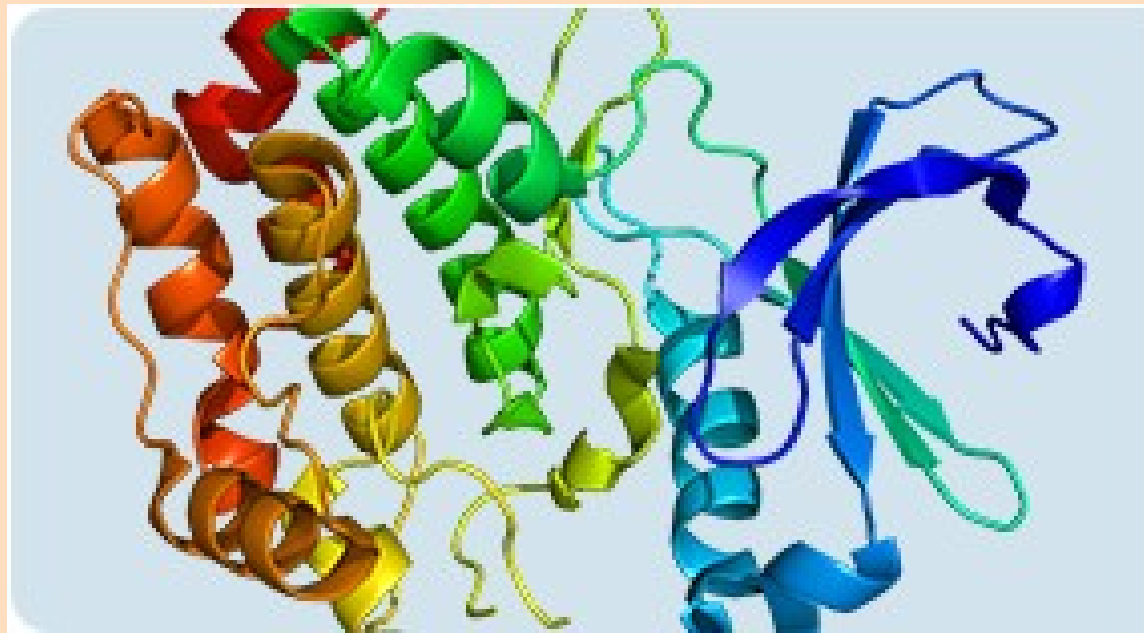
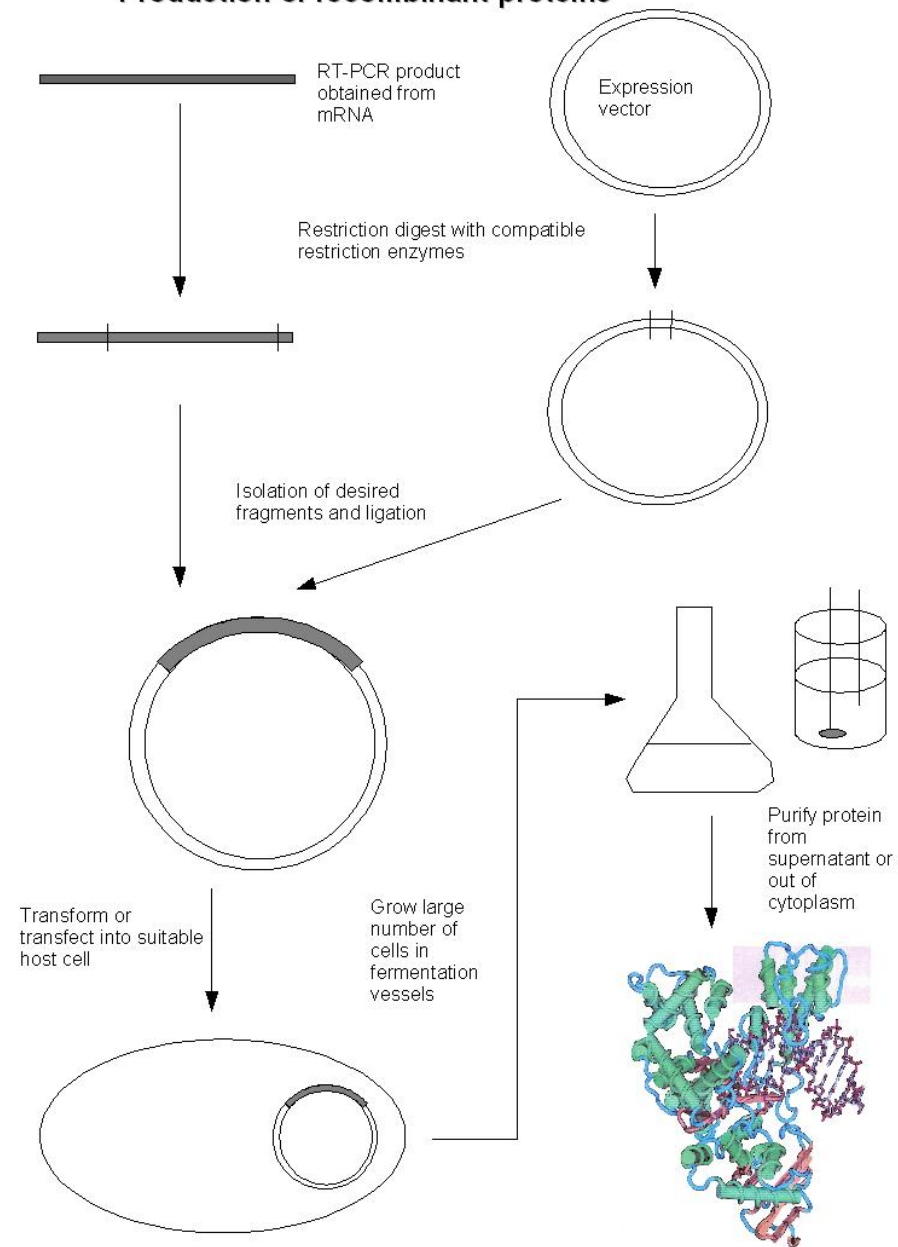


# **Produzione di proteine a partire da geni clonati**



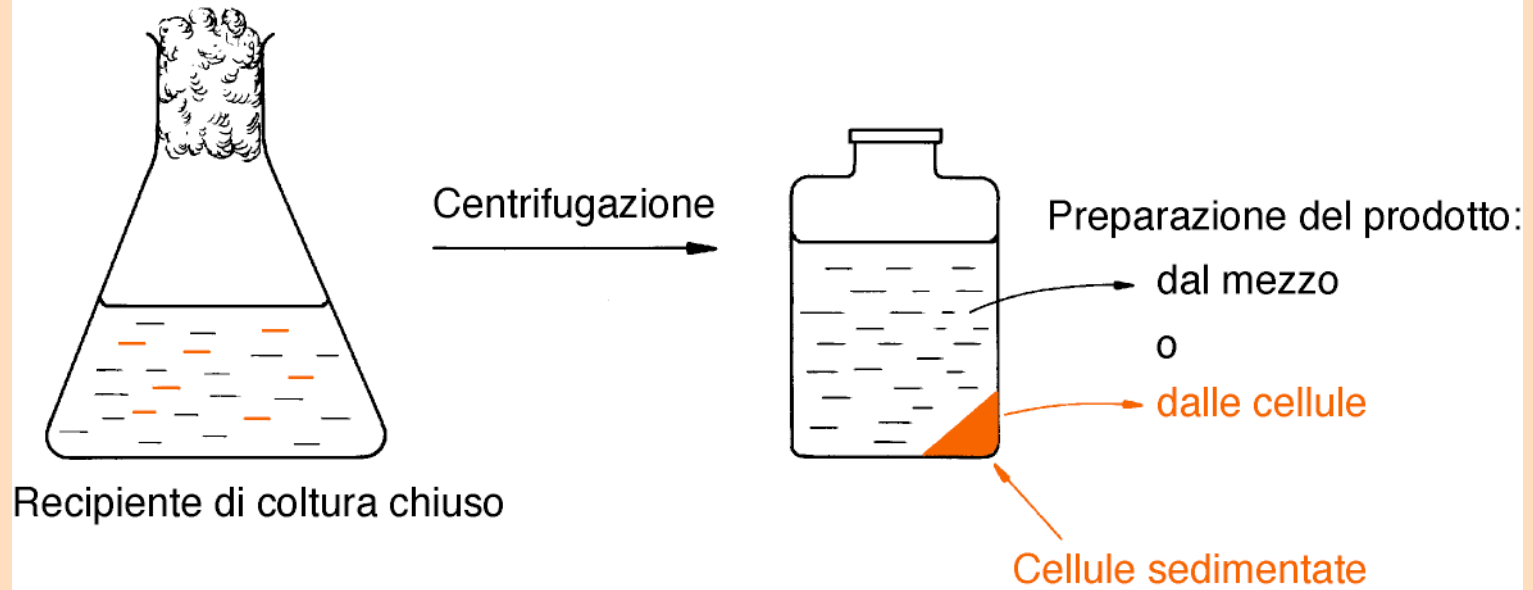
## Production of recombinant proteins



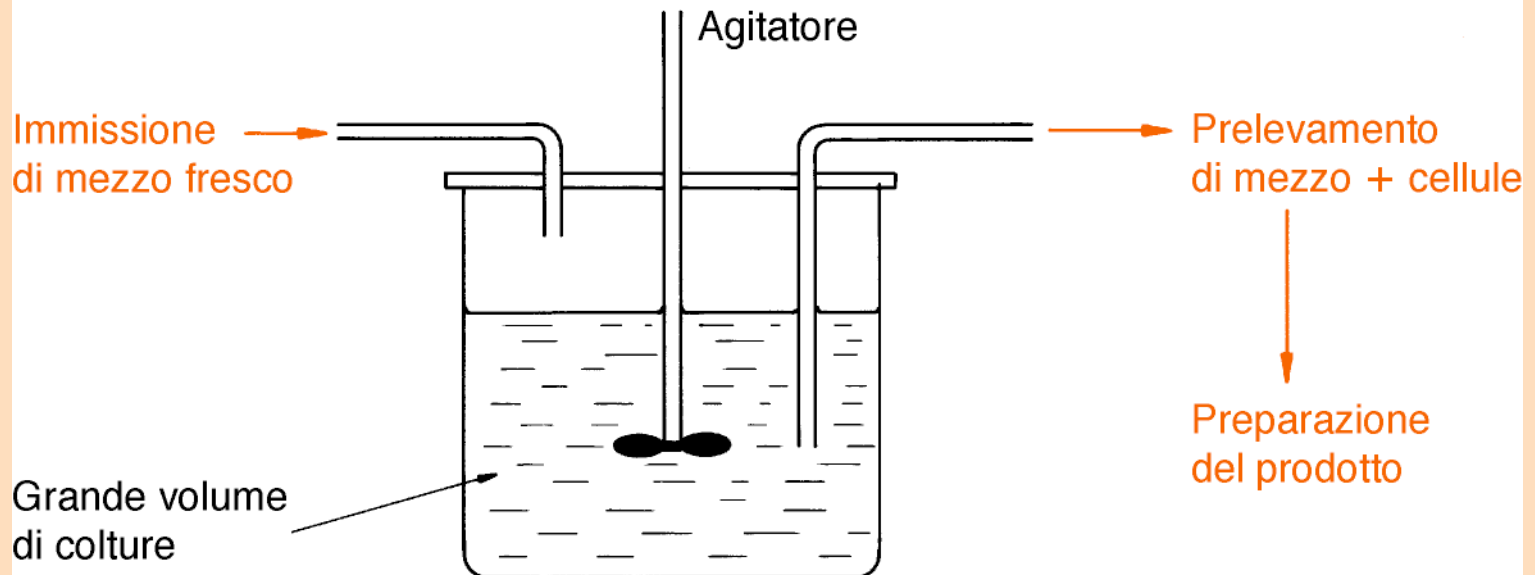
# Sistemi di espressione

- **Procarioti** (*E. coli*)
- **Eucarioti**
  - Lieviti (*S. cerevisiae*, *P. pastoris*)
  - Cellule di insetto/baculovirus
  - Cellule di mammifero

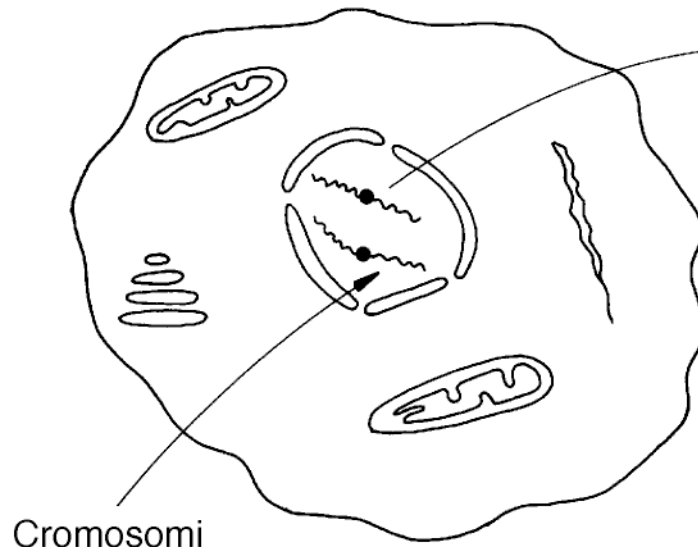
### (a) Coltura in batch



### (b) Coltura continua



Cellula animale

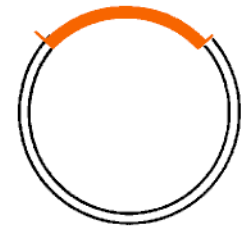


Cromosomi



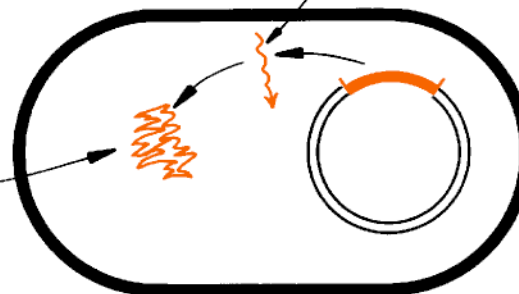
Gene che codifica  
per una proteina  
animale

