

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Biologia Cellulare, Molecolare e Industriale.  
Ciclo XXI

“Microbiologia e Biotecnologie Industriali “

**Settore scientifico disciplinari di afferenza:** Bio\19

“Autoinduzione dell’espressione genica  
per la produzione di proteine ricombinanti  
nelle fermentazioni industriali”

Presentata da: **dott. Salvatore Nocadello**

Coordinatore Dottorato

**Prof. Alejandro Hochkoepler**

Relatore presso  
Università degli studi di Bologna

**Prof. Diego Matteuzzi**

Correlatore presso  
Novartis Vaccines and Diagnostics

**Dott. Erwin Swennen**

Esame finale anno 2009

## **Abstract**

The use of recombinant gene expression for industrial protein production since the early 1970s has become a multi-billion industry. One of the most popular production organisms is the gram-negative bacterium *Escherichia coli*, which is regularly used for high-level production of both prokaryotic and eukaryotic proteins. However, in spite of the extensive knowledge on the genetics and molecular biology of *E. coli*, not every gene can be expressed “efficiently” in this organism. After many years of intensive research, it has become a general assumption that no universal expression system can exist for high-level industrial production of any given recombinant gene. Fortunately, some empirical “rules” that can guide the design of expression systems and limit the unpredictability of this operation in *E. coli* have emerged. Among these, tight regulations of a promoter in the inducible systems allow a fast cell growth to high density followed by induction of the promoter. So, they solve problems such as increased segregational and structural instability and to growth inhibition respect to constitutive expression. Induction is in many cases less favorable due to the high cost of inducers, incompatibilities with industrial scale-up or detrimental growth condition demanding. For the most popular inducer, IPTG, there are also controversial reports on its toxicity which could seriously limit its use for therapeutic proteins production.

Foreign gene expression systems using autoinduction (or self-induction) have the advantages of both constitutive and inducible expression systems: they respond to endogen or induced metabolic changing during the growth such as stationary growth, pH, oxygen levels and osmolarity, but frequently link to detrimental condition to cell growth.

We focus the attention on this class of expression system and consider a mechanism of Quorum Sensing as a regulative control of protein expression. We have built the pLAI system for recombinant protein production in *E. coli*, based on the regulative gene of *lux* regulon for bioluminescence control of gram-negative marine bacterium *V. fischeri*. It is

composed of the activator LuxR, a cis-acting DNA inverted repeat called the lux box, and the signal molecule N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone (3OC6-HSL). The signal, which is synthesized by the bacterial LuxI enzyme from common precursor in the cell as 3-oxo-hexanoyl-acyl carrier protein and S-adenosyl methionine. It diffuses freely the cell-membrane and complexes with LuxR protein only at high population density corresponding to a critical HSL concentration. The HSL±LuxR complex then binds to an operator sequence in the lux operon to stimulate transcription of recombinant gene from  $P_{luxI}$  promoter.

A series of plasmids carrying same suitable features concerning specially with protein expression vector were design and built by cloning and PCR assembling.

Using *gfp* as reporter gene, the expression system regulation in *E. coli* to different growth condition was attested. It show that different glucose concentration by catabolic repression and the pH control of the growth by pH-dependent stability of 3OC6-HSL, can regulate the induction and the rate of expression under different growth condition, making it extremely flexible for different protein production needs.

Different approaches have been developed to tighten the control of gene expression. By the sequence optimization of *luxR* and *luxI* for the expression in *E. coli*, the system is adapted to high level expression for recombinant protein production. The reduction of gene dosage of *luxI* by chromosomal integration is used to have a low basal expression level and a strong induction with tight control of gene expression. To amplify the response of the expression system to different cell density, from a PCR Random Mutagenesis mutant library of clones with a low expression at a low cell density and an increased fluorescence in induced condition were selected. The mutations are evaluated to consider there in an increased series of expression vector.



# INDICE GENERALE

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>I</b>
<b>INDICE DELLE FIGURE</b> .....	<b>VII</b>
<b>INDICE DELLE TABELLE</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
1.1 PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI.....	1
1.1.1 Sistemi di espressione disponibili tra procarioti ed eucarioti.....	2
1.2 ESPRESSIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI IN <i>E. COLI</i> .....	3
1.2.1 Gli elementi di un sistema di espressione.....	5
1.2.1.1 Promotori utilizzati per l'espressione in <i>E.coli</i> .....	7
1.2.1.1.1 Il "pET system".....	10
1.2.1.1.2 Il "pBAD expression system".....	11
1.2.1.2 Autoinduzione nel pET Expression System .....	14
1.2.1.3 L'origine di replicazione.....	16
1.2.1.4 Marcatori di resistenza .....	17
1.2.1.5 Terminatore trascrizionale .....	18
1.2.1.6 RNA messaggero.....	19
1.2.1.7 Ottimizzazione nell'utilizzo dei codoni .....	21
1.2.1.8 Tecnologia delle proteine di fusione e del taglio tramite proteolisi sito specifica .....	23
1.2.1.9 Ceppi ospiti di <i>E. coli</i> .....	25
1.2.1.10 Strategie per il design di sistemi di espressione finemente regolati.....	27
1.2.2 Risposta allo stress indotta dall'espressione della proteina ricombinante in <i>E. coli</i> .....	28
1.2.3 Fermentazioni industriali per la produzione di proteine di interesse terapeutico .....	29
1.3 INTRODUZIONE AL QUORUM SENSING .....	30
1.3.1 La bioluminescenza e la scoperta del QS in <i>V. fischeri</i> .....	32
1.3.2 Struttura e regolazione del regulone lux in <i>V. fischeri</i> .....	34
1.3.3 Modello molecolare della regolazione genica dipendente dalla densità cellulare. ....	37
1.3.3.1 LuxR.....	39
1.3.3.2 LuxI e HSL .....	41
1.3.4 Controllo gerarchico del QS in <i>V. fischeri</i> .....	42
1.3.5 Applicazioni del lux System .....	44
<b>2 SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>46</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>49</b>
3.1 PLASMIDI E CEPPI BATTERICI.....	49
3.1.1 Terreni e condizioni colturali.....	52
3.1.2 Estrazione DNA genomico.....	53
3.1.3 Estrazione DNA plasmidico.....	53
3.1.3.1 Minipreparazioni di DNA plasmidico da <i>E. coli</i> .....	53
3.1.3.2 Midipreparazioni di DNA plasmidico da <i>E. coli</i> .....	53
3.1.4 Reazioni di restrizioni .....	54
3.1.5 Deprotezione e precipitazione primer.....	54
3.1.6 Condizioni di PCR convenzionale.....	55
3.1.7 Assembling PCR.....	56

3.1.7.1	Sequenza MT .....	57
3.1.7.2	Sequenza MHTT.....	60
3.1.8	<i>Elettroforesi in gel di agarosio</i> .....	62
3.1.9	<i>Purificazione dei frammenti di DNA da gel</i> .....	63
3.1.10	<i>Reazioni di ligazioni</i> .....	63
3.1.11	<i>Preparazione e trasformazione di E. coli DH5a chimicamente competenti</i> .....	64
3.1.12	<i>Suclonaggio di geni</i> .....	64
3.1.13	<i>Costruzione dei plasmidi</i> .....	65
3.1.14	<i>Integrazione genomica di luxI</i> .....	67
3.1.15	<i>Southern blot</i> .....	68
3.1.16	<i>Estrazione proteica</i> .....	69
3.1.17	<i>Sds-page</i> .....	70
3.1.18	<i>Western blot</i> .....	70
3.2	MISURAZIONE DELLA FLUORESCENZA .....	71
3.2.1	<i>Saggio FACS</i> .....	72
3.2.2	<i>Saggio di fluorimetria in micropiastre</i> .....	72
3.2.3	<i>Random Mutagenesis PCR</i> .....	73
3.3	SAGGIO DEL 3OC6-HSL.....	74
3.4	PROCESSI BATCH .....	75
<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>76</b>
4.1	“PROOF OF CONCEPT” .....	76
4.2	DESIGN DEL VETTORE DI ESPRESSIONE .....	79
4.3	REPRESSIONE DEL CIRCUITO DI AUTOINDUZIONE .....	80
4.4	MODULAZIONE DELL’ESPRESSIONE DIPENDENTE DAI MEZZI COLTURALI E DALLA REPRESSIONE CATABOLICA SUL SISTEMA DI ESPRESSIONE PLAI .....	82
4.4.1	<i>Diverse formulazioni di terreni per regolare l’induzione e la rata di espressione</i> .....	83
4.4.2	<i>Chiusura del sistema in condizioni non indotte</i> .....	86
4.5	OTTIMIZZAZIONI DELLE SEQUENZE .....	87
4.6	EFFETTO PH.....	91
4.6.1	<i>Rilevamento del 3OC6-HSL nel sumatante culturale</i> .....	93
4.7	CONTROLLO DEL “DOSAGGIO GENICO” DI LUXI .....	95
4.8	ERROR PRONE PCR .....	98
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONE .....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>105</b>

