

DNA expression vectors

Producing high levels of proteins from cloned cDNAs

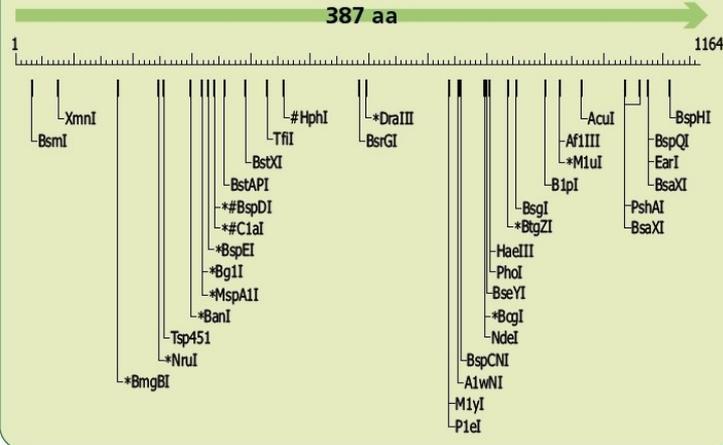
- Many proteins are normally expressed at very low concentrations within cells, which makes isolation of sufficient amounts for analysis difficult
- To overcome this problem, DNA expression vectors can be used to produce large amounts of full length proteins

Sito di clonaggio multiplo del vettore d'espressione

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

ATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCA

Analisi di restrizione della sequenza del gene



Sequenza del gene

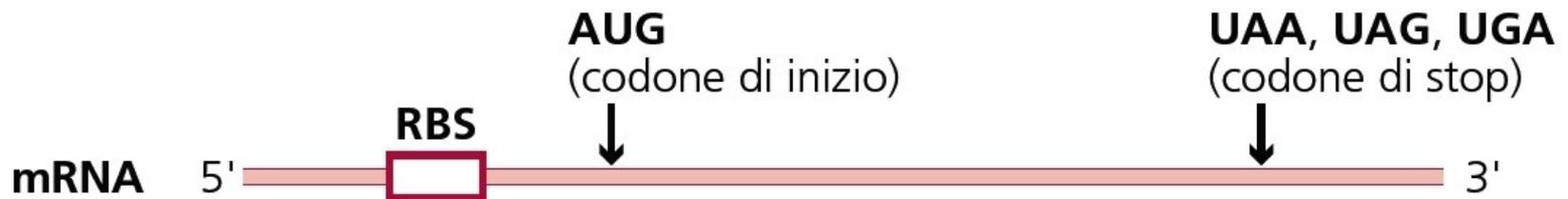
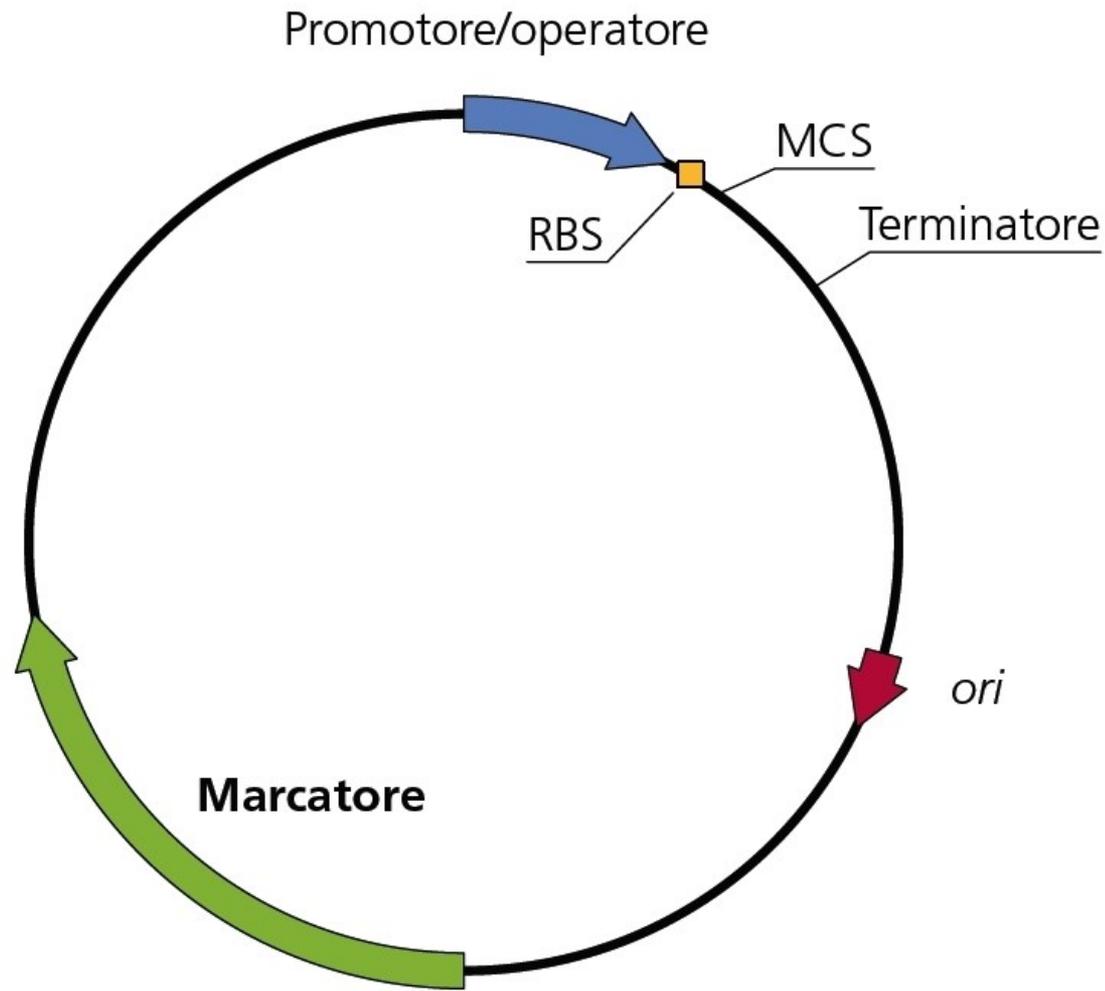
>gi|49175990:31533773154540 *Escherichia coli* str. K12 substr. MG1655 chromosome, complete genome
ATGAACAACCTTAAATCTGCACACCCCAACCCGCATTTCTGTTTGGTAAAGCGCAATCGTGGTTTACGG
AACAAATTCCTCACGATGCTCGCGTATTGATTACCTACGGCGCGCGCAGCGTGAAAAAACCGCGTTCT
CGATCAAGTTCGGATGCCCTGAAAGGCATGGACGTGCTGGAATTTGGCGGTATTGAGCCAAACCCGGCT
TATGAAACCGTGTGAACGCGGTGAAACTGGTTCGCGAACAGAAAGTACTTCTCGTGGCGGTTGGCG
GCGGTCTGTACTGGACGGCACCATAATTTATCGCGCAGCGGCTAACTATCCGGAAAAATATCGATCCGTG
GCACATTCGCAACCGGGCGTAAAGAGATTAAGAGCCCATCCCGATGGCTGTGTGCTGACGCTGCCA
GCAACCGGTTCCAGAAATCCAACGACGCGCGGTGATCTCCCGTAAAACACAGCGCAGCAAGCAGCGTTCC
ATTCGCCCATGTTTCAGCCGGTATTGCGGTGCTCGATCCGGTTTATACCTACACCCCTGCCGCCGCTCA
GGTGGCTAACGGCGTAGTGGACGCCCTTGTACACACCGTGAACAGTATGTTACCAACCCGTTGATGCC
AAAAATCAGGACCGTTTCGAGAAGGCATTTGCTGACGCTAATCGAAGATGGTCCGAAAGCCCTGAAAG
AGCCAGAAAACTACGATGTGCGGCCAACGTCATGTGGCGCGCACTCAGGCGCTGAACCGTTTGTATTGG
CGTGGCGTACCAGGACTGGGCAACGCATATGCTGGGCCACGAACTGACTGCGATGCACGGTCTGGAT
CAGCGCAAACTGGCTATCGTCCCTGCCTGCACTGTGGAATGAAAAACGCGATACCAAGCGCGTAAAGC
TGCTGCAATATGCTGAACGCGTCTGGAACATCACTGAAGTTCCGATGATGAGCGTATGACGCGCGGAT
TGCCGCAACCCGAAATTTCTTGGCAATTAGGCGTGGCAGCCACCTCTCCGACTACGGTCTGGACGGC
AGCTCCATCCCGGCTTTGCTGAAAAACTGGAAGACGCGCATGACCAACTGGGCGAAAAATCATGACA
TTACGTTGGATGTGAGCCCGGTATATACGAAGCCCGCCGCTAA

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 Eco0109I 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

Forward 5' CAGGGATCCATGAACAACCTTAAATCTGCAC3'
Reverse 5' CAGAAGCTTTTAGCGGGCGGCTTCGTATATAC3'



Promotori Espressione

- Promotore Lac
- Promotore ara_{BAD}
- Promotore trp
- Promotore tac (ibrido Lac-trp)
- Promotore T7
- Promotore P_L del fago λ