Vettore che porta  
un gene animale



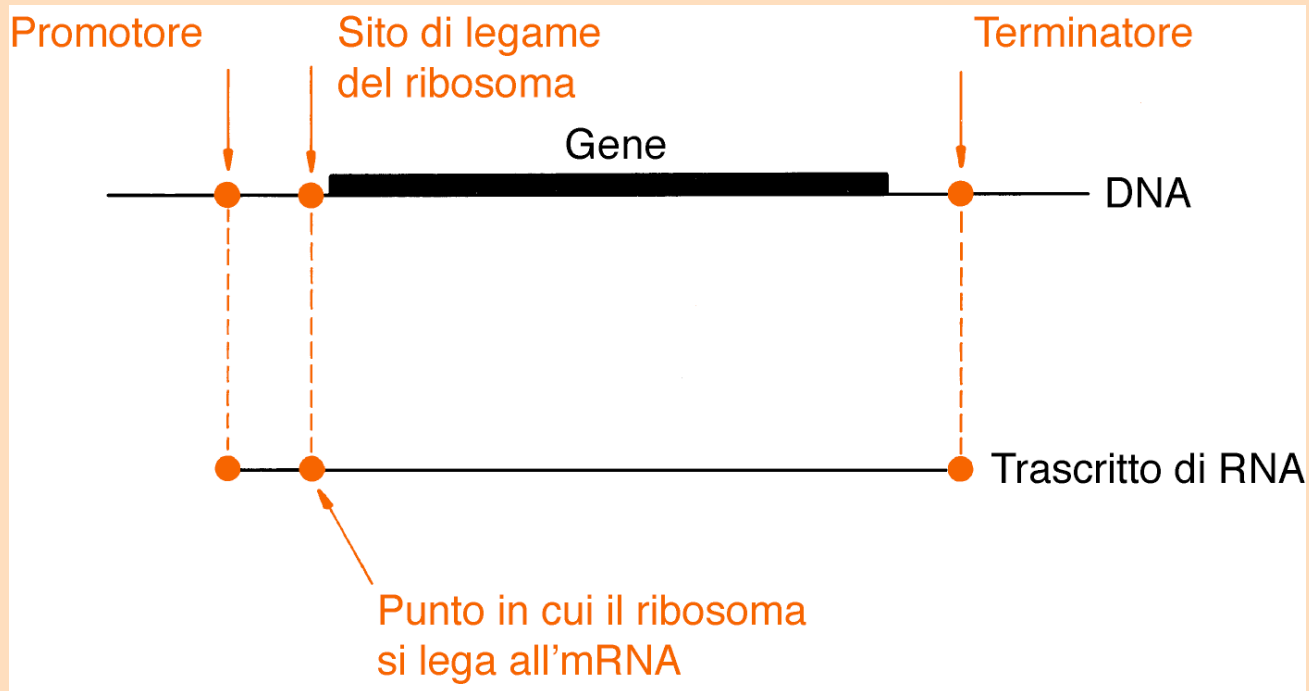
mRNA

Proteina animale



Batterio ingegnerizzato  
geneticamente che sintetizza  
la proteina animale

# Segnali importanti per l'espressione in *E. coli*



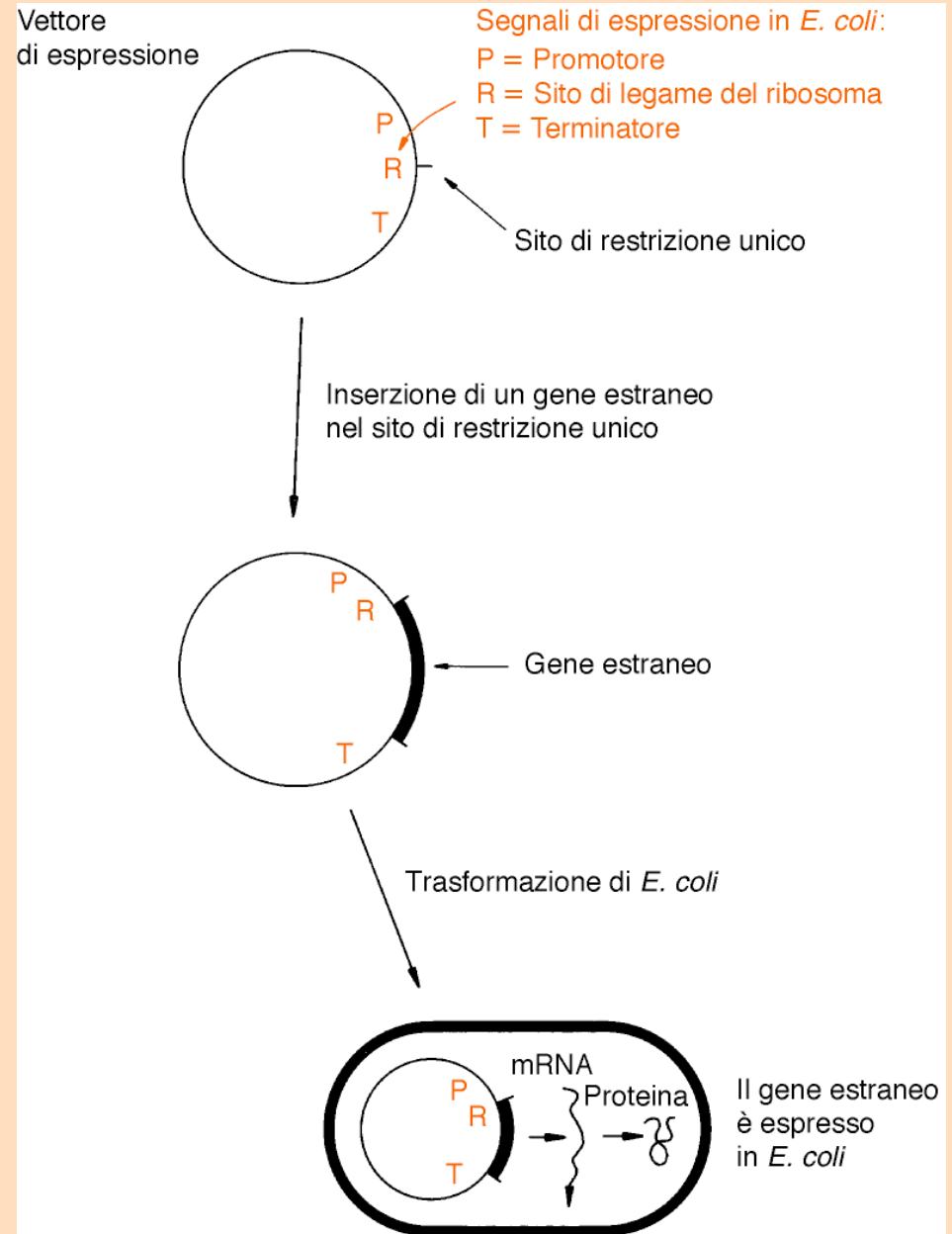
## (a) *E. coli*

..... TTGACA ..... TATAAT ..... → **Gene**  
box -35 box -10

## (b) Animali

..... Vari segnali ..... TATAAAT ..... → **Gene**  
box -25

Per l'espressione eterologa, bisogna inserire la sequenza codificante sotto il controllo di elementi (promotore, Ribosome Binding Site, terminatore) utilizzati da *E. Coli*. Si utilizzano **vettori di espressione** (es. pQE50).



# Promotori

```
graph TD; Promotori --> Forti; Promotori --> Costitutivi; Forti --> Deboli; Costitutivi --> Inducibili;
```

