

**Espressione eterologa.....**

**Come e Perché esprimere la nostra proteina d'interesse  
in un organismo ospite**

# Espressione Genica in Sistemi Eterologhi

## 1. Perché esprimere geni in sistemi eterologhi??

## 2. Quali sistemi eterologhi utilizzare???

### 1. Per studiare funzione della proteina *in vitro*

Per produrre anticorpi contro la proteina

Per studiare la localizzazione sub-cellulare della proteina

Per applicazioni biotecnologiche

(produzione di farmaci, o antigeni per la produzione di vaccini)

Per studiarne l'interazione con altre proteine

.....

### 2. I sistemi eterologhi utilizzati sono *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, cellule di insetto, cellule vegetali e cellule di mammifero in coltura. L'espressione in *E.coli* è di gran lunga la più semplice e, forse per questo, la più utilizzata come **prototipo di espressione genica in sistemi eterologhi**

# Espressione in sistemi eucarioti “eterologhi”

- **Espressione transiente:**

**in cellule, per studio di attività, localizzazione sub-cellulare**

il vettore resta nella cellula come frammento extra-cromosomico, senza integrarsi nel genoma cellulare; il gene verrà espresso per breve tempo, di solito non più di 72 ore.

E' un processo più rapido, facile ed economico ma ovviamente permette studi limitati nel tempo.

- **Espressione stabile:**

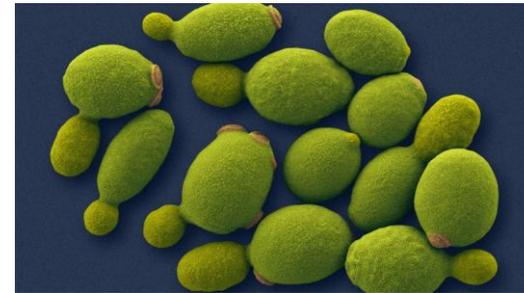
**In organismi, per purificazione, studi *in vitro*, produzione anticorpi**

il DNA esogeno si integra stabilmente nel genoma: il gene sarà espresso «sempre» e sarà trasmesso anche alla progenie. La produzione di una linea/organismo stabilmente trasformata richiede un tempo più lungo dell'espressione transiente

Expression system	Most common application	Advantages	Challenges
<b>Mammalian</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Functional assays</li> <li>• Structural analysis</li> <li>• Antibody production</li> <li>• Expression of complex proteins</li> <li>• Protein interactions</li> <li>• Virus production</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Highest-level protein processing</li> <li>• Can produce proteins either transiently, or by stable expression</li> <li>• Robust optimized transient systems for rapid, ultrahigh-yield protein production</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gram-per-liter yields only possible in suspension cultures</li> <li>• More demanding culture conditions</li> </ul>
<b>Insect</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Functional assays</li> <li>• Structural analysis</li> <li>• Expression of intracellular proteins</li> <li>• Expression of protein complexes</li> <li>• Virus production</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Similar to mammalian protein processing</li> <li>• Can be used in static or suspension culture</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• More demanding culture conditions than prokaryotic systems</li> <li>• Production of recombinant baculovirus vectors is time consuming</li> </ul>
<b>Yeast</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Structural analysis</li> <li>• Antibody generation</li> <li>• Functional analysis</li> <li>• Protein interactions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eukaryotic protein processing</li> <li>• Scalable up to fermentation (grams per liter)</li> <li>• Simple media requirements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fermentation required for very high yields</li> <li>• Growth conditions may require optimization</li> </ul>
<b>Bacterial</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Structural analysis</li> <li>• Antibody generation</li> <li>• Functional assays</li> <li>• Protein interactions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Scalable</li> <li>• Low cost</li> <li>• Simple culture conditions</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein solubility</li> <li>• May require protein-specific optimization</li> <li>• May be difficult to express some mammalian proteins</li> </ul>
<b>Algal</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Studying photosynthesis, plant biology, lipid metabolism</li> <li>• Genetic engineering</li> <li>• Biofuel production</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetic modification and expression systems for photosynthetic microalgae</li> <li>• Superb experimental control for biofuel, nutraceuticals, and specialty chemical production</li> <li>• Optimized system for robust selection and expression</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nascent technology</li> <li>• Less developed compared to other host platforms</li> </ul>
<b>Cell-free</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxic proteins</li> <li>• Incorporation of unnatural label or amino acids</li> <li>• Functional assays</li> <li>• Protein interactions</li> <li>• Translational inhibitor screening</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Open system; able to add unnatural components</li> <li>• Fast expression</li> <li>• Simple format</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Scaling above multimilligram quantities may not be costly</li> </ul>

# *Pichia pastoris* e *Kluyveromyces lactis*

- ✓ *P. pastoris* lievito metilotrofico che utilizza metanolo come fonte di C
- ✓ *K. lactis* è un lievito aerobico che utilizza lattosio come fonte di C
- ✓ Organismi considerati GRAS (Generally Regarded as Safe)
- ✓ Crescita ad alta densità in tempi brevi
- ✓ Sistemi di esporto delle proteine eterologhe più efficienti
- ✓ Glicosilazione proteine simile a quella di mammifero
- ✓ Possibilità di scale up (fermentatori)
- ✓ Disponibilità di promotori inducibili e/o costitutivi
- ✓ Limitata disponibilità di ceppi e vettori



LOW

HIGH

Per esprimere un gene eterologo bisogna definire due componenti:

SPEED



MAMMALIAN



BEVS/INSECT CELL



YEAST



BACTERIA

-un ospite per l'espressione

COST



BACTERIA



YEAST



BEVS/INSECT CELL



MAMMALIAN

-un vettore d'espressione

TYPICAL YIELD



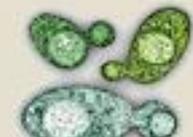
MAMMALIAN



BEVS/INSECT CELL



BACTERIA



YEAST

POST –  
TRANSLATION  
MODIFICATION



BACTERIA



YEAST



BEVS/INSECT CELL



MAMMALIAN

FDA APPROVAL



BEVS/INSECT CELL



YEAST



BACTERIA



MAMMALIAN

## Vantaggi

- Vasta scelta di vettori di clonaggio
- Vasta scelta di ceppi batterici
- Controllo relativamente semplice dell'espressione del gene
- Ottima resa nella produzione di proteine ricombinanti (25% del totale)
- La proteina ricombinante può essere espressa come proteina di fusione
- La proteina ricombinante può essere secreta nel terreno di crescita
- Basso costo di produzione
- Processi di fermentazione ben conosciuti
- Facile possibilità di "scale-up"

## Produzione di proteine eterologhe in *E.coli*

## Svantaggi

- La proteina ricombinante può mancare di modificazioni post-traduzionali (es. glicosilazioni)
- Batteri Gram-negativi contengono endotossine
- Presenza di proteasi
- La sovra-produzione di proteine può portare alla formazione di "corpi d'inclusione", aggregati insolubili che rendono difficoltosa la purificazione della proteina e possono ridurre la sua attività biologica

# Promotore

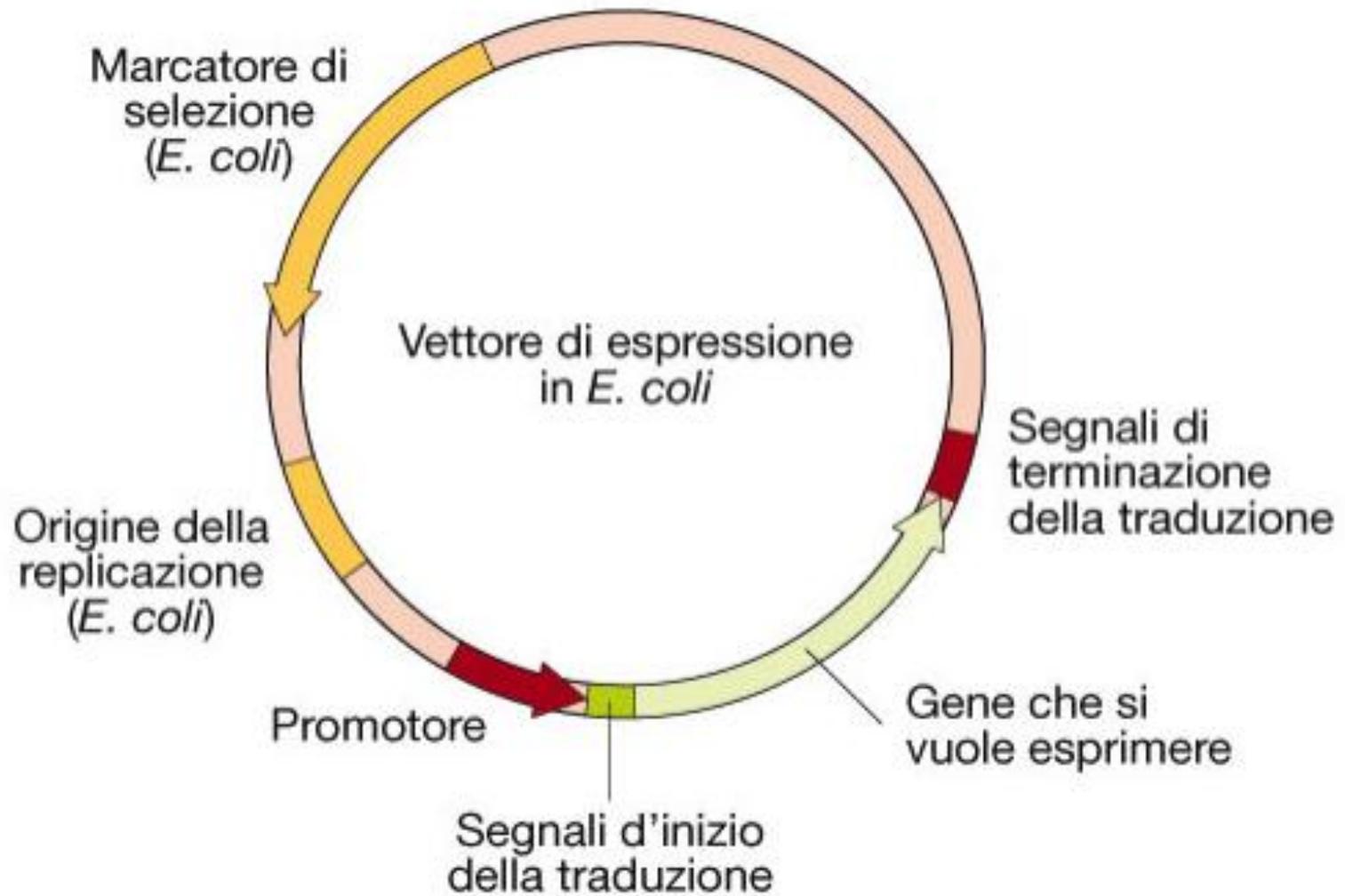
Il livello di espressione di un gene dipende in larga misura dalla **forza del promotore** che lo controlla determinando la frequenza con la quale l'RNA polimerasi inizia la trascrizione. Sono stati quindi isolati ed ottimizzati un certo numero di promotori forti di E.coli che sono presenti nella maggior parte dei vettori d'espressione attuali. In più, sono disponibili **promotori in parte o totalmente sintetici** sulla base delle sequenze consensus ottimali.

# Stabilità

La resa di un prodotto di espressione dipende anche dalla stabilità della proteina. La stabilità delle proteine dipende dalla presenza di **aminoacidi stabilizzanti all'estremità N-terminale** e di **aminoacidi destabilizzanti all'estremità C-terminale**. Modificando la sequenza codificante una proteina, possiamo alterarne la composizione aminoacidica ed aumentarne la stabilità.