E. coli expression systems can produce full-length proteins

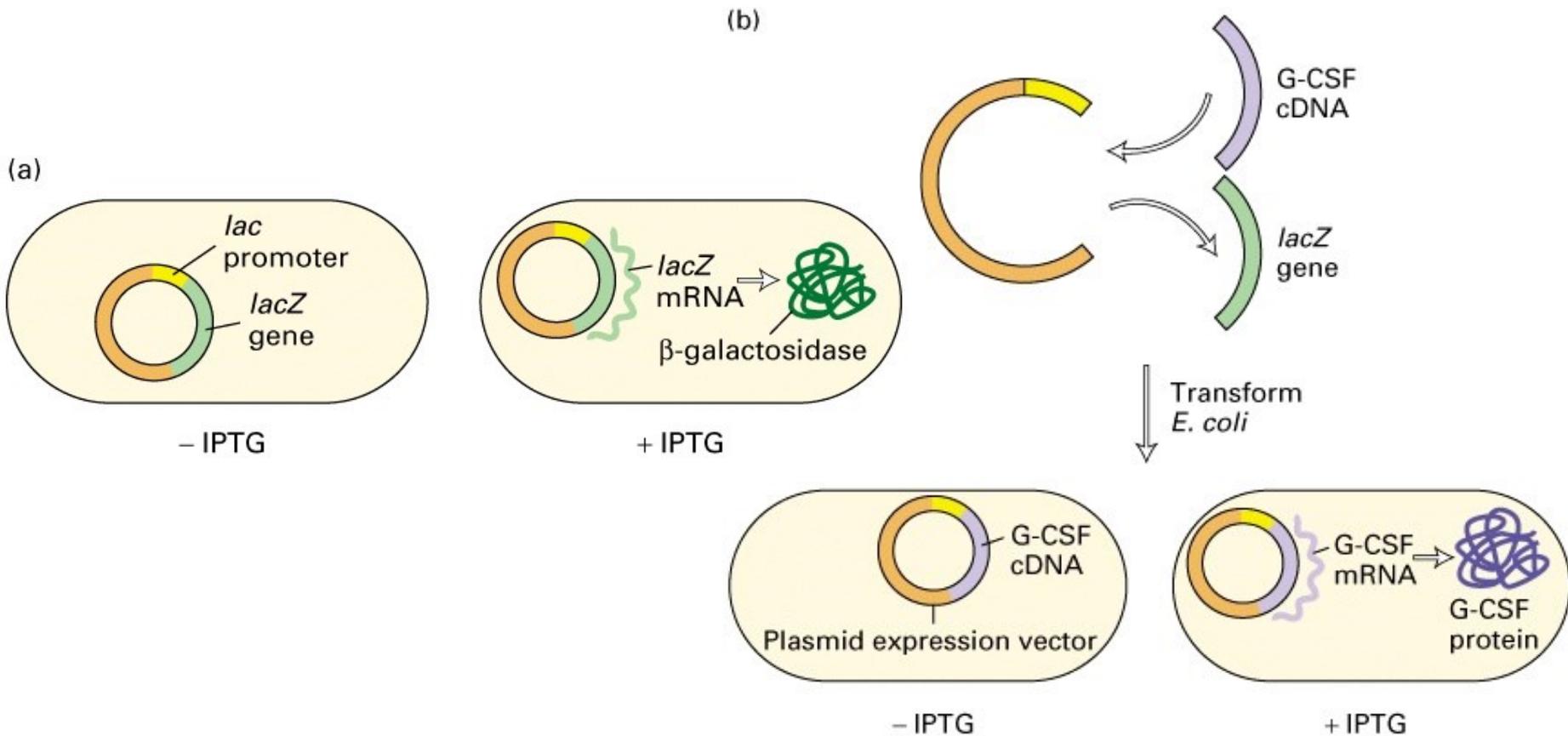


Figure 7-36

Promotori Espressione

Promotore Lac

- Basato sull'operone Lac
- Induzione con IPTG (isopropil- β -tio-D-galattoside)
- Espressione basale elevata; uso di alleli di LacI con una produzione di repressore più elevata, o LacI sul vettore di espressione
- Promotore non molto forte

Lac repressor, *lac* operon, IPTG

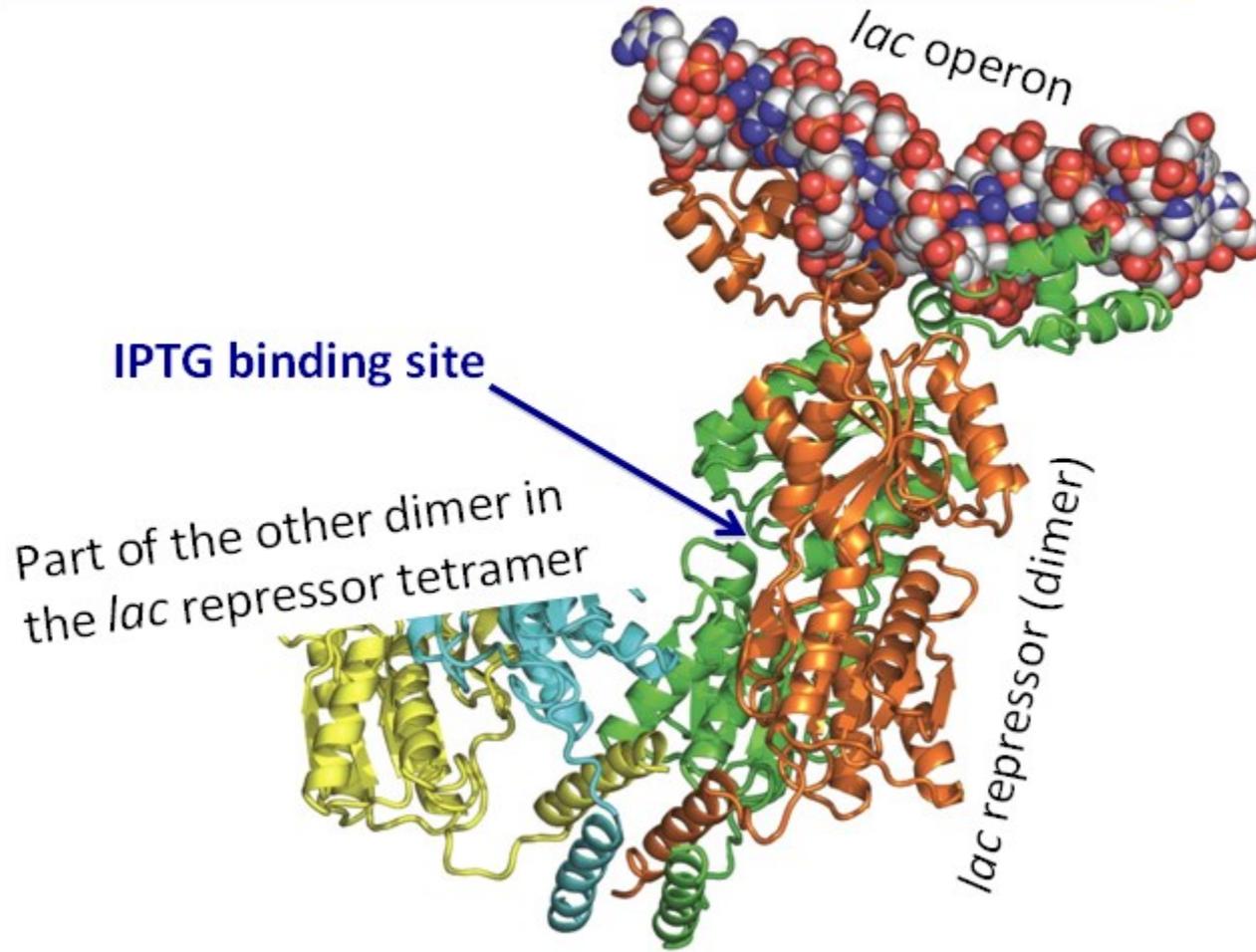


Figure 31-40a
© John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Promotori Espressione

Promotore ara_{BAD}

- Attivato da arabinosio
- Gene controllato dal repressore AraC
- Utilizzato quando non è utilizzabile IPTG

Es. proteine ad uso terapeutico

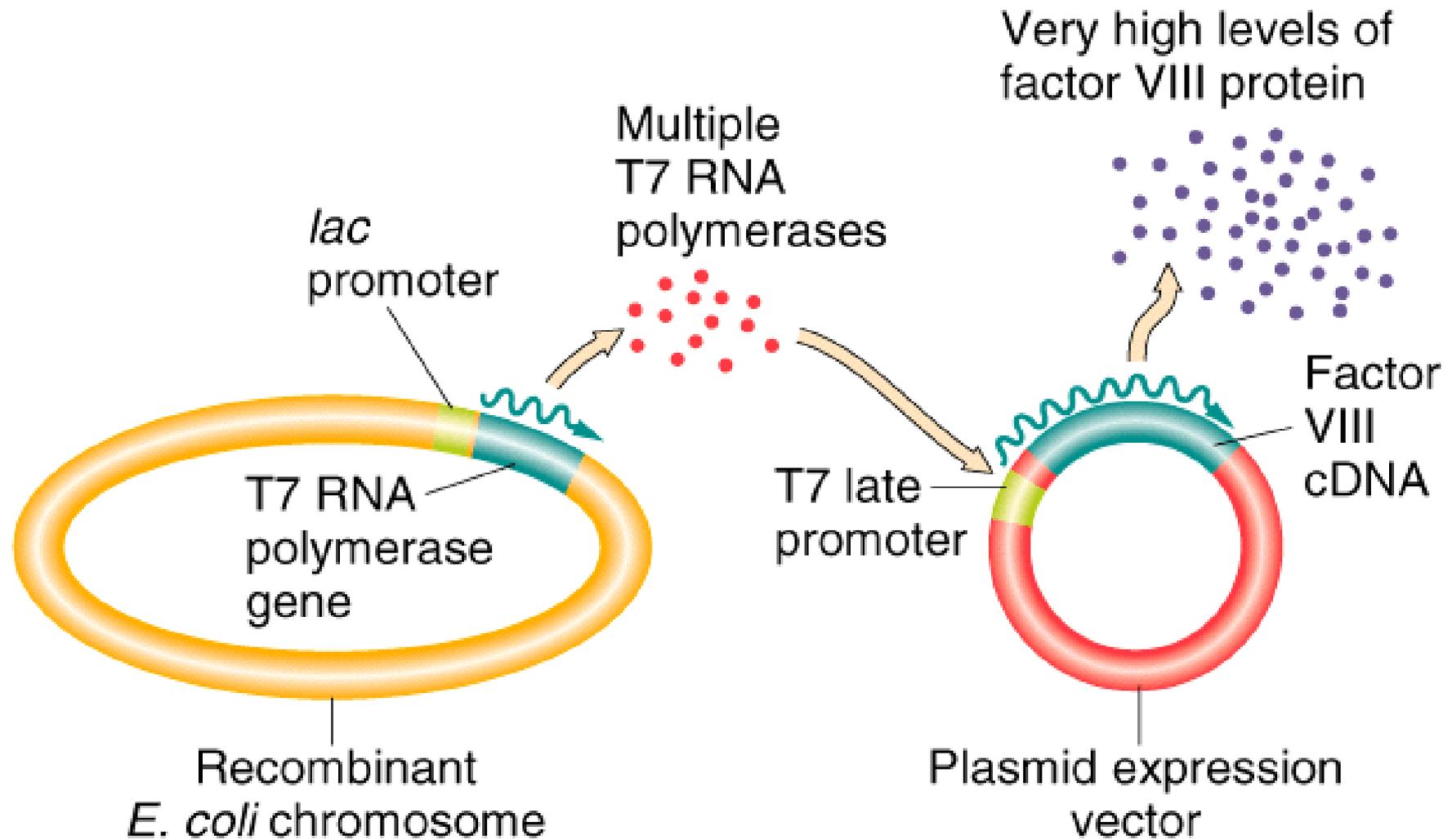
Promotori Espressione

Promotore T7

- Trascrizione costitutiva
- Polimerasi del Fago T7
- Gene della Polimerasi T7 integrato nel ceppo ospite sotto il controllo di Lac

Two-step expression vector

- Chromosomal lac inducible T7 RNA pol
 - T7 RNA pol initiates expression of plasmid