## INDICE DELLE FIGURE

Figure 1-1 Rappresentazione schematica delle principali caratteristiche e degli elementi di sequenza di un sistema di espressione procariotico. Come esempio è riportato il promotore ibrido <i>tac</i> con le regioni -10 e -35 distanziate da uno spacer di 17 basi. L'RBS è costituito dalla sequenza SD seguito da uno spacer ricco di AT che ha una lunghezza ottimale di 8 basi. La sequenza DS interagisce con il 16S rRNA durante la traduzione. Sono mostrati i tre codoni di start e la loro frequenza di utilizzo in <i>E. coli</i> . Tra i tre codoni di stop invece, UAA seguito da U è la sequenza di fine trascrizione più efficiente in <i>E. coli</i> . R è la proteina regolatrice dell'attività del promotore, generalmente un repressore, codificato da un gene che può essere presente sia sullo stesso vettore che integrato nel cromosoma batterico. TT è il terminatore trascrizionale che serve per stabilizzare l'mRNA e il vettore. Inoltre, è presente il gene di resistenza alla tetraciclina per semplificare le operazioni di selezione fenotipica del vettore, l'Ori, l'origine di replicazione che determina il numero di plasmidi per cellula ( Da Makrides 1996).....	6
Figure 1-2 <i>Vibri fischeri</i> .....	33
Figure 1-3 <i>Euprymna scolopes</i> .....	33
Figure 1-4 Induzione della bioluminescenza in <i>V. fischeri</i> . Durante la crescita avviene l'induzione della bioluminescenza (A). L'induzione, in condizioni di crescita specifiche, è determinato da una concentrazione cellulare specifica (B) che determina il raggiungimento della concentrazione critica dell'HSL per il legame a LuxR. ....	34
Figure 1-5 Organizzazione dei geni lux nel regulone per la bioluminescenza di <i>V. fischeri</i> e particolare della regione regolatrice.....	35
Figure 3-1 Sequenza MT con le più importanti caratteristiche, che comprendono il MCS, i tre codoni di stop nelle tre ORF possibili e il terminatore trascrizionale dal 5S rRNA. ....	57
Figure 3-2. Condizioni utilizzate per il design degli oligo.....	58
Figure 3-3 Sequenza MHTT con le più importanti caratteristiche, che comprendono il MCS, l' His tag, il sito di taglio per la TEV-proteasi, i tre codoni di stop nelle tre ORF possibili e il terminatore trascrizionale dal 5S rRNA. ....	60
Figure 3-4 Step di costruzione dei vettori pLAI: le due sequenze sono state ottenute tramite Assembling PCR, e inserite in pCRII. Nei siti di AatII e MluI del vettore ottenuto, è stata inserito il frammento <i>luxR</i> , la regione regolatrice, <i>luxI</i> e la regione intergenica <i>luxI-luxC</i> . pLAIR32 e pLAIET32 si diversificano per l'origine di replicazione e per alcuni siti unici nel MCS. D) MCS delle due serie di vettori pLAI. ....	66
Figure 4-1 Frammento amplificato dal DNA genomico di <i>V. fischeri</i> ATCC7744. ....	76
Figure 4-2. Plasmide pGLlux506.....	77
Figure 4-4 Induzione dell'espressione della <i>gfp</i> dipendente dalla densità cellulare. La barra di istogramma in nero e le crescite contrassegnate da □, fanno riferimento rispettivamente alla fluorescenza specifica e alla densità cellulare nel tempo per <i>E.</i>	

<i>coli</i> /pGlow (controllo negativo). Le crescite contrassegnate da $\Delta$ si riferiscono alla densità cellulare di <i>E. coli</i> /pGLlux506 e in bianco la sua fluorescenza specifica netta. ( medi di tre esperimenti).....	78
Figure 4-5 Caratteristiche generali e MCS delle due serie di vettori pLAI. ....	80
Figure 4-6 Organizzazione dei due promotori convergenti P <sub>T7</sub> e P <sub>luxR</sub> .....	81
Figure 4-7 L'induzione del promotore P <sub>T7</sub> nel ceppo BL21DE3 cresciuto su LB agar, 1mM IPTG, reprime l'espressione di LuxR, il QS e l'espressione della GFP.....	82
Figure 4-8 Crescite di <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ /pGL506 in diversi mezzi colturali con diverse concentrazioni di glucosio .....	83
Figure 4-9 Fluorescenza specifica delle colture ( <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ /pGL506). Le fluorescenze sono al netto della fluorescenza dei terreni e della fluorescenza specifica della biomassa. I dati fanno a tre esperimenti indipendenti.....	84
Figure 4-11 SDS page (A) e WB ( $\alpha$ -GFP) (B) per campioni di una batch in bioreattore. Come controllo positivo è stato utilizzato il sistema pET indotto con 1mM di IPTG per l'espressione della GFP. ....	86
Figure 4-12 Ottimizzazione per l'uso dei codoni di <i>E. coli</i> per il gene <i>luxI</i> . Si osserva che, rispetto alla sequenza originale (A), sono stati cambiati diversi codoni nella sequenza ottimizzata (B) che mostra una percentuale di identità rispetto alla sequenza originale del 76,411%. Da un contenuto di 32% di GC si è passato al 46% in quella ottimizzata. Nella sequenza di <i>luxI</i> , inoltre, sono stati inseriti due siti di restrizione per ciascuno dei due enzimi di restrizione KpnI e XbaI.....	88
Figure 4-14 Vettore di espressione pMKS $\alpha$ . A) Caratteristiche generali del vettore di espressione. B) Caratteristiche del MCS. ....	90
Figure 4-16 Diverso comportamento di espressione della fluorescenza specifica dei vettori pLAI-GFP e pMKS $\alpha$ -GFP (dati come medie di tre esperimenti indipendenti.....	91
Figure 4-16 Saggio di fluorescenza e SDS page dei campioni provenienti da colture batch ai setpoint di pH di 6,2 (A-C) e 7,2 (B-D).....	92
Figure 4-17 Plasmide pMKS $\alpha$ - <i>luxI</i> .....	93
Figure 4-18 Saggio semiquantitativo di 3OC6-HSL nel surnatante colturale. I campioni provengono da crescite a pH 6,2 (A) e pH 7,2 (B) (medie di 5 ripetizioni da saggi indipendenti con tre repliche, sottratti della fluorescenza al tempo T0 di incubazione con il bioreporter; vedi testo).....	94
Figure 4-19 Caratterizzazione molecolare del ceppo MM294.1:: <i>luxI</i> . A) Prodotto di PCR utilizzando la coppia di primer LuxI4Fr/LuxI4Rv utilizzando come template DNA genomico di MM294.1 (pozzetto 1, controllo negativo), MM294.1:: <i>luxI</i> (3) e DNA plasmidico di pGLLux506 (2, controllo positivo). B) Southern Blotting utilizzando come sonda il prodotto di PCR come in A), pozzetto 2). In 1 e 2 Sono stati caricati i due prodotti di PCR in A), pozzetto 2 e 3. In 3 e 4 il DNA plasmidico di pGLEM- <i>luxI</i> , utilizzato per assemblare il frammento lineare per la ricombinazione omologa ( vedi Materiali e metodi) e	

quello genomico di MM294.1:: <i>luxI</i> rispettivamente, digeriti con gli enzimi di restrizione XmaI e AatII. Nel pozzetto 5, il DNA genomico di MM294.1, digerito come MM294.1:: <i>luxI</i> . In C) la cassetta per luxI nel DNA genomico di MM294.1.....	96
Figure 4-20 Le colture sono state normalizzate per le crescite tramite pre-colture a saturazione e diluizioni in terreno fresco. Medie di 5 ripetizioni per ciascuna crescita. Per una descrizione maggiore delle combinazioni vedi Tab1.....	97
Figure 4-22 Cloni selezionati in basaii pattern di espressione. In giallo il controllo di riferimento (MM294.1\pGLLux506) (ODR=Densità ottica relativa). .....	101

## INDICE DELLE TABELLE

Table 1-1. Promotori maggiormente utilizzati per l'espressione di proteine ricombinanti in <i>E. coli</i> .....	9
Table 1-2 Uso dei codoni rari dei ceppi K12 e B di <i>E. coli</i> , basato sulle frequenze dei codoni delle sequenze inserite nella GenBank (Nakamura et al. 2000) .....	22
Table 1-3. Alcuni ceppi di <i>E. coli</i> disponibili per la produzione di proteine eterologhe..	26
Table 3-1 Ceppi di utilizzati in questo lavoro.....	49
Table 3-2. Lista di plasmidi utilizzati in questo lavoro. ....	50
Table 3-3 Lista di primer utilizzati .....	56
Table 3-4 Reazione della topoisomerasi.....	63
Table 3-5 Reazioni di RM-PCR.....	73
Table 3-6. Cicli utilizzati per 13 RM-PCR .....	73
Table 4-1 Combinazioni ospite\plasmide utilizzati nell'esperimento di fig.21 .....	98



# 1 INTRODUZIONE

## **1.1 Produzione di proteine ricombinanti**

Nel 1973 il gruppo di ricerca guidato da Herbert Boyer (University of California, San Francisco) introdusse l'uso della tecnologia del DNA ricombinante per il clonaggio e l'espressione genica in un organismo ospite. In particolare, fu clonato il gene per la resistenza alla streptomina di *Salmonella typhimurium* nel plasmide pSC101 di *Escherichia coli*, e fu verificata la tolleranza all'antibiotico (Cohen et al. 1973).

Per la prima proteina umana ricombinante espressa e prodotta in un organismo ospite, si dovettero aspettare solo pochi anni. La giovane società biotecnologica, la Genentech (S. San Francisco, CA, USA) fondata dallo stesso Boyer, nel 1978 annunciò il programma di produzione della somatostatina umana in *E. coli* (Itakura et al. 1977). Nell'1982 la stessa azienda annunciò la produzione di "Humulin", un'insulina ricombinante prodotta in *E. coli*. Fu anche il primo farmaco biotecnologico ricombinante ammesso sul mercato dalla "Food and Drug Administration".