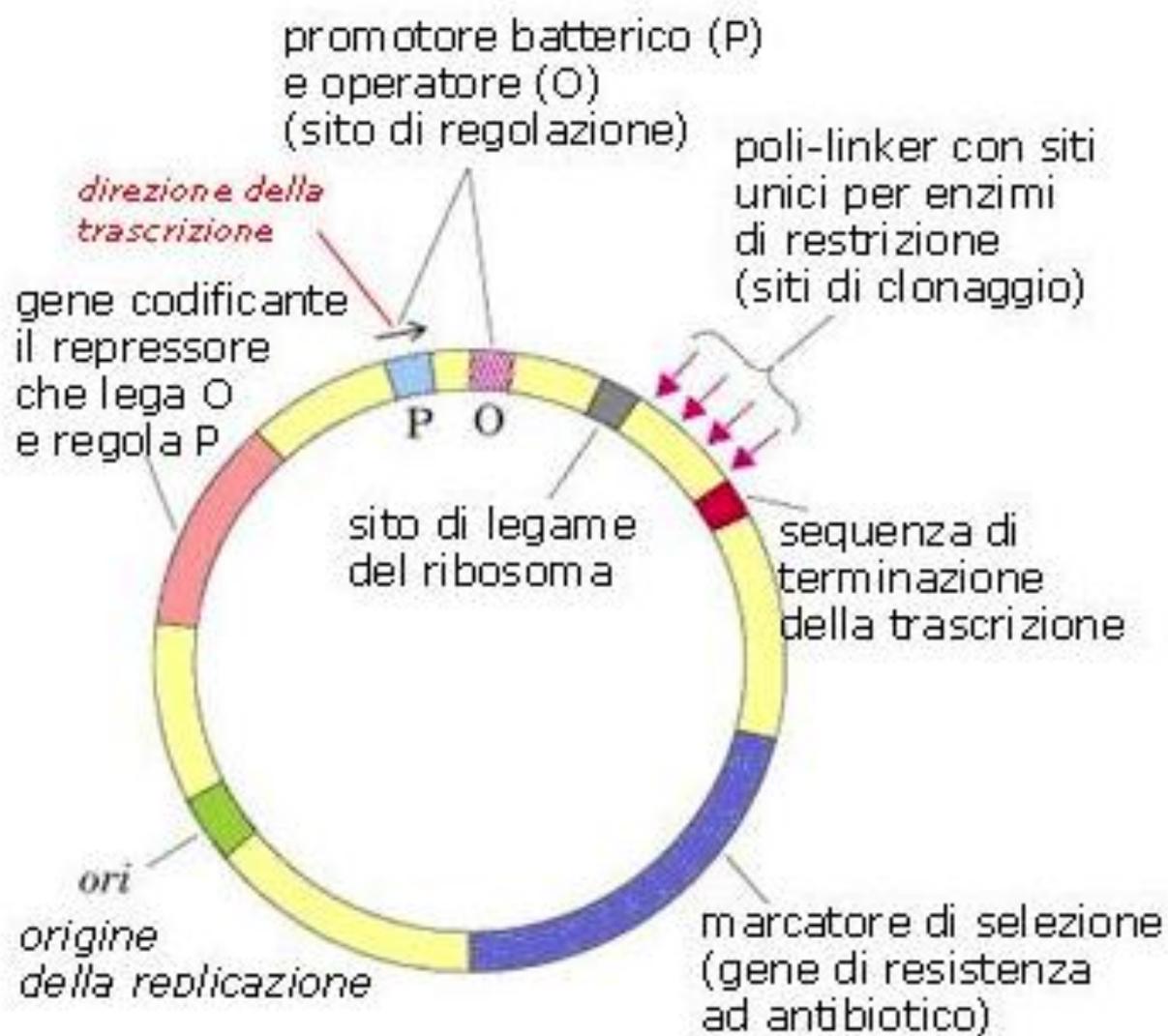
## Uso di ceppi difettivi in proteasi

Un modo per ottimizzare la stabilità dei prodotti d'espressione, consiste nel **minimizzare la degradazione proteolitica** a carico delle proteine espresse

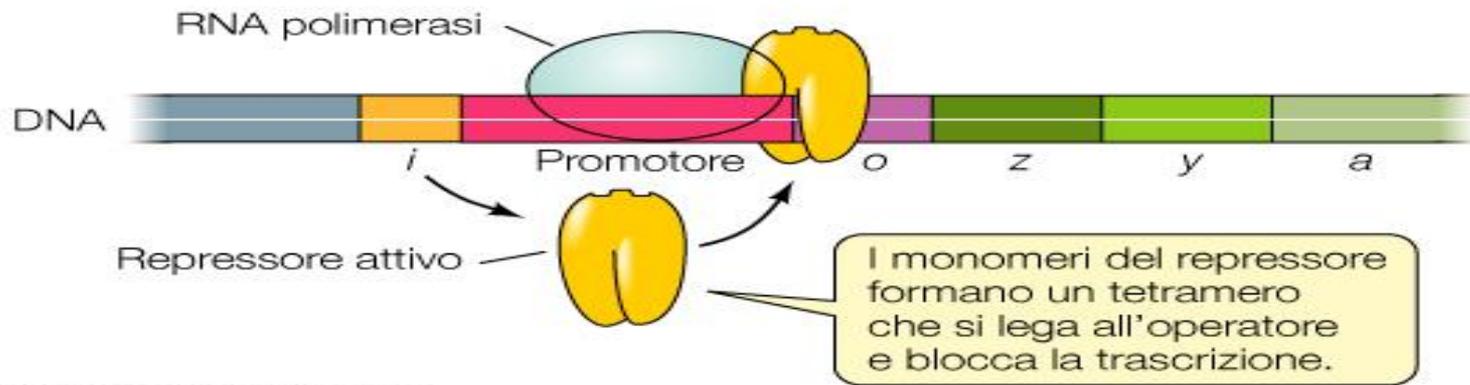


## Perchè i vettori d' espressione sono regolati

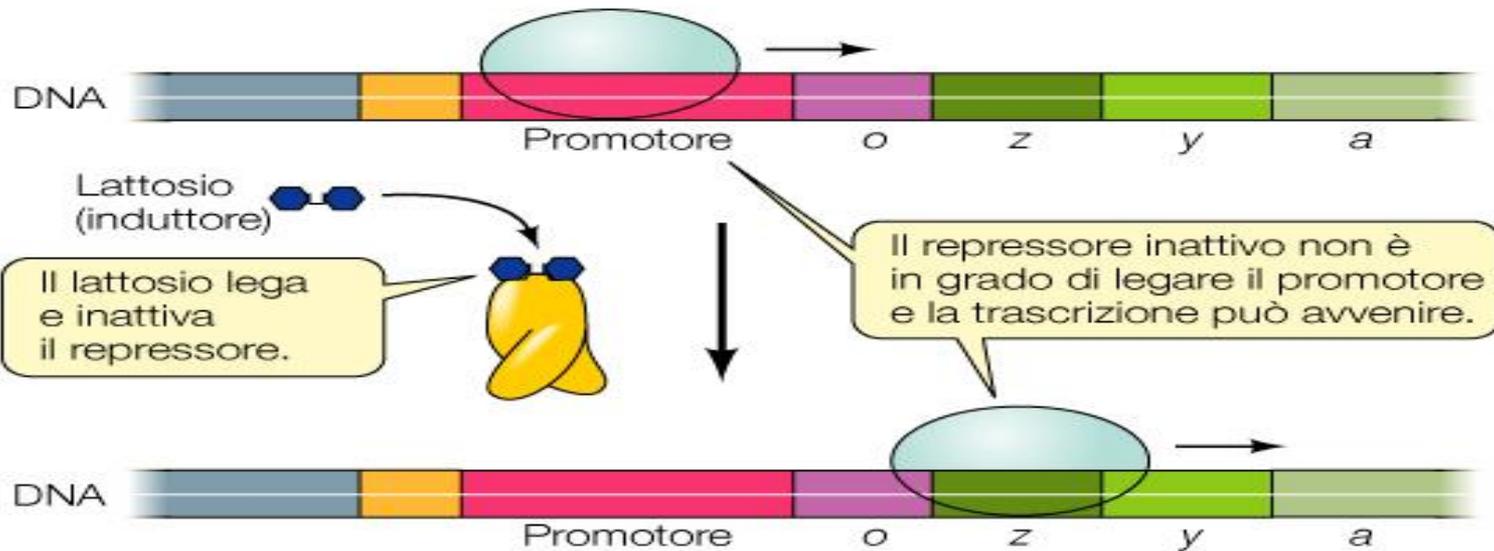
- Una proteina eterologa tende ad essere identificata come “**estranea**” e degradata dalla cellula che attiva specifiche proteasi. La possibilità di indurre/regolare l'espressione della proteina permette di ridurre la degradazione proteolitica aumentando la resa.
- Alcune proteine possono essere **tossiche** o, comunque, **interferire con la crescita dell'ospite di espressione**. In alcuni casi fino al 25-50% delle proteine totali sono costituite dalla proteina ricombinante, a discapito delle proteine che assicurano il normale metabolismo di E.coli. La possibilità di limitare l'espressione della proteina alla sola **fase di induzione** permette il normale sviluppo della cellula.



### Assenza di lattosio



### Presenza di lattosio



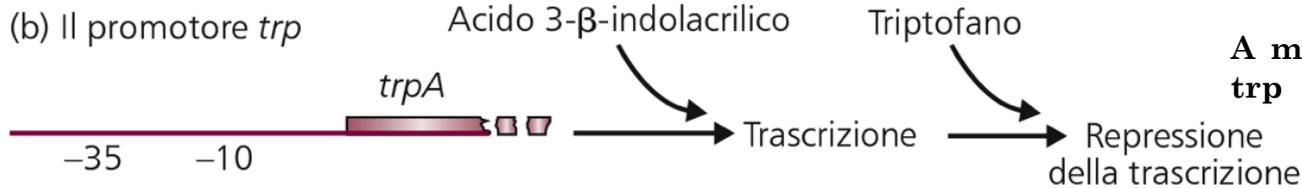
Per indurre l'espressione di geni eterologhi clonati in vettori d'espressione regolati da questo sistema si utilizza l'induttore gratuito **IPTG** (isopropil-beta-tio-D-galattopiranoside)

# Principali sistemi di regolazione

(a) Il promotore *lac*

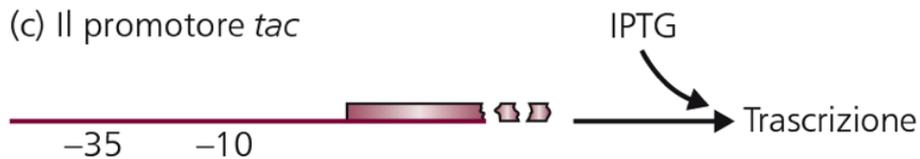


(b) Il promotore *trp*



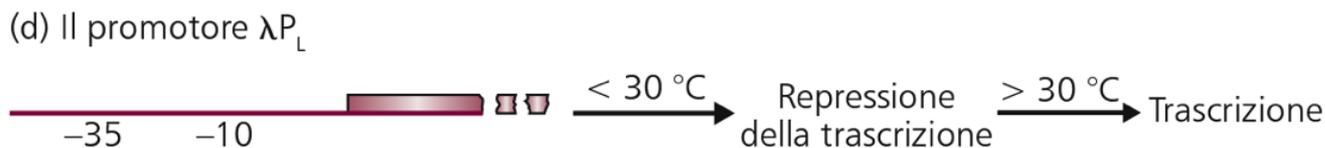
**A monte dei geni per la biosintesi del *trp***

(c) Il promotore *tac*



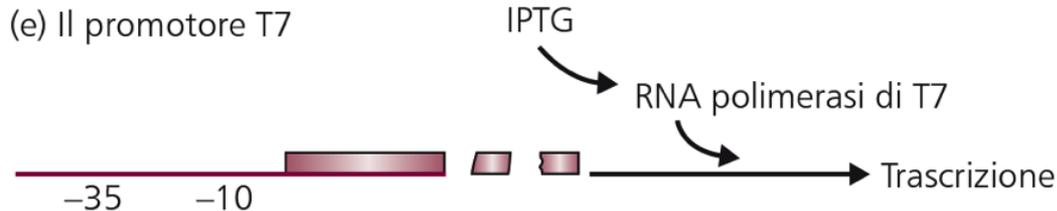
**Promotore ibrido tra *lac* e *trp*, molto più forte**

(d) Il promotore  $\lambda P_L$



**Promotore forte, represso da  $\lambda cI$ . Si usa ceppo di *E.coli* con  $cI$  termolabile. A 30°  $cI$  mutata è in grado di reprimere, mentre a 42°,  $cI$  è inattiva e la trascrizione è on**

(e) Il promotore T7



**Promotore forte, riconosciuto dall'RNAPol del fago T7. Si usa un ceppo di *E.coli* lisogeno per il fago T7, il cui gene per l'RNAPol è controllato da promotore *lac*, indotto da IPTG**

I sistemi di regolazione procariotici sono sempre “**leaky**”. Una repressione assoluta, infatti, impedirebbe al sistema di essere ri-attivato. La completa repressione dell’operone del lattosio per esempio, reprimendo completamente anche l’espressione della lattosio permeasi, impedirebbe l’assunzione di lattosio eventualmente presente nel mezzo di coltura

Analogamente, il principale problema di molti vettori d’espressione è quello di essere **troppo “leaky”** e di esprimere un pò (troppa) proteina anche in condizioni di non induzione

Sono stati quindi messi a punto dei sistemi di regolazione “stringenti” che minimizzano il livello di espressione basale di geni repressi.

- **Aumentare il dosaggio genico dei geni di regolazione (lacI)**
- **Creare delle regolazioni a cascata**
- **Promotore dell’operone dell’arabinosio che è quantitativamente represso da quantità crescenti di arabinosio**

## Regolazione da Arabinosio pBAD

Il promotore araBAD è regolato **sia positivamente che negativamente** dal prodotto del gene araC, un regolatore trascrizionale che forma un complesso con l' L-arabinosio.