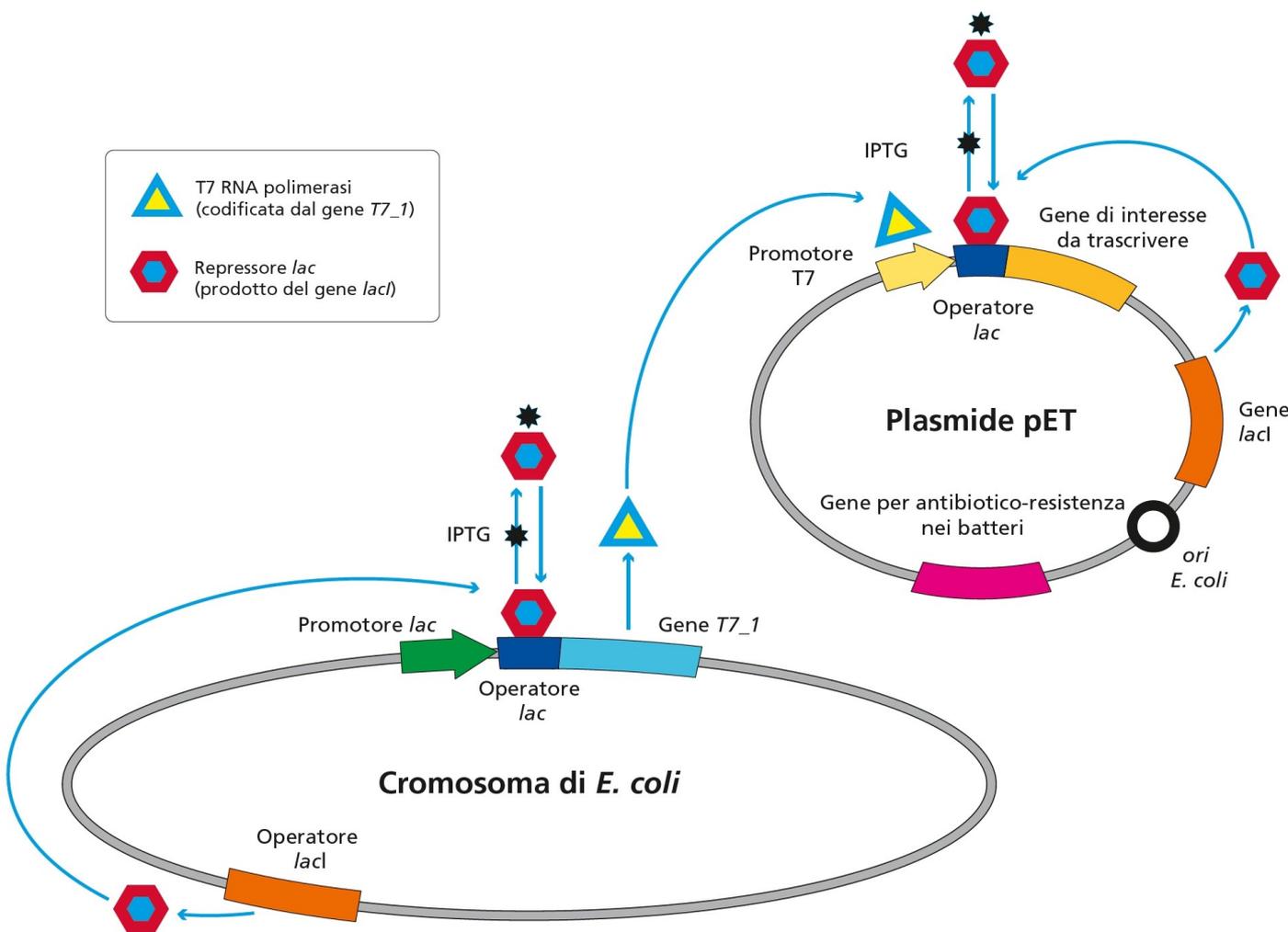


Figura 15.1
 Vettori di espressione pET per l'espressione di proteine in *Escherichia coli*. Per l'espressione di proteine ricombinanti attraverso il vettore di espressione pET è richiesto l'utilizzo di un ceppo batterico, nel cui genoma sia integrata la sequenza del gene che codifica per l'RNA polimerasi T7 del fago T7. I promotori sia del gene d'interesse, clonato nel plasmide pET, sia della RNA polimerasi T7 contengono la sequenza dell'operatore *lac* (*lacO*); tale sequenza è soggetta alla regolazione negativa della proteina repressore prodotta dal gene *lacI*. Di conseguenza, i promotori sono indotti dall'aggiunta di IPTG nel mezzo di coltura, capace di staccare il repressore dalla sequenza *lacO*. L'RNA polimerasi T7 prodotta potrà riconoscere il promotore T7 posto sul vettore pET e attivare la trascrizione del gene d'interesse.

Promotori Espressione

Promotore trp

- Trascrizione regolata da trp
- In presenza di trp → gene represso
- Induzione **con assenza di trp** nel terreno di coltura

Promotori Espressione

Promotore λP_L

- Repressore cI di λ \rightarrow off espressione
 - Ceppi batterici con gene cI sotto il controllo del trp \rightarrow gene represso
 - Induzione **in presenza di trp** nel terreno di coltura

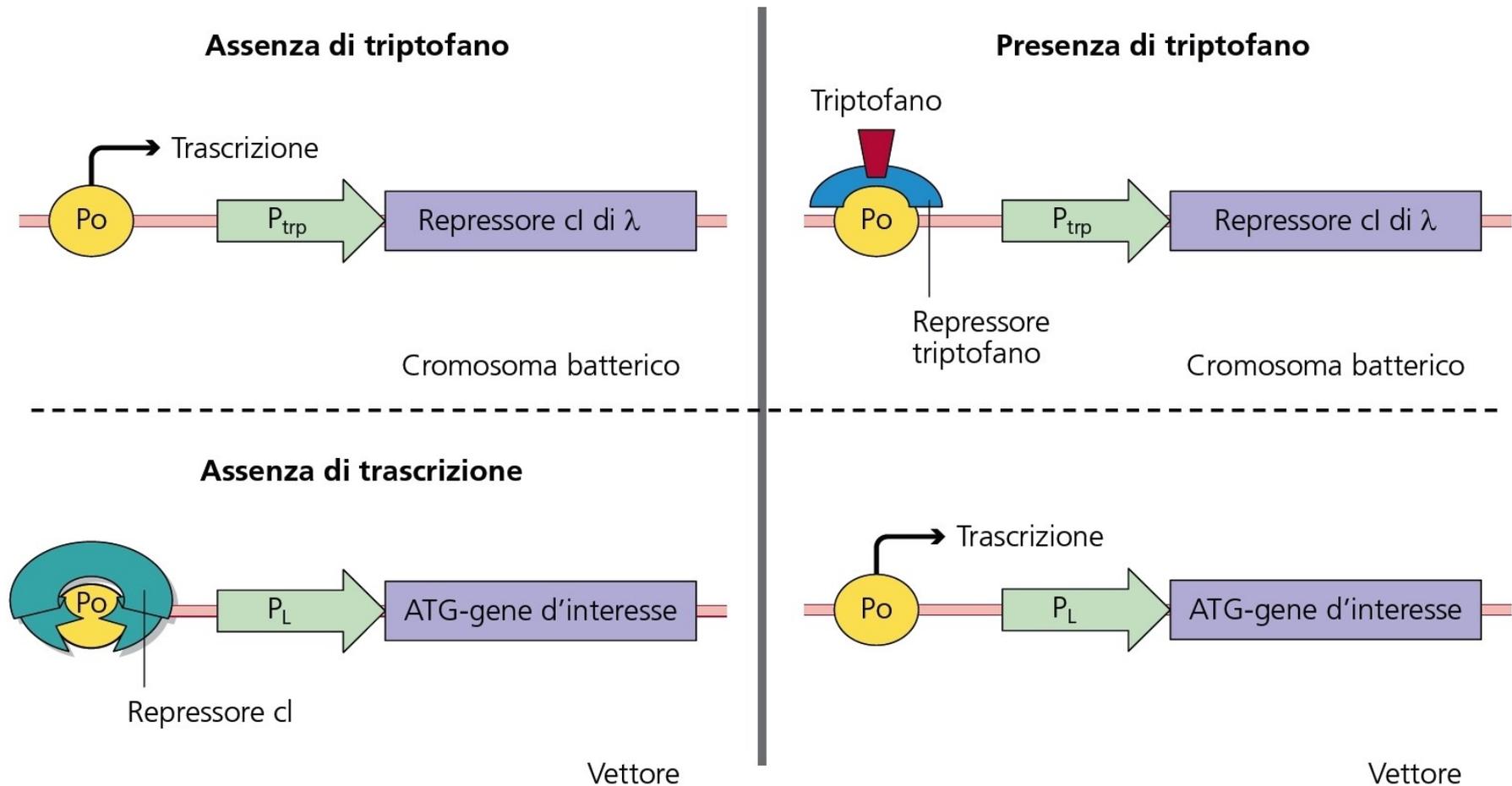


Figura 4.2

Rappresentazione del sistema di regolazione dell'espressione con il promotore λ P_L e il repressore cI. Il gene del repressore cI è integrato nel cromosoma batterico sotto il controllo del promotore *trp*: in assenza di triptofano, il repressore cI è espresso e blocca

la trascrizione del gene di interesse (controllato dal promotore P_L). In presenza di triptofano, invece, il repressore cI non è espresso e quindi in questo caso può avvenire la trascrizione del gene di interesse. Po: regione operatore.

Promotori Espressione

Promotore λP_L

- Repressore cI di λ → off espressione
- Ceppi batterici con gene cI termosensibile
 - gene cI **espresso a** (28-30°C)
 - gene cI **represso a** (37-42°C)
- **Induzione a** (37-42°C)

Tabella 3.1 Espressione di proteine ricombinanti in batteri.

Vantaggi	Svantaggi
Alta efficienza di trasformazione	Assenza di modificazioni post-traduzionali eucariotiche
Caratteristiche genetiche note	Produzione delle proteine in forma di aggregati (refolding necessario)
Crescite rapide e poco costose	Scarso controllo della formazione dei ponti disolfuro
Recupero delle biomasse e lisi relativamente facile	Degradazione proteolitica
Scalabilità a condizioni fermentative dei processi di crescita	Difficoltà alla produzione in forma secretoria
Elevato numero di plasmidi di espressione disponibili	

Problemi di basse rese di proteina ricombinante solubile

- Problemi nel folding
 - Non corretta struttura 3D
 - Assenza di cofattori
 - Assenza modificazioni post-traduzionali
- Problemi overespressione o crescita cells
 - Degradazione proteolitica
 - Tossicità della proteina

OTTIMIZZAZIONE STABILITA'

- Utilizzo di codoni alternativi
 - organismi diversi possono utilizzare preferenzialmente codoni sinonimi per stesso AA
 - Considerare la % di utilizzazione media dei codoni sinonimi
 - possibile aumentare i livelli di espressione modificando i codoni del gene di interesse senza alterarne il prodotto di espressione.