•Forti

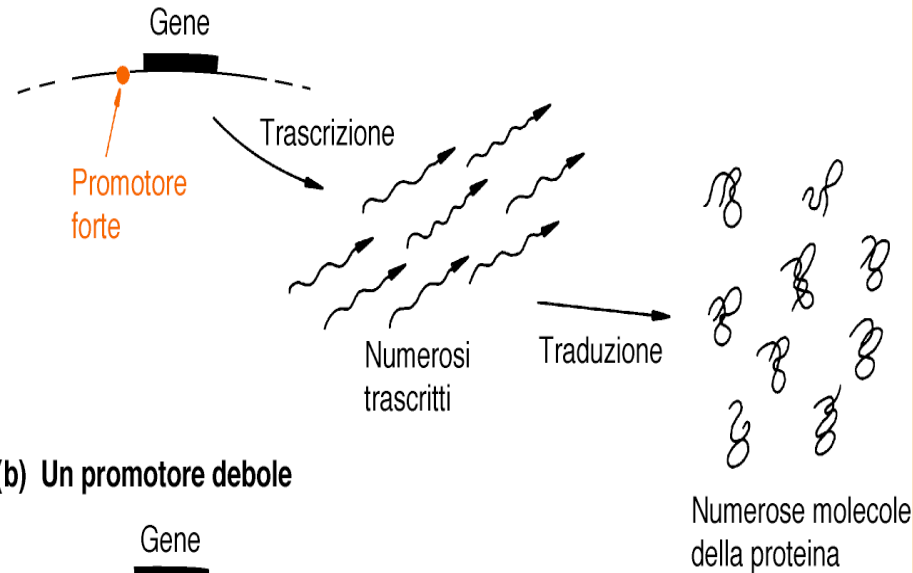
•Deboli

•Costitutivi

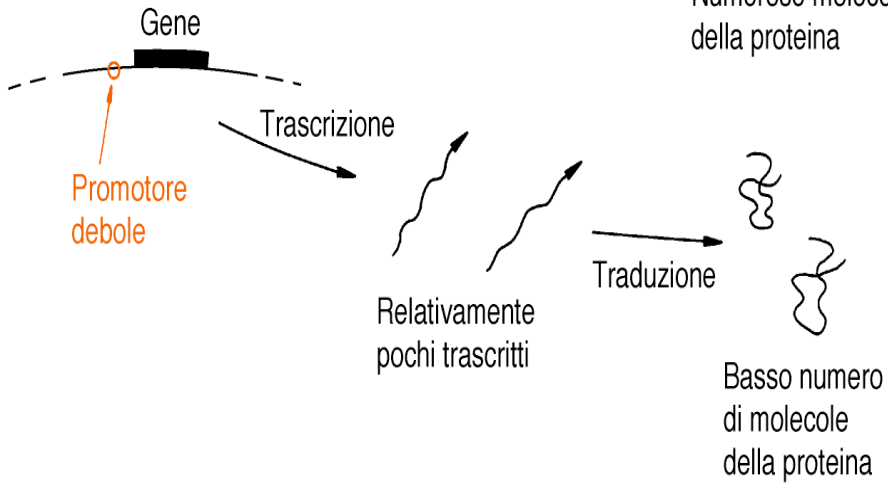
•Inducibili



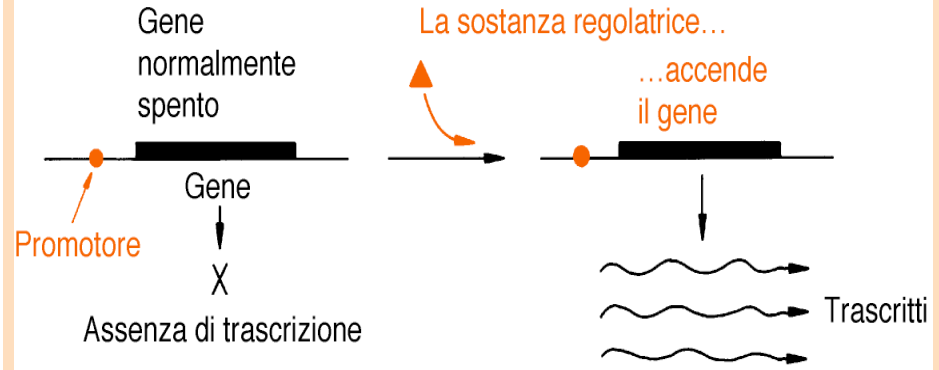
### (a) Un promotore forte



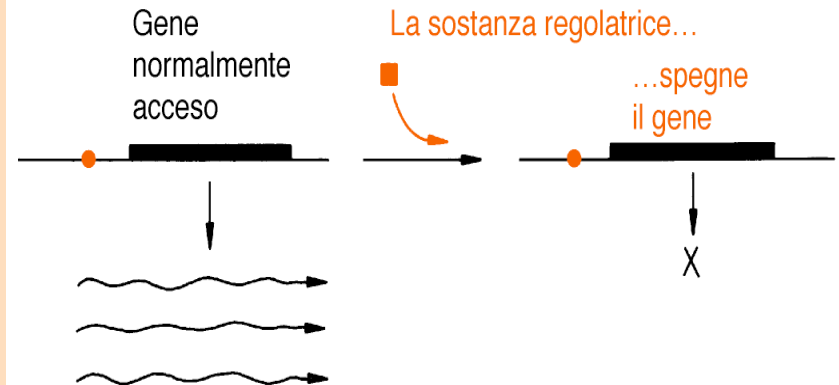
### (b) Un promotore debole



### (a) Un gene inducibile



### (b) Un gene reprimibile

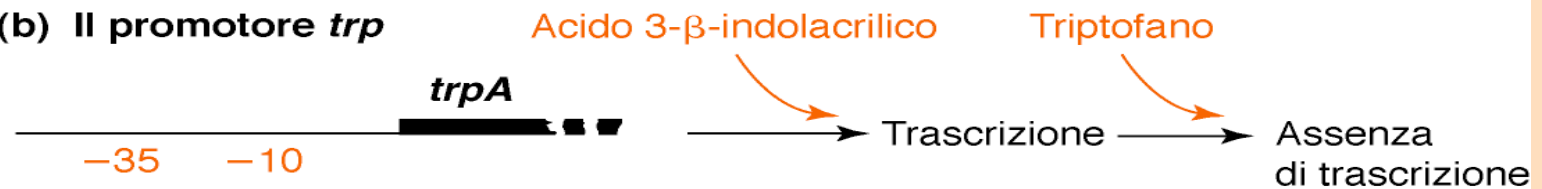


# Alcuni promotori comunemente utilizzati nei vettori di espressione

## (a) Il promotore *lac*



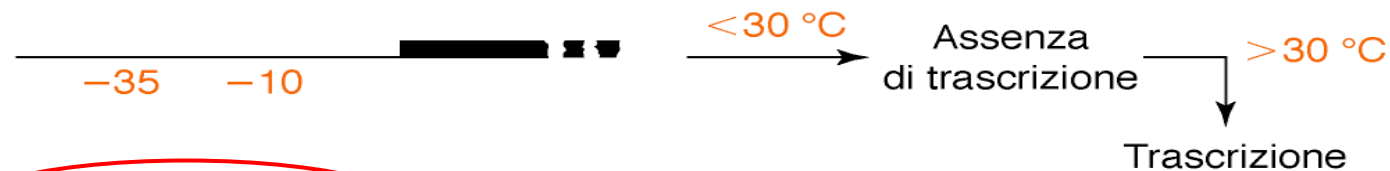
## (b) Il promotore *trp*



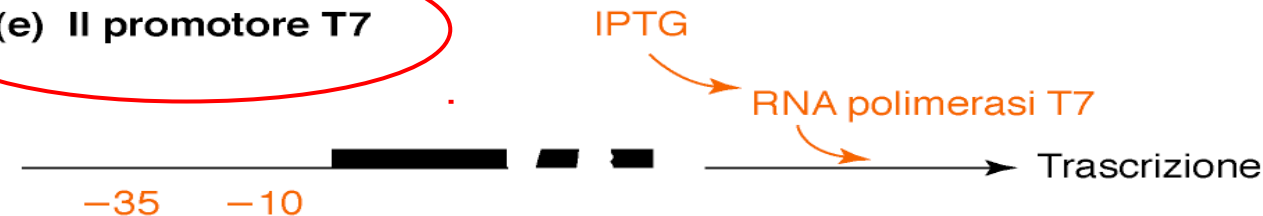
## (c) Il promotore *tac*



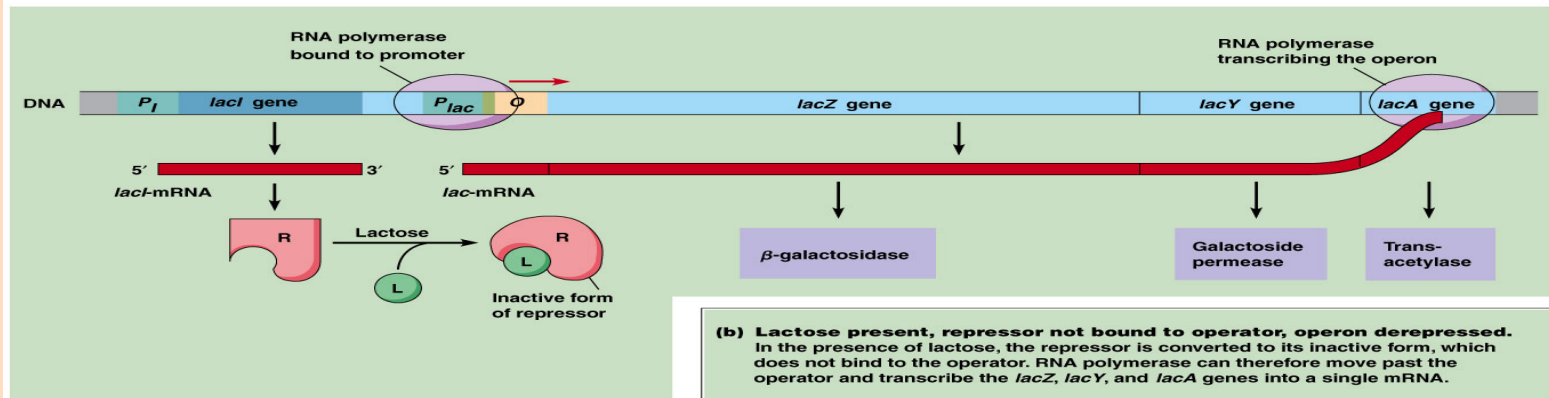
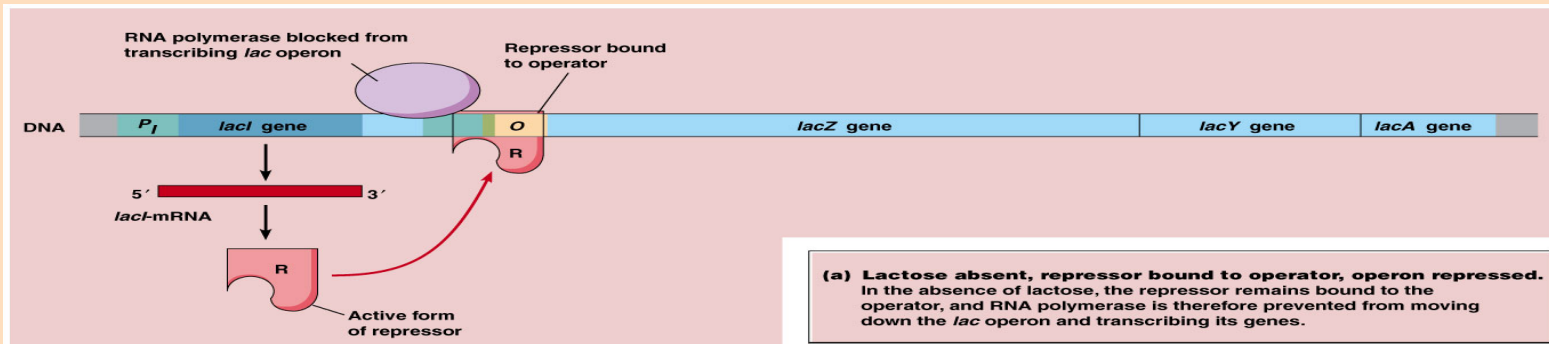
## (d) Il promotore $\lambda P_L$



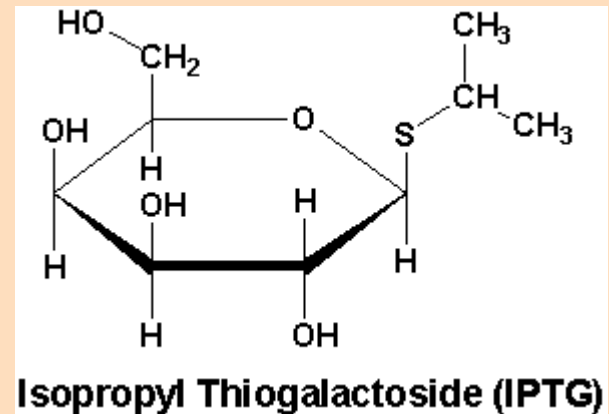
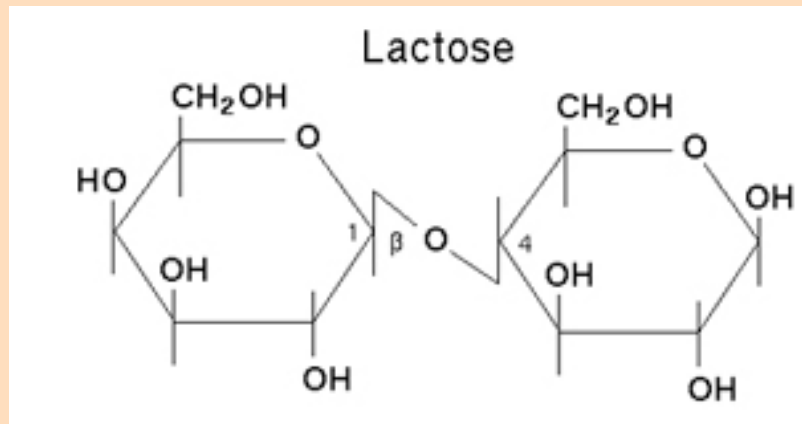
## (e) Il promotore T7



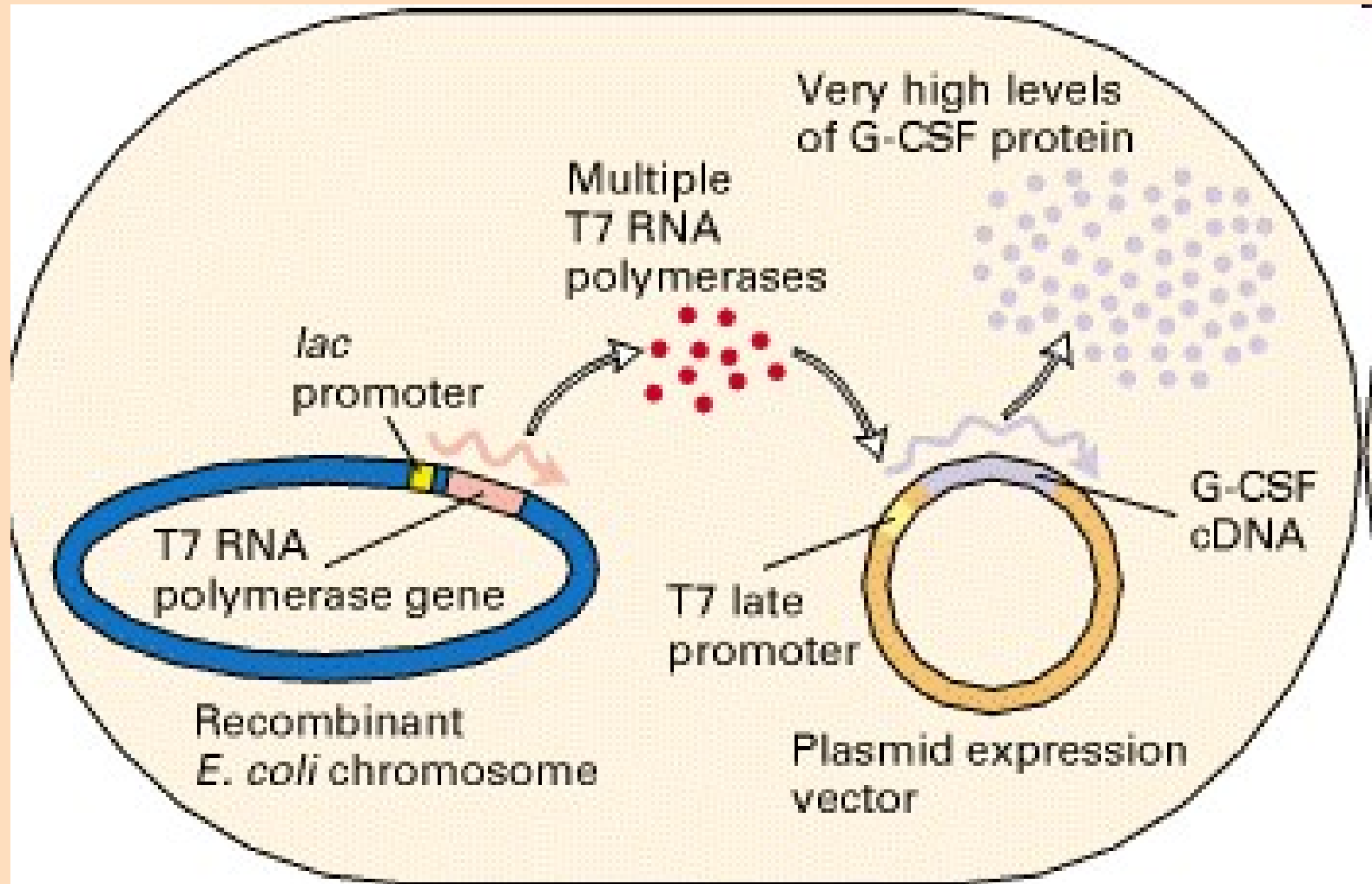
# Promotore Lac



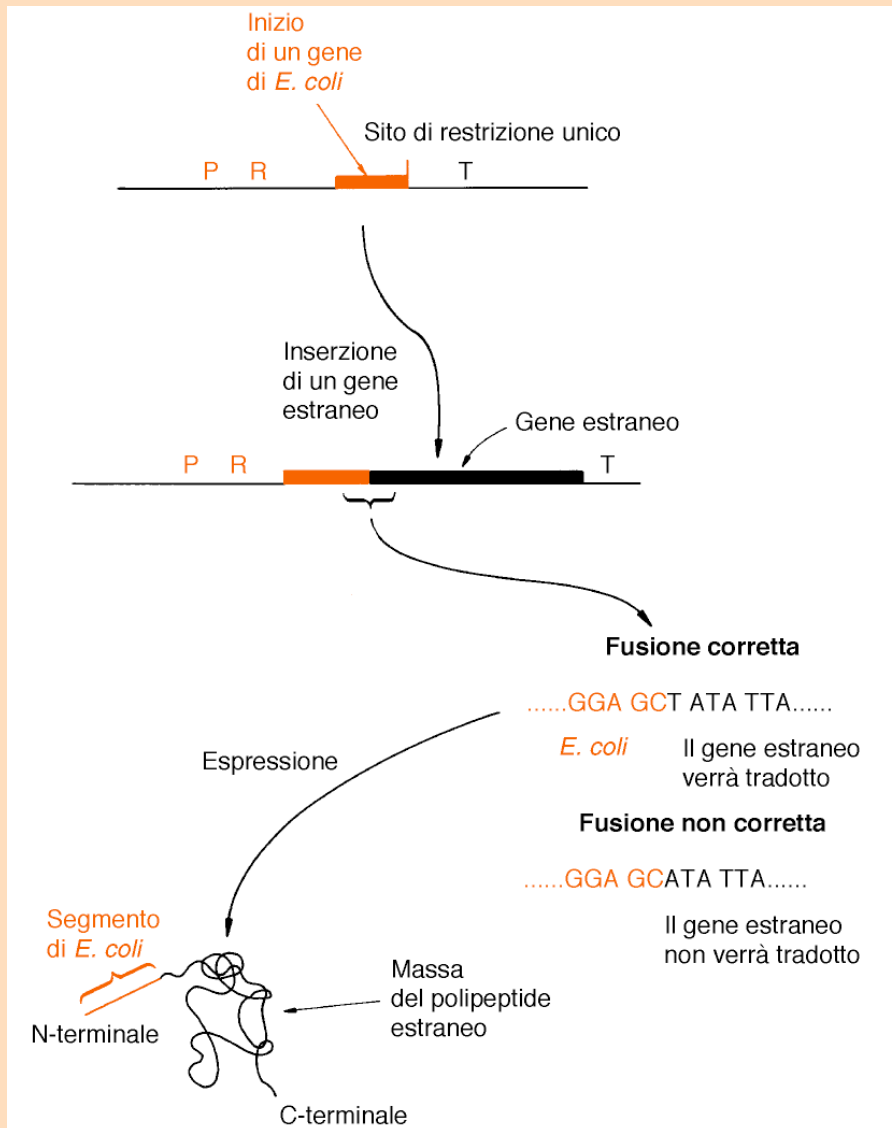
© 2012 Pearson Education, Inc.