**Off:**

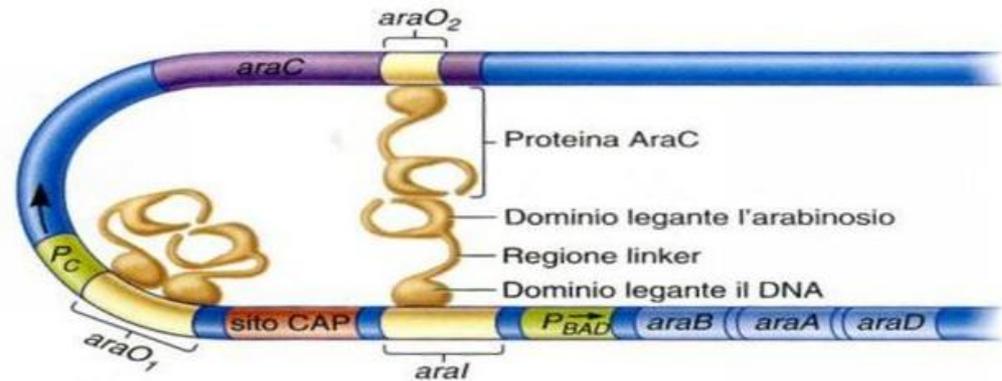
In assenza di arabinosio, il dimero AraC contatta i siti O<sub>2</sub> e I<sub>1</sub> dell' operone araBAD, formando un loop sul DNA.

**On:**

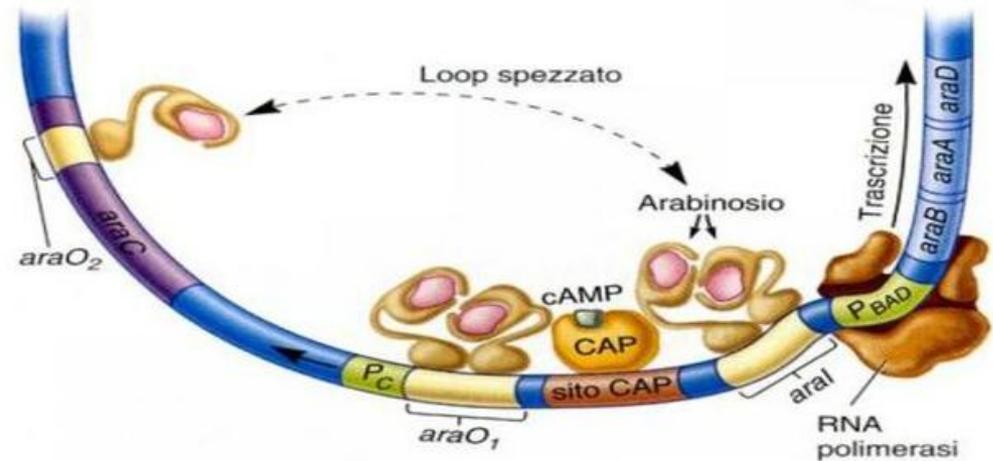
L-arabinosio lega AraC, e cio' rilascia il loop e permette la trascrizione.

Il complesso cAMP Activator Protein (CAP)-cAMP lega il DNA e stimola il legame di AraC ad I<sub>1</sub> e O<sub>1</sub>.

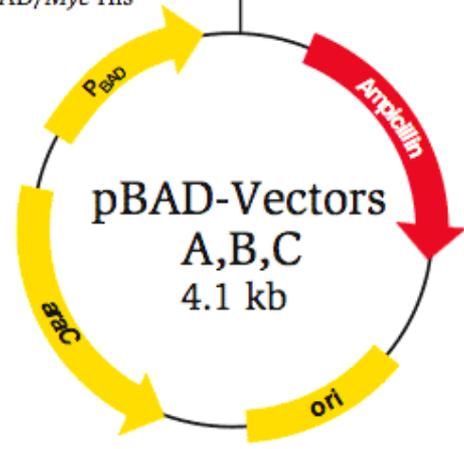
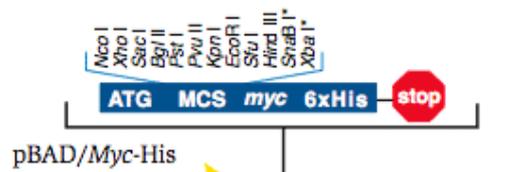
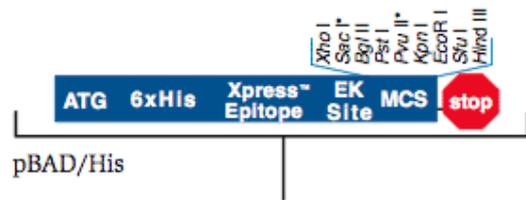
**Il livello d' espressione basale puo' quindi essere represso aggiungendo glucosio che abbassa i livelli di cAMP che a sua volta riduce il legame di CAP. Di conseguenza l'attivazione trascrizionale è ridotta.**



(a) Operone inibito in assenza di arabinosio

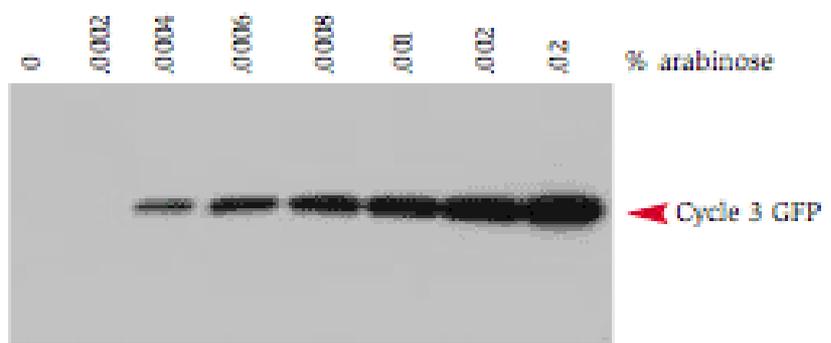


(b) Operone attivato in presenza di arabinosio

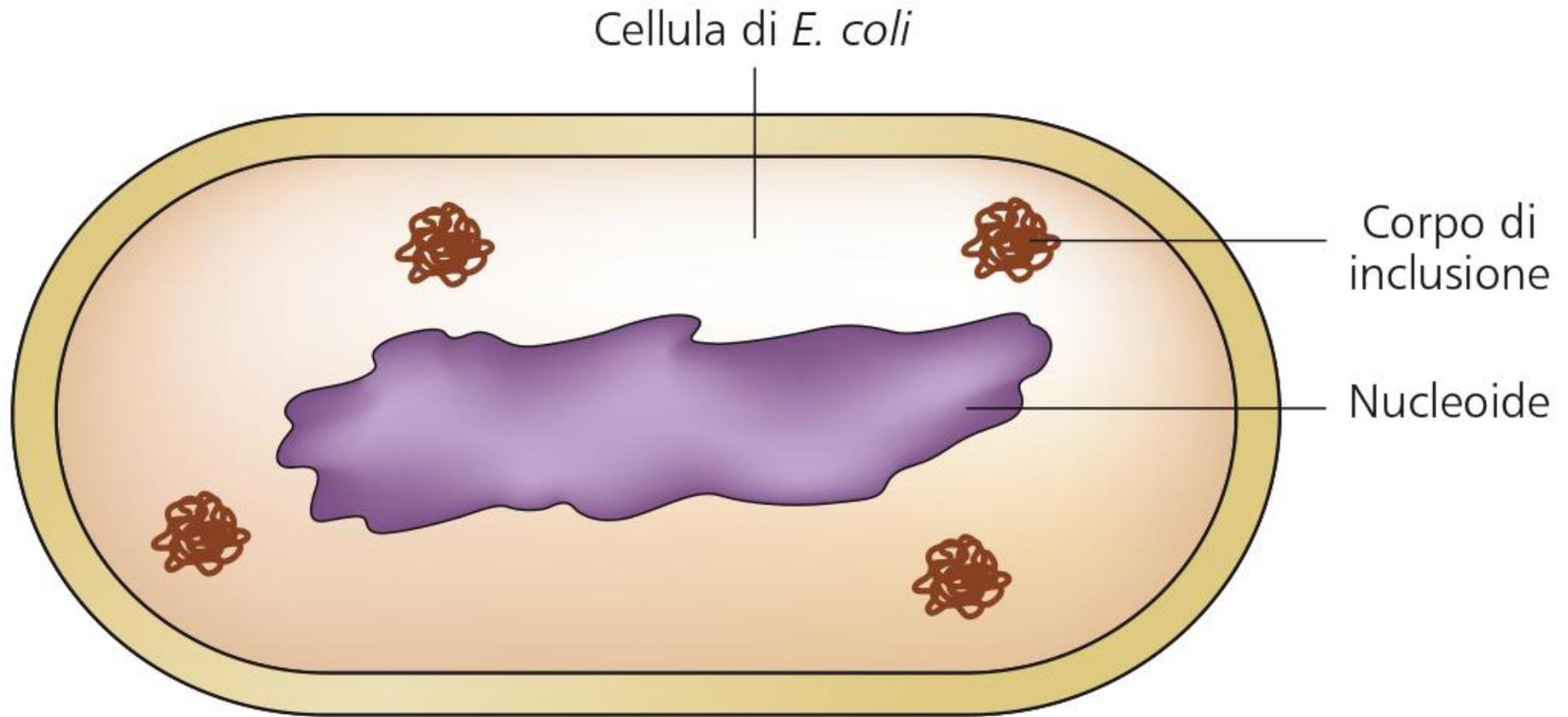


\* Frame-dependent variations

Figure 2 - Western blot of arabinose induction



# Corpi di inclusione



**la proteina nativa deve essere recuperata  
mediante denaturazione *in vitro* e refolding**

# Corpi di inclusione

Se il folding della proteina non è corretto

Se la proteina necessita di ponti disolfuro per il folding

...la proteina potrebbe essere insolubile e formare **corpi di inclusione**

In questo caso....

- la proteina ricombinante e' fino al 50% delle proteine totali
- e' protetta dalla degradazione
- non può essere tossica per la cellula

Ma non è facilmente disponibile

- isolamento dei corpi inclusi
- denaturazione in presenza di agenti denaturanti come guanidina o urea o condizioni riducenti (DTT)
- refolding della proteina mediante lenta rimozione del denaturante con dialisi,

# Esporto della Proteina

## Vantaggi

- La stabilità della proteina può aumentare (meno proteasi)
- Permette l'accumulo di proteine tossiche
- La proteina può essere isolata più facilmente

## Svantaggi

- Resa ridotta

## Come?

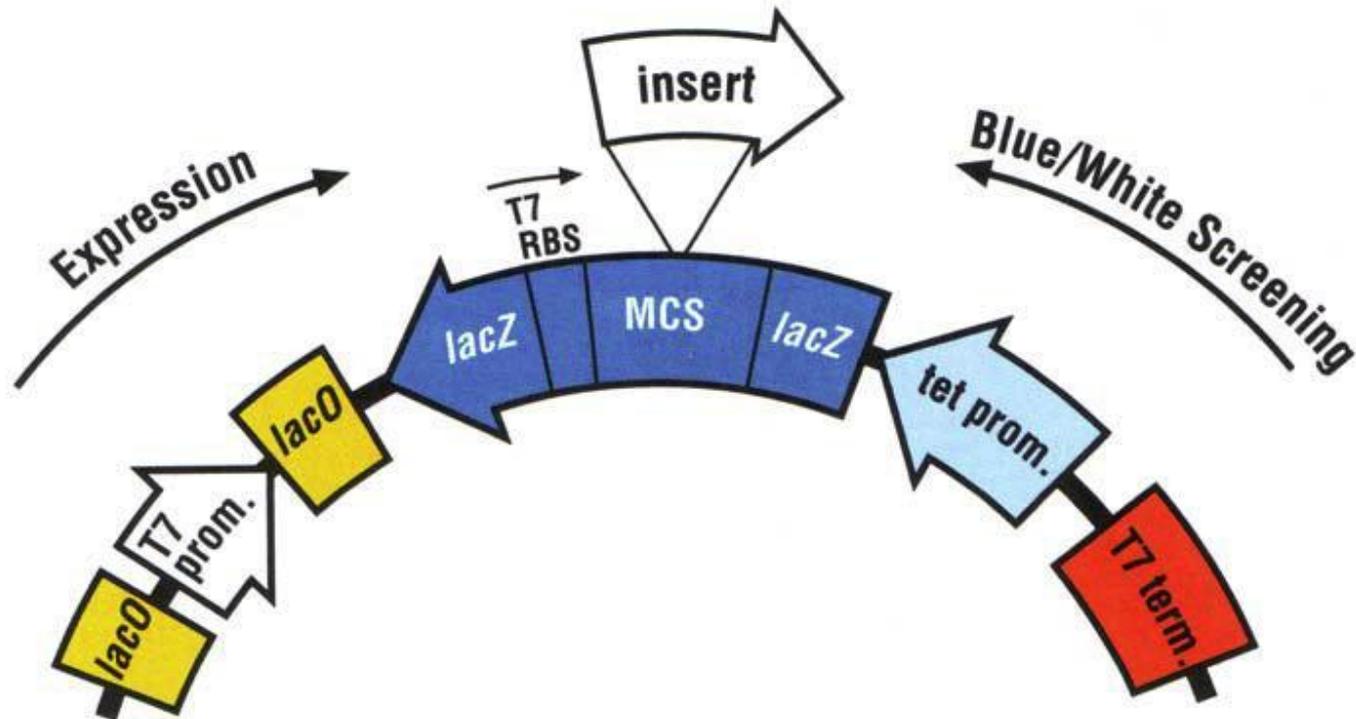
- Peptide segnale, aggiunto all'estremità  $\text{NH}_2$  della proteina