OTTIMIZZAZIONE STABILITA'

Differenza nell'uso dei codoni tra Procarioti ed Eucarioti

Può avere un impatto nella produzione delle proteine eterologhe in *E.coli*

ESEMPIO:

Codoni comuni in eucarioti per Arg (AGA e AGG) sono codoni rari in *E.coli*

Possibili risoluzioni:

Mutare i codoni con CGC preferito da *E.coli*

Oppure

Co-esprimere in gene per il tRNA^{Arg}(AGA/AGG)

Tabella 3.2 Caratteristiche di alcuni ceppi di *E. coli* utilizzati per l'espressione di proteine ricombinanti.

Ceppo <i>E. coli</i>	Caratteristiche
BL21 (DE3)	Esprime la RNA polimerasi del fago T7 a seguito di induzione con IPTG. È difettivo delle proteasi <i>lon</i> e <i>ompT</i> .
BL21 (DE3)-plysS	Come le BL21 (DE3) esprime la T7 RNA polimerasi. Esprime dal plasmide <i>plysS</i> il lisozima T7. Adatto per l'espressione di proteine tossiche.
Origami	Ha mutazioni sui geni <i>trxB</i> e <i>gor</i> . Facilita la formazione dei ponti disolfuro citoplasmatici.
Origami-plysS	Come il precedente, con l'aggiunta del sistema <i>plysS</i> per il controllo trascrizionale.
Rosetta	Sovraesprime i tRNA per i codoni rari. Facilita l'espressione di proteine eucariotiche.
Rosetta-gami-plysS	Come il precedente con l'aggiunta del sistema <i>plysS</i> per il controllo trascrizionale.
BL21-codon plus	Sovraesprime i geni dei tRNA più rari per arginina (AGA/AGG), isoleucina (AUA) e leucina (CUA).
C41 e C43 (DE3)	Adatti per l'espressione di proteine tossiche di ogni origine.

Principali Mutazioni di Geni in ceppi di Laboratorio di E.coli

Gene	Descrizione della mutazione	Conseguenza funzionale
<i>ara</i>	Alterazione del metabolismo dell'arabinosio	Incapacità di utilizzare l'arabinosio come fonte di carbonio
<i>dam</i>	Mutazione della DNA adenina metilasi (GATC)	Preparazione di DNA non metilato, importante se si vuole digerire con enzimi di restrizione che sono sensibili alla metilazione (per esempio <i>Clal</i> o <i>XbaI</i>)
<i>dcm</i>	Mutazione della DNA citosina metilasi (CCWGG)	Preparazione di DNA non metilato, importante se si vuole digerire con enzimi di restrizione che sono sensibili alla metilazione (per esempio <i>Clal</i> o <i>XbaI</i>)
<i>deoR</i>	Mutazione del repressore <i>deo</i> ^R che controlla il metabolismo dei deossiribonucleotidi	Permette l'assorbimento di plasmidi di grandi dimensioni
<i>endA, endA1</i>	Mutazione della endonucleasi I (taglio non specifico di dsDNA)	Aumenta la resa di plasmide
<i>F</i>	L'ospite avrà (F ⁺) o non avrà (F ⁻) il plasmide F	Presenza o meno di un piccolo plasmide che codifica per i fattori di coniugazione
<i>gal</i>	Alterazione del metabolismo del galattosio	Incapacità di utilizzare il galattosio come fonte di carbonio
<i>gyrA, gyrA96</i>	Mutazione della DNA girasi	Resistenza all'acido nalidissico (un antibiotico)
<i>hsdRMS</i>	<i>hsdR</i> (rk ⁻ , mk ⁺)	Il DNA non metilato non è degradato, le cellule possono ancora metilare il DNA
	<i>hsdS</i> (rk ⁻ , mk ⁻)	Il DNA non metilato non è degradato, le cellule non possono metilare il DNA

Principali Mutazioni di Geni in ceppi di Laboratorio di E.coli

Gene	Descrizione della mutazione	Conseguenza funzionale
<i>lac</i>	<i>lacIq</i>	Sovraespressione del repressore <i>lacI</i> con conseguente maggiore inibizione del promotore <i>pLac</i>
	<i>lacZ</i>	Inattivazione della β -galattosidasi, screening blu/bianco
	<i>lacY</i>	Inattivazione della lattosio permeasi, le cellule non possono assorbire lattosio
<i>leuB</i>	Inattivazione della β -isopropil malato deidrogenasi	Necessaria leucina esogena per la crescita
<i>mcrA, mcrBC</i>	Inattivazione della via che porta al taglio del DNA metilato su citosina	Permette l'assorbimento di DNA estraneo metilato
<i>mrr, $\Delta(mcrC-mrr)$</i>	Inattivazione della via che porta al taglio del DNA metilato su adenina o citosina	Permette l'assorbimento di DNA estraneo metilato
<i>proAB</i>	Alterazione della via di biosintesi della prolina	Necessaria prolina esogena per la crescita
<i>recA, recA1, recA13</i>	Mutazione di una ATPasi DNA-dipendente che è essenziale per la ricombinazione e la riparazione del DNA	Riduce la ricombinazione nei plasmidi e ne aumenta la stabilità
<i>recBCD</i>	Mutazione della esonucleasi V	Riduce la ricombinazione nei plasmidi e ne aumenta la stabilità
<i>relA, relA1</i>	Fenotipo rilassato	Permette la sintesi di RNA in assenza di sintesi proteica
<i>rpsL</i>	Mutazioni della subunità S12 del ribosoma 30S	Resistenza alla streptomicina
<i>supE44 (glnV44)</i>	Mutazione su un tRNA	Soppressione dello stop codon <i>amber</i> (UAG) per inserzione di glutammina e minore terminazione della traduzione

Principali Mutazioni di Geni in ceppi di Laboratorio di E.coli

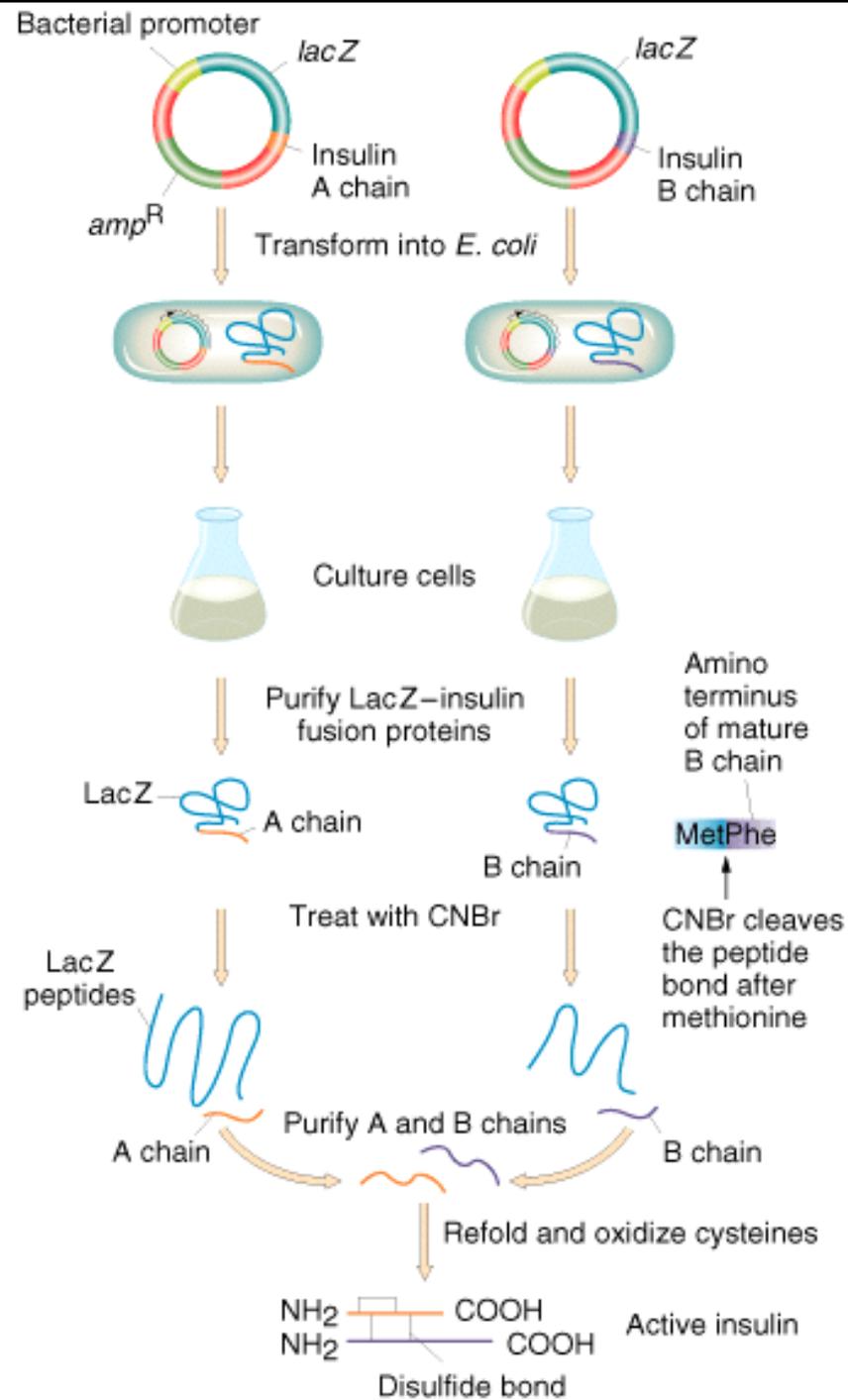
Gene	Descrizione della mutazione	Conseguenza funzionale
<i>supF (tyrT)</i>	Mutazione su un tRNA	Soppressione dello stop codon <i>amber</i> (UAG) per inserzione di tirosina e minore terminazione della traduzione
λ - <i>thi-1</i> , <i>thi1</i>	Alterazione del metabolismo della tiamina	Necessaria tiamina esogena per la crescita
<i>Tn10</i>	Elemento trasponibile che porta il gene <i>tet^R</i>	Resistenza alla tetraciclina

Tabella 3.3**Genotipi di ceppi di laboratorio di *E. coli* per il mantenimento di plasmidi.**