Dopo poco più di due decenni di continuo sviluppo, la tecnologia del DNA ricombinante nel settore terapeutico rappresenta il cuore dell'industria farmaceutica biotecnologica con un valore di 32 bilioni di dollari calcolato nel 2003. Il mercato per le proteine ricombinanti di interesse terapeutico (comprendente gli anticorpi) è stimato essere maggiore di 50 bilioni di dollari, con un tasso di crescita annuo del 20% (Schmidt 2004).

L'era delle proteine ricombinanti ha visto l'affermarsi del batterio gram-negativo *E. coli* come organismo modello e come ospite. Tuttavia, la consapevolezza acquisita che per una produzione ottimale, l'espressione di una proteina può richiedere differenti caratteristiche fisiologiche e biochimiche dell'organismo nel quale sono espressi, ha stimolato la ricerca di nuovi ospiti sia tra i procarioti che tra gli eucarioti.

### **1.1.1 Sistemi di espressione disponibili tra procarioti ed eucarioti.**

Tra i vari ospiti per l'espressione di proteine eterologhe, il batterio gram-negativo *E. coli* è in generale il più vantaggioso. Oltre ad essere un microrganismo geneticamente e fisiologicamente ben caratterizzato, per la sua capacità di crescere rapidamente su mezzi colturali poco costosi, per la facile manipolazione genetica, ai brevi tempi di duplicazione, alla capacità di un alto livello di espressione proteica e ai bassi costi di crescita, *E. coli* è l'ospite più diffuso per la produzione di proteine ricombinanti (Baneyx 1999; Dai, Chen et al. 2005).

Tuttavia, le proteine ricombinanti espresse in *E. coli*, spesso sono prive delle corrette modifiche post-traduzionali quando richieste, non hanno il giusto "fold" o sono prodotte in forma insolubile e aggraccate nei corpi di inclusione (Clark 2001).

Per l'espressione di proteine eterologhe nei lieviti, generalmente sono utilizzati come ospiti sia *Pichia pastoris* che *Saccharomyces cerevisiae* (Cereghino and Cregg 1999). Tra gli altri ospiti eucariotici per l'espressione, i funghi hanno più basse esigenze colturali, sono veloci nella crescita e sono facili da manipolare geneticamente. Hanno inoltre la capacità di effettuare alcune modifiche post-traduzionali semplici come la glicosilazione. Tuttavia, essi mancano di alcuni "pathway" di modificazione post-traduzionale che possono essere importanti allorquando la proteina ricombinante è di origine animale, come l'idrossilazione, l'ammidazione e alcuni tipi di fosforilazione e glicosilazione (Eckart and Bussineau 1996, Cregg and Higgins 1995).

Alcune linee cellulari di insetto offrono molti vantaggi come cellule ospiti per la produzione di proteine ricombinanti. Generalmente i sistemi di espressione fanno uso di infezione con un baculovirus ricombinante. Uno dei maggiori vantaggi derivanti dal loro utilizzo è la possibilità di raggiungere facilmente densità cellulari molto elevate. Il loro svantaggio principale deriva dalla mancanza delle convertasi e dalla limitata capacità di corretto processazione di quelle proteine che sono sintetizzate come precursori inattivi. La

produzione proteica, inoltre, può essere limitata a causa dell'accumulo di proteine insolubili all'interno delle cellule (James, Freedman et al. 1995).

Per la produzione di proteine ricombinanti sono utilizzati anche i sistemi di espressioni di origine vegetale. Questi fanno riferimento soprattutto a sospensioni cellulari di *Nicotiana tabacum* o di piante modificate geneticamente (Doran 2000). I maggiori vantaggi associati all'utilizzo di sistemi vegetali *in vitro* includono la rapidità di espressione e produzione proteica e la capacità di manipolare le condizioni di crescita culturale per una migliore quantità e qualità del prodotto proteico. Ciononostante, la velocità di crescita cellulare risulta spesso bassa e anche alcuni pathway di glicosilazione sono diversi da quelle dei mammiferi. Molti sforzi sono stati indirizzati anche per migliorare i sistemi vegetali di espressione *in vivo* a causa dell'abbattimento dei costi di produzione. Tuttavia, il prodotto proteico è più difficilmente purificabile rispetto ai sistemi *in vitro* (Hood and Jilka 1999).

Le cellule di mammifero possono essere gli ospiti preferiti per la produzione di proteine terapeutiche di origine animale. In teoria, ogni tipo cellulare che può essere coltivato, può anche essere manipolato per esprimere geni estranei. Purtroppo, le cellule di mammifero hanno elevati costi di gestione e crescono lentamente. Infine va ricordato che le cellule di mammifero sono suscettibili all'infezione da virus. I rischi associati con la contaminazione del prodotto finale con componenti virali rappresenta un problema serio se il fine ultimo è la produzione di proteine di interesse terapeutico (Baldi, Muller et al. 2005).

## **1.2 Espressione di proteine ricombinanti in *E. coli***

I sistemi di espressione batterica generalmente rappresentano la scelta preferita per la produzione di proteine eterologhe, sia che esse siano di origine procariotica che eucariotica.

Circa l'80% delle proteine usate per risolvere la struttura tridimensionale e inserita nel "Protein Data Bank" (PDB) nel 2003, utilizzavano come organismo ospite per l'espressione *E. coli* (Sørensen and Mortensen 2005). Inoltre, tra il 2003 e il 2006, delle 31 proteine

terapeutiche approvate, nove erano prodotte in *E. coli*, tra queste l'insulina e l'interferone (Walsh 2006, Schmidt 2004).

I maggiori svantaggi nell'utilizzo di *E. coli* come ospite per l'espressione di proteine ricombinanti sono i seguenti:

- la mancanza di un efficiente sistema di secrezione per il rilascio delle proteine nel mezzo di coltura;
- la limitata capacità nella formazione di ponti disolfuro e altre modifiche post tradizionali (in questi casi per *E. coli* si preferisce la compartimentalizzazione periplasmatica);
- l'imprevedibilità nell'eliminazione della metionina all'N-terminale della proteina che può risultare in una è più bassa stabilità proteica e un aumento dell'immunogenicità;
- un'inefficienza di folding dovuto alla mancanza di specifiche chaperonine (Makrides 1996; Yin et al. 2007).

La maggior parte dei sistemi di espressione per *E. coli* sono basati sui plasmidi. L'uso dei vettori di espressione da un lato semplifica le operazioni di clonaggio e permettono un aumento del "gene dosage", dall'altro richiede un'alta stabilità che è ottenuta con l'utilizzo dei marcatori di resistenza agli antibiotici.

Nonostante tutti i sistemi di espressione che la tecnologia del DNA ricombinante ha reso disponibile per *E. coli*, il successo di produzione di una proteina eterologa in questo gram-negativo, molto spesso si basa sull'accuratezza della scelta del sistema di espressione adatto alla proteina da produrre e all'ottimizzazione del gene di interesse.

Non esiste un sistema di espressione che da solo è ottimale per l'espressione di un dato gene ricombinante. I più importanti approcci volti a massimizzare la produzione di proteine ricombinanti in *E. coli* coinvolgono i seguenti punti:

- scelta e design del promotore ottimale;
- ingegnerizzazione dei regolatori trascrizionali;

- adattamento del “gene dosage” del gene da esprimere;
- ingegnerizzazione della regione non tradotta al 5’;
- aumento dell’emivita dell’ mRNA;
- armonizzazione dei codoni del gene per l’espressione nello specifico organismo ospite;
- l’eventuale trasporto allo specifico compartimento cellulare;
- scelta e miglioramento genetico dell’organismo ospite;
- ottimizzazione delle condizioni fermentative (Makrides 1996; Baneyx 1999; Schumann and Ferreira 2004; Jana and Deb 2005; Sørensen and Mortensen 2005; Choi et al. 2006; Terpe 2006).

### **1.2.1 Gli elementi di un sistema di espressione**

La costruzione di un sistema di espressione plasmidico si basa su alcuni elementi la cui configurazione deve essere attentamente considerata per assicurare il più alto livello di sintesi proteica possibile (Balbas and Bolivar 1990).

L’espressione è generalmente regolata da un plasmide con un background genetico compatibile con l’ospite. Gli elementi genetici di un sistema di espressione includono:

- l’origine di replicazione del batterio (ORI);
- un marcatore di selezione, generalmente una resistenza ad un antibiotico;
- un promotore trascrizionale;
- il sito di legame del ribosoma (RBS)
- terminatore traduzionale;
- terminatore trascrizionale.

L’elemento più importante dell’architettura di un sistema di espressione è rappresentato dal promotore, posizionato tra 10-100 bp a monte del “ribosome binding site” (RBS) ed è

sotto il controllo di elementi regolativi che possono essere presenti sul vettore stesso o integrati sul genoma dell'ospite.