# Espressione di proteine native

Un vettore d'espressione può essere usato per produrre una **proteina nativa** o una **proteina chimerica** (fusa ad un tag)

La produzione di una proteina nativa può essere necessario per produzione di anticorpo, o studi funzionali. Potrà essere purificata solo dall'SDS-PAGE



# Sito di clonaggio multiplo del vettore di espressione

*Bam*HI *Eco*RI *Sac*I *Sal*I *Hind*III *Not*I *Xho*I

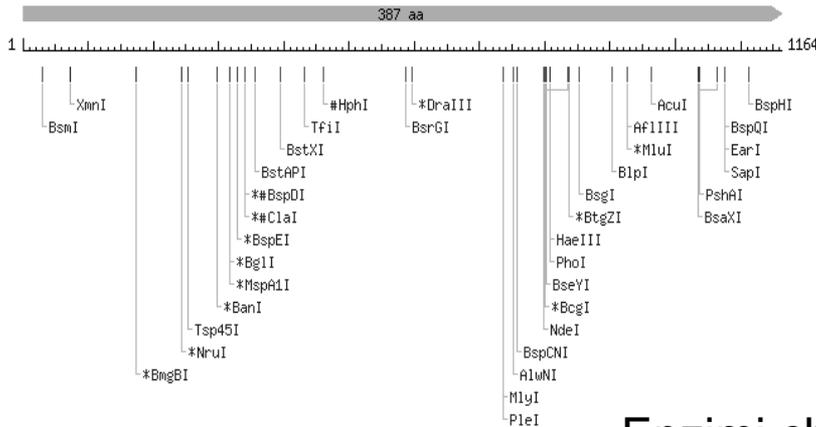
ATCGGAATTAATTCCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCA

## Sequenza del gene

>gi|49175990:3153377-3154540 *Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655 chromosome, complete genome

ATGAACAACCTTTAATCTGCACACCCCAACCCGCATTCTGTTTGGTAAAGGCGCAATCGCTGGTTTACGGC  
AACAAATTCCTCACGATGCTCGCGTATTGATTACCTACGGCGGCGGACAGCGTGAAAAAACCCGGCTTCT  
CGATCAAGTTCTGGATGCCCTGAAAGGCATGGACGTGCTGGAATTTGGCGGTATTGAGCCAAACCCGGCT  
TATGAAACGCTGATGAACGCCGTGAAACTGGTTTCGCGAACAGAAAGTGACTTTCTGCTGGCGGTTGGCG  
GCGGTTCTGTACTGGACGGCACCAAAATTTATCGCCGACAGCGCTAACTATCCGGAAAATATCGATCCGTG  
GCACATTCGCAAAACGGGCGGTAAAGAGATTAAGCGCCATCCCGATGGGCTGTGTGCTGACGCTGCCA  
GCAACCGGTTTCAAGATCCAACGCAGGCGCGGTGATCTCCCGTAAAACACAGGCGACAAGCAGGCGTTCC  
ATTCTGCCCATGTTTCAGCCGGTATTTGCCGTGCTCGATCCGGTTTATACCTACACCCTGCCCGCGTCA  
GGTGGCTAACGGCGTAGTGGACGCCCTTTGTACACACCGTGAACAGTATGTTACCAACCGGTTGATGCC  
AAAATTCAGACCGTTTCGCAGAAGGCATTTGTGACGCTAATCGAAGATGGTCCGAAAGCCCTGAAAG  
AGCCAGAAAACCTACGATGTGCGCGCCAACGTCATGTGGCGGCGACTCAGGCGCTGAACGGTTTATTGG  
CGTGGCGTACCAGGACTGGGCAACGCATATGCTGGGCCACGAACTGACTGCGATGCACGGTCTGGAT  
CACGCGCAAACACTGGCTATCGTCTCGCTGCCTGACTGTGGAATGAAAAACGCGATACCAAGCGCGCTAAGC  
TGCTGCAATATGCTGAACGCGTCTGGAACATCACTGAAGTTCCGATGATGAGCGTATTGACGCGCGAT  
TGCCGCAACCCGCAATTTCTTTGAGCAATTAGGCGTGCCGACCCACCTCTCCGACTACGGTCTGGACGGC  
AGCTCCATCCCGGCTTTGCTGAAAAAAGTGAAGAGCACGGCATGACCCAACCTGGGCGAAAATCATGACA  
TTACGTTGGATGTCAGCCGCCGTATATACGAAGCCGCCCGCTAA

## Analisi di restrizione della sequenza del gene



## Enzimi che NON tagliano la sequenza del gene

AatII Acc65I AccI AclI AfeI AflII AhdI AleI ApaI ApaLI AscI AseI AsiSI AvaI AvrII BaeGI BaeI BamHI  
BanII BbsI BbvCI BciVI BclI BfaI BfuAI BglII BmtI BpmI Bpu10I BpuEI BsaAI BsaBI BsaI BseRI BsiEI BsiWI  
BsmAI BsmBI BsmFI BsoBI BspMI BsrBI BsrDI BssSI BstBI BstEII BstNI BstYI BstZ17I Bsu36I BtsI CspCI DraI  
DrdI EaeI EagI EciI Eco53kI EcoNI EcoO109I EcoRI EcoRV FseI FspI HincII HindIII HpaI Hpy99I KasI KpnI  
MfeI MscI NaeI NarI NcoI NgoMIV NheI NmeAIII NotI NsiI NspI PacI Paer7I PciI PflFI PflMI PmeI PmlI PpuMI  
PsiI PspGI PspOMI PspXI PstI PvuI PvuII RsrII SacI SacII SalI SbfI ScaI SexAI SfcI SfiI SfoI SgrAI SmaI  
SmlI SnaBI SpeI SphI SspI StuI StyI SwaI TliI TspMI Tth111I XbaI XcmI XhoI XmaI ZraI



## Sequenza degli oligonucleotidi per il clonaggio del gene per PCR

Forward 5'-CAGGGATCCATGAACAACCTTTAATCTGCAC-3'

Reverse 5'-CAGAAGCTTTTAGCGGGCGGCTTCGTATATAC-3'

# **TAG per affinità**

**Uno delle caratteristiche più importanti dei vettori d' espressione consiste nella presenza dei TAG che permettono di purificare con facilità la proteina**

- Un TAG codifica per un peptide caratterizzato da un' alta affinità a qualche ligando e che può essere revertita in condizioni fisiologiche**
- Il TAG può essere aggiunto all' N-ter o al C-ter della proteina (folding della proteina)**

## **TAG**

**Calmodulin binding peptide (CBP)**

**• 6xHis**

**• Proteina A (IgG binding domain)**

**• Glutathione S-transferasi (GST)**

**• Strep tag (Streptavidin binding tag)**

**• Flag tag**

**• Myc tag**

**• HemAgglutinin (HA) tag**

# Espressione di proteine di fusione

Spesso si preferisce esprimere proteine di fusione, per la loro maggiore stabilità, gli alti livelli di espressione e la relativa facilità con cui si purificano. Con queste proteine chimeriche si pone

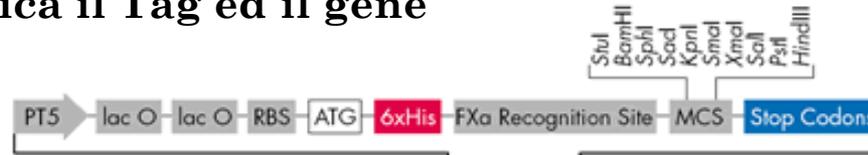
## il problema dello schema di lettura (frame)

```
          BamHI      HindIII
AGAACCATG  CACCACCACCACCACCAC  GGATCCGTCGAAGCTTGATAATTAGCTGA
TCTT GGTTAC GTGGTGGTGGTGGTGGTG  CCTAGGCAGCTTCGAACTATTAAATCGACT
```

```
          BamHI      HindIII
ATG  CACCACCACCACCACCAC  GGATCC  cDNA  AGCTTGATAATTAGCTGA
TAC  GTGGTGGTGGTGGTGGTG  CCTAGG  TCGAACTATTAAATCGACT
          ATG              TAA
```

# Tag ad istidina

Esistono numerosi vettori commerciali che includono il Tag ad istidina per esprimere fusioni N-terminali o C-terminali. Di solito nel caso delle fusioni N-terminali è presente un sito di riconoscimento per una proteasi interposto tra la sequenza che codifica il Tag ed il gene



## Purificazione della proteina chimerica su colonna di Ni-NTA

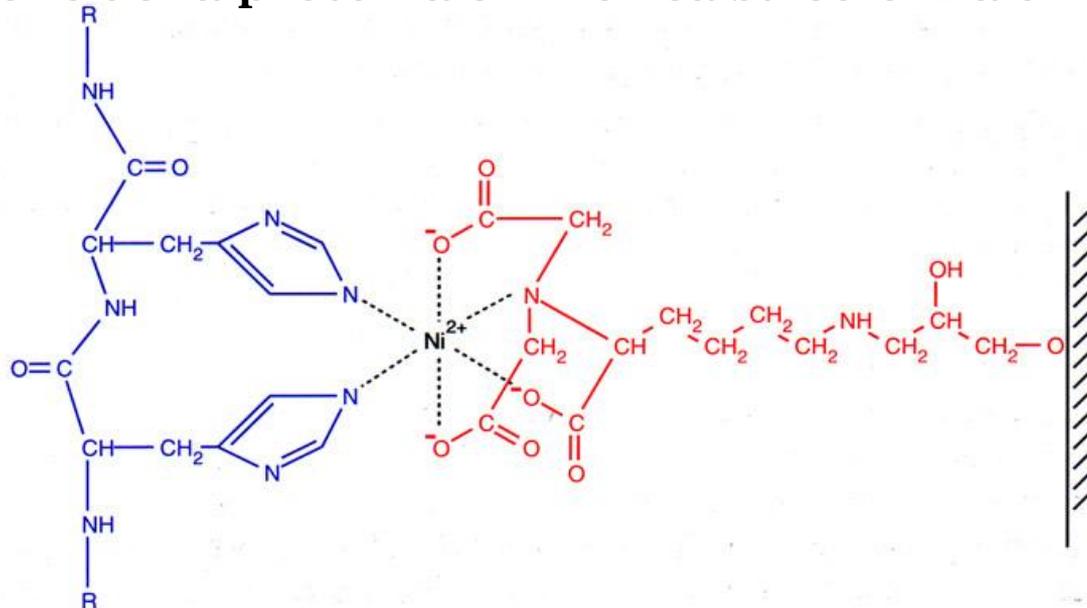
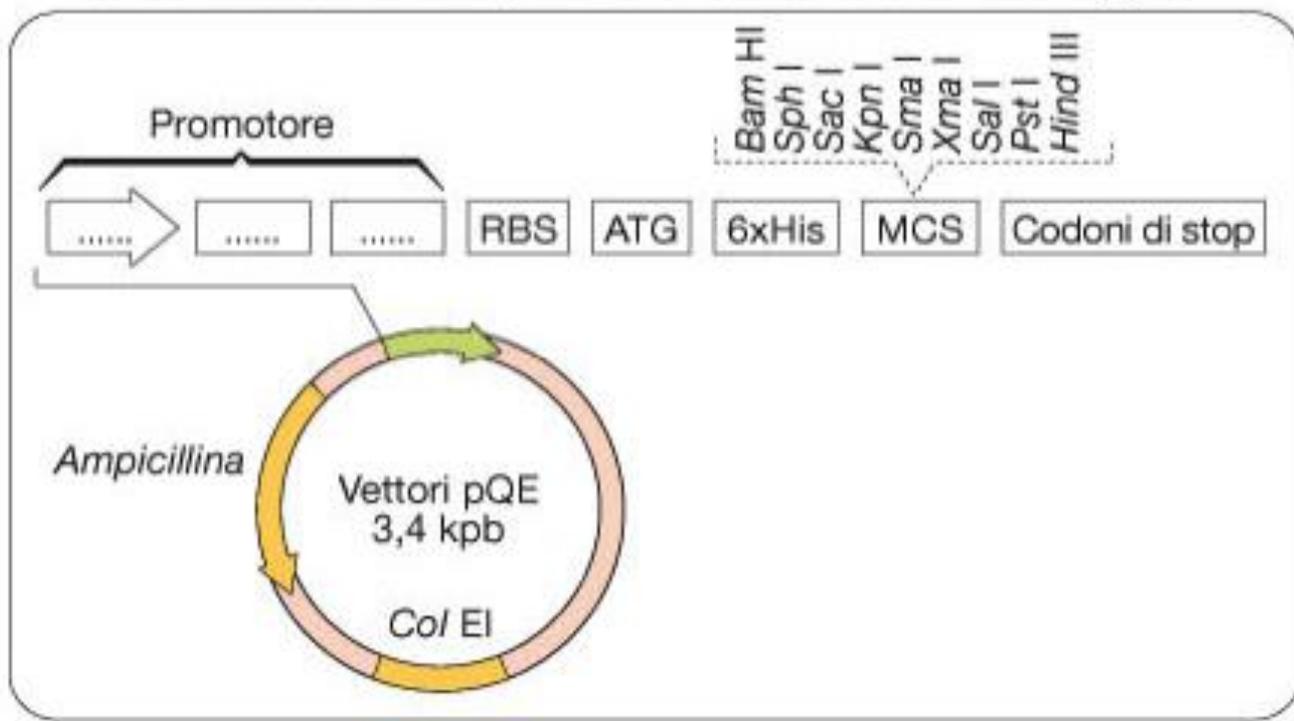


Figure 5. Interaction between neighboring residues in the 6xHis tag and Ni-NTA matrix.