Ceppo	Resistenza naturale	Uso	Genotipo
DH5 α		Clonaggio generico e mantenimento dei pi \dot{u} comuni plasmidi, screening blu/bianco	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
HB101	Streptomicina	Ceppo per il clonaggio e il mantenimento di plasmidi	F ⁻ mcrB mrr hsdS20(r _B ⁻ m _B ⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(Sm ^R) glnV44 λ ⁻
TOP10	Streptomicina	Clonaggio generico e mantenimento dei pi \dot{u} comuni plasmidi, screening blu/bianco	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻
XL1 Blue	Tetraciclina	Clonaggio generico e mantenimento dei pi \dot{u} comuni plasmidi, screening blu/bianco; resistenza all'acido nalidissico	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ (lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)
XL10 Gold	Tetraciclina e cloramfenicolo	Alta capacit \grave{a} di competenza per il clonaggio e la propagazione di plasmidi di grandi dimensioni, librerie; resistenza all'acido nalidissico	endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet ^R F'[proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10(Tet ^R Amy Cm ^R)]

Bacterial expression of Insulin

- No human signal sequence
- Add bacterial signal sequence



Proteine di fusione

- Migliorano espressione
- Migliorano solubilità
- Facilitano rilevamento
- Facilitano purificazione

Protein Properties that can be Used as Handles for Purification

Genetically Engineered Purification Handles (RECOMBINANT DNA)

- Alter the **cDNA** in such a way as to add a few extra amino acids on the N-terminus or the C-terminus of the protein being expressed.
- This added “tag” can be used as an effective purification handle. One of the most popular tags is addition of **6-10 histidines onto the N-terminus of a protein** (Hochuli *et al.*, 1988; Ford *et al.*, 1991; Porath, 1992)

Preparing extracts for purification

Recombinant DNA technology is a very useful tool for protein purification

- for 'overproduction' of proteins using expression vectors
- for application of 'tags' to proteins
- for excretion of proteins into the culture medium

Disruption and homogenization of cells, tissue, etc.

- Different techniques: shearing, grinding, sonication, French pressure cell disruption, depending of cell types
- Isolation of organelles; solubilization of membranes
- Excreted proteins

Clearing of extracts

- Cleared extracts should be used for column steps; clearing by centrifugation or filtration; solubilization of membranes

Immobilized metal affinity chromatography

Principle

- Transition metals (Ni, Co, Zn) are attached to column
- Proteins with affinity to metal ions can be bound to the column and subsequently eluted by change of conditions

Not many naturally occurring proteins have affinity for metal ions.

Technique is mainly used to purify recombinant proteins provided with a His-tag.

Resins for IMAC

Application: purification of 'His-tagged' proteins

1. Provide a protein with a 'tag' of 6 histidine residues by mutagenesis of the gene (add codons for 6 consecutive His residues to the gene).

i.e.

... ATC GCG TAG ...

... Ile Ala Stop

... ATC GCG CAC CAT CAC CAT CAC CAT TAG ...

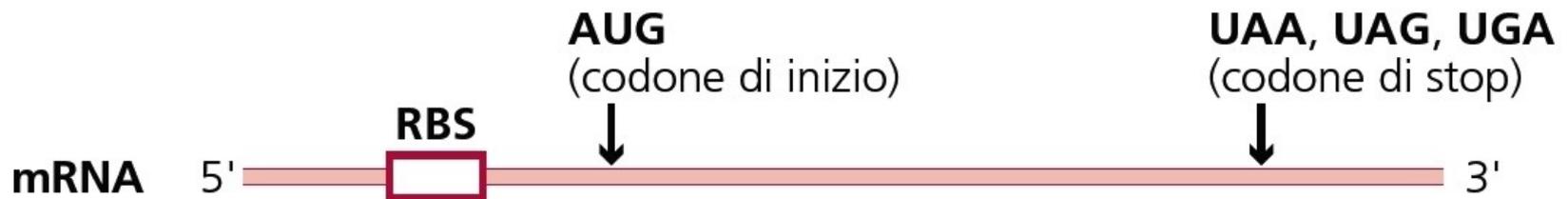
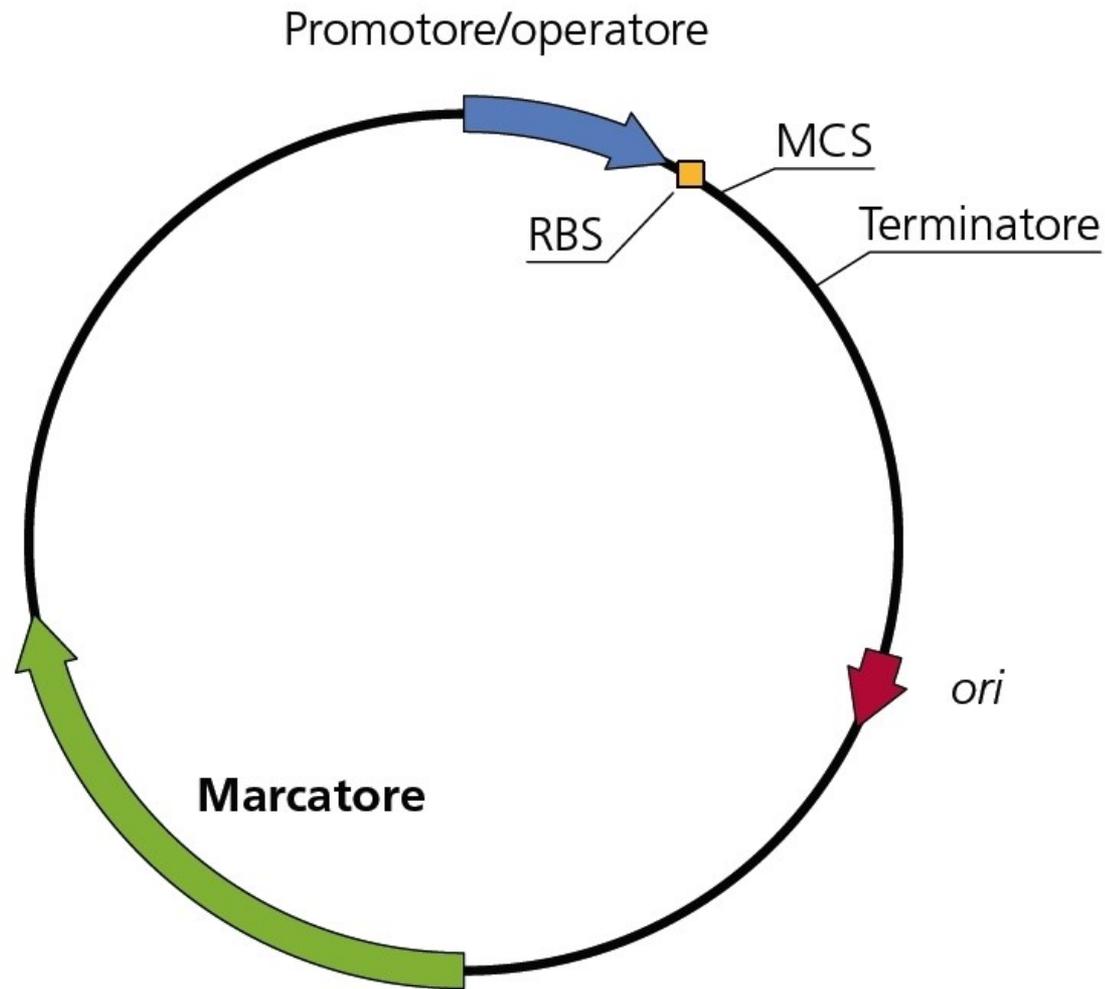
... Ile Ala His His His His His His Stop

2. The His-tag should not interfere with folding or activity of the protein (C-terminal is often the best choice)

3. Produce the protein

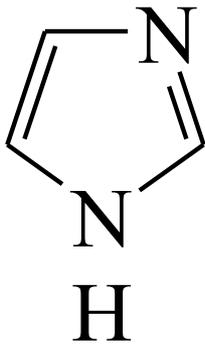
4. Purify the protein in 1 step with IMAC on a nickel column

5. Elute the bound protein with imidazol (specific elution) or with aspecific elution (pH)

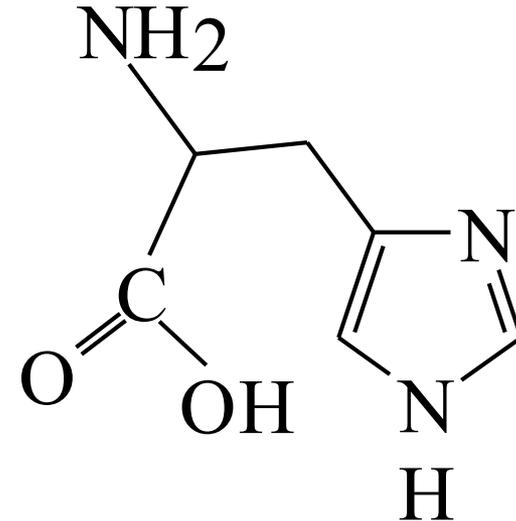


Resins for IMAC

Elute the bound protein
with imidazol (specific elution) or with aspecific elution (pH)



Imidazol



Histidine

Tabella 3.3 Struttura, utilizzo e localizzazione di *tag* peptidici e proteici.

tag peptidici	Struttura	Utilizzo	Localizzazione rispetto alla proteina
His-tag	6-10 residui di istidina	Purificazione tramite cromatografia di affinità su metalli e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
Flag-tag	DYKDDDDK	Purificazione tramite cromatografia di affinità e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
c-myc-tag	EQKLISEEDL	Purificazione tramite cromatografia di affinità e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
HA-tag	YPYDVPDYA	Purificazione tramite cromatografia di affinità e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
tag proteici			
GST	Glutazione S-transferasi (26 kDa)	Purificazione tramite cromatografia di affinità su glutatione e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
MBP	<i>Maltose binding protein</i> (40 kDa)	Purificazione tramite cromatografia di affinità su amilosio e identificazione con anticorpi	N-terminale
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (27 kDa)	Marcatore fluorescente per localizzazione subcellulare	C- o N-terminale

Problemi generali con la produzione di proteine ricombinanti in procarioti

Problemi causati dalle limitazioni del *batterio* come ospite per la sintesi di proteine ricombinanti

- **non «produrre»** proteine con modificazioni post-traduzionali
Questi problemi non si risolvono si ricorre ad sistemi di espressioni eucariotici quali lieviti, funghi, baculovirus.
- **non «foldare»** correttamente la proteina, la quale in genere risulta insolubile e forma i cosiddetti inclusion body all'interno del batterio.
Screening su diversi ceppi di procarioti
- può **«degradare»** la proteina ricombinante perché non la riconosce come propria. Come il riconoscimento avviene non è tuttora noto.
L'utilizzo di ceppi carenti in proteasi

Recombinant DNA Technology- Yeast

- Geneticamente e fisiologicamente ben conosciuto
- Cellule singole facilmente coltivabili
- Esistenza di parecchi promotori forti
- Capacità di effettuare numerose modificazioni post-traduzionali
- Secerne poche proteine autologhe
- Sicurezza (varie proteine prodotte in *S. cerevisiae* sono utilizzate come terapeutici, vaccini o diagnostici)

