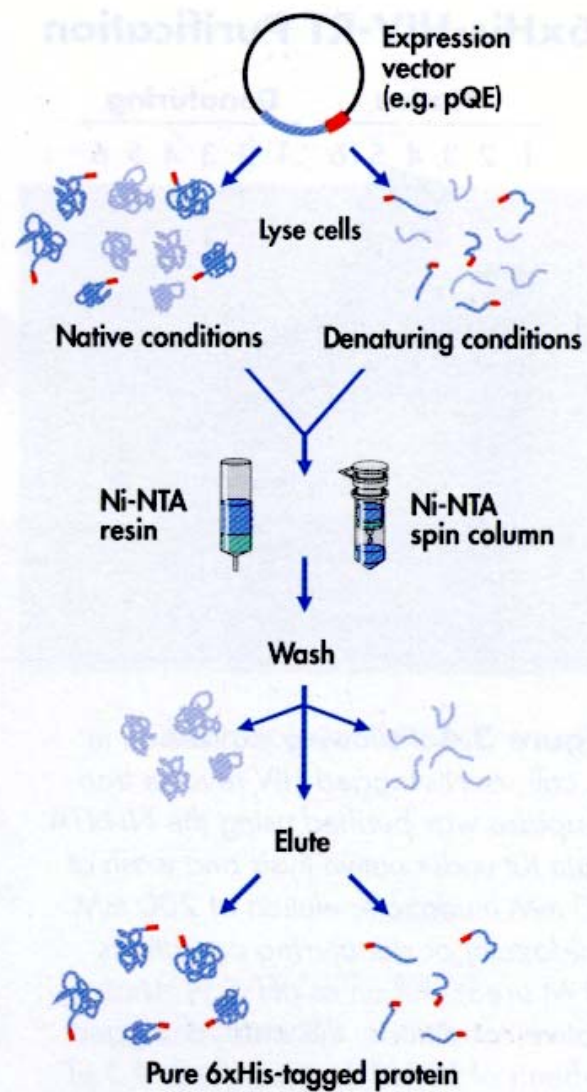
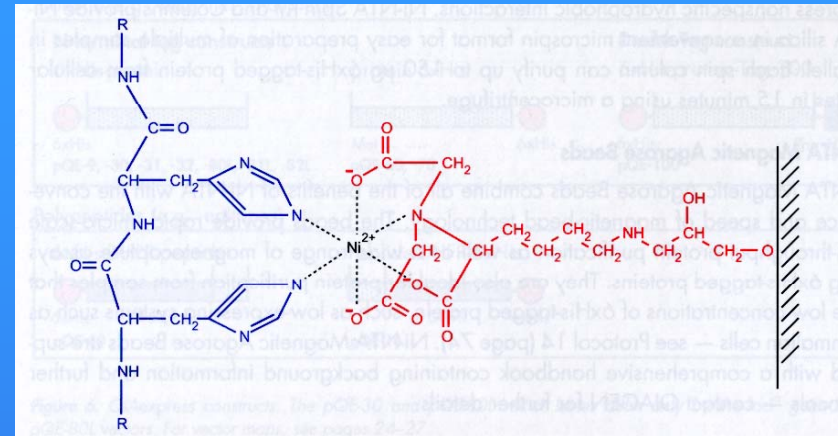
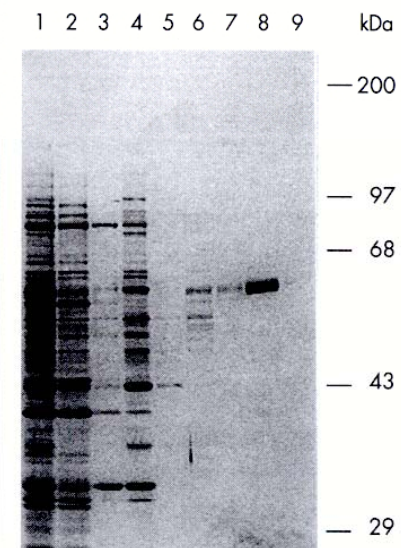


Figure 3.2 Protein purification with the Ni-NTA Protein Purification System.



Purification under Native Conditions



Ulteriori strategie per favorire il “folding” delle proteine

- Coespressione di Chaperoni
- Modificazione dei ceppi batterici
(knockout di geni per proteasi, etc..)
- Modificazioni mirate delle proteine
-

Inclusion Bodies

- Gli inclusion bodies possono essere purificati facilmente
- “Refolding” in vitro, Denaturazione-rinaturazione

Sintesi in sistemi cell-free

E' possibile far sintetizzare proteine in estratti cellulari di origine procariotica (E. coli) od eucariotica (germe di grano)

- Nei casi più favorevoli consente di ottenere un'alta efficienza di produzione in un volume molto piccolo, che facilita la successiva purificazione della proteina
- Nessun problema di tossicità
- Consente l'incorporazione di amino acidi marcati per studi metabolici o sstrutturali
- Possono essere inseriti aminoacidi non naturali
- Più semplice controllare l'azione di proteasi o modulare il folding
- Può essere adattato a produrre proteine con o senza modificazioni post-traduzionali