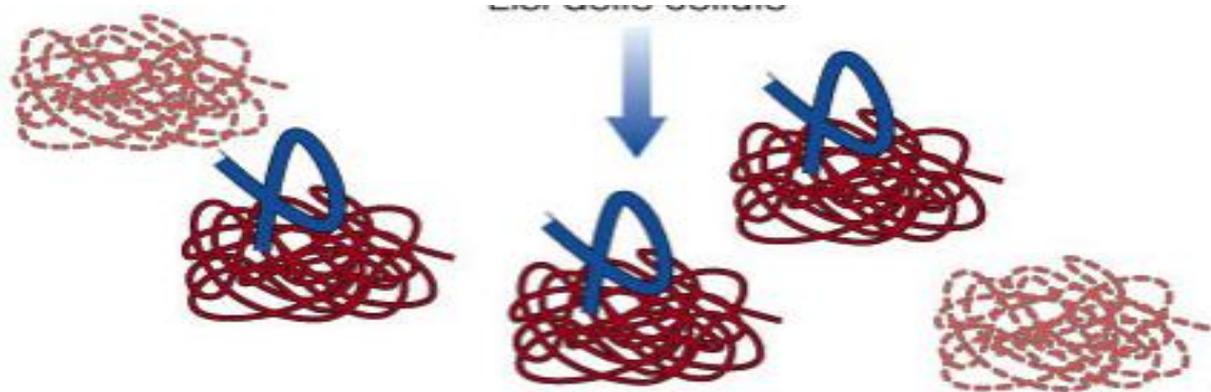
# Purificazione di una proteina ricombinante "His-tagged"



Raccolta delle cellule di *E. coli* dopo induzione del gene ricombinante

Lisi delle cellule

Lisi delle cellule



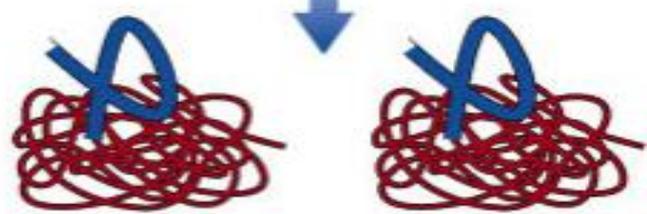
Purificazione per affinità su colonna di Ni-Nta