Recombinant DNA Technology- Yeast

- Vectors
- Transformation
- Gene regulation

NB: Sviluppato dopo la scoperta del

plasmide da $2\mu\text{m}$ (n° copie 70-200)

- Marcatore gene LEU (codifica per β -isopropil malato deidrogenasi)
su ceppi yeast auxotrofi (LEU-/-)

Recombinant DNA Technology- Yeast

1. Vettori episomiali o plasmidici

- Molto diffusi
- Possibile instabilità su larga scala (>10 L)

2. Vettori episomiali (Y episomal Plasmid)

- Alta efficienza trasformante, numero di copie del gene clonato
- limitazione della resa in proteina
- Geni in tandem spesso instabili

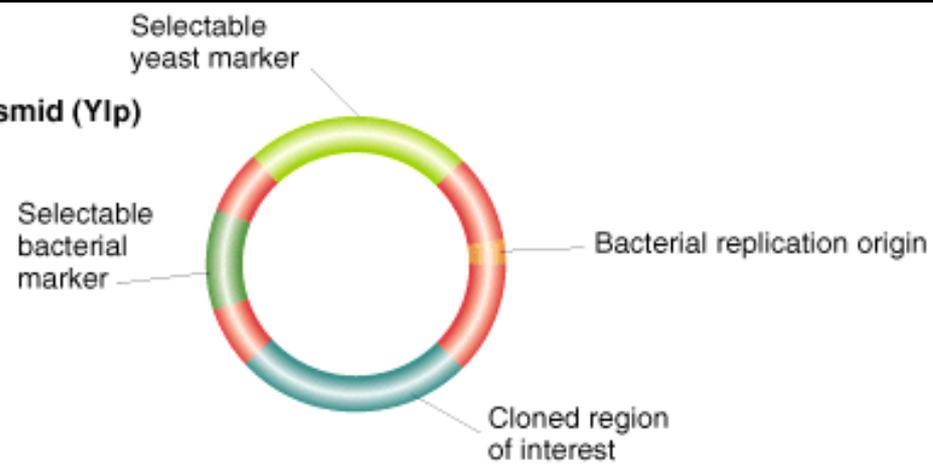
3. Vettori che si integrano (Y integrating Plasmid)

- Limitazioni del numero di copie del gene clonato (uno per cromosoma) e quindi limitazione della resa in proteina
- Geni spesso stabili e perdita di YIp integrato avviene a bassissima frequenza

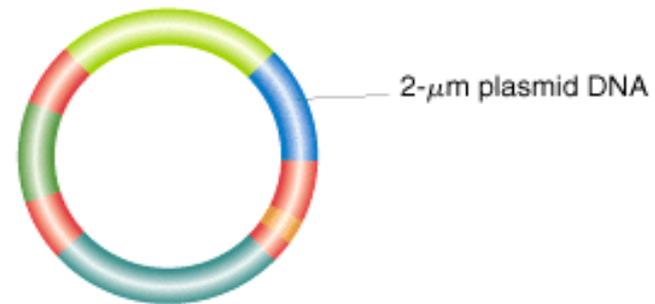
4. Cromosomi artificiali di lievito (YAC)

- Lungo frammento di DNA che viene mantenuto nella cellula come cromosoma separato
- Altamente stabile

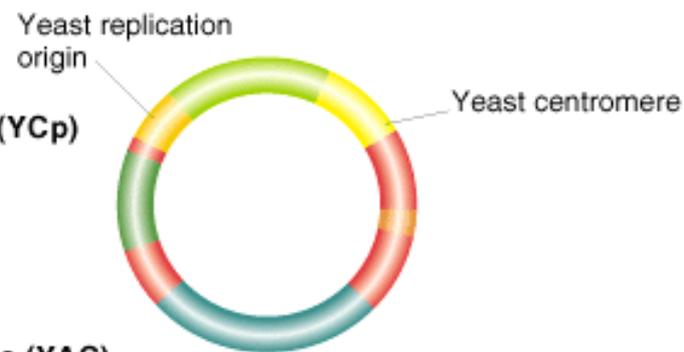
(a) Yeast integrative plasmid (YIp)



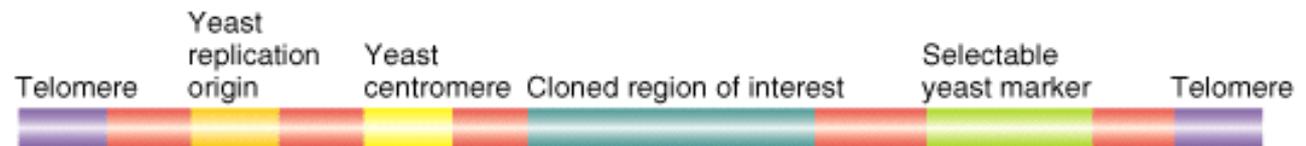
(b) Yeast episomal plasmid (YEp)



(c) Yeast centromere plasmid (YCp)



(d) Yeast artificial chromosome (YAC)



Recombinant DNA Technology- Yeast

- Vectors basati su **plasmide da $2\mu\text{m}$**
- Plasmidi episomici di lievito (YE_p) (20-50 copie per cellula)

Es Yep13 (vettore navetta)

(trasformanti 10000-100000/ μg DNA Plasmidico):

ori $2\mu\text{m}$; marcatore LEU;

seq pBR322 (replicabile anche in E.coli)

- Marcatore gene LEU
(codifica per β -isopropil malato deidrogenasi)
su ceppi yeast auxotrofi (LEU-/-)

Recombinant DNA Technology- Yeast

Altri vettori

- Plasmidi integrativi di lievito (YIp) (1 copia per cellula)

Es YIp5 (trasformanti 1000/ μ g DNA Plasmidico):

ori 2 μ m; marcatore URA3; seq pBR322 (replicabile anche in E.coli); di integra nel DNA (nessuna ori plasmidica)

- Marcatore gene URA3 (codifica per orotidina 5'-fosfato decarbossilasi, biosintesi nt pirimidinici)
su ceppi yeast auxotrofi (URA3-/-)

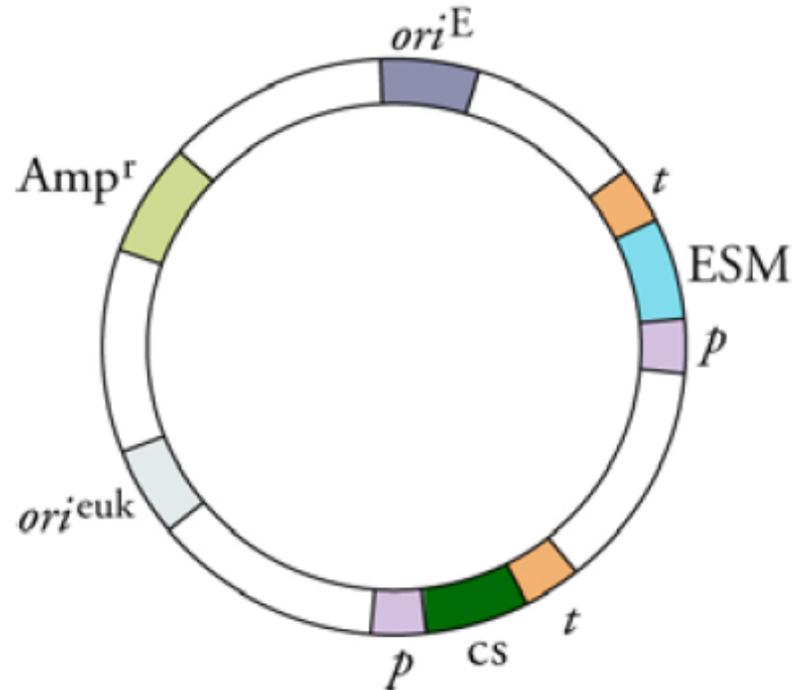
- Plasmidi replicativi di lievito (YRp) (5-100 copie per cellula, ma instabili)

Es YRp7 (trasformanti 1000-10000/ μ g DNA Plasmidico): :

ori; marcatore TRP1; seq pBR322 (replicabile anche in E.coli); di integra nel DNA (nessuna ori plasmidica)

- Marcatore gene TRP1 (codifica per fosforibosilantranilato isomerasi, 3° step sintesi del triptofano) si trova vicino all'ori di lievito su ceppi yeast auxotrofi (TRP1 -/-)

I vettori di espressione eucarioti hanno le stesse caratteristiche dei vettori procarioti



Promotore (p)

Sito di clonazione (cs)

Segnali di arresto e poliadenilazione (t)

Origine della replicazione eucariota (ori^{euk})

Gene marcatore selezionabile eucariota (ESM)

Origine della replicazione procariota (ori^E)

Gene marcatore selezionabile procariota (Amp^r)

} per permettere la
manipolazione
genetica di routine
in *E. coli*

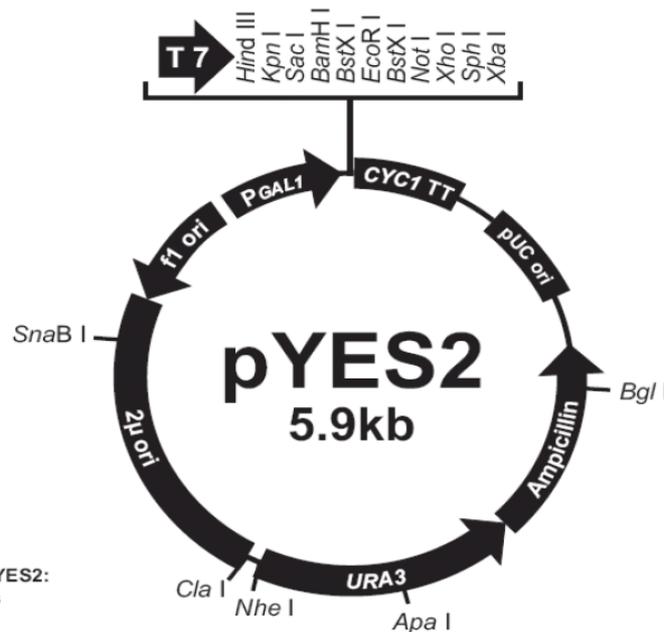
Esempio vettore in Lievito

pYES2

pYES2 is a 5.9 kb vector designed for inducible expression of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Features of the vectors allow easy cloning of the gene of interest and selection of transformants by uracil prototrophy.

Map of pYES2

The figure below summarizes the features of the pYES2 vector. The sequence for pYES2 is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or from Technical Service (see page 17).