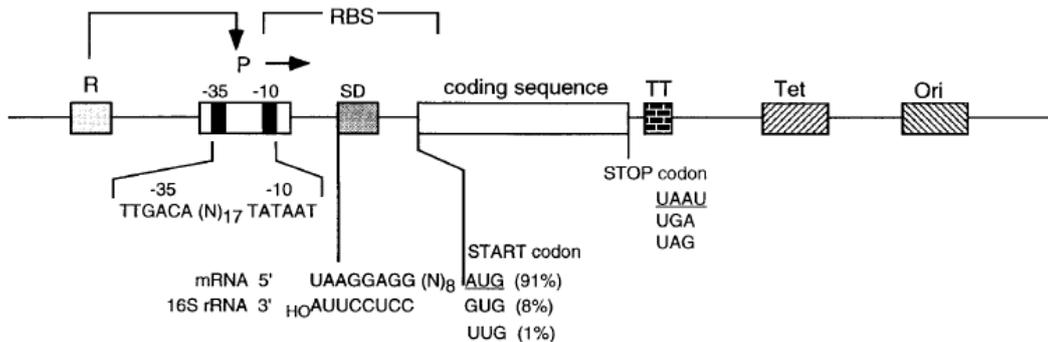


Figure 1-1 Rappresentazione schematica delle principali caratteristiche e degli elementi di sequenza di un sistema di espressione procariotico. Come esempio è riportato il promotore ibrido *tac* con le regioni -10 e -35 distanziate da uno spacer di 17 basi. L'RBS è costituito dalla sequenza SD seguito da uno spacer ricco di AT che una lunghezza ottimale di 8 basi. La sequenza DS interagisce con il 16S rRNA durante la traduzione. Sono mostrati i tre codoni di starte la loro frequenza di utilizzo in *E. coli*. Tra i tre codoni di stop invece, UAA seguito da U è la sequenza di fine trascrizione più efficiente in *E. coli*. R è la proteina regolatrice dell'attività del promotore, generalmente un repressore, codificato da un gene che può essere presente sia sullo stesso vettore che integrato nel cromosoma batterico. TT è il terminatore trascrizionale che serve per stabilizzare l'mRNA e il vettore. Inoltre, è presente il gene di resistenza alla tetraciclina per semplificare le operazioni di selezione fenotipica del vettore, l'Ori, l'origine di replicazione che determina il numero di plasmidi per cellula (Da Makrides, 1996).

Il promotore di *E. coli* è costituito da una sequenza esanucleotidica localizzata a circa 35 bp a monte dell'inizio della trascrizione (-35 region) separata da un breve "spacer" da un'altra sequenza esanucleotidica posizionata a circa 10 bp dall'inizio della trascrizione (-10 region) (Harley e Reynolds 1987).

Ci sono molti promotori disponibili per l'espressione in *E. coli*. I più utilizzati sono riportati nella tabella 1-1.

A valle del promotore c'è l'RBS, che copre una regione di circa 54 nucleotidi. Il sito Shine-Dalgarno (SD) interagisce con il 3' dell'rRNA 16S all'inizio della traduzione. La

distanza tra la sequenza SD e il codone di inizio è tra le 5 e le 13 basi e la sequenza di questa regione può avere effetti importanti sulla formazione di strutture secondarie dell'mRNA e quindi sulla traduzione (Chen et al. 1994, Hall et al.1982).

Il terminatore trascrizionale è posizionato a valle dell'ORF e funziona sia come segnale di terminazione trascrizionale, sia come elemento protettivo contro la degradazione esanucleotidica e aumenta l'emivita dell'mRNA (Rosenberg et Court, 1979; Wong et al., 1986).

Oltre agli elementi che hanno un impatto diretto sull'efficienza di espressione del gene, i vettori di espressione necessitano di un gene come marcatore di selezione.

Infine, un ulteriore elemento da considerare è il “plasmid copy number” del vettore di espressione che determina il dosaggio genico del gene di interesse.

### **1.2.1.1 Promotori utilizzati per l'espressione in *E.coli***

Quando ci si imbatte nella problematica di voler ottimizzare un processo di produzione di proteine ricombinanti su larga scala, molti criteri possono essere presi in considerazione: la stabilità dell'mRNA, l'efficienza di traduzione, l'inserzione degli giusti amminoacidi, il giusto folding proteico, la suscettibilità alla proteolisi, la richiesta delle modifiche post-traduzionali, il giusto processamento proteolitico. Le caratteristiche di un promotore possono avere un effetto maggiore nel risolvere molti di questi criteri. Per esempio, un promotore con una elevata forza di espressione può compensare, almeno in parte, l'instabilità dell'RNA messaggero, una bassa efficienza di traduzione o un prodotto instabile. Per questo la scelta del promotore ha un effetto decisivo e fondamentale sulla produzione di una proteina ricombinante.

Affinché un promotore per *E. coli* sia adeguato ad un elevato livello di sintesi, deve avere delle caratteristiche particolari.

1. Forza di espressione. Il promotore deve avere la massima forza di espressione al fine di ottenere la più alta concentrazione di proteina di interesse rispetto alle proteine totali dell'ospite.

2. Regolazione. Un promotore deve essere regolabile, cioè essere efficientemente represso in condizioni non indotte. Infatti è preferibile disaccoppiare la fase di rapido accrescimento della popolazione microbica da quella di induzione del dell'espressione del gene target e della produzione proteica .

La fine regolazione del promotore è essenziale per la produzione di proteine che potrebbero essere tossiche per l'ospite. In queste condizioni, la stringenza del promotore è fondamentale poiché anche piccole quantità della proteina drasticamente abbassano la sopravvivenza batterica durante le fasi di crescita colturale (Yike et al., 1996). Il fenomeno della tossicità non è rilegata all'espressione di geni eterologhi, ma anche come risultato della sovraespressione di alcuni geni nativi, come ad esempio per il gene *traT* che codifica per una lipoproteina di membrana o per l'endonucleasi EcoRI in assenza della corrispondente metilasi per la modificazione protettiva (O'Connor et al.,1987). Inoltre, un sistema di espressione non completamente represso può causare instabilità plasmidica, una diminuzione della crescita cellulare, e una perdita della produzione della proteina di interesse (Mertens et al., 1995).

3. Induzione semplice ed economica. Il terzo requisito importante per un promotore sono le proprietà di induzione.

Uno dei primissimi operoni ad essere studiato in *E. coli* fu l'operone *lac* per l'utilizzo del lattosio e il modello classico di regolazione genica di Jacob e Monod si basava sulle sue proprietà (Jacob and Monod 1961).

Dalla scoperta del suo funzionamento, gli elementi dell'operatore *lac* furono rapidamente adottati per la costruzione di sistemi di espressione per le proteine ricombinanti (Polisky

Bonehi et al. 1998). Nella tabella 1-1 sono riportati i promotori maggiormente utilizzati per la produzione di proteine eterologhe in *E. coli*.

**Table 1-1. Promotori maggiormente utilizzati per l'espressione di proteine ricombinanti in *E. coli*.**

Promotori	Regolatori	Induzione	Referenze
<b><u>Inducibili</u></b>			
<i>lac</i>	LacI, LacIs	IPTG, termica	Gronenborn 1976
<i>trc and tac</i>	LacI, LacIs	IPTG, termica	Brosius et al. 1985
$\lambda P_1$	$\lambda cI_{ts}$ 857	Termica	Elvin et al. 1990
<i>T7</i>	LacI, LacIs	IPTG, termica	Studier and Moffatt 1986
<i>P<sub>BAD</sub></i>	AraC	L-arabinosio	Guzman et al. 1995
<i>cspA</i>		Termica	Mujacic et al. 1999
<i>rhaPBAD</i>	RhaR, RhaS	L-ramnosio	Haldimann et al. 1998
<i>tetA</i>	TetR	Tetraciclina	Skerra 1994
<i>P<sub>m</sub></i>	XylS	m-toluic acid	Blatny et al. 1997
<i>lpp</i>		IPTG, lattosio	Nakamura et Inouye. 1982
<i>recA</i>	LexA	Nalidixic acid	Shirakawa et al. 1984
<i>P<sub>syn</sub></i>	LacI, LacIq	IPTG	Giacobini et al. 1994
<i>pL-9G-50</i>		Termica (<20°C)	Oppenheim et al. 1996
<i>T3-lac operator</i>	LacI <sub>q</sub> ,	IPTG	Yamada et al. 1991
<i>T5-lac operator</i>	LacI <sub>q</sub> , LacI	IPTG	Mukhija et al. 1995
<i>T4 gene 32</i>		Infezione T4	Gorski et al. 1985
<i>nprM-lac operator</i>	LacI <sub>q</sub>	IPTG	Yamada et al. 1991
<i>Protein A</i>			Lo'fdahl et. 1983
<b><u>Regolati dai nutrienti</u></b>			
<i>phoA</i>	PhoB, PhoR	Deplezione di fosfato	Miyake et al. 1985
<i>ugpBAECQ</i>		Deplezione di glucosio e fosfato	Su et al. 1991
<i>proU</i>		Osmolarità (NaCl)	Herbst et al. 1994
<i>vglnAp2</i>		Deplezione di azoto	Schroeckh et al. 1992
<i>trp</i>		Deplezione di trp , IAA	Yansura et Henner. 1990
<i>cst-1</i>		Deplezione di glucosio	Tunner et al. 1992
<i>mglBAEC</i>	MglD	Aggiunta di glucosio	Death and Ferenci 1994
<i>araB</i>		Deplezione di glucosio e aggiunta di arabinosio	Lobell and Schleif 1991
<i>Starvation promoters</i>			Matin, A. 1994

<b>Ossigeno-regolati</b>			
<i>vhb</i>			Microaerobiosi, cAMP-CAP
<i>pfl</i>			Anaerobiosi
<i>nirB</i>	Fnr	(FNR,	Anaerobiosi
<i>nar</i>	NARL)		Anaerobiosi
<b>pH-regolati</b>			
<i>cadA</i>	CadR		pH acido
			Dikshit et al. 1990
			Oxer et al. 1991
			Oxer et al. 1991
			Lee et al. 1996
			Chou et al. 1995

*IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactoside*

Il sistema di espressione più famoso in *E coli* è il “pET Expression System” (Novagen) basato sul promotore del fago T7. Rappresenta da solo il sistema di espressione proteica usato per più del 90% delle proteine incluse in PDM nel 2003 (Yin et al. 2007, Sørensen and Mortensen 2005).

