

- Le finalità di produrre proteine ricombinanti in modelli cellulari sono molteplici:
 - **velocizzare e studiare le funzioni della proteina di interesse**
 - **visualizzare gli effetti di espressione di una forma mutata della proteina di nostro interesse**
 - **produrre la proteina di nostro interesse in grandi quantità per applicazioni**

Come si può produrre proteine ricombinanti?

La sequenza codificante della proteina viene clonata all'interno di un vettore di espressione. I vettori più utilizzati sono i **plasmidi**, manipolati ai fini del clonaggio di una sequenza genica di interesse, che poi sarà **trasferita** all'interno di un modello cellulare. I modelli cellulari possono essere di tipo **procariontico**, come i **batteri** (tra cui *E. Coli* è quello più utilizzato) o di tipo **eucariotico**, come cellule di **lievito**, di **mammifero** e di **insetto** (in base alle applicazioni).

Un **vettore di clonaggio** ha chiaramente lo scopo di produrre più copie del DNA di interesse. Invece, un **vettore di espressione** mira ad esprimere una determinata proteina di interesse; il secondo può inoltre servire ai fini del clonaggio.

Fasi del clonaggio

1. scelta del vettore da utilizzare per il clonaggio;
 2. analisi del polylinker, sequenza contenente siti unici di riconoscimento per enzimi di restrizione, in cui inserire il DNA esogeno.
 3. digestione del vettore (polylinker) e del DNA di interesse con gli stessi enzimi di restrizione, così da creare estremità coesive.
 4. il DNA esogeno e il plasmide vengono lardati e fissati ad opera di ligasi.
5. inserimento del vettore ricombinante nella cellula batterica
6. i plasmidi ricombinanti vanno cresciuti su gel di agarosio;
 7. vengono plottati su un mezzo contenente antibiotico che permette di distinguere le cellule batteriche che hanno ricevuto il plasmide ricombinante (in cui è presente appunto il gene di resistenza all'antibiotico).
 8. è possibile proseguire con amplificazione di queste cellule.
 9. Recupero delle colonie cresciute su terreno selettivo;
 5. purificazione del DNA plasmidico e valutazione dell'avvenuto clonaggio.

Procedura di clonaggio dove abbiamo un vettore plasmidico, con un sito di restrizione che può essere scelto ai fini del clonaggio. Il sito è scelto all'interno del polylinker e in questo modo il DNA di interesse può essere digerito con specifici enzimi di restrizione e clonato all'interno del plasmide. Dopo di che si ottiene il DNA ricombinante, prodotto in seguito a legame ad opera di una ligasi, che salda le estremità coesive del DNA inserito. In questo modo possiamo inserire il plasmide ricombinante all'interno di una cellula, che poi moltiplicandosi consentirà il clonaggio del DNA di nostro interesse. Possiamo usare dei terreni selettivi per selezionare le cellule che hanno ricevuto il plasmide ricombinante ed amplificarle a nostro piacimento.

Queste sono le fasi sia ai fini del clonaggio semplice (vettori di clonaggio) sia ai fini dell'espressione di una proteina di interesse (vettori di espressione).

Caratteristiche di un plasmide ottimale

- lunghezza variabile da 3 a 40 kb.
- la presenza di un buon numero di siti unici di restrizione ("ricco" polylinker) è molto utile perché ci consente di poter clonare in modo specifico il frammento di DNA di nostro interesse.

Vettori di espressione

Hanno come scopo oltre al clonaggio, quello di **esprimere una proteina da un gene clonato**.

Le caratteristiche dei vettori di espressione sono in parte simili a quelle dei vettori di clonaggio.

- Entrambe le tipologie di vettori presentano infatti:
 - **sito di clonaggio (CS)**, ovvero una regione in cui è inserito il DNA di interesse ai fini dell'espressione;
 - una sequenza regolatrice detta "**promotore**" (p) che guida la trascrizione della sequenza del DNA di interesse inserito;
 - una sequenza di **terminazione (T)** della trascrizione.

In questo modo è possibile clonare la sequenza di nostro interesse e poi regolare l'espressione per mezzo del promotore.