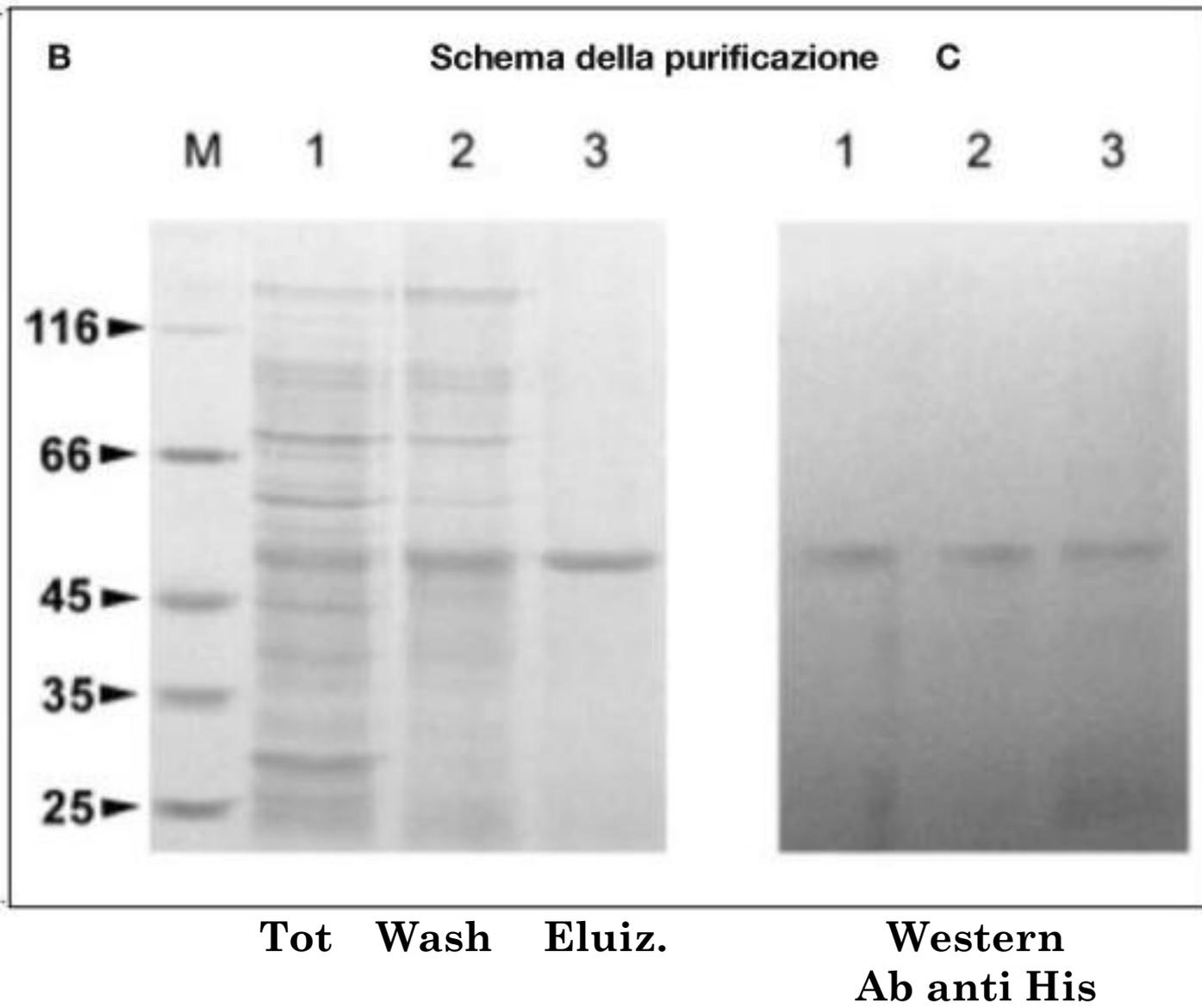


Lavaggio proteine aspecifiche

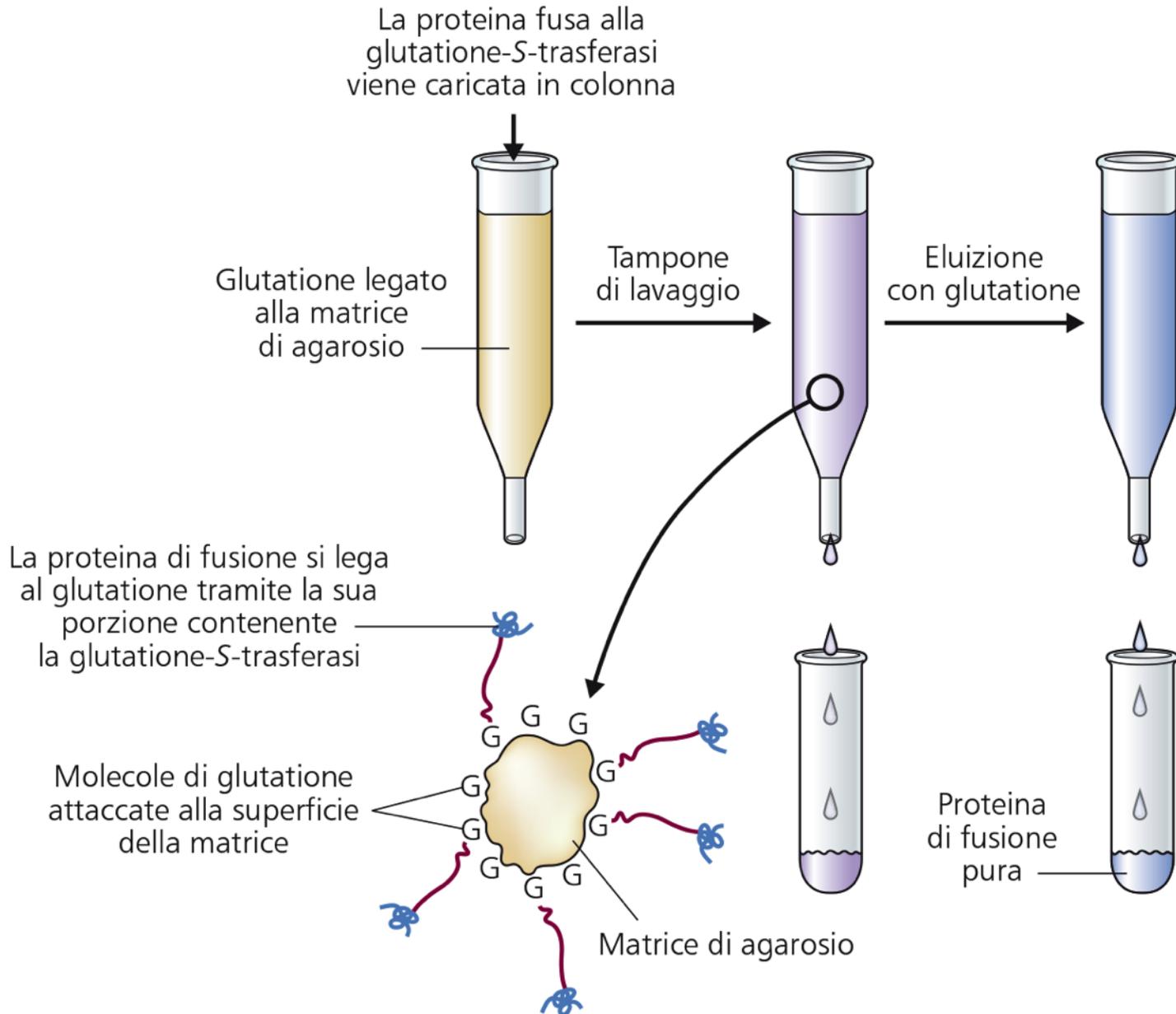


Eluizione

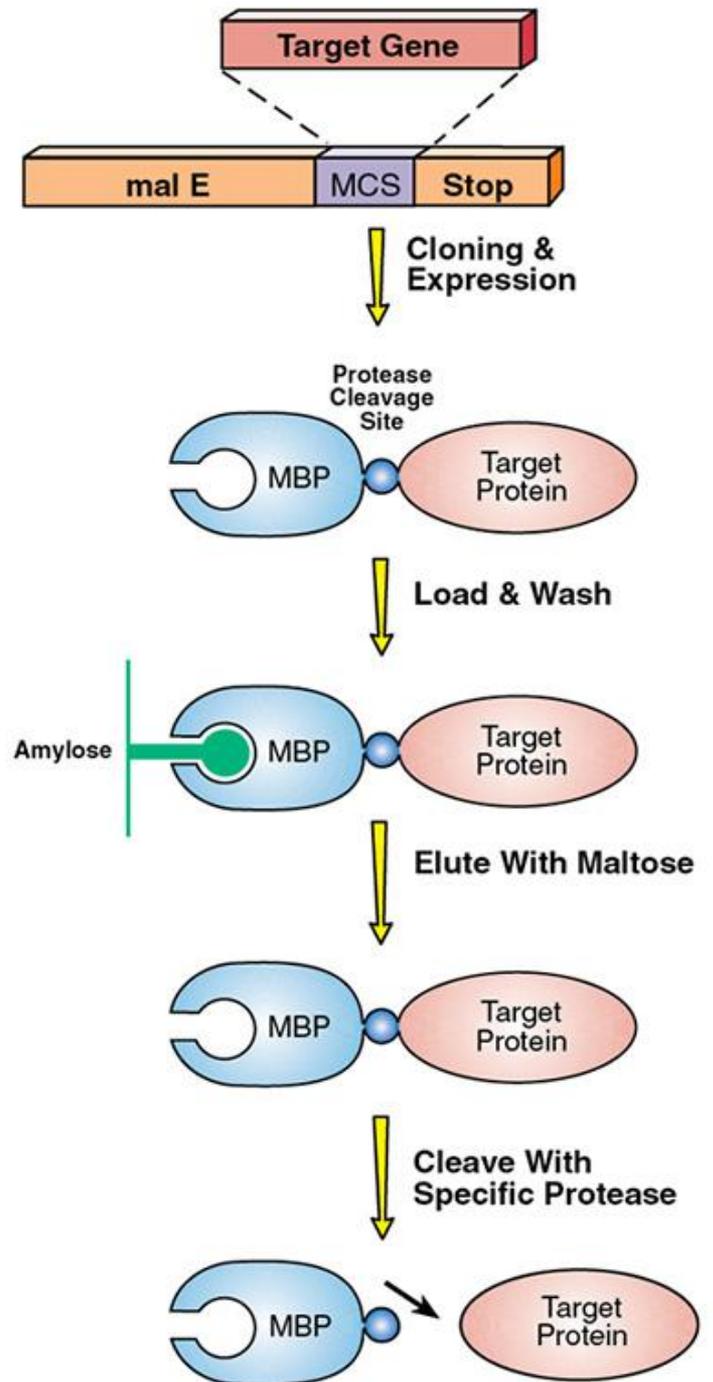
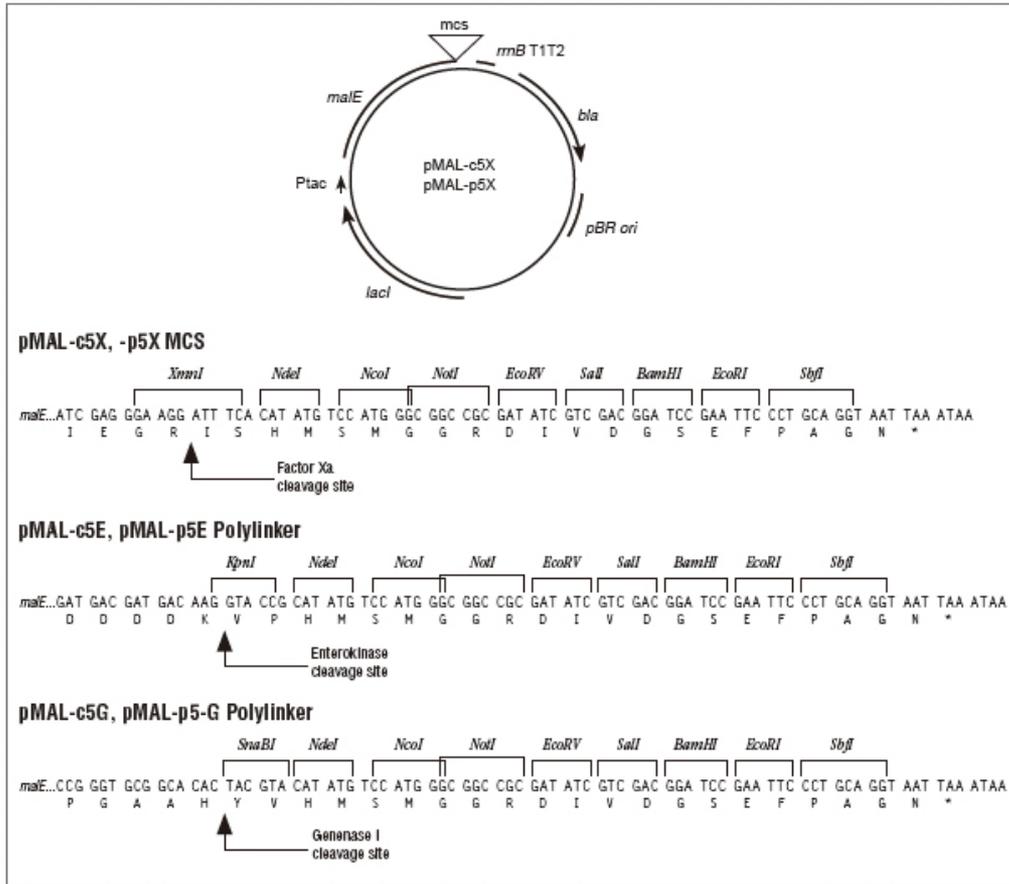




# Tag GST

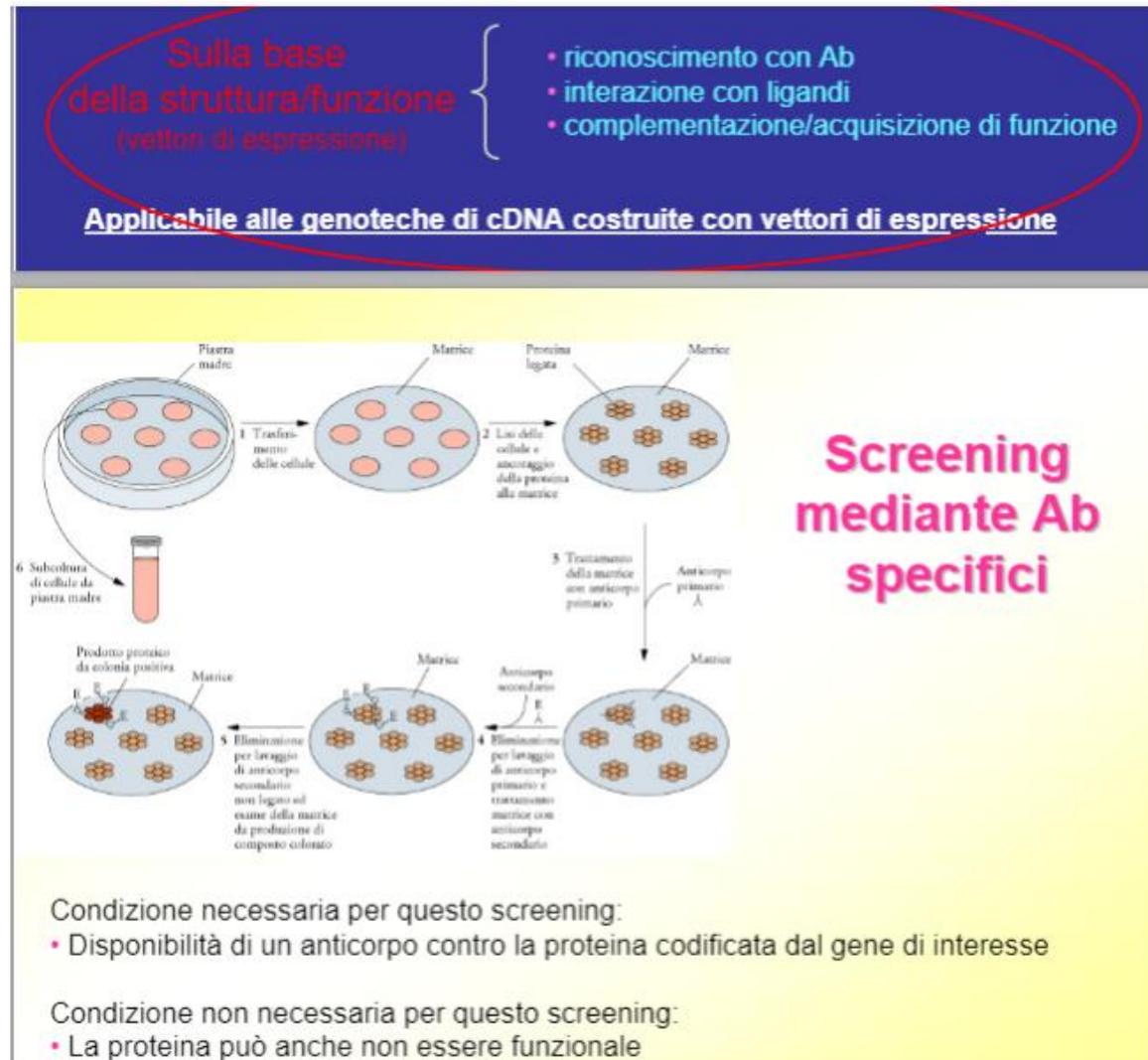


# Produzione di proteine con tag MBP

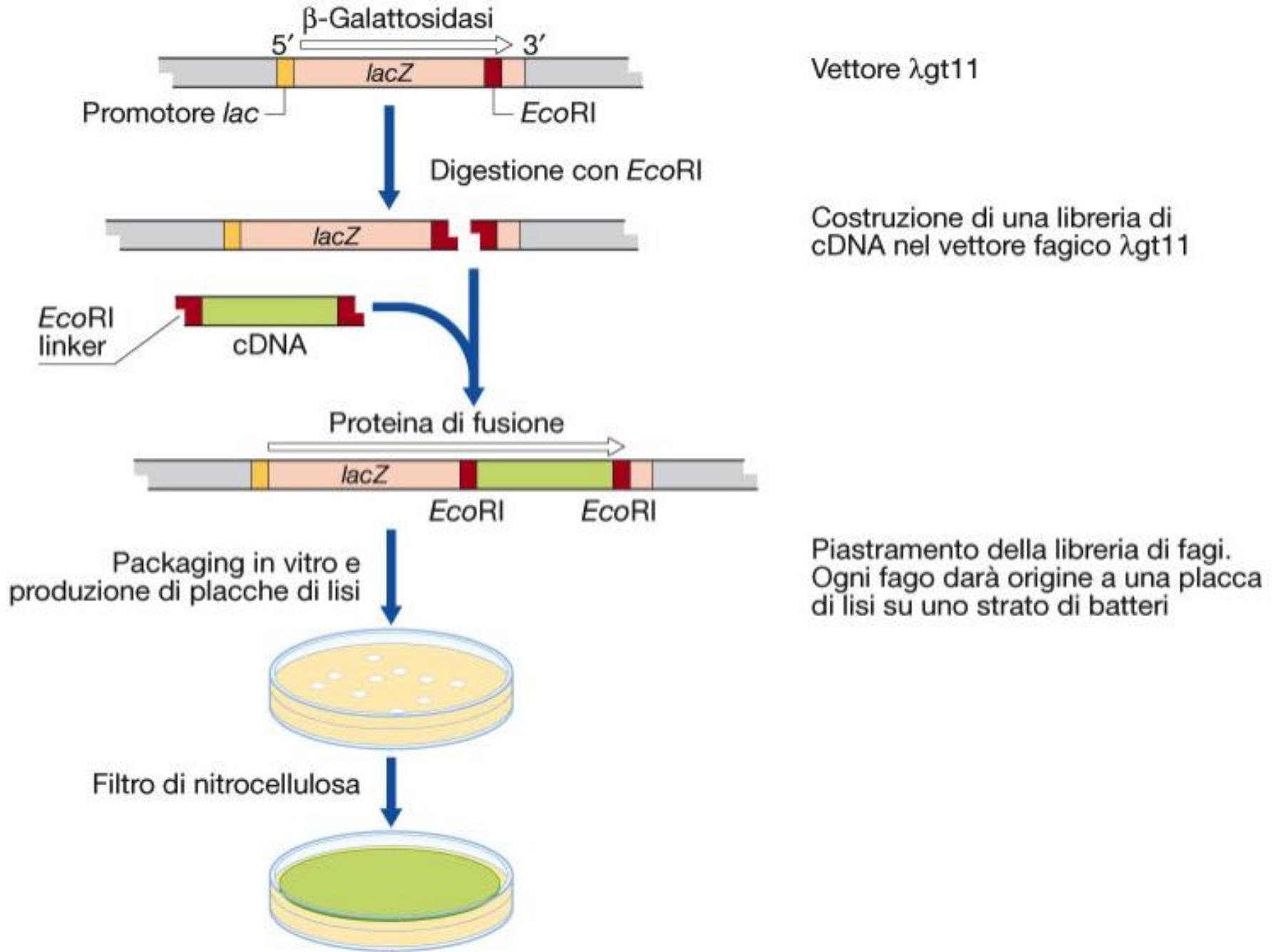


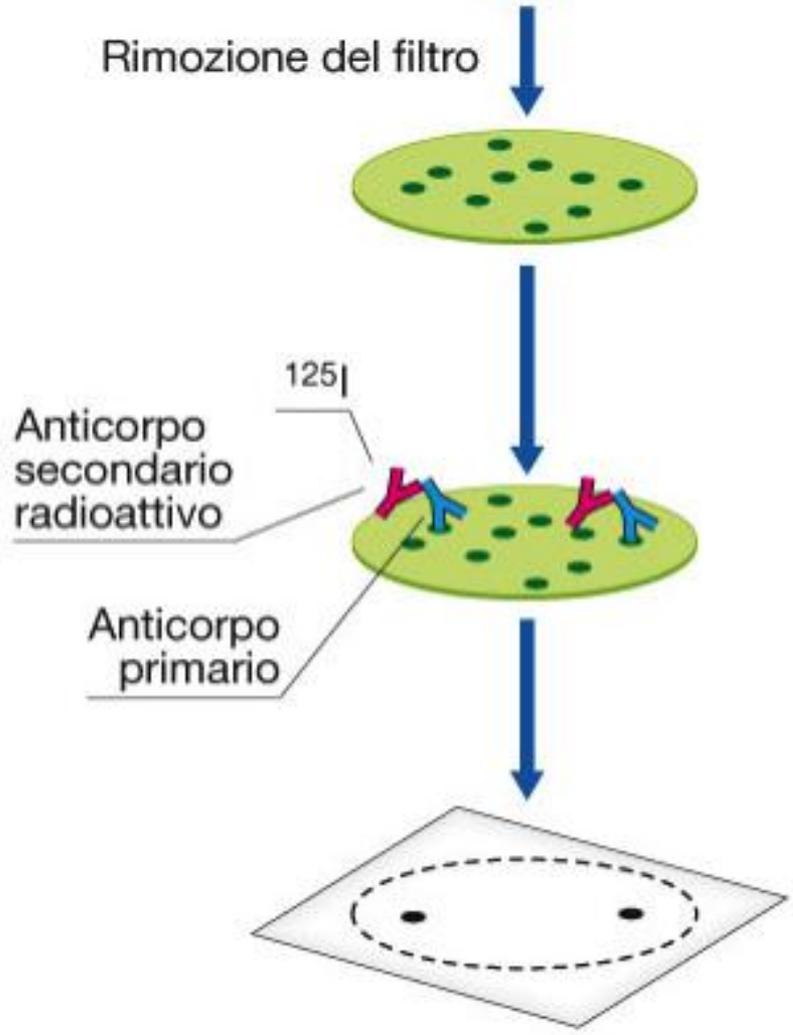
# Screening immunologico di una libreria di espressione

Una libreria di espressione risponde a tutti i requisiti di una libreria genica con un'unica differenza: è costruita in modo da avere **promotori forti funzionali in *E.coli*** (es. il **promotore lac**) capaci di indurre l'espressione in *E.coli* dei **cDNA** clonati.