Altri sistemi di espressione molto famosi sono il “pBAD system” dell’Invitrogen, inducibile con arabinosio, il “pGEX system” dell’Amersham Biosciences, basato sul promotore *tac*, il “pQE system” della Qiagen basato sul promotore *lac/T5*, il sistema pLEX dell’Invitrogen, basato sul promotore  $p_{l/cI}$  e il sistema pTrc dell’Amersham Biosciences basato sul promotore *Trc* (Studier et al. 1990; Dubendorff and Studier 1991; Jonasson et al., 2002).

#### 1.2.1.1.1 Il “pET system”

Il “pET system” è stato descritto per la prima volta da Studier che lo sviluppò per le più diverse applicazioni di espressione genica (Dubendorff and Studier, 1991; Studier et al., 1990).

Puo’ contare su più di 40 diversi plasmidi di espressione commercializzati che includono disparate caratteristiche: promotori ibridi, MCS diversi, la possibilità di incorporare differenti domini di fusione e siti di taglio per le proteasi. Tutto ciò lo rende un sistema di espressione utilizzato per i più disparati scopi.

Il sistema di espressione richiede un ospite lisogenizzato dal frammento fagico DE3 che codifica per la polimetasi T7 del batteriofago T7. Il gene è sotto il controllo del promotore *lacUV5* inducibile con IPTG.

Il promotore *lacUV5* è un derivato del promotore *lac* che è meno sensibile alla regolazione da parte del complesso cAMP-CRP.

LacI reprime *lavUV5* e il promotore ibrido T7/lac che è presente sul plasmide pET. Il gene *lacI* è presente sul genoma di *E. coli* e sul plasmide pET. L'IPTG, quando aggiunto al mezzo colturale, lega e induce il rilascio del tetramero di LacI dall'operatore *lac*. Ciò permette il rilascio dell'espressione della polimerasi T7 e quindi del gene target dal promotore ibrido T7\lac. Il promotore T7 è costituito da una sequenza di 20 basi e non è riconosciuto dall'RNA polimerasi di *E. coli*. L'RNA polimerasi T7 è 5 volte più veloce dell'RNA polimerasi di *E. coli* (230 nucleotidi al secondo contro i 50 nucleotidi al secondo per l'RNA polimerasi di *E. coli*).

L'espressione basale può essere diminuita dalla presenza del T7 lisozima che è un inibitore naturale della polimerasi T7. La coespressione del gene per il lisozima T7 è regolata dal promotore *Tc* sui plasmidi pLysS e PLysE.

#### **1.2.1.1.2 Il “pBAD expression system”**

Il sistema di espressione basato sul promotore *araBAD* è costruito per un fine controllo dell'espressione basale e per un livello di espressione della proteina target dipendente dalla concentrazione di *l*-arabinosio (Guzman et al., 1995).

Quest'ultima proprietà è tipica di questo sistema: si osserva un aumento lineare dell'espressione batterica a livello di popolazione con l'aumento della concentrazione dell'induttore (Morgan-Kiss et al., 2002).

Invece, un'espressione genica omologa avviene nei ceppi deficienti per il sistema di trasporto e per la metabolizzazione dell'arabinosio (Khlebnikov et al., 2002; Morgan-Kiss et al., 2002).

La regolazione dell'operone dell'arabinosio è diretta dal prodotto di *araC* (Englesberg et al., 1969). AraC come dimero lega tre siti nell'operone dell'*ara*. In assenza di arabinosio il dimero lega l'operatore O2 collocato all'interno del gene *araC*, a 210 basi dal promotore *araBAD*. L'altra metà del dimero lega invece l'operatore O1 nella regione del promotore, inducendo un ripiegamento al DNA. Il ripiegamento reprime i promotori *araBAD* e *araC*. Con il legame con l'arabinosio, il dimero di AraC cambia conformazione, e il legame con il sito O2 è sostituito con il legame al sito I del promotore *araBAD* e l'espressione è indotta. Il legame del dimero AraC al sito O1 e I è stimolato dal complesso cAMP-CRP e il livello basale di espressione può essere ridotto con il glucosio mediante la repressione catabolica (Guzman et al., 1995).

AraC regola il trasporto dell'arabinosio dal promotore *araE* in modo simile, inducendo una risposta “all-or-nothing” dopo l'induzione.

L'espressione di AraE da un promotore indipendente dalla concentrazione di arabinosio invece ha portato a una popolazione omogenea di cellule a tutte le concentrazioni di autoinduttore e un promotore regolabile in ogni cellula della popolazione.

I promotori inducibili con isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)- come il *tac* o il *trc* sono tra i più utilizzati per la ricerca di base (de Boere et al., 1983; Brosius et al., 1985). Tuttavia l'utilizzo dell'IPTG in produzioni di proteine ricombinanti terapeutiche su larga scala è indesiderato per la sua tossicità e per il suo costo elevato.

Questi svantaggi associati all'induttore, limitano fortemente l'utilizzo dei sistemi di espressioni basati su quei promotori che rispondono all'IPTG. Diversi sforzi hanno dato la disponibilità del mutante *lacI(TS)*, che codifica per repressore LacI termosensibile, permette l'induzione termica di questi promotori.

La termoinduzione, oltre ad essere inadeguata alla scala industriale in termini di costi e di praticità, induce nell'ospite l'espressione delle proteine da shock termico incluse alcune proteasi che possono accelerare la degradazione della proteina di interesse. Infatti, è stato riportato che la termoinduzione attiva le risposte SOS, come ad esempio l'espressione di *recA* e *sfiA*, cioè geni di riparo del materiale genetico che inducono l'arresto della duplicazione del DNA (Aris et al., 1998).

I promotori che rispondono al freddo, sebbene meno studiati di tanto altri, hanno mostrato di rispondere bene per un'efficiente espressione genica a basse temperature.

L'attività del promotore  $p_L$  del fago  $\lambda$ , è più alto a 20°C e si riduce fortemente a temperature più alte (Giladi et al., 1995). Anche il promotore del più importante gene "cold-shock", *cspA* mostra di essere attivo a basse temperature (Giladi et al., 1995).

La comparazione tra il promotore  $p_L$  del fago  $\lambda$  e quest'ultimo, hanno portato all'identificazione delle regioni specifiche di DNA coinvolte nella regolazione della trascrizione a bassa temperatura. È stato così costruito un derivato del promotore Pl che è altamente attivo a temperature sotto i 20°C (Oppenheim et al., 1996).

La ragione che c'è dietro l'utilizzo di promotori indotti da basse temperature, è che tra i 15 e i 20°C la cinetica del folding proteico è solo debolmente affetto, mentre il tasso di trascrizione e traduzione è fortemente ridotto. Questo da un lato, fornisce il giusto tempo alle proteine per foldarsi, producendo proteine attive e riducendo la formazione degli aggregati di proteine inattive nei corpi di inclusione, senza ridurre la produzione finale di proteina.

Dall'altra parte, ci sono promotori che non necessitano di induzione chimica o fisica ma che sono ugualmente regolati e indotti dai cambiamenti fisio-metabologici che avvengono durante la crescita. Gli stati fisiologici e metabolici inducenti possono essere sia endogeni che indotti dall'esterno. Questi promotori sono molto ricercati perché essi sono un buon compromesso tra una semplice induzione e una buona regolazione dell'espressione.

Alcuni dei promotori appartenenti a questa classe sono già stati utilizzati per la produzione su larga scala. Il promotore *phoA* è stato utilizzato per la produzione del fattore di crescita epidermico umano e il gene *pfl*, che è espresso in condizioni anaerobiotiche, è stato utilizzato con successo per l'espressione a livelli alti di colesterolo ossidasi da *Brevibacterium sterolicum* in *E. coli* (Oka et al., 1985; Sawers and Bock, 1989).

I "nutrient promoter" come *phoA* e *ugpBAECQ* hanno comunque degli svantaggi: essi richiedono condizioni di crescita limitanti e non è regolabile il livello di espressione dopo l'induzione.

Inoltre, i promotori "oxygen-regulated" hanno lo svantaggio di avere molto spesso un'attività basale significativa.

I promotori che rispondono alla fase stazionaria, rappresentano un'importante classe tra quelli controllati metabolicamente. Tuttavia, nell'ospite la fase stazionaria è legata anche all'induzione delle risposte a stress che possono avere un 'impatto sull'espressione della proteina di interesse.

Sono stati sviluppati una serie di vettori usando il promotore *proU* che è regolato in base all'osmolarità (Herbst et al., 1994). L'attività del promotore è controllato da varie concentrazioni di NaCl nel mezzo colturale con un'induzione semplice ed economica.

Ciò che appare tuttavia evidente è che proprio gli stati fisiologici e metabolici inducenti l'espressione da questi tipi di promotori sono quasi sempre legati a condizioni di stress, o limitano l'adattabilità dei sistemi alle diverse esigenze di produzione o si discostano dalle condizioni colturali ottimali.

L'uso di sistemi costitutivi per la produzione di proteine ricombinanti in *E. coli* è raramente riportato. Ciò accade perché ci si aspetta che un sistema di espressione costitutivo basato su un promotore con un'elevata forza trascrizionale elevata, possa avere problemi di instabilità segregazionale e strutturale e inibizione della crescita. Ciò non evita che possano rispondere a particolari esigenze di produzione. Per esempio, la D-idantoinasi, un importante enzima industriale da *Bacillus stearothermophilus*, è stata prodotta in fermentatori su scala da 50 L usando *E. coli* XL1-Blue. Nel sistema di espressione, il vettore di espressione pHU183 derivante da pUC18 era mantenuto stabilmente per più di 80 generazioni anche senza la pressione selettiva dell'antibiotico (Lee et al., 1997).