Un sistema molto comune utilizza la  
combinazione dei **promotori Lac e T7** con **IPTG**  
come induttore

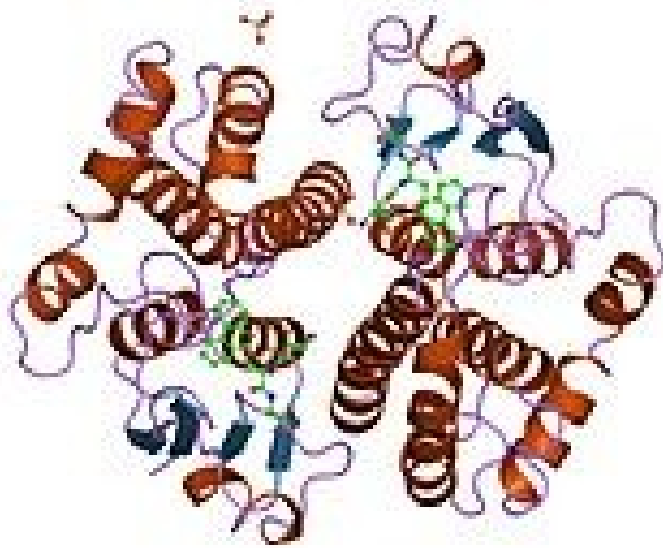


# Costrutti per l'espressione di proteine di fusione



Il segmento può essere un gene di *E. coli* per facilitare l'inizio della traduzione oppure un **tag** (es 6XHIS, come in pQE50 o la GST (glutathione S-transferasi)) che si utilizzerà per la purificazione della proteina tramite cromatografia di affinità.

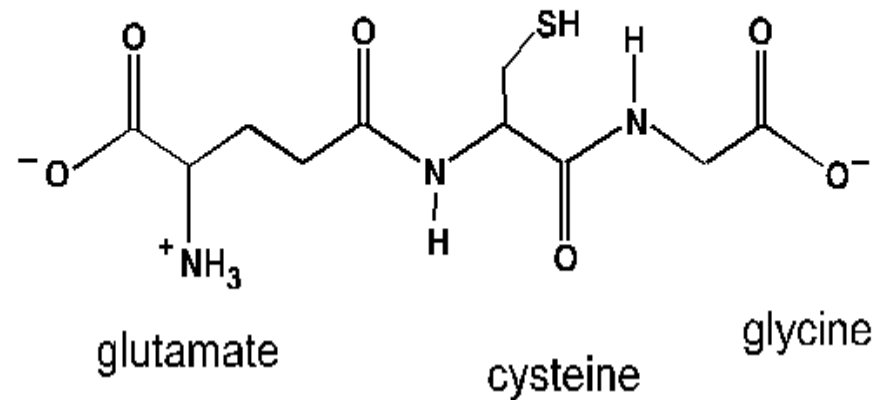
# Glutathione S-transferasi



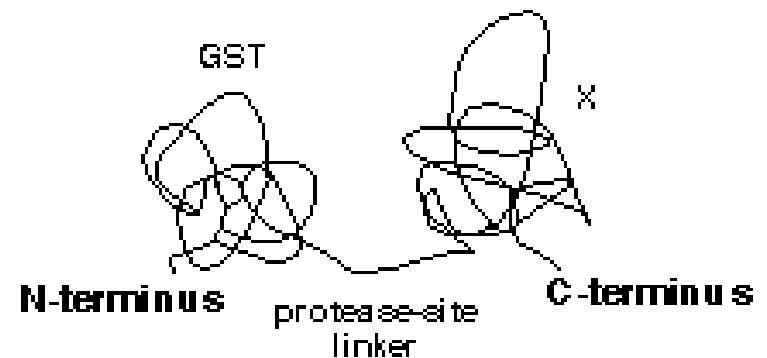
gene level



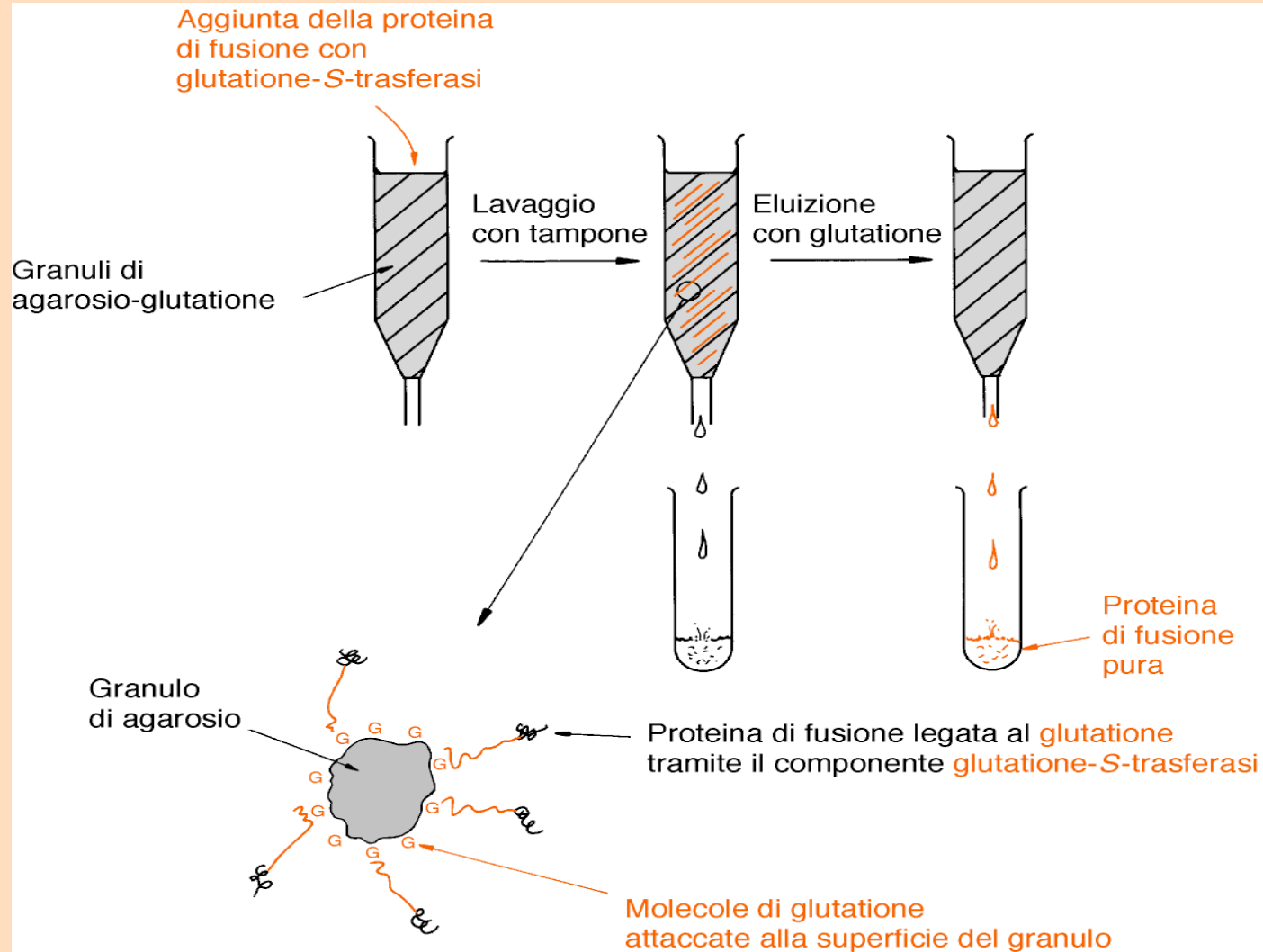
glutathione (GSH)