Comments for pYES2:
5856 nucleotides

GAL1 promoter: bases 1-451

T7 promoter/priming site: bases 475-494

Multiple cloning site: bases 501-600

CYC1 transcription terminator: bases 608-856

pUC origin: bases 1038-1711

Ampicillin resistance gene: bases 1856-2716 (C)

URA3 gene: bases 2734-3841 (C)

2 micron (μ) origin: bases 3845-5316

f1 origin: bases 5384-5839 (C)

(C) = complementary strand

Yeast *GAL1* promoter for high level inducible protein expression in yeast by galactose and repression by glucose.

A versatile multiple cloning site for simplified cloning.

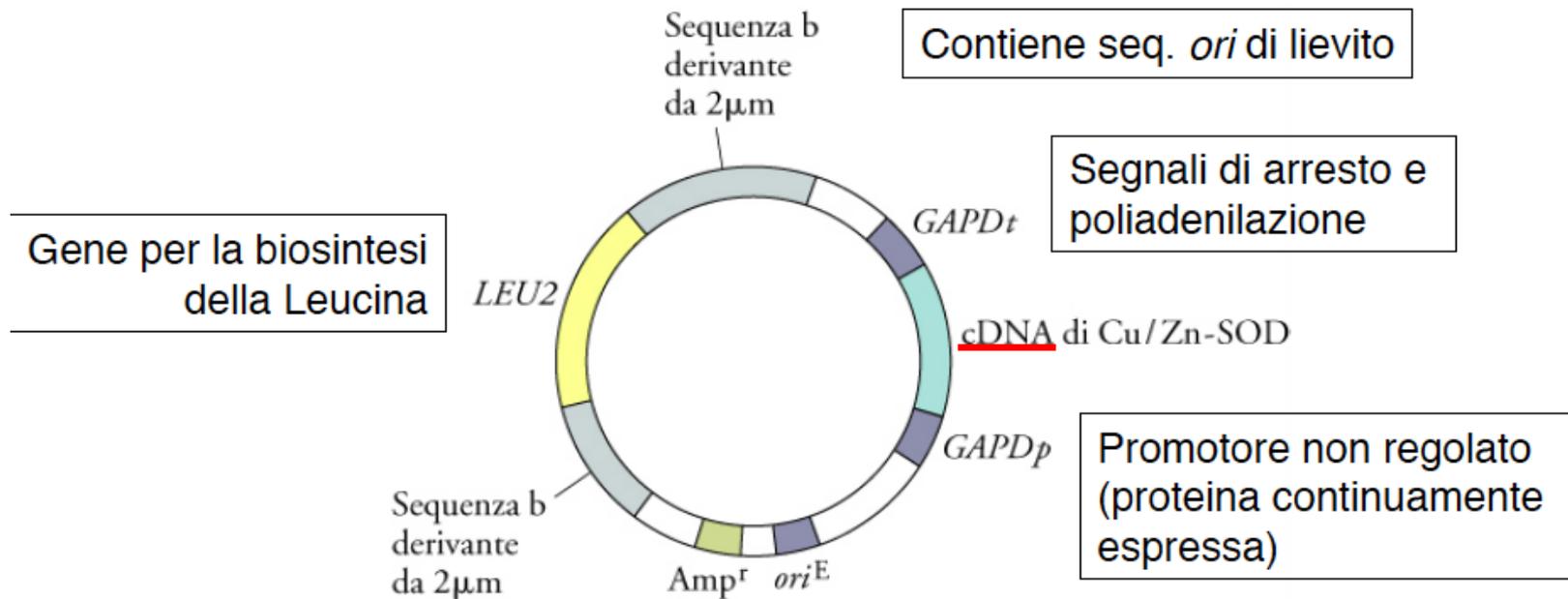
CYC1 transcriptional terminator for efficient termination of mRNA.

URA3 gene for selection of transformants in yeast host strains with a *ura3* genotype.

Ampicillin resistance gene for selection in *E. coli*.

Es. SOD in lievito

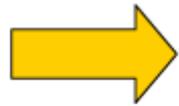
- L'enzima funzionale umano è acetilato sulla prima Alanina.
- *E.coli* non è in grado di fare questa modificazione
- cDNA clonato in un vettore di espressione eucariota



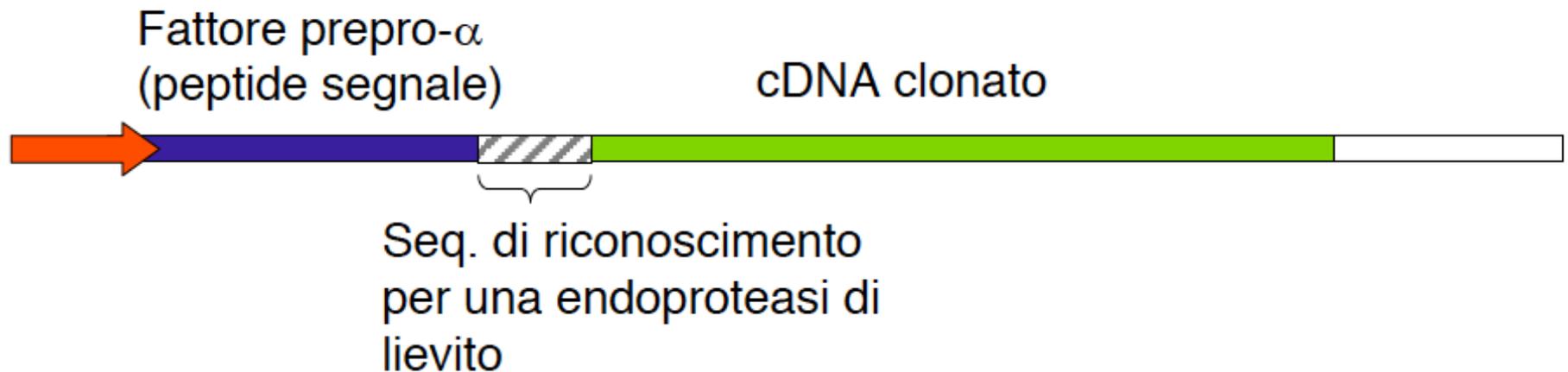
- Trasformazione in un ceppo di lievito *LEU2*⁻
- Crescita in un mezzo privo di leucina
- Accumulo di SOD acetilata nel citoplasma

Secrezione di proteine eterologhe in *S. cerevisiae*

Nel lievito vengono glucosilate solo le proteine secrete

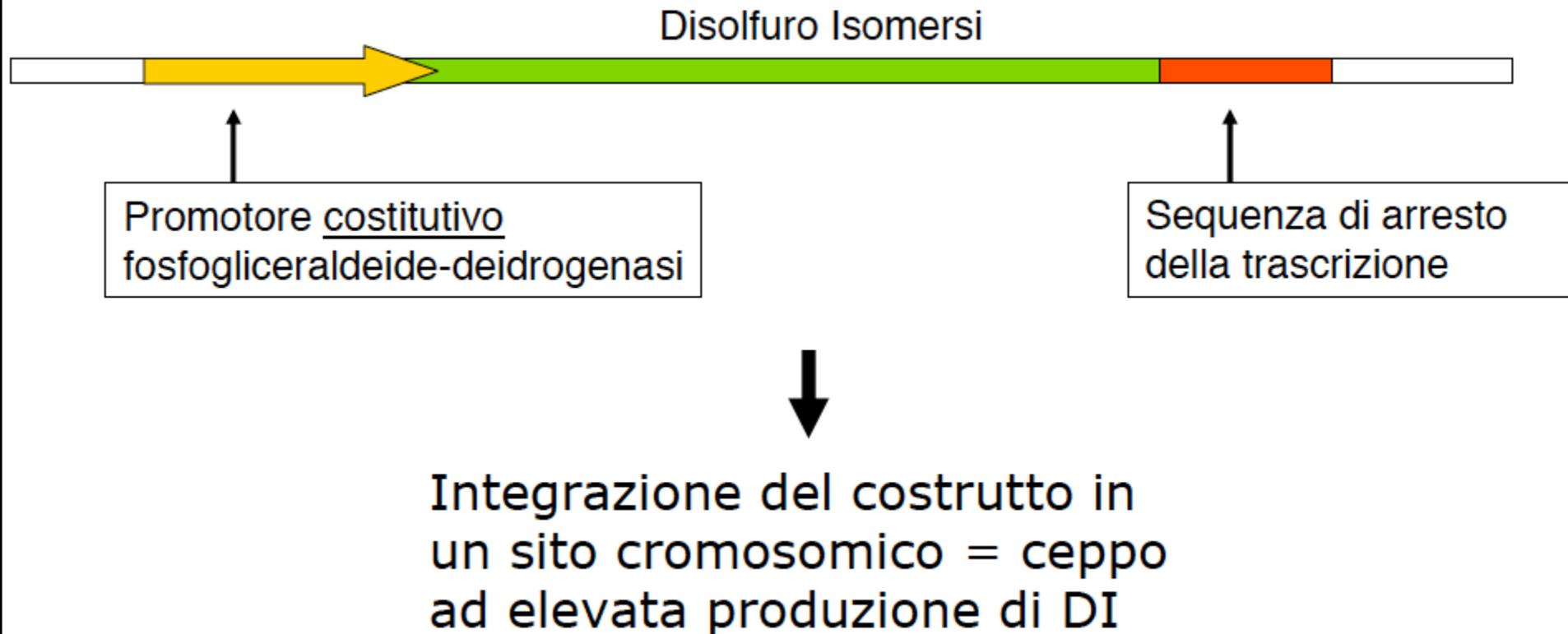


Per ottenere proteine ricombinanti glicosilate all'O o all'N bisogna utilizzare un sistema che permetta la secrezione della proteina



Miglioramento della secrezione di proteine ricombinanti in *S. cerevisiae*

- ❑ Sovrapproduzione della proteina **Disolfuro isomerasi** (aumenta in maniera specifica la secrezione di proteine con ponti disolfuro)



Promotori del lievito

Promoter

Status

Acid phosphatase	PHO5	Inducible
Alcohol dehydrogenase I	ADH I	Constitutive
Alcohol dehydrogenase II	ADH II	Inducible
Galactokinase	GAL 1	Inducible
Metallothionein	Cup 1	Inducible
Phosphoglycerate kinase	PGK	Constitutive
Triose Phosphate isomerase	TPI	Constitutive