### **1.2.1.2 Autoinduzione nel pET Expression System**

Uno dei più promettenti approcci utilizzati di recente è stato lo sviluppo del sistema di autoinduzione per l'espressione di proteine ricombinanti, un metodo introdotto da Studier (Studier, 2004; Grabski et al., 2003).

Questo approccio si basa sulle preferenze che i batteri hanno nell'uso selettivo di diversi fonti di carbonio durante la crescita diauxica e sulla regolazione negativa, frequentemente osservata, dalla repressione catabolica (Kremling et al., 2001; Donovan et al., 1996).

In *E. coli* come ospite per i sistemi di espressione derivati dall'operone *lac* ( per esempio i sistemi pET, pGEM e pQE), il glucosio può agire sia come substrato di crescita che come un repressore catabolico dei geni sotto il controllo dell'operatore *lac* ( Neubauer et al.,1994).

Infatti in ceppi ospiti con l'appropriato genotipo (*lacY* per la lattosio permeasi che permette l'internalizzazione del lattosio e *lacZ* per la  $\beta$ -galattosidasi che converte l' $\alpha$ -lattosio in allo lattosio, l'induttore naturale dell'operone *lac*), l'esaurimento del glucosio nel mezzo colturale, attiva l'espressione genica per la metabolizzazione di una fonte carbonata alternativa. Così il consumo di lattosio può sopperire sia la crescita cellulare che sia quella dell'espressione della proteina ricombinante dai promotori che sottostanno al controllo negativo dell'operatore *lac* (Neubauer et al.,1991, Neubauer et al., 1992). Questi principi sono stati verificati nell'uso del lattosio come induttore dell'espressione del sistema pET in fermentazioni fed-batch in sistemi "high-cell density" (Hoffman et al.,1995) e affiancati anche alla produzione di proteine marcate con <sup>15</sup>N-selenometionina (Studts et al.,1999).

Per applicazioni "high-throughput", il metodo di autoinduzione ha molti vantaggi rispetto al metodo classico di induzione, tra cui l'evitare un'induzione troppo forte e l'apparente tossicità associata con l'utilizzo di un induttore chimico come l'IPTG, la possibilità di formulare diversi tipi di terreni per ottenere il desiderato livello di crescita prima dell'espressione, la semplificazione delle operazioni di manodopera per un sistema di espressione con un'induzione della proteina legata alla crescita (Studier, 2004; Grabski et al., 2003; Hoffman et al., 1995; Studier et al.,1990). Infatti, una delle difficoltà sostanziali nello screening su larga scala è ottenere tutte le colture in stati di crescita comparabili, così da indurle simultaneamente. Proprio nel cercare di superare questa difficoltà, è stato verificato il metodo di autoinduzione.

Uno degli approcci utilizzati per cercare di standardizzare le fasi di crescita di diverse colture, portare i pre-inoculi a saturazione e poi aggiungere terreno fresco a tutte le crescite nello stesso momento. In questo modo le differenze di densità cellulare da coltura a coltura al momento dell'induzione dovrebbero essere minimizzate. Proprio nel testare questa strategia furono verificate delle induzioni inattese da Grossman et al. (1998), che verificò che certe colture in alcuni mezzi complessi inducevano una quantità sostanziale di proteina

target, in assenza dell'aggiunta di induttore. Lo stesso Grossman concludeva che il lattosio non era responsabile dell'induzione ma che fosse richiesto l'AMP ciclico. Nei mutanti per la produzione di AMP ciclico, infatti, osservò un aumento della stabilità plasmidica e della produzione di proteina. Coerentemente con la repressione catabolica, fu verificato che l'aggiunta dell'1% di glucosio al mezzo complesso, preveniva l'induzione spontanea.

Tuttavia, lo stesso Studier (2005) osservò che differenti lotti di produzione di mezzi colturali complessi potevano contenere piccole quantità di lattosio e che da questo dipendeva l'induzione non dipendente da aggiunta di induttore. Sono state sviluppate diverse formulazioni per mezzi colturali per la crescita batterica a saturazione. Alcuni di essi permettono il mantenimento dello stato non indotto, altri invece definiscono le condizioni ottimali per la crescita e l'autoinduzione.

### **1.2.1.3 L'origine di replicazione**

I repliconi dei plasmidi contengono l'origine di replicazione e in alcuni casi sono associati ai "*cis acting element*" (del Solar et al., 1998).

I repliconi più utilizzati per i sistemi di espressione di proteine, sono ColE1 e p15.

ColE1 presente nei moderni sistemi di espressione, deriva dal plasmide pBR322 (copy number 15-20 ) o da pUC (copy number 500-700), mentre il p15A deriva dal plasmide pACYC184 (copy number 10-12). Oltre che dall'ORI, il "plasmid copy number" è influenzato anche dalle caratteristiche del plasmide, dal genotipo dell'ospite e dalle condizioni di crescita come velocità di crescita, mezzo colturale e temperatura (del Solar et al., 1998). Il "plasmid copy number" rappresenta per i sistemi di espressione una caratteristica determinante, poiché esso determina il "gene dosage" sia del gene da esprimere che degli elementi "*cis*" e "*trans*" del sistema di espressione. Spesso è possibile ottenere un aumento di produzione della proteina di interesse aumentando il "copy number" del vettore di espressione e quindi del gene ricombinante. L'aumento del "plasmid copy number" può però essere svantaggioso per l'eccessivo carico metabolico imposto

all'ospite. (Bentley et al. 1990; Birnbaum and Bailey 1991). È riportato che i vettori ad elevato numero di copie per cellula soffrono di instabilità segregazionale e strutturale (Jones and Melling 1984; O'Connor et al. 1989). Per instabilità segregazionale si intende la perdita di efficienza di ripartizione dei plasmidi tra le cellule figlie durante la divisione. Invece l'instabilità strutturale è attribuita alle delezioni, alle inserzioni e ai riarrangiamenti nella struttura del plasmide.

Molti dei problemi osservati nelle condizioni di elevato "copy number", rappresentano forse soltanto una manifestazione più evidente di alterazioni metaboliche che i plasmidi inducono all'ospite solo per il fatto di essere presenti. Sono stati effettuati molti studi sull'effetto che hanno i plasmidi sulle cellule ospiti. Molti lavori hanno dimostrato che essi inducono una perturbazione nella normale replicazione, trascrizione e traduzione, un'alterazione nell'assorbimento dei nutrienti, nel metabolismo primario, come nella glicolisi, nel ciclo degli acidi tricarbossilici e nella via dei pentosi fosfati e inducono una diminuzione del tasso di crescita (Wang et al. 2006; Diaz Ricci and Hernández 2000; Grabherr and Bayer 2002; Grabherr et al., 2002).

Per quanto detto, vi possono essere dei casi in cui un plasmide a "low copy number" è desiderabile. Un esempio è dato dal pETcoco vector (Novagen) che ha un "copy number" di uno. Una strategia completamente differente è rappresentata dall'integrazione cromosomica della cassetta di espressione che in aggiunta risolve oltre che i problemi derivanti dall'uso dei plasmidi, anche dell'utilizzo dell'antibiotico resistenza (Jana and Deb 2005).

#### **1.2.1.4 Marcatori di resistenza**

Come già accennato, la maggior parte dei sistemi di espressione sono basati sui plasmidi. Se l'uso di queste unità di replicazione indipendenti semplificano le operazioni di clonaggio e permettono un aumento del "gene dosage", dall'altro necessitano di un forte controllo di

stabilità. Questo è ottenuto generalmente con l'utilizzo dei marcatori di resistenza agli antibiotici.

I marcatori di resistenza maggiormente utilizzati nei sistemi di espressione proteica sono quelli che conferiscono la resistenza all'ampicillina, canamicina, cloranfenicolo o tetraciclina.

L'uso dei marcatori di resistenza rappresenta un problema rilevante soprattutto quando le proteine prodotte sono di interesse terapeutico. Per esempio, la  $\beta$ -lattamasi codificata dal gene *bla* che conferisce resistenza all'ampicillina, è riportata causare reazioni allergiche. Inoltre, vi è la possibilità di trasferire la resistenza agli antibiotici agli organismi sia ambientali che patogeni (Williams et al. 1998; Swartz 2001).

#### **1.2.1.5 Terminatore trascrizionale**

Nei procarioti, la terminazione della trascrizione può essere di due tipi: Rho-dipendente o Rho indipendente.

La prima dipende dalla proteina Rho che causa il rilascio del nascente trascritto di mRNA dalla macchina trascrizionale molecolare. In contrasto, la terminazione Rho indipendente, dipende dalle strutture secondarie dell'mRNA tipo "hairpin" o "stem-loop" seguite da una regione ricca di dA e dT (Yang et al., 1995).

Sebbene non siano sempre presi in considerazione nella costruzione dei vettori di espressione, un'efficiente terminazione della trascrizione ha un'impatto importante su diverse caratteristiche.

La trascrizione attraverso un promotore può inibire la sua funzione in un fenomeno noto come "promoter occlusion" ed è noto che la trascrizione di un promotore forte può destabilizzare il plasmide tramite un'alterazione degli elementi regolativi della replicazione dello stesso plasmide, come risultato del "read-through" nella regione di replicazione (Platt, T. 1986; Adhya et Gottesman, 1982). I terminatori trascrizionali aumentano anche la stabilità dell'mRNA e possono incrementare significativamente il livello di espressione

della proteina ricombinante (Stueber et Bujard,1982;Wong et Chang, 1986; Vasquez et al., 1989; Brosius et al.,1981).