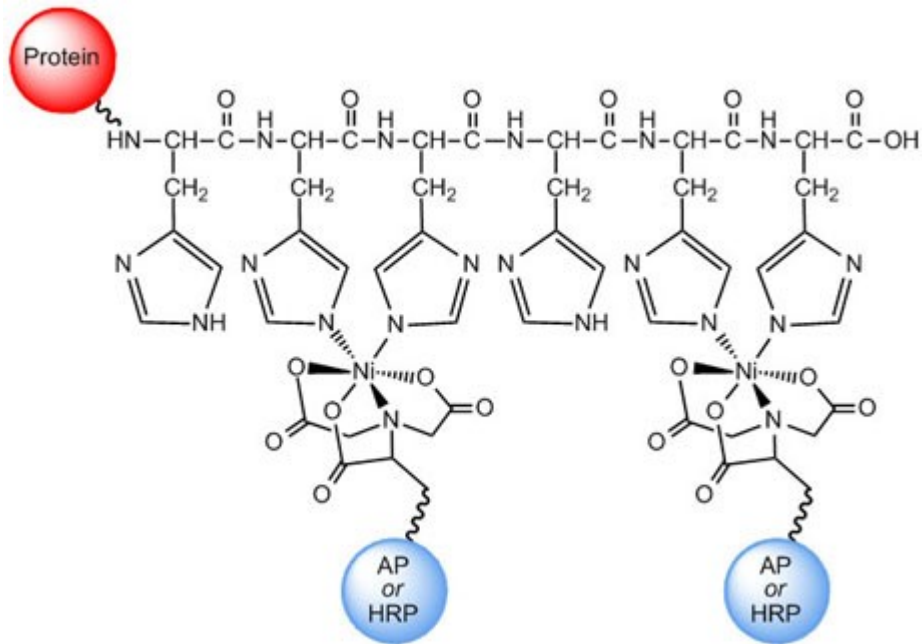
protein level



# Cromatografia di Affinità

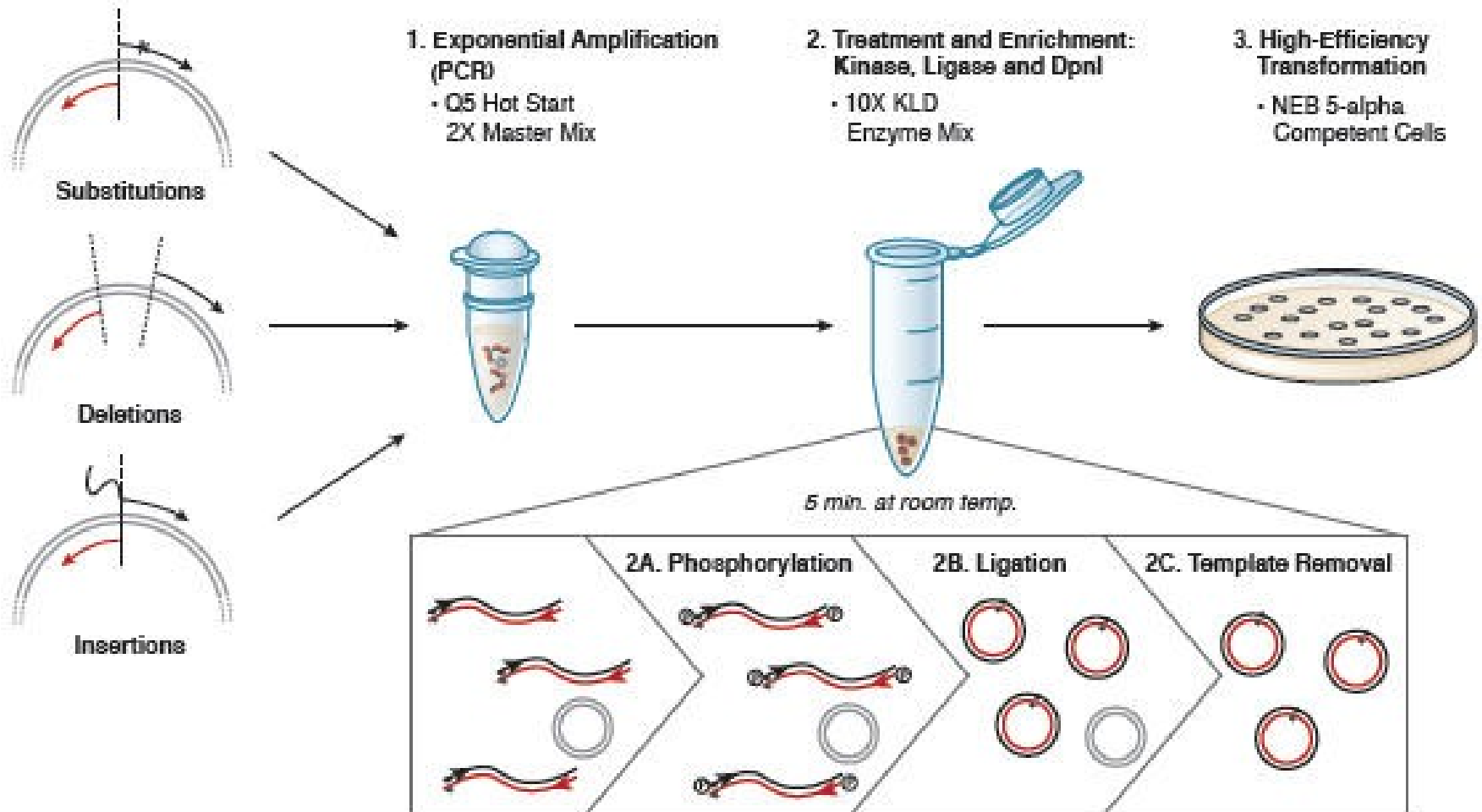


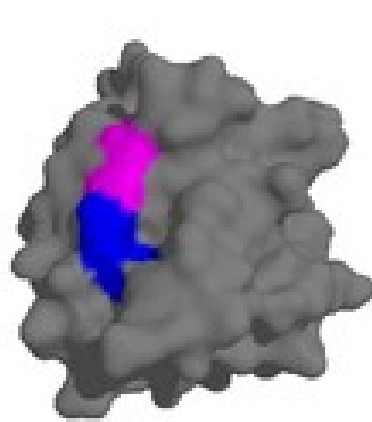
# 6XHis-tag





# Espressione di proteine mutate



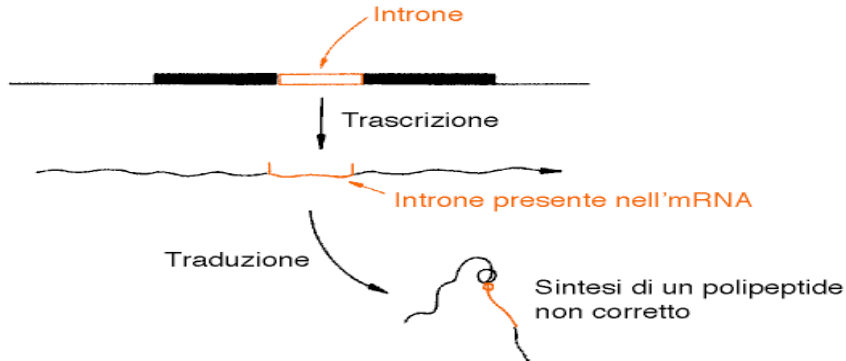


A surface representation of a protein structure, colored gray. A binding site is highlighted with a magenta region on top and a blue region on the bottom.

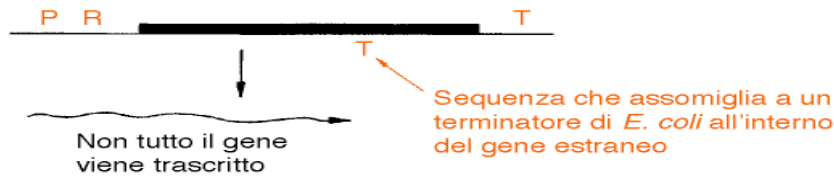


# Problemi generali per quanto riguarda le proteine in *E. coli*

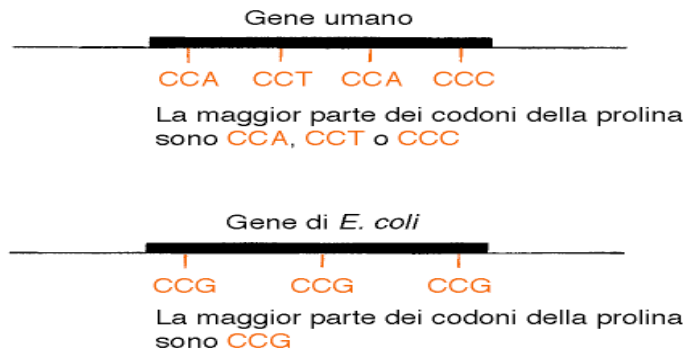
(a) *E. coli* non può rimuovere introni



(b) Terminazione prematura della trascrizione



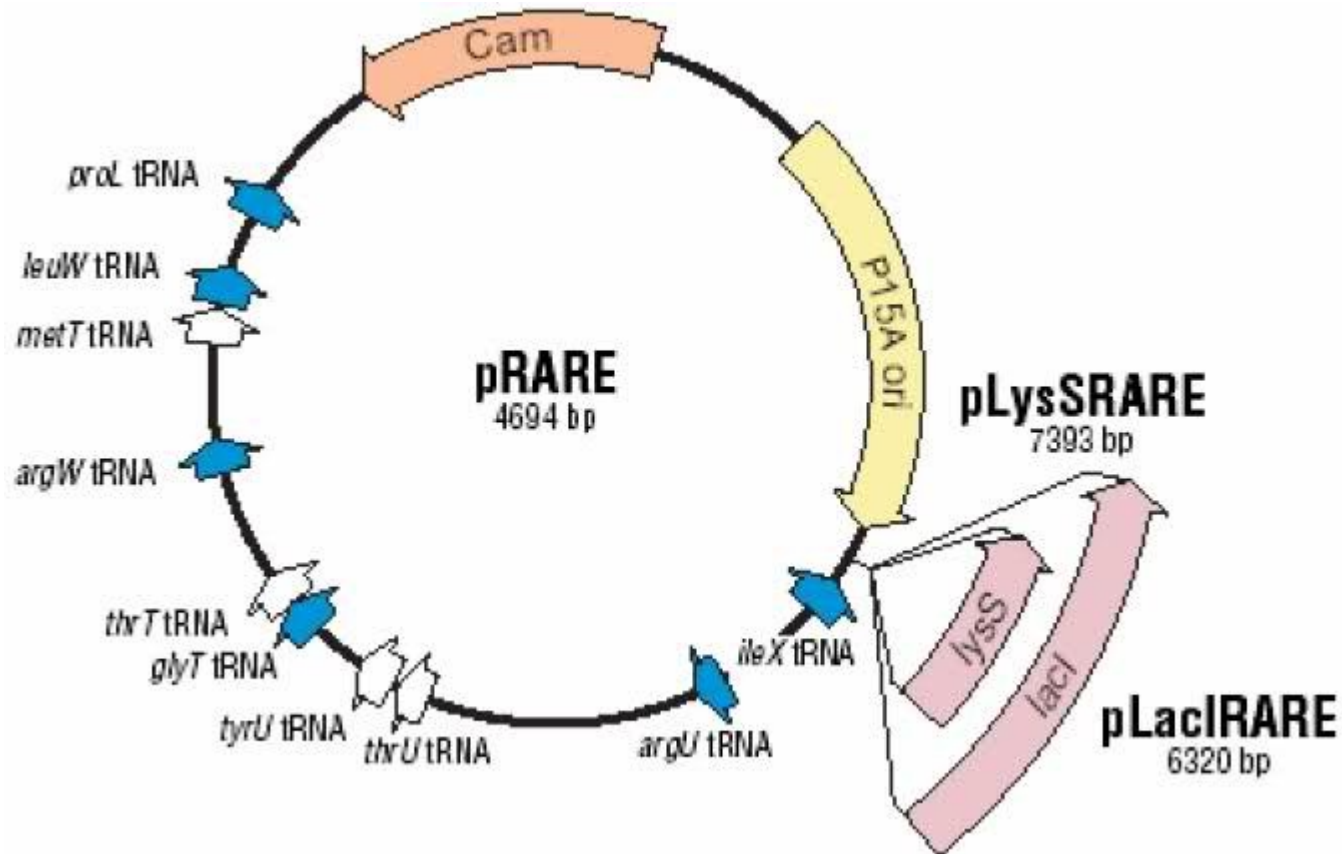
(c) Propensione per un codone



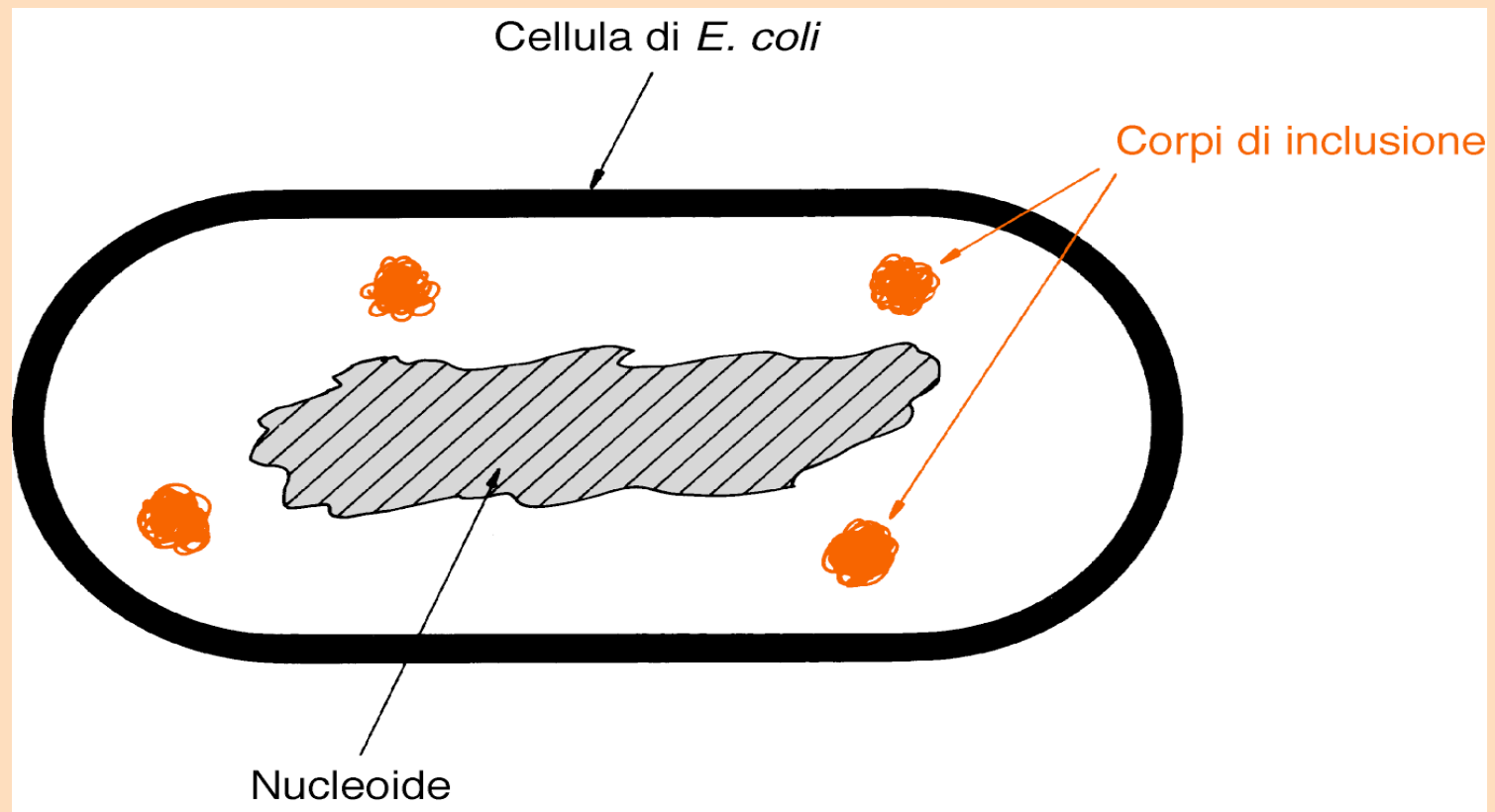
RISULTATO: *E. coli* ha difficoltà a tradurre i codoni della prolina di un gene umano

Per esprimere proteine in *E. coli* si deve partire da cDNA che rappresenta solo la sequenza codificante (senza introni).

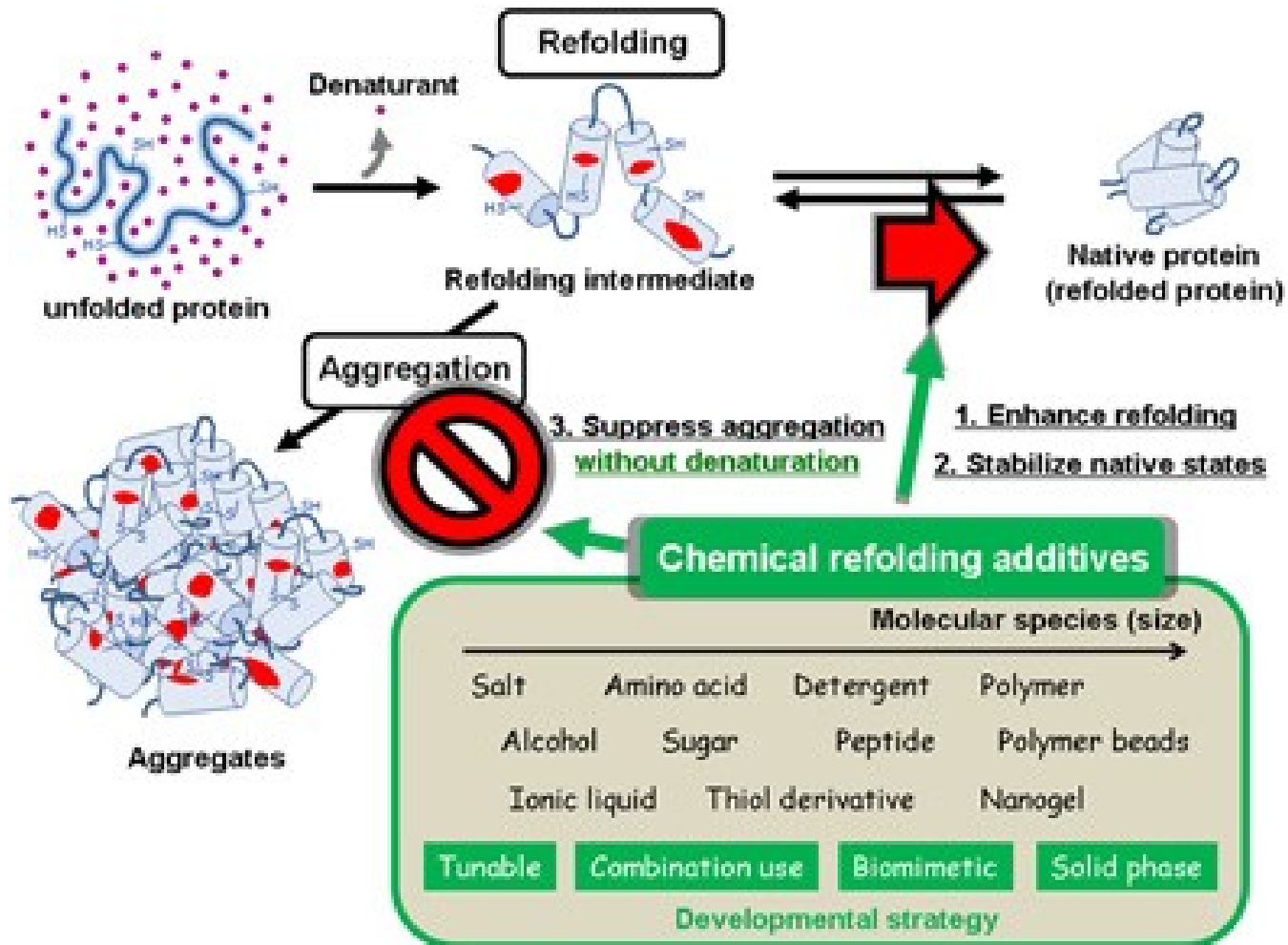
# Co-trasformazione con plasmide per codoni rari



Inoltre spesso la proteina espressa non si ripiega correttamente e si ritrova sotto forma di aggregati insolubili chiamati **corpi di inclusione**. Ciò è dovuto all'incapacità dei procarioti, in alcuni casi, di favorire il “folding” di proteine di origine eucariota.