Nei vettori di espressione **eucariotico** è necessario che ci sia un'origine di **replicazione procariontica** di *E. Coli* (oriE), sia quella di **replicazione eucariotica** (oriuk).

È infatti più semplice e più rapido eseguire procedure di clonaggio in procarionti (le cellule batteriche si duplicano in 20 minuti, quelle di mammifero in 24 ore). In tal modo è possibile ottenere una grande biomassa di queste cellule, da cui estrarre il DNA plasmidico clonato di nostro interesse. A questo punto è possibile inserirli in un modello cellulare eucariotico, in cui sarà duplicato (grazie alla presenza di oriuk) e poi espresso. Il promotore consente la trascrizione del gene di interesse.

Un vettore di espressione è presente anche una regione che codifica per un **marker di selezione eucariotico** (ESM) che consente di selezionare le cellule che hanno ricevuto il plasmide ricombinante. Generalmente si tratta di un **marker** che codifica per la **resistenza ad un antibiotico**, per cui se poniamo le nostre cellule in un terreno contenente antibiotico, cresceranno solo quelle che hanno ricevuto il plasmide ricombinante che contiene la sequenza codificante per la resistenza all'antibiotico. Le cellule si moltiplicano in un apposito terreno di coltura e, raggiunta la biomassa desiderata, viene estratto il DNA ricombinante che potremmo utilizzare per l'espressione in cellule eucariotiche.

Questi sistemi di espressione sono detti di tipo **"shuttle"** perché sono utilizzati sia nei sistemi procarionti, sia in quelli eucariotici.

Elementi essenziali dei vettori di espressione

- sito multiplo di clonaggio (MCS) o Polylinker
- promotore
- origine di replicazione del DNA
- marker di selezione
- sequenze di terminazione della trascrizione
- elementi inducibili (vedi Effetti secondari) – ci consentono di esprimere il nostro vettore solo in seguito ad uno specifico stimolo da noi stessi generato
- elementi stabilizzanti e ottimizzanti
- code per la purificazione (o tag) – è una sorta di etichetta che ci consente di identificare più facilmente la proteina di nostro interesse e permetterne la purificazione.

Fattori che influenzano i livelli di espressione di un gene clonato

- forza del promotore
- terminazione della trascrizione
- numero di copie del plasmide
- stabilità del plasmide
- fisiologia della cellula ospite
- sequenze al sito di inizio della traduzione
- scelta dei codoni
- struttura dell'mRNA

Effetti secondari

- Per massimizzare l'espressione di un gene clonato, non è sufficiente scegliere il **promotore più forte** possibile.
- A volte la proteina di interesse presente in un modello cellulare può risultare molto tossica e se venisse espressa fin dall'inizio provocherebbe la morte di tutte le cellule e non si otterrebbe una biomassa significativa.
- In questo caso è importante l'utilizzo di **vettori di espressione contenenti elementi inducibili** (esempio promotori inducibili) che appunto inducano l'espressione della proteina di interesse solo quando la biomassa raggiunge i livelli desiderati. A questo punto le cellule moriranno, ma noi avremo raggiunto lo scopo di ottenere quella proteina in grandi quantità.

SISTEMI DI ESPRESSIONI EUCARIOTICI

I sistemi di espressione eucariotici possono essere diversi e i criteri di scelta sono dettati dalle finalità che ci prefiggiamo. Posso essere sistemi a base di lievito, tra cui *S. cerevisiae* è uno dei più utilizzati.

Proteine ricombinanti prodotte dai sistemi di espressione a base di **Saccharomyces cerevisiae**.

- I prodotti di espressione ottenuti utilizzando il lievito in particolare *S. cerevisiae*, sono:
 - **vaccini**, ad esempio l'antigene di superficie dell'epatite B;
 - **prodotti** che possono avere **applicazioni diagnostiche**, ad esempio la proteina del virus dell'epatite C, la quale può essere prodotta per mezzo di approcci basati su tecniche di DNA ricombinante e viene utilizzata per diagnosticare eventuale presenza del virus dell'epatite C.
 - **prodotti** che possono avere **applicazioni terapeutiche** per l'uomo tra cui **Insulina**, la quale può essere ottenuta per via ricombinante clonando il gene dell'insulina e poi facendola esprimere in sistemi procarionti o eucariotici.