Particolarmente utilizzati sono i due terminatori trascrizionali in tandem *T1* e *T2*, derivanti dall'operone per la sintesi dell'rRNA in *E. coli*.

L'efficienza dei terminatori trascrizionali viene giudicata in base all'efficienza di terminazione (T%) che è indicata come il rapporto tra la quantità di mRNA trascritto a monte, rispetto a quello trascritto a valle. L'efficienza dipende dalla capacità del terminatore di bloccare la trascrizione tramite l'allontanamento dell'RNA polimerasi dal DNA. Sia in vivo che in vitro, l'efficienza di terminazione di un terminatore trascrizionale varia dal 2 al 95% (Nojima et al., 2005).

Mentre molti plasmidi di espressione si servono della sequenza completa di 424 bp della regione terminatrice del *5SRNA-rrnB*, contenente i due terminatori in tandem *T1* e *T2*, è riportato che anche uno solo dei due terminatori è sufficienti a svolgere la sua funzione (Dykhhoorn et al., 1996). Infatti è riportato che l'utilizzo del solo terminatore T1 ha un'efficienza di terminazione di circa 90% (Nojima et al., 2005).

#### **1.2.1.6 RNA messaggero**

L'avvio della traduzione del mRNA richiede un RBS che include la sequenza di Shine-Dalgarno e un codone di inizio della traduzione (Sørensen et al., 2002).

La struttura secondaria dell'RBS è estremamente importante per la traduzione e la sua efficienza di inizio è migliorata da un elevato contenuto di adenina e timina (Laursen et al., 2002). L'efficienza di inizio della traduzione, in particolare, è influenzata dal codone successivo a quello di avvio e la presenza di adenina è molto abbondante nei geni molto espressi (Stenstrom et al., 2001).

Un terminatore trascrizionale posto a valle della sequenza del gene codificante la proteina ricombinante aumenta la stabilità plasmidica, come già discusso, ma in più, stabilizza anche l'mRNA tramite la formazione di strutture stabili al 3'(Newbury et al., 1987). La

terminazione della traduzione è mediata preferibilmente dal codone di stop UAA in *E. coli*. Una maggiore efficienza della traduzione si ottiene con l'inserimento del codone di stop nelle tre ORF possibili o allungando lo stop codon alla sequenza UAAU (Poole et al., 1995).

Il livello di espressione genica dipende principalmente da tre elementi: l'efficienza di trascrizione, la stabilità dell'mRNA e dall'efficienza di traduzione. La trascrizione e la traduzione sono stati soggetti a più studi di ottimizzazione che si sono tradotti in diversi sistemi di espressione proteica. La stabilità del trascritto genico invece, è meno considerato.

L'emivita media dell'mRNA in *E. coli* a 37°C varia da alcuni secondi a 20 minuti e il livello di espressione dipende strettamente dalla degradazione dell'mRNA. (Rauhut and Klug, 1999; Regnier and Arraiano, 2000).

Gli RNA messengeri sono degradati dalle RNasi, prima dalle due esonucleasi RNasi II e PNPasi e poi dall'endonucleasi RNasi E. La protezione dell'mRNA dalle RNasi dipende dal folding dell'RNA, dalla protezione esercitata dai ribosomi e dalla modulazione della stabilità dipendente dalla poliadenilazione. La poliadenilazione all'estremità 3' dell'mRNA è fornito dalle poliadenilato polimerasi PAPI e PAPII che facilitano il degrado da parte di RNasi II e PNPasi (Cao et al., 1996).

Sono disponibili ceppi di *E. coli* utilizzati per l'espressione di proteine ricombianti, che sono mutati per l'RNasiE (mutazione *rne131*) e che hanno una maggiore stabilità dell'mRNA (Invitrogen BL21 star strain) (Lopez et al., 1999). Comunque, un efficiente inizio della traduzione e la conseguente protezione dalla degradazione offerta dai ribosomi, stabilizza sostanzialmente l'mRNA e sono stati ottenuti, tramite selezione, dei siti di legame del ribosoma che mancano totalmente di strutture secondarie di inibizione.

Uno stabile mRNA ibrido dovrebbe essere costruito tramite il miglioramento delle sequenze stabilizzatrici al 3' e al 5'. Per esempio, l'mRNA della subunità dell'ATPasi di *E.*

*coli*, Fo, è stata stabilizzata con la fusione di un frammento codificante per la GFP (Arechaga et al., 2003).

La stabilizzazione dell'mRNA è tuttavia un approccio ancora poco usato.

### 1.2.1.7 Ottimizzazione nell'utilizzo dei codoni

L'utilizzo dei codoni in *E. coli* dipende dal livello dei rispettivi amminoacil-tRNA disponibili nel citoplasma. I codoni più utilizzati sono quelli che si trovano nei geni più espressi mentre i codoni rari tendono a essere presenti nelle sequenze di mRNA di geni espressi poco.

I codoni rari per l'espressione in *E. coli* sono spesso frequenti nei geni eterologhi provenienti da fonti diverse quali eucarioti, archaeobatteri e di altri organismi distanti che hanno diverse preferenze per le frequenze dei codoni (vedi tab. 1-2) (Kane, 1995). L'espressione dei geni contenenti codoni rari può anche portare ad errori traduzionali a seguito dello stallo ribosomiale nelle posizioni che richiedono l'inserimento di aminoacidi abbinanti al codone del tRNA con più bassa frequenza (McNulty et al., 2003). I problemi maggiori si verificano nei sistemi di espressione quando i trascritti contenenti codoni rari si trovano in cluster, come doppietti o tripletti. Gli errori traduzionali comprendono le sostituzioni aminoacidiche, il frameshifting o eventi di fine prematura della traduzione (Kurland e Gallant, 1996; Sørensen et al., 2003). La qualità della proteina, in questi casi può essere influenzata dall'inserimento di una lisina al posto dell'arginina nei codoni AGA (Calderone et al., 1996; Seetharam et al., 1988). Pertanto, l'espressione ad alti livelli della proteine target non corrisponde all'integrità della traduzione.

I codoni più problematici vengono decodificati dai prodotti dei geni *argU* (AGA e AGG), *argX* (CGG), *argW* (CGA e CGG), *ileX*(AUA), *glyT* (GGA), *leuW* (CUA), *ProL* (CCC) e *lys* (AAG). AAG è uno dei principali codoni di *E. coli* codificati dal tRNA<sup>Lys</sup>UUU, che è in grado di oscillare a G tramite la modifica xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U<sub>34</sub> (Yarian et al., 2000). Poiché UUU legge

AAG con meno efficienza, vi è un problema quando una sequenza contiene codoni AAG consecutivi. Particolarmente rilevante è la rarità dei codoni AGG e AGA per l'arginina, che si verificano in *E. coli* con frequenze di circa 0,21% e 0,14% rispettivamente (Kane, 1995).

Tre differenti strategie sono utilizzate al fine di rimediare all'inconveniente delle diverse frequenze di codoni tra i vari organismi. Un approccio prevede la mutagenesi sito diretta della sequenza target per generare i codoni che riflettono la distribuzione dei tRNA nell'ospite (Calderone et al., 1996; Kane et al., 1992). Sebbene questo approccio abbia dimostrato di essere utile, purtroppo non si adatta bene con le biotecnologie "high-throughput".

**Table 1-2 Uso dei codoni rari dei ceppi K12 e B di *E. coli*, basato sulle frequenze dei codoni delle sequenze inserite nella GenBank (Nakamura et al. 2000)**

Rare codons	Amino acid	Frequency (K12)	Frequency (B)
AGG	Arg	0.11	0.21
AGA	Arg	0.20	0.24
CGA	Arg	0.35	0.24
CUA	Leu	0.39	0.34
AUA	Ile	0.43	0.50
UGU	Cys	0.51	0.42
CCC	Pro	0.54	0.24
CGG	Arg	0.54	0.50
UGC	Cys	0.64	0.58
ACA	Thr	0.70	0.61
CCU	Pro	0.70	0.58
UCA	Ser	0.71	0.61
GGA	Gly	0.79	0.82
CCA	Pro	0.84	0.74
UCC	Ser	0.86	0.80
AGU	Ser	0.87	0.90
UCG	Ser	0.89	1.14

Un approccio che è meno dispendioso di tempo consiste nella cotrasformazione nell'ospite, di un plasmide che codifica per il tRNA del codone raro (Dieci et al., 2000). Sono disponibili diversi plasmidi per l'espressione dei tRNA rari. Tra questi il pR.A.R.E (Novagen) e quello fornito nel "CodonPlus system" della Stratagene.

Un terzo approccio che invece aggira il problema dell'adattamento della frequenza dei codoni dell'ospite è il completo ridisegno dell'intero gene di interesse, o di parte di esso, tramite la sostituzione dei codoni rari con quelli più frequenti (Gustafsson et al. 2004).

La sintesi de novo della sequenza del gene di interesse è generalmente evitata a causa degli altri costi (Wu et al. 2004). Da qualche anno la tecnologia della sintesi dei geni è diventata più popolare poiché i progressi hanno contenuto notevolmente i costi e così è più permissivo ricorrere all'ottimizzazione genica e al design della sequenza genica per aumentare la stabilità dell'mRNA anche tramite le predizioni delle possibili strutture secondarie, modulare il contenuto del GC% a quello dell'ospite.