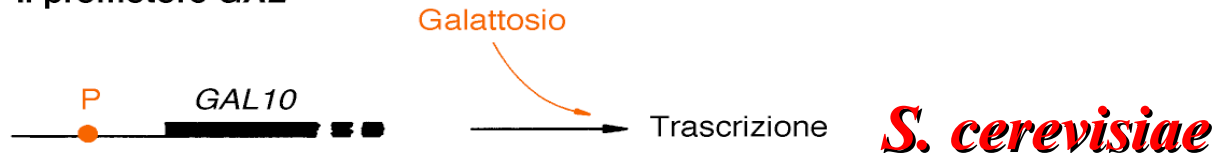
# Protein refolding



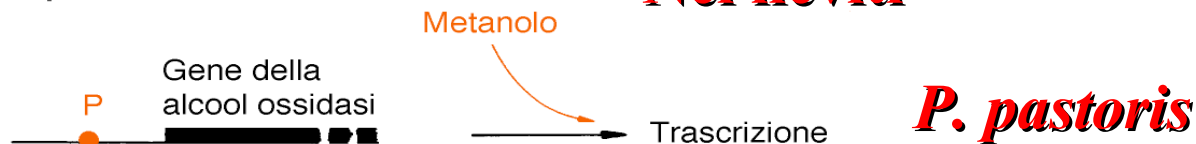
# Espressione in organismi eucarioti inferiori

Si utilizzano promotori inducibili di geni eucarioti

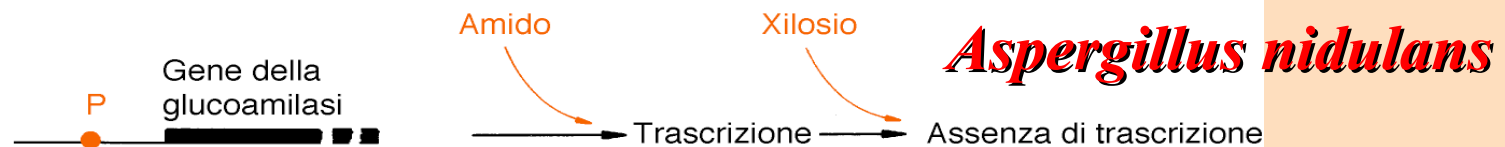
(a) Il promotore *GAL*



(b) Il promotore *AOX*



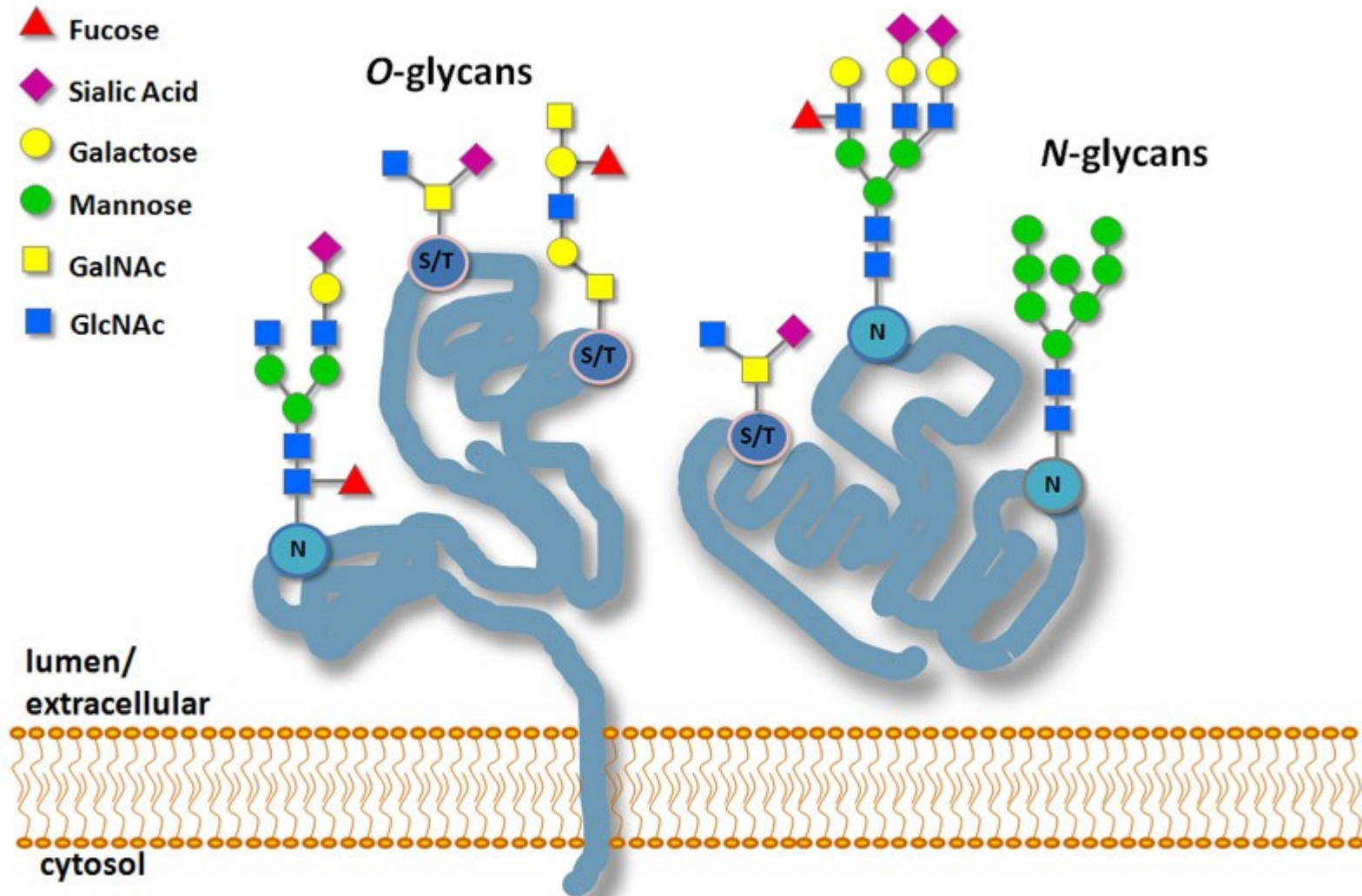
(c) Il promotore della glucoamilasi



(d) Il promotore della cellobioidrolasi

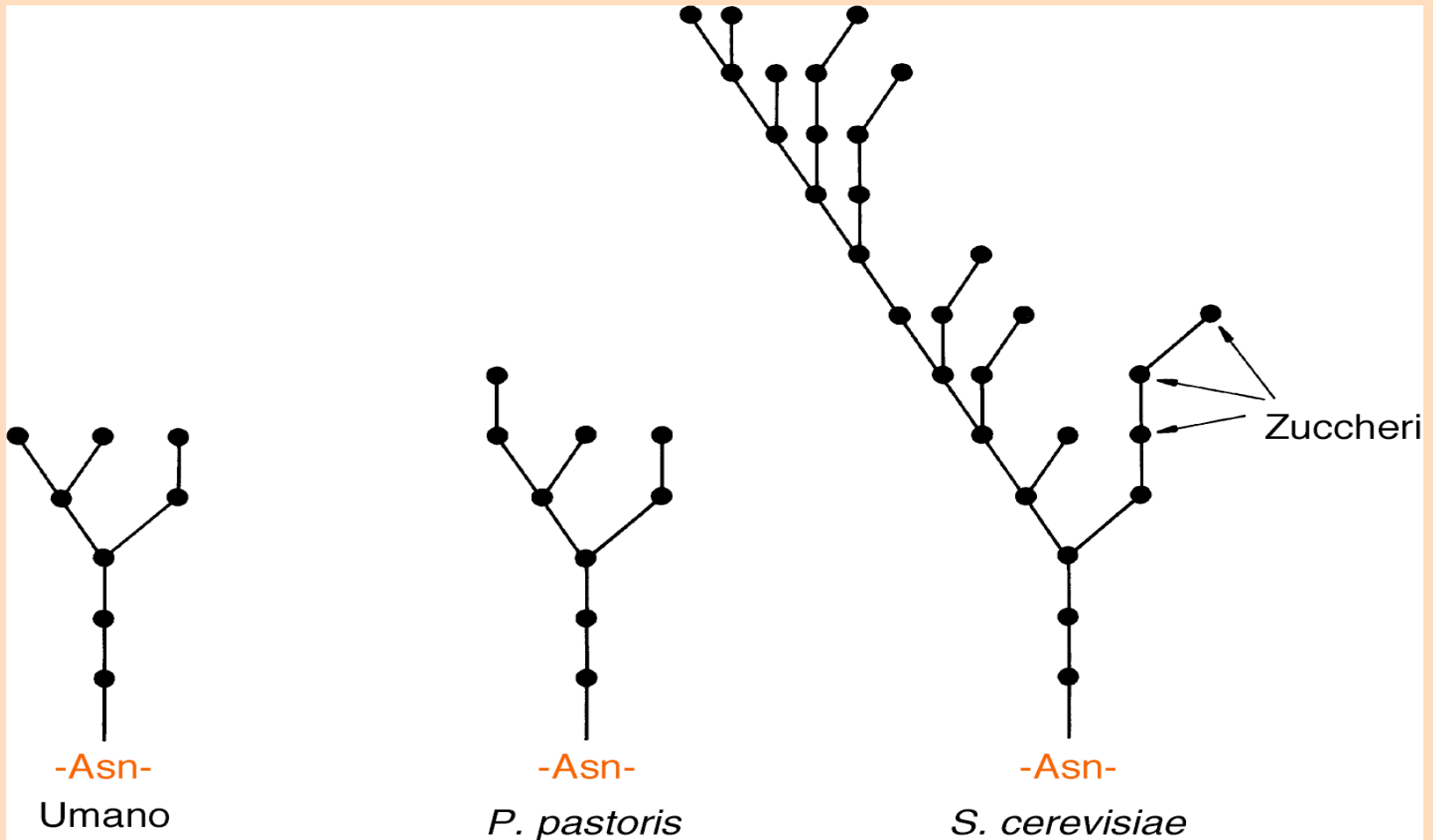


# Modifiche post-traduzionali (es glicosilazione)



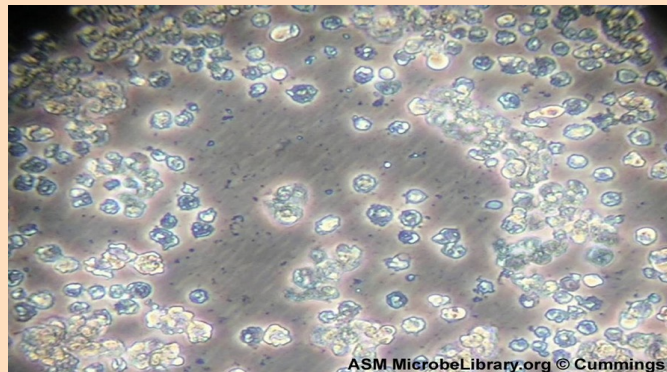
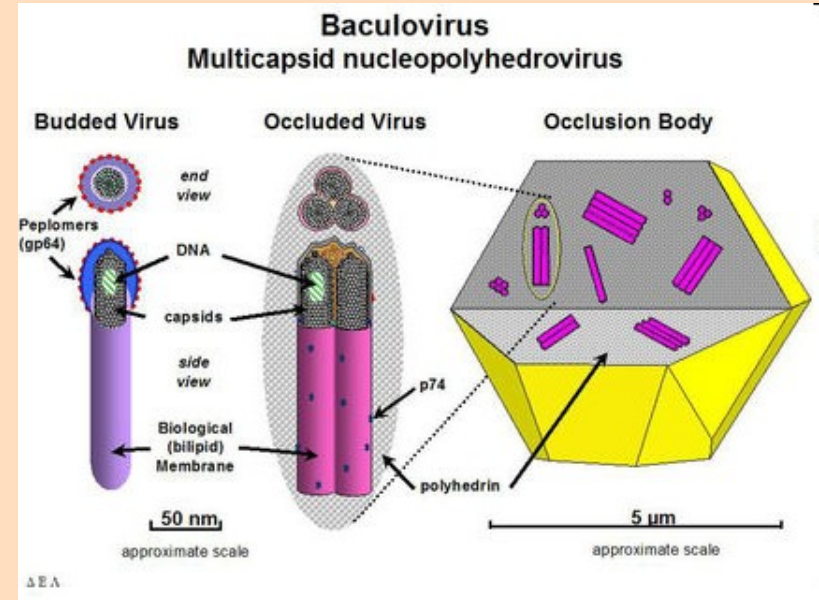