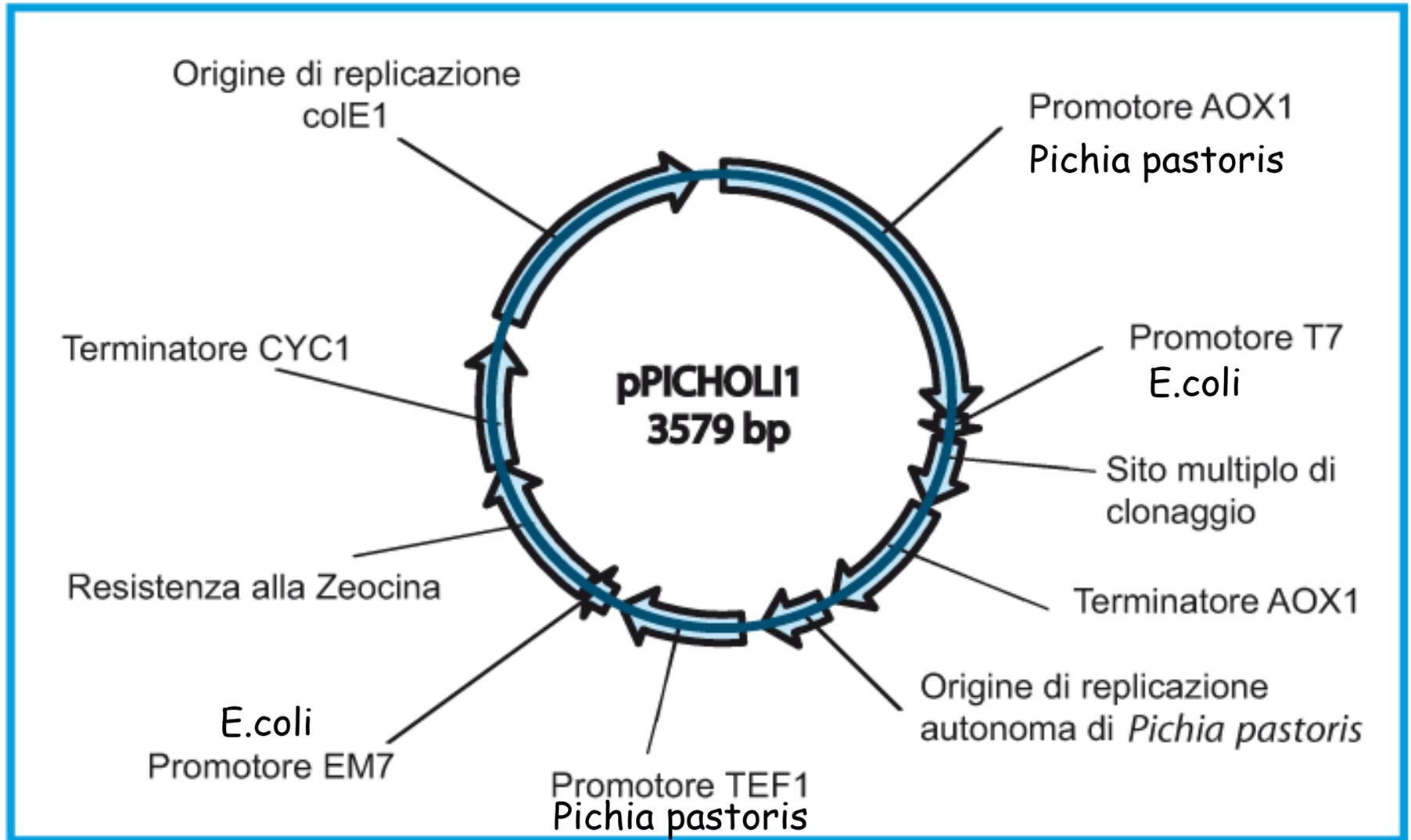
Problemi nella espressione di proteine ricombinanti in *S. cerevisiae*:

- Perdita del plasmide (anche con promotori inducibili)
- Iperglucosilazione della proteina eterologa [fino a 100 residui di mannosio contro ~10 normale]
=> alterazione della attività biologica e/o immunogenicità
- A volte proteine progettate per essere secrete sono trattenute nello spazio periplasmatico

Table 1 - Yeast Expression Systems

System/ Vector	Host	Secretion Signal	Fusion Partner			Selectable Marker	Promoter	Inducer	Advantage
			Position	Purif.	Epitope				
<i>Pichia</i> Expression System	<i>P. pastoris</i>	α -factor or <i>PHO</i>	C-term.	6xHis	<i>c-myc</i>	<i>HIS4</i> , Zeocin™, or Blasticidin	<i>AOX1</i> or <i>GAP</i>	methanol (<i>GAP</i> is constitutive)	High-level expression, copy number control, suitable for industrial- scale protein production
	<i>P. methanolica</i>	α -factor	C-term.	6xHis	V5	<i>ADE2</i>	<i>AUG1</i>	methanol	High-level expression
YES™ Vector Collection	<i>S. cerevisiae</i>	—	N-term. C-term.	6xHis	Xpress™ V5	<i>URA3</i> or blasticidin	<i>GAL1</i>	galactose	High- or low-copy episomal expression
pTEF1/Zeo pTEF1/Bsd	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. pastoris</i> <i>P. methanolica</i>	—	—	—	—	Zeocin™ or Blasticidin	<i>TEF1</i>	—	Simplified construction of Zeocin™- or Blasticidin-resistant vectors in yeast
SpECTRA™ <i>S. pombe</i> Expression System	<i>S. pombe</i>	—	C-term.	6xHis	V5	<i>LEU2</i>	<i>nm1</i> <i>nm41</i> <i>nm81</i>	thiamine	Flexible control of expression levels in <i>S. pombe</i>
pYD1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>AGA2</i>	N-term. C-term.	6xHis	Xpress™ V5	<i>TRP1</i>	<i>GAL1</i>	galactose	Displays protein on cell surface

Vettore (plasmide shuttle) di espressione utilizzabile in *Pichia pastoris* (lievito) ed *E.coli* (batterio)



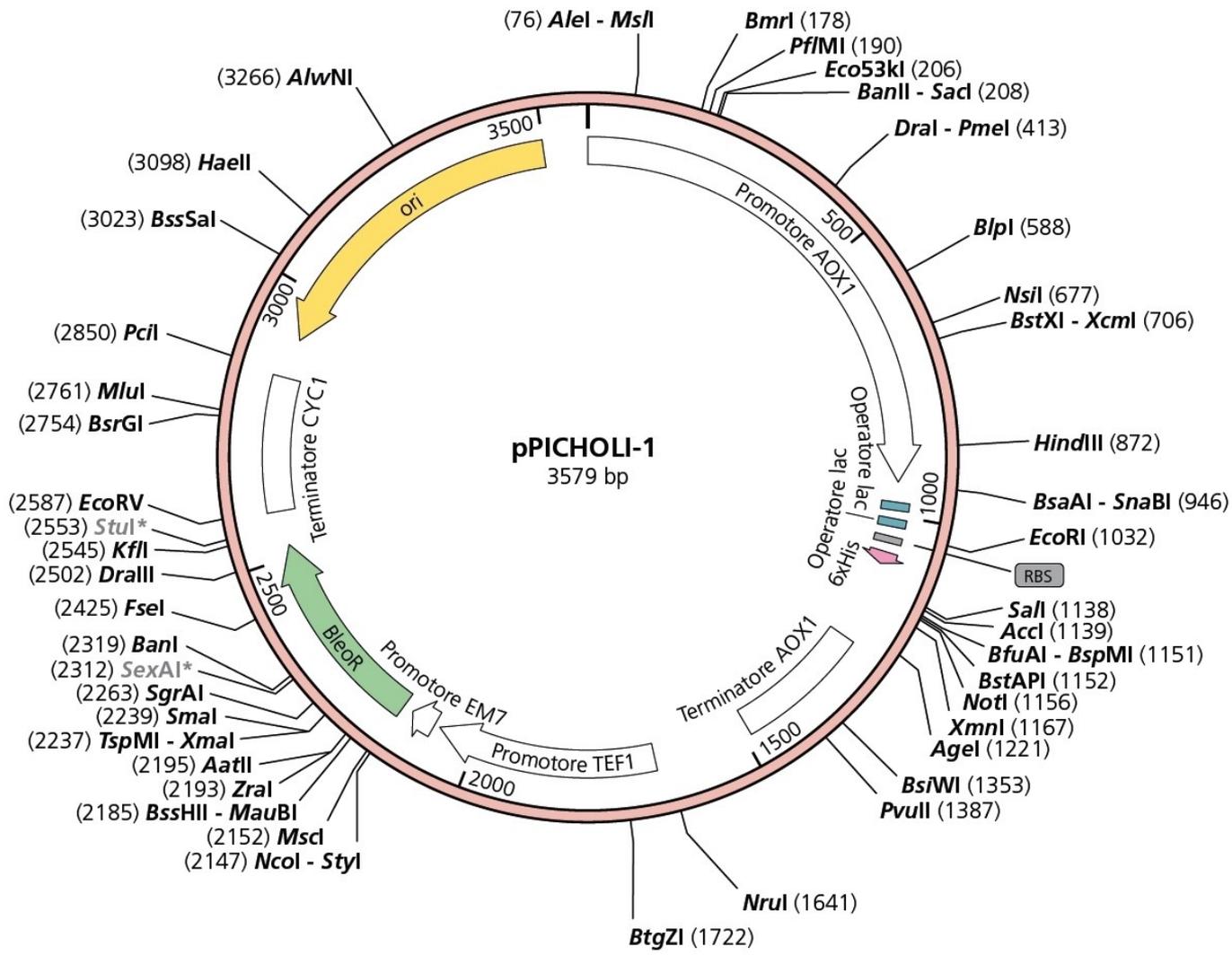


Figura 4.3

Mappa del vettore pPICHOLI per l'espressione di proteine ricombinanti in *E. coli* sotto il controllo del promotore T7 e in *P. pastoris* sotto il controllo del promotore AOX1. Il marcatore di selezione (resistenza alla zeocina) è espresso in *E. coli* dal promotore EM7 e in *P. pastoris* dal promotore TEF1. La figura è stata prodotta con il programma SnapGene Viewer.

Tabella 3.3 Struttura, utilizzo e localizzazione di *tag* peptidici e proteici.

tag peptidici	Struttura	Utilizzo	Localizzazione rispetto alla proteina
His-tag	6-10 residui di istidina	Purificazione tramite cromatografia di affinità su metalli e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
Flag-tag	DYKDDDDK	Purificazione tramite cromatografia di affinità e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
c-myc-tag	EQKLISEEDL	Purificazione tramite cromatografia di affinità e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
HA-tag	YPYDVPDYA	Purificazione tramite cromatografia di affinità e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
tag proteici			
GST	Glutazione S-transferasi (26 kDa)	Purificazione tramite cromatografia di affinità su glutatione e identificazione con anticorpi	C- o N-terminale
MBP	<i>Maltose binding protein</i> (40 kDa)	Purificazione tramite cromatografia di affinità su amilosio e identificazione con anticorpi	N-terminale
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (27 kDa)	Marcatore fluorescente per localizzazione subcellulare	C- o N-terminale

Reporter Gene assay

Lievito: Vettori per il doppio ibrido