# Screening di una libreria d'espressione con anticorpi specifici





Rimozione del filtro

Le proteine ricombinanti prodotte dai fagi ricombinanti rimangono attaccate al filtro di nitrocellulosa

Il filtro è inoculato con un anticorpo primario prodotto contro la proteina codificata del gene d'interesse. Il complesso antigene-anticorpo formatosi in corrispondenza di specifiche placche di lisi è a sua volta riconosciuto da un anticorpo radioattivo secondario  $^{125}\text{I}$  che si lega all'anticorpo primario

I complessi antigene-anticorpo radioattivi danno origine a macchie scure se il filtro è esposto su una lastra per raggi X. I segnali ottenuti permettono di identificare le placche originarie che producono la proteina di fusione d'interesse

**E se non riusciamo  
ad esprimere la nostra proteina.....**

## **CELL-FREE EXPRESSION SYSTEMS**

*In vitro* transcription + *in vitro* translation

Lisato reticolociti coniglio

Lisato Germe Grano (Wheat Germ)

Lisato *E. coli*

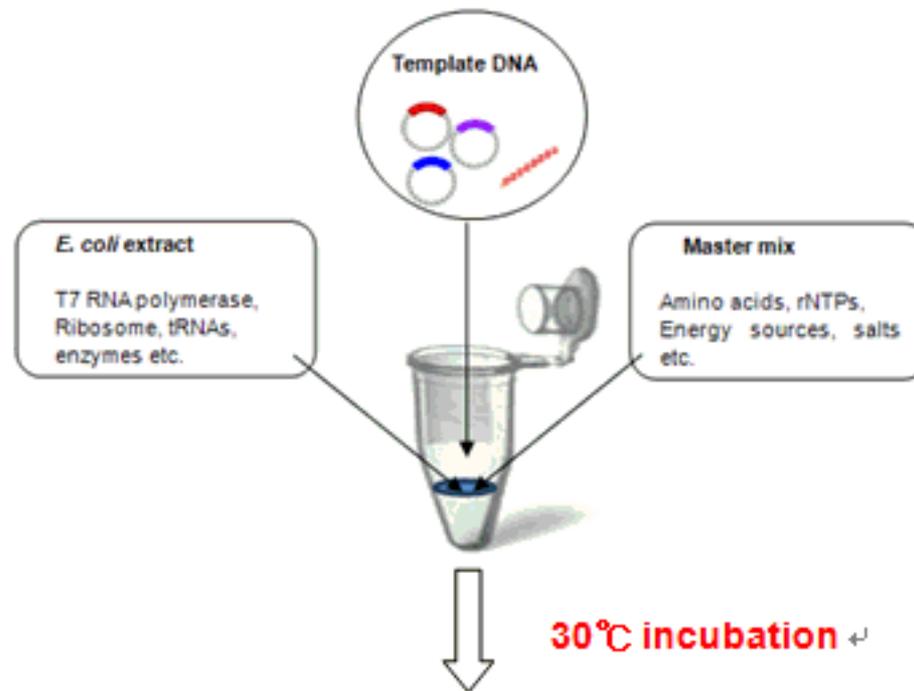
+ ATP

tRNAs

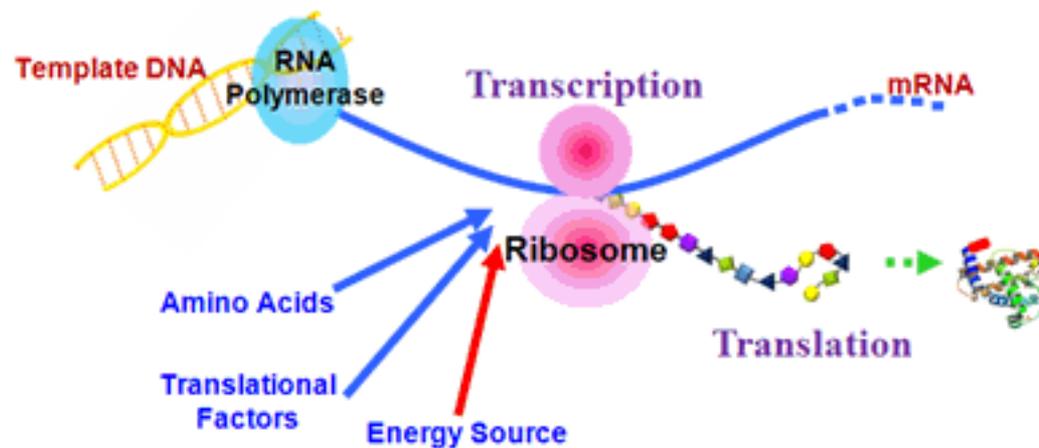
amino acidi (marcati),

Linearized Vector

## Step I: Prepare of Reaction Mixture ↵

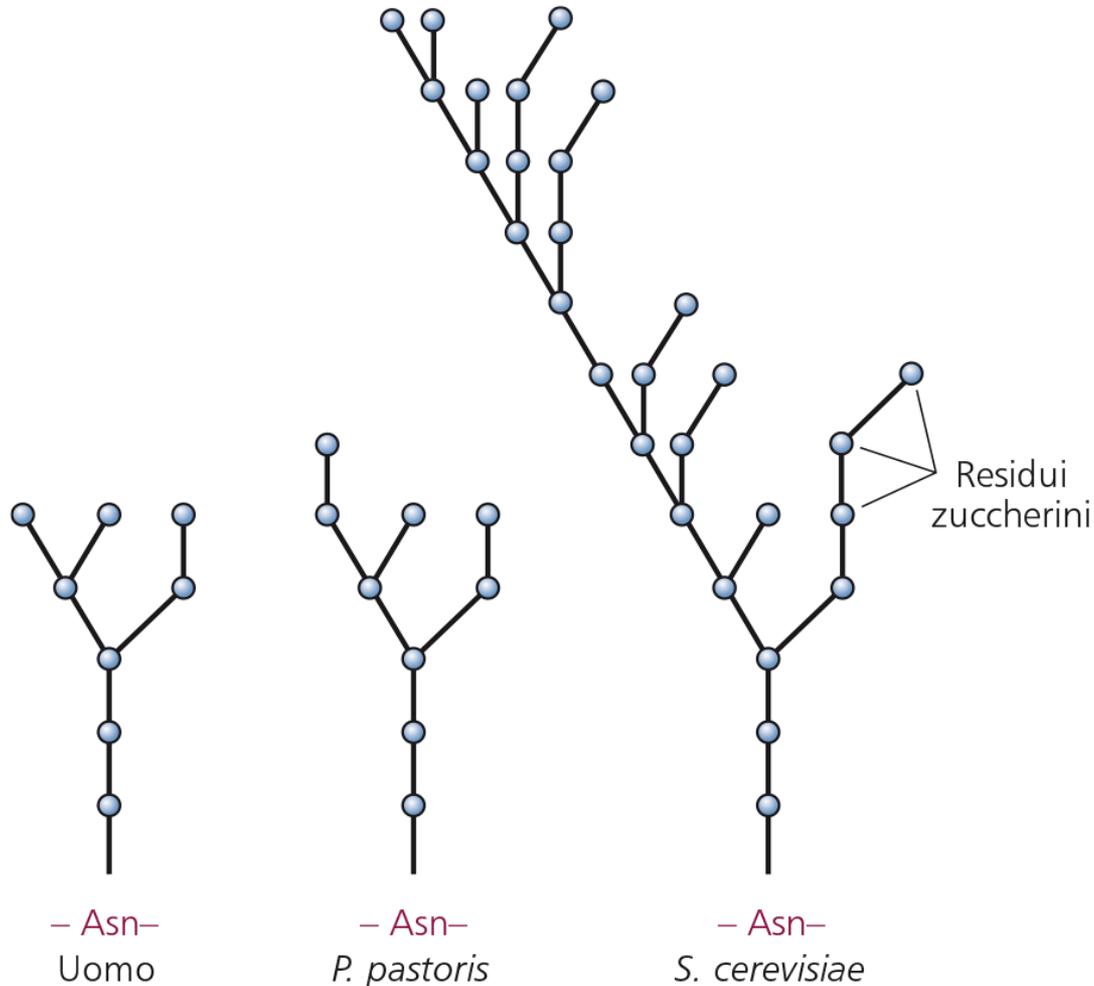


## Step II: Protein Expression (in reaction tube) ↵



Spesso le proteine eucariotiche sono sottoposte a modificazioni post-traduzionali (glicosilazione), necessarie per la funzionalità.  
La glicosilazione è estremamente rara nei batteri, quindi....

## Espressione in eucarioti



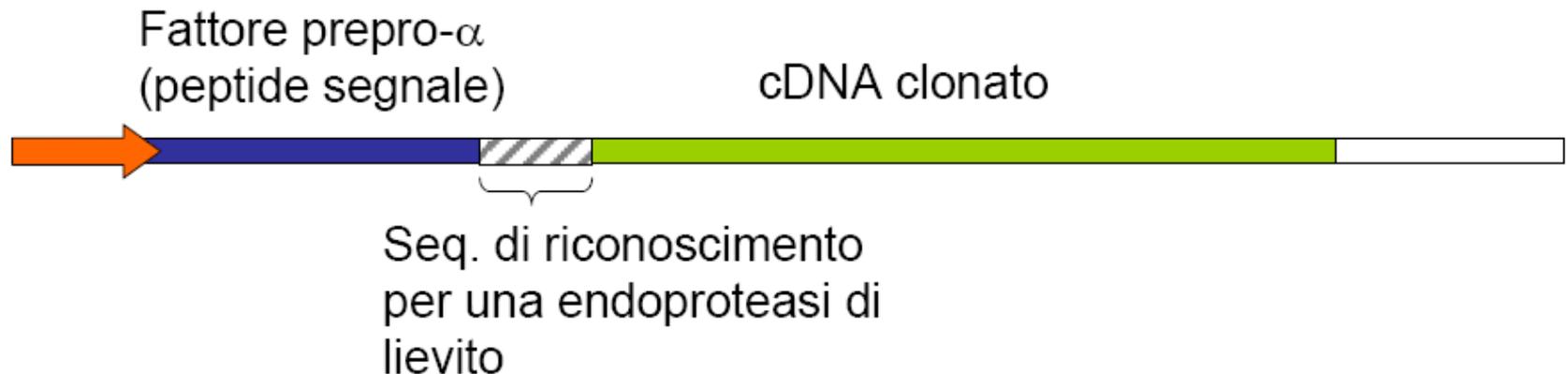
# Espressione in *Saccharomyces cerevisiae*