I sistemi di espressione eucarioti permettono di ottenere le **modifiche post-traduzionali** (es. fosforilazione, glicosilazione ecc.) anche se a volte con risultati leggermente diversi tra i vari organismi

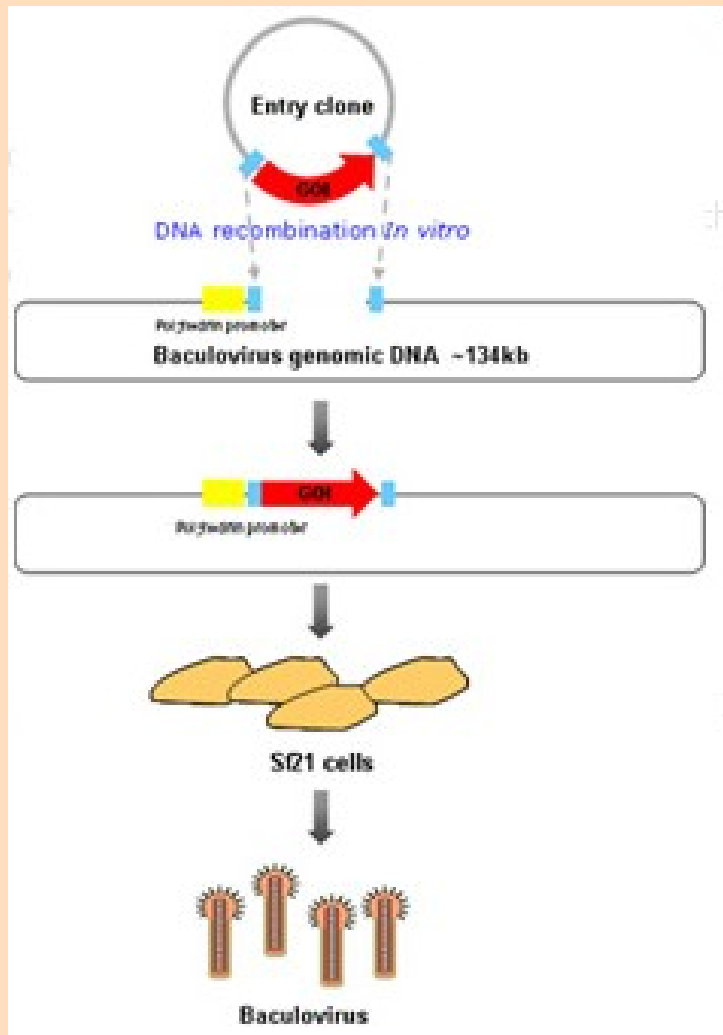


# Espressione in cellule animali

Il sistema più comune utilizza cellule di insetto infettate con baculovirus.



Si utilizzano **baculovirus** modificati con il gene di interesse e si infettano cellule di insetto in coltura che produrranno la proteina di interesse

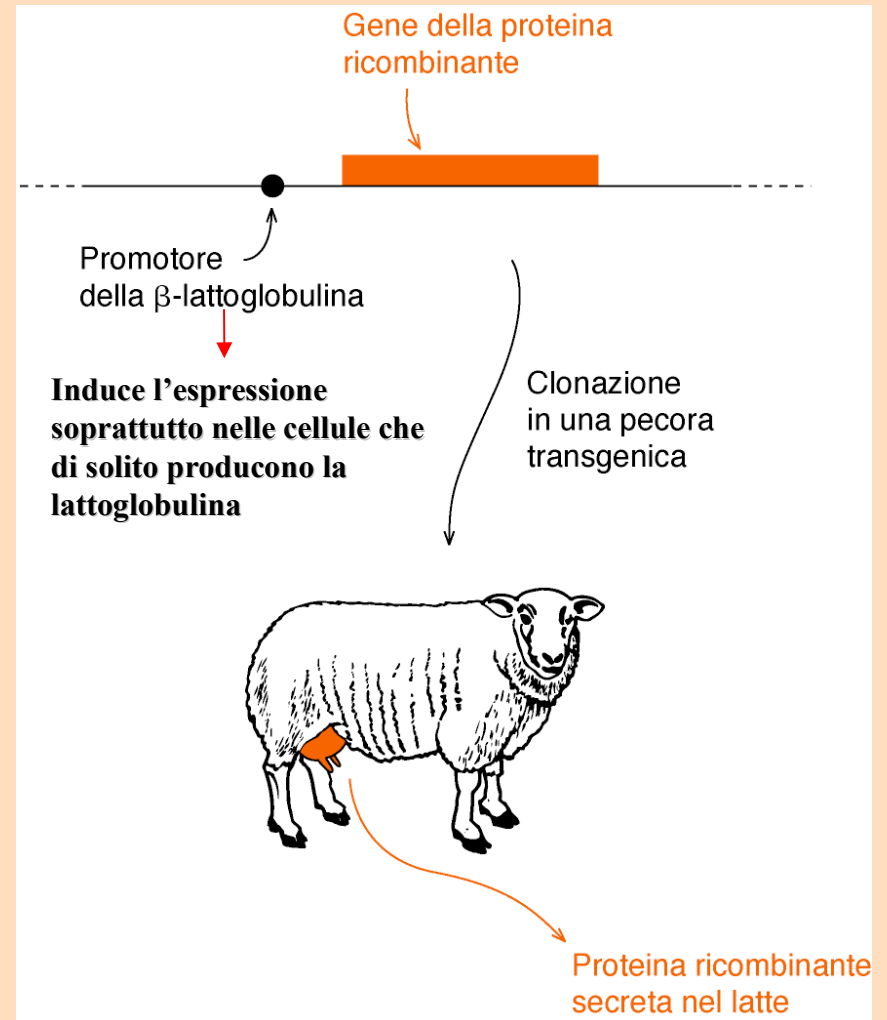
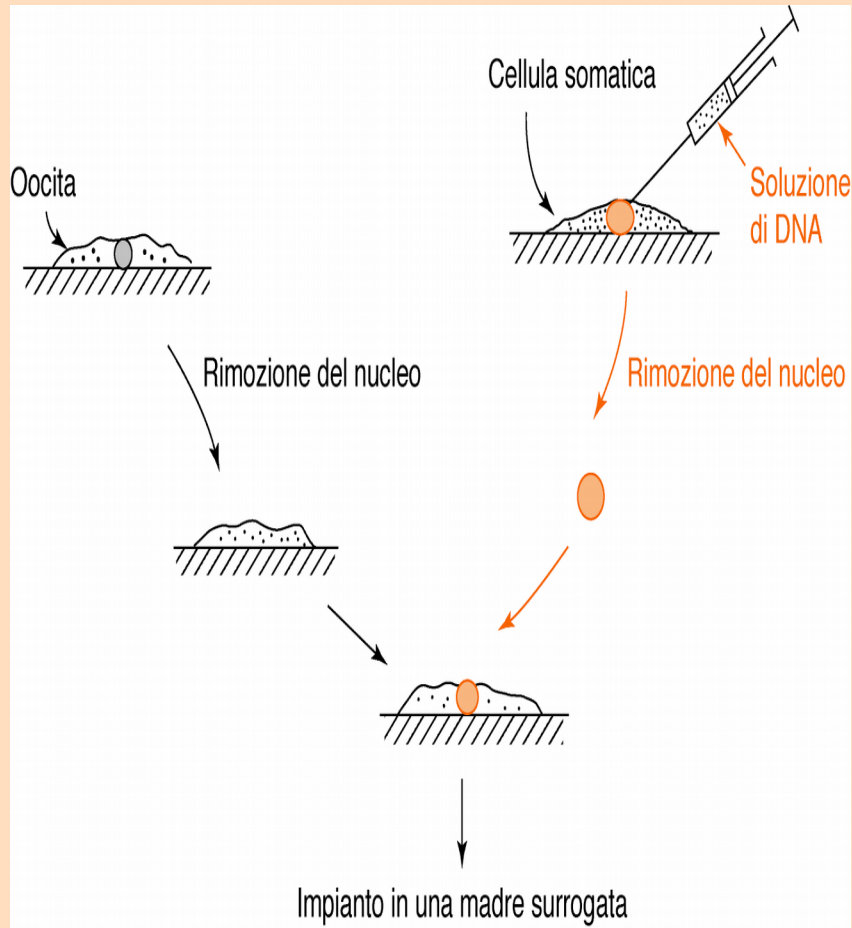


cellule di insetto infette contenente i  
granuli poliedrici del virus



# Espressione *in vivo* in animali

## Clonazione di un animale



# **SDS PAGE**

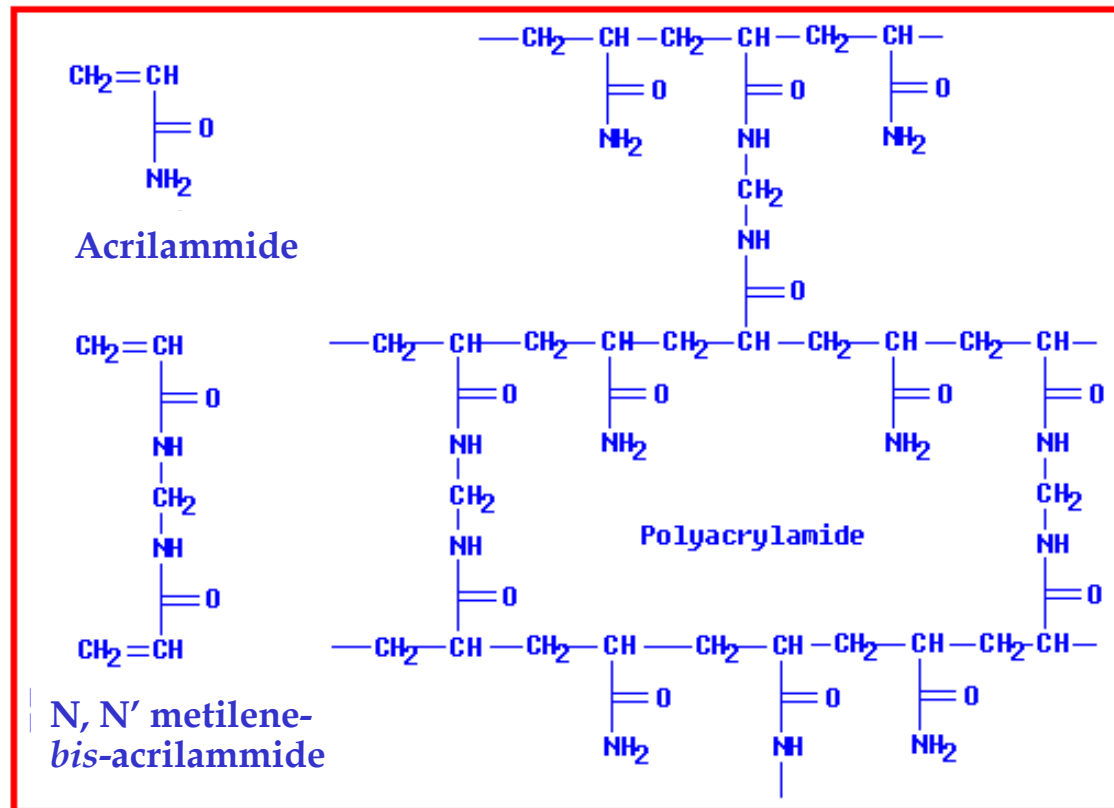
**Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis**