È bene utilizzare sistemi eucariotici, e non procarionti, ai fini dell'espressione di una proteina di interesse perché, se da un lato i sistemi procarionti sono più flessibili per clonaggio ed espressione di una proteina, dall'altro non è sempre possibile utilizzare sistemi procarionti, le proteine di interesse necessitano di **modifiche post tradizionali** che non possono avvenire in sistemi procarionti. Si deve in questo caso ricorrere per forza a sistemi eucariotici se si vuole produrre la proteina di interesse in modo che risulti funzionale.

Un modello di vettore di espressione in *S. cerevisiae*.

- Sono presenti sequenze caratteristiche tra cui:
 - il **promotore**
 - il **polylinker** dove viene clonato il vettore di interesse che in questo caso è il cDNA della **superossidodismutasi 1** (detta anche Cu/Zn-SOD), un enzima antiossidante importantissimo che può essere prodotto per via ricombinante clonando il cDNA nel polylinker di questo vettore di espressione sotto il controllo di uno specifico promotore e con la **terminazione di trascrizione** specifica.
 - le sequenze "**marker di selezione**" (LEU2) che consente la crescita del lievito su un terreno privo di leucina (le cellule che non hanno questo vettore non **cresceranno** su un terreno privo di leucina) e in questo modo possiamo effettuare la selezione delle cellule che hanno ricevuto il vettore ricombinante.
 - un'origine di replicazione procariontica di *E. coli* (oriE)
 - un marker di selezione procariontico (ampic) poiché il clonaggio della sequenza di DNA di nostro interesse viene generalmente effettuato in sistemi procarionti, poiché questi ci offrono il vantaggio di poter ottenere rapidamente quantità elevate di cloni di DNA ricombinante che poi introdurremo nelle cellule di lievito.

Un altro sistema di espressione basato sulle cellule di lievito.

È basato su **Pichia pastoris** che ha dei suoi vantaggi rispetto a *S. cerevisiae* ed è stato adoperato per produrre l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg). In questo caso il prodotto ricombinante può essere utilizzato come un vaccino.

La sequenza codificante per l'antigene di superficie dell'epatite B è stata clonata tra il **promotore AOX1** e la **sequenza di terminazione 3'-AOX1 dell'alcol ossidasi 1**.

Questo poi viene veicolato all'interno delle cellule di lievito e, grazie alla presenza di sequenze omologhe all'estremità del costrutto (tra cui il promotore e la sequenza di terminazione dell'alcol ossidasi 1), avviene una ricombinazione omologa con il DNA genomico del lievito, dove è presente il gene dell'**alcol ossidasi 1** (gene AOX1) e al suo posto viene inserito il costrutto ricombinante codificante per la proteina di interesse, in questo caso **l'antigene dell'epatite B**.

In tal modo il vettore viene integrato nel genoma della cellula ospite. Pichia pastoris è questo sistema codificante per tutte le proteine del lievito e in più per la proteina ricombinante che abbiamo inserito. Il gene dell'AOX1 viene disattivato (L'AOX1 non viene più prodotto e questa inattivazione può essere vantaggiosa ai fini dell'espressione della proteina di interesse. L'AOX1 serve per metabolizzare il metanolo, per cui le cellule che contengono AOX1 possono crescere in un terreno in cui è presente metanolo. L'inattivazione dell'AOX1 non consente alle cellule di crescere in questo tipo di terreno (il professore invita ad approfondire qual è la soluzione in questi casi).

Sempre in Pichia pastoris è stato visto un altro esempio:

In questo caso il **genoma** della cellula ospite presenta un **difetto nel gene HIS4** che può essere corretto grazie all'inserimento di DNA ricombinante che porta una sequenza corretta di questo gene. Le cellule ricombinanti possono crescere su un terreno privo di istidina.