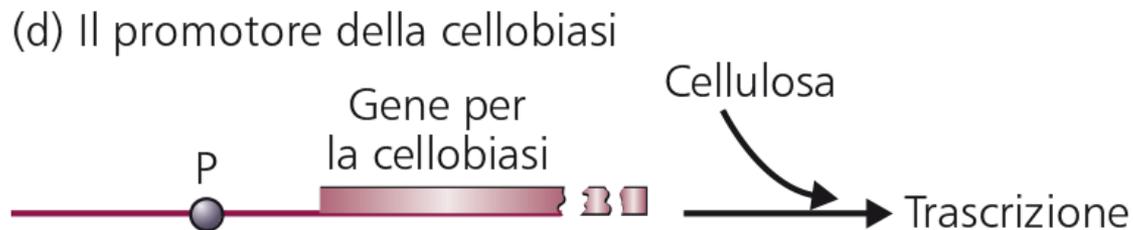
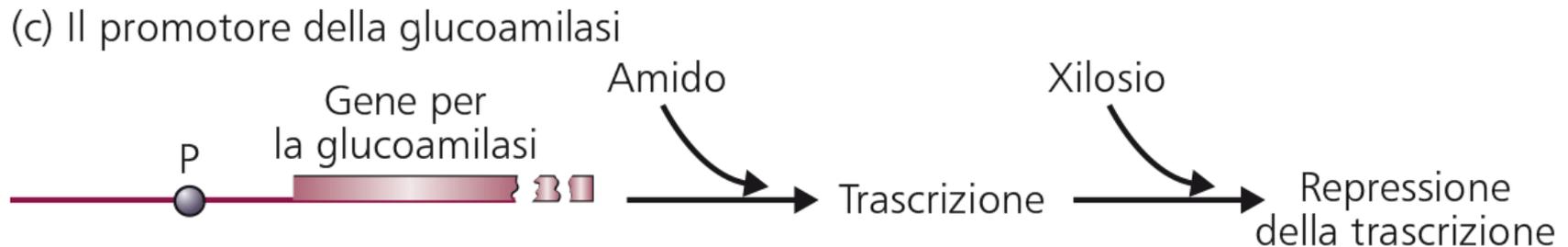
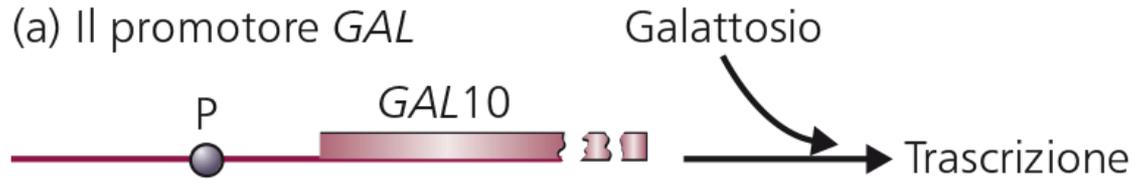
## Pro

- Produzione grandi quantità di proteina
- Disponibilità di diversi promotori inducibili (GAL, PHO5, CUP1)
- Organismo “sicuro” anche per la produzione di proteine utilizzate per principi farmaceutici

## Contro

- Iperglicosilazione
- Privo di sistema efficiente di secrezione
- Bias nell'utilizzo dei codoni





Utilizzato nei vettori per *P. pastoris*, che ha apparato di glicosilazione simile a quello delle cellule animali. Le proteine prodotte in *Pichia* difficilmente inducono risposta immunitaria

*Aspergillus nidulans* (promotore della glucoamilasi) e *Trichoderma reesei* (promotore della cellobiasi) hanno buona attività di glicosilazione e capacità di secernere le proteine.

# Controllo dell' espressione di proteine in eucarioti

## Sistema Tet-on/Tet-off

Sistema che deriva da Operone Tet di E.Coli

(in presenza di tetraciclina, si attivano geni per la resistenza alla Tc)

Sistema a 3 elementi: **Tet-Repressor**: Repressore, **Tc/Dox**: Tetraciclina,

**TRE**: Elemento cis di risposta alla Tet (dominio tetO)

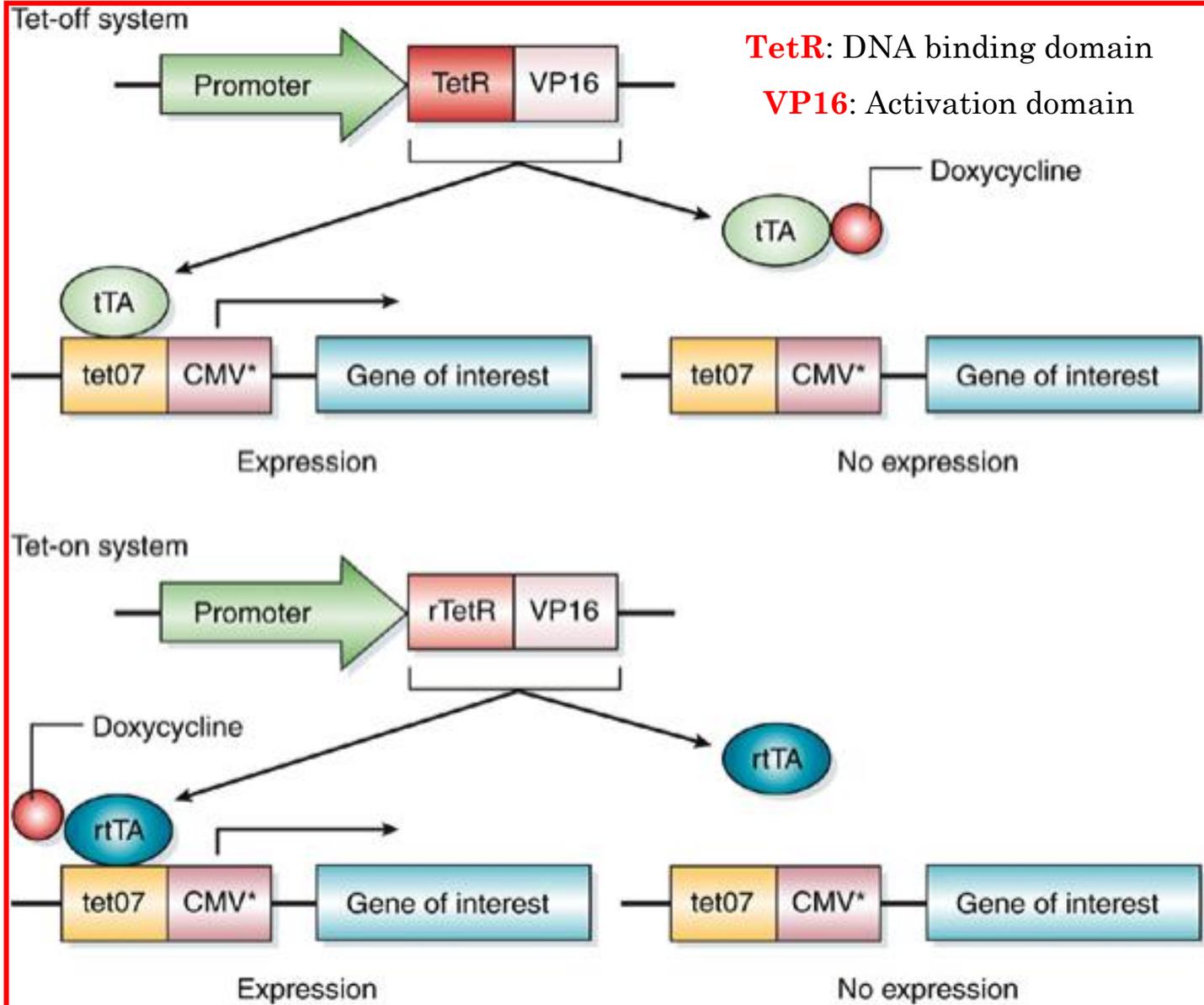
### Tetracycline/Doxycycline-regulated gene expression

#### Tet-off: la tetraciclina spegne

The chimeric tetracycline transactivator protein (**tTA**) consists of the TetR domain that recognizes tetO, fused to the VP16 transactivating domain of herpes simplex virus. tTA binds to seven tetO domains (tetO7) connected to a minimally active CMV promoter (CMV\*), **resulting in gene activation**. Dox binds tTA and prevents gene activation.

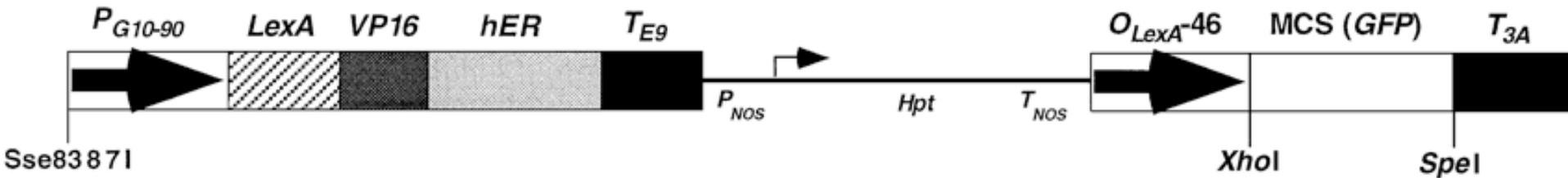
#### Tet-on: la tetraciclina accende

TetR is mutated to rTetR, which must have doxycycline present in order to bind to tetO7 and activate gene expression.



# Controllo dell' espressione di proteine in eucarioti

## Sistema a 2 componenti dell' human Estrogen Receptor (hER)



Il sistema XVE consiste di tre unità trascrizionali:

1. promotore sintetico costitutivo  $P_{G10-90}$  che controlla l'espressione della proteina chimerica (LexA BD-VP16-hER)
2. promotore costitutivo::Hpt (Hygromicina resistenza)
3. otto copie dell'operatore di LexA ( $O_{LexA}$ ) e un MCS per il gene target

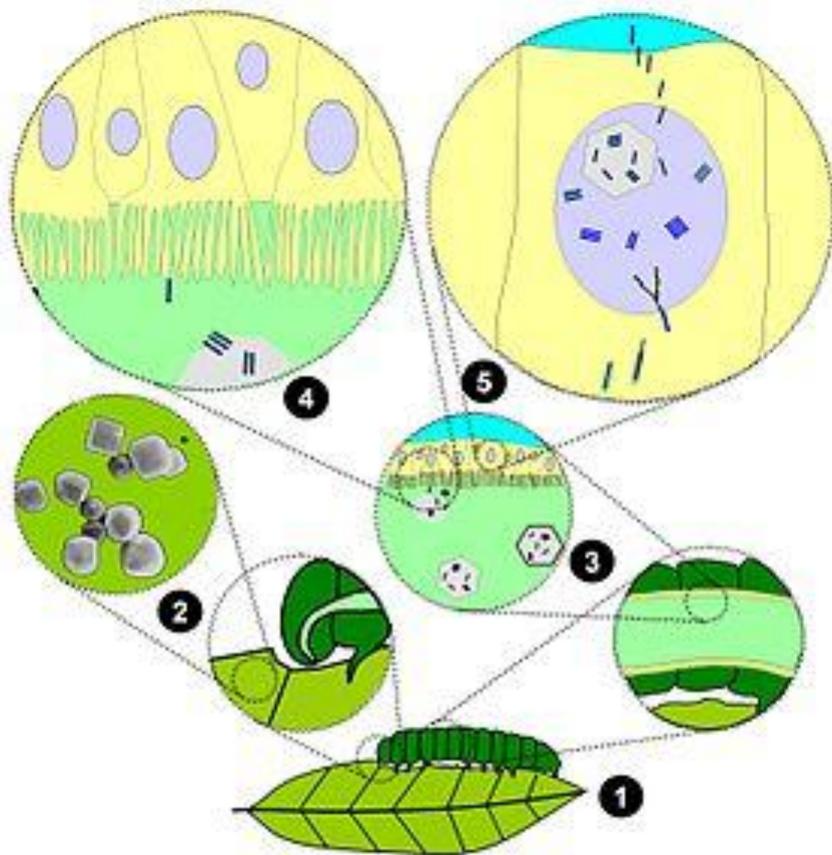
La proteina chimerica è prodotta in modo costitutivo, ma rimane sequestrata nel citoplasma in assenza dell'induttore.

In presenza di  $\beta$ -estradiolo migra nel nucleo e attiva la trascrizione del gene d'interesse, in modo proporzionale alla dose di  $\beta$ -estradiolo

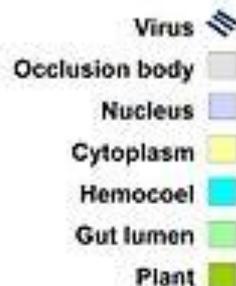
Clonando il gene d'interesse nel MCS è possibile attivarne la trascrizione e controllarne il livello variando la concentrazione di  $\beta$ -estradiolo nel mezzo di coltura.

# Baculovirus in natura

Famiglia di **virus dsDNA infettanti artropodi** molto utilizzati in ricerca, grazie alla elevata specificità



- 1 Insect feeding on virus-contaminated foliage
- 2 Close up of occlusion bodies (OBs)
- 3 Lumen of digestive tract (alkaline conditions)
- 4 Virus particles being released from OBs and attaching to brush border of gut cells
- 5 Replication of virus in insect cell



1. l'artropode si nutre di un substrato infetto, ad es. una foglia con associati i corpi di occlusione (OB), che permettono la conservazione del capside e del suo contenuto in un ambiente esterno. Gli OB sono formati da poliedrina, proteina degradata solo all'interno del tubo digerente dell'artropode, garantendo le massime chance di sopravvivenza al virus.

2. Il virus comincia a infettare le cellule.

3. Il virus, all'interno della cellula, trascrive il suo DNA circolare, il quale verrà poi tradotto dalla cellula ospite e darà inizio, successivamente, alla sintesi degli enzimi virali e alla riproduzione del virus.

4. Sono prodotte quindi altre unità per la propagazione nell'ospite.

5. Replicazione del virus nella cellula dell'insetto

Le cellule di insetti offrono alti livelli di espressione proteica con modifiche post-traduzionali simili alle cellule di mammifero, facile scale-up e crescita in liquido ad alta densità per l'espressione su larga scala. I sistemi di espressione del baculovirus sono sistemi potenti e versatili per produrre alti livelli di espressione di proteine ricombinanti nelle cellule di insetti.

# Baculovirus

## Multicapsid nucleopolyhedrovirus

Budded Virus

Occluded Virus

Occlusion Body