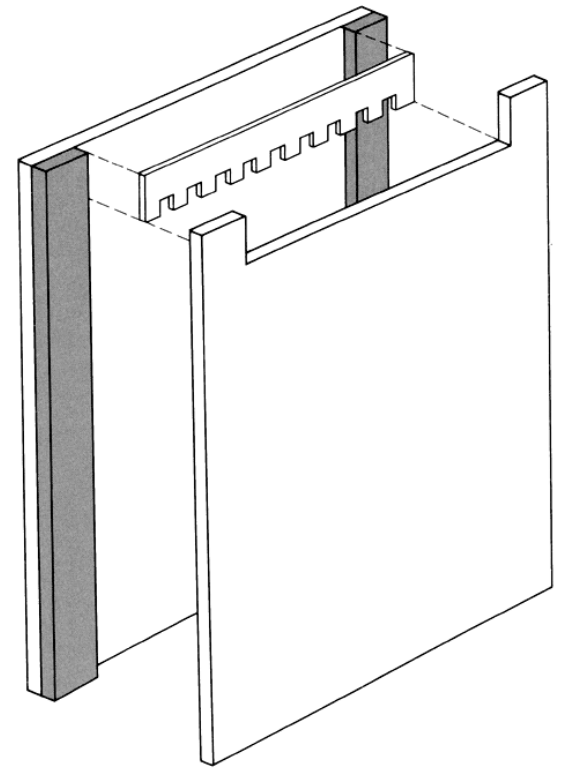
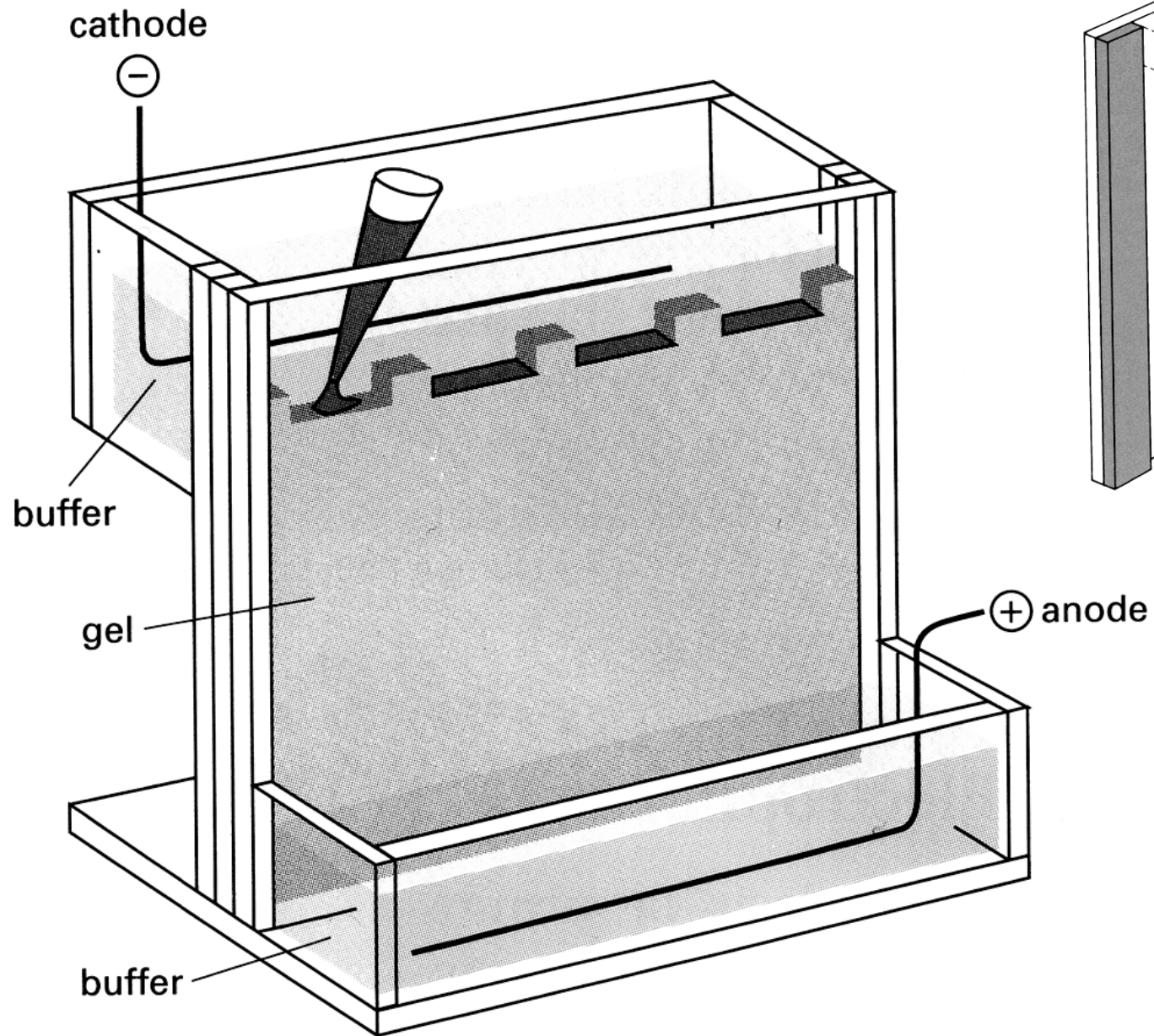
# Elettroforesi su gel di Poliacrilamide

Utilizzato prevalentemente per la separazione di proteine.

I gel sono preparati facendo polimerizzare monomeri di acrilammide in presenza di piccole quantità di N,N' metilenbisacrilammide.

La polimerizzazione inizia con l'aggiunta di ammonio persolfato (APS) e N,N,N',N'-tetrametiletilenediamine (TEMED).





# Porosità del PAG

Dipende da:

$$C = b \times 100 / (a + b) \quad [\%]$$

$$T = (a + b) / V \quad \times 100 \quad [\%]$$

a = acrilammide

b = metilenbisacrilammide o BIS



# Concentrazioni di **acrilammide** e intervalli di **pesi molecolari**

15 %	12.000 - 45.000
10 %	15.000 - 70.000
5 %	25.000 - 200.000
3 %	fino a 1.000.000

# **Elettroforesi su gel di poliacrilamide**

- **Nativa**

- **denaturante**

# Trattamento del campione

## SDS

denatura le proteine (stessa forma a “bastoncino”)  
conferisce la stessa densità di carica (negativa)

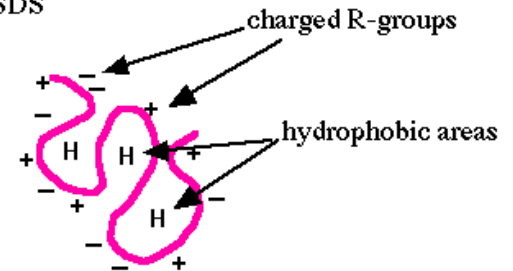
$\beta$ -Mercaptoetanololo  $\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

rompe eventuali legami disolfuro

Temperatura (100 °C)

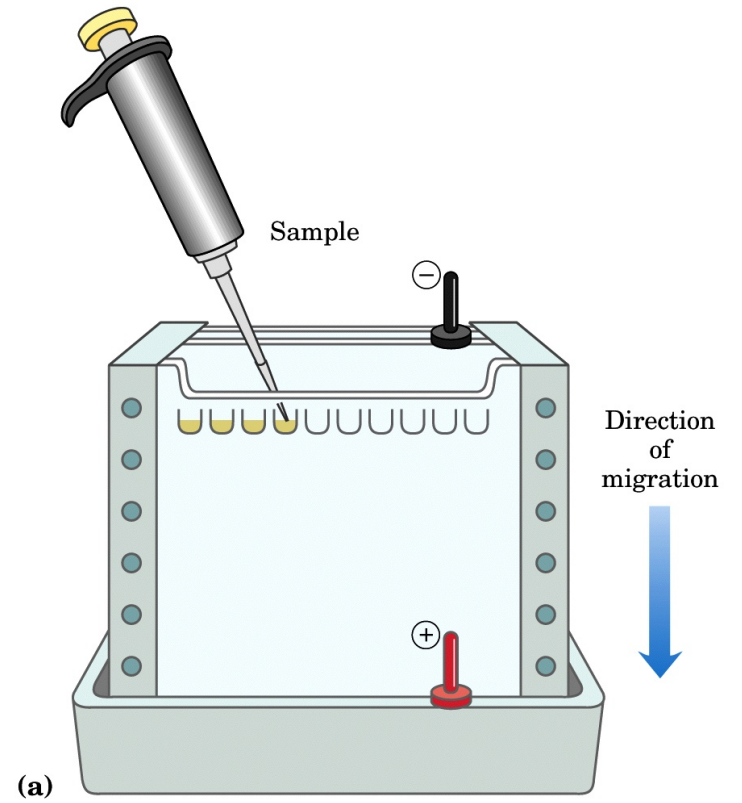
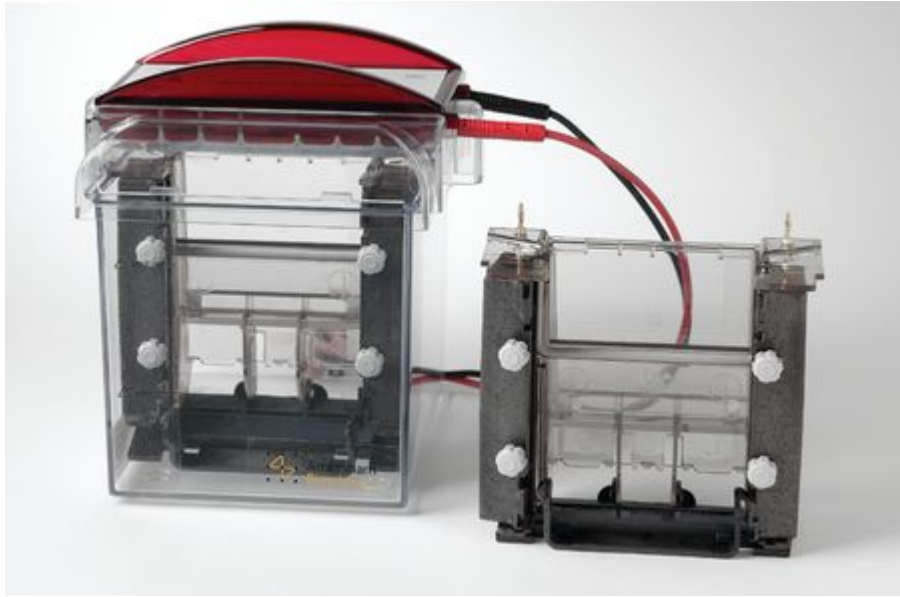
accelera la denaturazione completa

BEFORE SDS



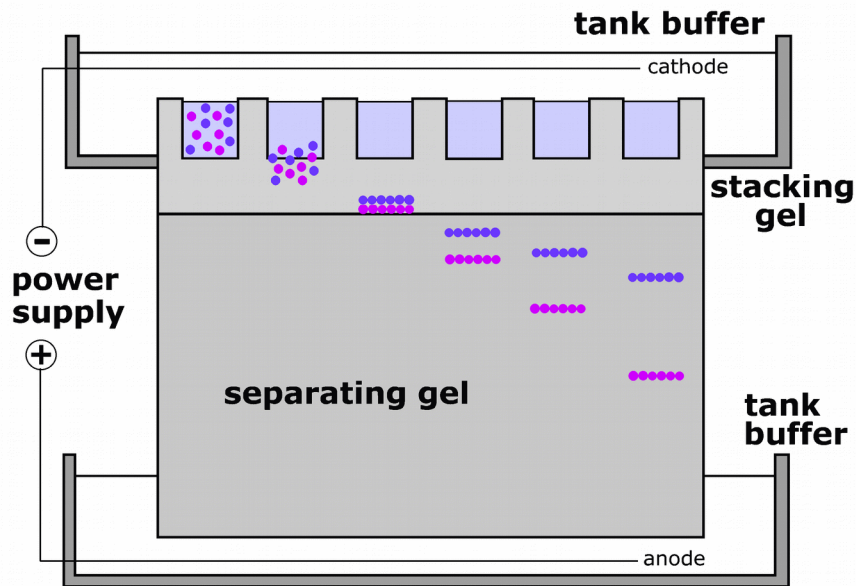
AFTER SDS





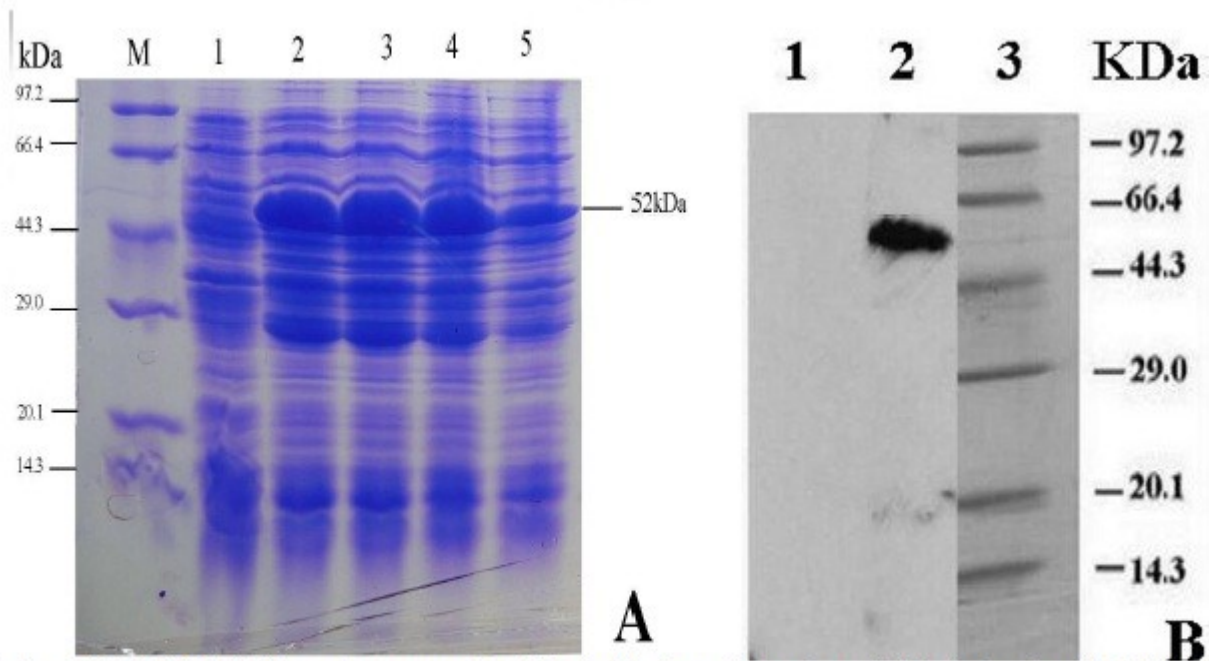
## SDS-PAGE discontinua

Il gel e' funzionalmente diviso in due parti: stacking gel e running gel.



La disc-elettroforesi si fa usualmente verticale con il catodo in alto, così che le proteine migrano verso l'anodo in basso. Il tampone contenuto nelle due riserve è identico.

Le proteine (in SDS e  $\beta$ -mercaptoetanolo) vengono caricate in un pozzetto. La maggior densità fa sì che non si mescoli con il tampone della corsa. Le proteine vengono quindi concentrate nello stacking gel e separate nel running gel. In genere, nella soluzione di proteine si inserisce un colorante "tracciante" per poter fermare la elettroforesi al massimo della sua risoluzione



**Figure 9.** Analysis of SDS-PAGE (A) and western blot (B) A: M. Protein marker; 1. Un-induced with IPTG; 2, 3, 4, and 5: induced for by IPTG; B: 1, pGEX5x-1+BL21; 2, pGEX5x-1-xyn8+BL21; 3.