I sistemi di espressione basati su cellule di insetto in cultura

Sono sistemi di espressione molto utilizzati per specifiche applicazioni. È utile ricorrere a cellule di insetto come quelle di *Baculovirus* perché alcuni prodotti ricombinanti necessitano di modifiche **post tradizionali** che non possono avvenire in sistemi inferiori come le cellule di lievito. Anche qui la procedura è identica, con accorgimenti che hanno consentito di perfezionare le procedure (e i sistemi precedenti) in questi precedenti: un sito di clonaggio multiplo (mcs) dove sono presenti siti di restrizione multipli, all'interno di tale sito di clonaggio è possibile clonare la sequenza di DNA di interesse che sarà sotto il controllo di un promotore e seguita da un sito di poliadenilazione (o di terminazione della trascrizione). In questo modo il costrutto sarà espresso.

Le operazioni di clonaggio avvengono sempre in un sistema **procariontico**, infatti è presente l'oriE di *E. coli* e un marker di selezione procariontico (ampic). Una volta clonato il costrutto ricombinante, sarà possibile trasferirlo in **modelli cellulari di mammifero** attraverso la tecnica di **trasfezione cellulare**. Le cellule di mammifero che avranno ricevuto il DNA ricombinante potranno esprimerlo e noi potremo selezionare le cellule di mammifero che sono state trasformate con il costrutto di DNA ricombinante grazie alla presenza di un marker di selezione eucariotico. I vari fattori devono essere presi in considerazione ai fini di un clonaggio e di una espressione efficace e sono gli stessi che abbiamo già visto per gli altri sistemi: promotore, marker di selezione e code di fusione.

L'espressione coordinata di DHFR e di una proteina ricombinante

Si può avere un costrutto di espressione che consenta l'espressione di un gene e che darà origine alla corrispondente proteina e poi sistemi che ci consentiranno di selezionare le cellule con il costrutto ricombinante e che produrranno la proteina ricombinante di interesse.

Gli approcci possono essere diversi.

- Sistema di espressione a due vettori.
 - A volte le proteine sono costituite da due subunità, **a** e **b**, che devono associarsi per dare origine ad una proteina funzionale, per cui è importante produrre entrambe le subunità che sono codificate da geni diversi.
 - È utile usare un **sistema di espressione a due vettori**, ciascuno dei quali produce una subunità della proteina.
 - È possibile ottenere la stessa cosa utilizzando un **sistema di espressione a due geni**.
 - Oppure utilizzare un **costrutto unico** che contiene le sequenze codificanti per le due proteine di interesse. Il vantaggio è che le quantità di prodotti proteici (corrispondenti alle due subunità) saranno equivalenti. Questo approccio non è sicuro al 100% perché abbiamo due sequenze di espressione e i livelli di messaggero del primo gene potrebbero essere diversi da quelli del secondo, e la stessa cosa vale per la traduzione del primo messaggero rispetto al secondo per cui i livelli di espressione delle due subunità potrebbero essere diversi.
 - Questo problema potrebbe essere risolto utilizzando un sistema di **espressione dictronica**.

In un vettore di espressione dictronico c'è un'unica sequenza che codifica per le due subunità intercalate da una Internal Ribosome Entry Site (IRES) che consente di produrre quantità uguali delle due subunità della proteina dimerica.

Ci sono altre applicazioni dei sistemi di espressione eucariotici e delle limitazioni quali la scelta del modello cellulare per l'espressione delle proteine di interesse è dettata da criteri volti a far risultare la proteina funzionale, oppure altri criteri sono studiare le funzioni di una proteina in un determinato modello cellulare.

I vettori virali

Anche i vettori virali possono essere dei sistemi che consentono di esprimere proteine di interesse con elevata efficienza e possono avere applicazioni molteplici tra cui la terapia genica.

Nell'approccio di **terapia genica ex vivo**, in cui le cellule di un paziente possono essere espianate, manipolate per la realizzazione di un costrutto codificante per il gene normale, in un contesto di cellule che presentavano il gene mutato. Queste cellule possono essere reimpiantate per far sì che la funzione deficitaria possa essere corretta. I vettori virali per l'espressione di proteine sono caratterizzati da particolari sequenze che possono essere manipolate per raggiungere lo scopo finale, che è quello di evitare che il virus possa generare effetti patologici, ma possa servire solo da vettore per veicolare il gene di interesse. Tutte le sequenze potenzialmente patologiche vengono eliminate. Il gene di interesse è la sequenza codificante per il gene che viene espresso nei sistemi bersaglio cellulari.