#### **1.2.1.8 Tecnologia delle proteine di fusione e del taglio tramite proteolisi sito specifica**

Al fine di facilitare la purificazione e l'espressione delle proteine ricombinate, sono stati sviluppati una vasta gamma di partner di fusione (Stevens, 2000). Molti partner di fusione sono sviluppati soprattutto per strategie di purificazione per affinità e possono essere vantaggiose *in vivo* poiché possono proteggere le proteine "passeggere" dalla proteolisi intracellulare (Jacquet et al., 1999; Martinez et al., 1995), possono aumentare la solubilità (Davis et al., 1999; Kapust and Waugh, 1999; Sørensen et al., 2003b) o essere utilizzate come reporter per l'espressione (Waldo et al., 1999). Inoltre, i partner all'N terminale, possono avere anche un effetto importante nel miglioramento della stabilità dell'mRNA (Arechaga et al., 2003).

I tag di affinità maggiormente utilizzati sono l'His-tag (sequenza di istidine) che è compatibile con l'IMAC (“immobilized metal affinity chromatography”) e la glutatione S-trasferasi per la purificazione su resine di glutatione.

Partner di fusione finalizzati soprattutto per l'ottimizzazione dell'espressione includono la proteina che lega il maltosio (MBP) e NusA. MBP (40 kDa) e NusA (54.8 kDa) agiscono aumentando la solubilità delle proteine a loro fuse, e sono indicate per la produzione di proteine che tendono a formare i corpi di inclusione (Kapust and Waugh, 1999).

Tuttavia, il successo di utilizzare la fusione con un partner di solubilità dipende dalla proteina specifica e non è un metodo universale per la prevenzione della formazione dei corpi inclusi.

Una nuova strategia utilizzata per selezionare le proteine solubili, è l'utilizzo di un “folding reporter”. La fluorescenza di *E. coli* che esprime il gene target fuso alla GFP, dipende solo dalla solubilità della proteina espressa (Waldo et al., 1999).

Generalmente, è desiderabile separare la proteina ricombinante dal partner di fusione. Ciò avviene tramite la proteolisi sito diretta *in vitro* del prodotto proteico. Per questo scopo, sono molto utilizzate due serino proteasi, di origine eucariotica, coinvolte nella coagulazione del sangue: il fattore Xa e la trombina (Jenny et al., 2003). Il fattore Xa riconosce e taglia la sequenza amminoacidica IEGR/X, dove X può essere un amminoacido qualsiasi ad eccezione dell'arginina e della prolina. La trombina riconosce la sequenza LVPR/G.

Tra le altre proteasi più utilizzate, vi è una 3C proteasi, la TEV proteasi (“tobacco etch virus protease”). Questa proteasi taglia con alta efficienza, la sequenza ENLYFQ/G (Kapust et al., 2002). È intensamente usata per la proteolisi sito diretta *in vitro*, ma è anche utilizzata per controllare il processamento intracellulare della proteina fusa (Kapust and Waugh, 2000).

Tuttavia, la selezione delle condizioni ottimali di reazione di proteolisi e la specifica proteasi da utilizzare, dipendono dalla proteina target.

### **1.2.1.9 Ceppi ospiti di *E. coli***

La base genetica del ceppo ospite è una caratteristica importante per la produzione di proteine ricombinanti. I ceppi di espressione possono essere mutati per le proteasi naturali dell'ospite, mantenendo stabile il prodotto proteico e conferendo al ceppo alcuni elementi genetici rilevanti del sistema di espressione (per esempio, i ceppi DE3). Sono disponibili diversi tipi di ceppi specializzati per le singole applicazioni (tab.3).

*E. coli* BL21 è l'ospite più utilizzato e si è dimostrato eccellente nelle applicazioni standard di espressione ricombinante. BL21 è un ceppo robusto di *E. coli* B, in grado di crescere vigorosamente in mezzi minimi (Chart et al., 2000). BL21 è deficiente per OmpT e Lon, due proteasi che possono interferire nella produzione della proteina ricombinante intatta. Tra i ceppi derivati da BL21, ci sono quelli *recA* negativi che stabilizzano i plasmidi contenenti sequenze ripetitive (ceppo BLR della Novagen), mutanti negativi *trxB* / *Gor* per migliorare la formazione del legame disolfuro nel citosol (ceppi Origami e AD494 della Novagen), mutanti *LacI* che consente livelli regolabili di espressione proteica (serie Tuner della Novagen) e mutanti con aumentata tolleranza all'espressione di proteine tossiche e aumentata espressione solubile per proteine che tendono ad aggregarsi nei corpi inclusi e per le proteine di membrana (Avidis C41 (DE3) e C43 (DE3) ceppi).

**Table 1-3. Alcuni ceppi di *E. coli* disponibili per la produzione di proteine eterologhe.**

<b>Ceppi</b>	<b>Deriv.</b>	<b>Caratteristiche chiavi</b>	<b>Referenze</b>
BL21	B834	<i>lon</i> e <i>ompT</i>	Novagen
BL21 <i>trxB</i>	BL21	<i>trxB</i> ; <i>lon</i> e <i>ompT</i>	Novagen
BL21 CodonPlus-RIPL	BL21	Esprime codoni rari per <i>E. coli</i> ; <i>lon</i> and <i>ompT</i>	Stratagene
BL21 (DE3)	BL21	La T7 RNA è necessaria per l'attività del promotore T7.	Novagen
BL21 (DE3) pLysS	BL21	La T7 RNA è necessaria per l'attività del promotore T7.; contiene il lisozima T7 che degrada la T7 RNA polimerasi.	Novagen
BLR	BL21	<i>recA</i> ; stabilizza le ripetizioni tandem; <i>lon</i> and <i>ompT</i> .	Novagen
HMS174	K-12	<i>recA</i> ; resistenza alla rifampicina.	Novagen
JM 83	K-12	Utilizzato per la traslocazione della proteina ricombinante nel periplasma.	(High et al. 1993)
Origami	K-12	<i>trxB</i> e <i>gor</i> .	Novagen
Origami B	BL21	<i>trxB</i> e <i>gor</i> ; <i>lon</i> e <i>ompT</i> .	Novagen
Rosetta	BL21	Esprime codoni rari per <i>E. coli</i> ; <i>lon</i> e <i>ompT</i> .	Novagen
Rosetta-gami	BL21	<i>trxB</i> and <i>gor</i> ; Esprime codoni rari per <i>E. coli</i> ; <i>lon</i> e <i>ompT</i> .	Novagen
BL21 star	BL21	<i>rne131</i> ; <i>lon</i> and <i>ompT</i> .	Invitrogen
MM-294	K-12	Contiene mutazioni nel pathway per la produzione di acetato.	(Bauer et al. 1990)

### **1.2.1.10 Strategie per il design di sistemi di espressione finemente regolati.**

I vantaggi di avere a disposizione dei promotori ben caratterizzati, ha portato al design di sistemi di espressione finemente regolabili che sono estremamente utili soprattutto per i casi in cui l'espressione della proteina di interesse è dannosa per la crescita dell'ospite.

Sono stati sviluppati vari tipi di approcci per ottimizzare i sistemi di espressione: l'uso del "plating" (Suter-Crazzolaro e Unsicker, 1995), cambiamento nei rapporti repressore\operatore (Muller-Hill e Gilbert 1968.), l'induzione tramite infezione con un fago ricombinante (Doherty et al., 1993), l'aumento della forza di un promotore con l'utilizzo di un plasmide ad elevato numero di copie (Warne et al., 1986.), l'uso del terminatore trascrizionale (Nishihara et al., 1994) in combinazione dell'antiterminatore (Mertens et al., 1995), l'uso di un promotore inducibile su un plasmide con un "copy number" controllabile (Thomas et al., 1993), sistemi a regolazione incrociata (Chen et al., 1993; Chen et al., 1995), cotrasformazione di plasmidi che utilizzano la SP6RNA polimerasi (Sagawa et al., 1996), l'uso di RNA antisense (O'Connor et al., 1987).

In fine, un approccio elegante riguarda l'utilizzo di un promotore invertibile: il promotore fiancheggiato da due siti di integrazione, così che l'espressione del gene di interesse avviene soltanto quando si ha l'induzione genica di una girasi che induce una ricombinazione sito specifica e permettendo l'espressione della proteina target (Wulfinf et al., 1993).

Ovviamente tutte queste soluzioni possono essere un valido aiuto per l'ottimizzazione dei sistemi di espressione, tuttavia è sempre la specifica proteina che determina volta per volta quale possa essere la strategia migliore. Sebbene molti di questi approcci non siano ancora stati utilizzati per la produzione su scala industriale, rappresentano comunque degli strumenti importanti nell' "armamentarium" dell'espressione genica.

### **1.2.2 Risposta allo stress indotta dall'espressione della proteina ricombinante in E. coli**

Il mantenimento del plasmide spesso induce una risposta di stress soprattutto quando la proteina target è espressa ad alti livelli (Hoffmann and Rinas, 2004).

Alcune risposte a stress da espressione di proteine eterologhe rientrano nelle risposte a stress ambientale come shock termico, deplezione di amminoacidi o di altri elementi nutritivi. Lo stress indotto dal mantenimento plasmidico dipende dall'elevato numero di copie per cellula e dall'espressione dei geni espressi sul plasmide, molte volte costitutivamente, come le resistenze agli antibiotici (Bailey, 1993; Hoffmann et al., 2002).

Alcune delle proteine prodotte possono interferire con il metabolismo dell'ospite, ma in generale l'espressione della proteina ricombinante induce un sovraccarico metabolico.

Il "metabolic burden" è definito come la quantità di risorse, sia materiali che energetiche, che è deviata dal metabolismo dell'ospite verso l'espressione del gene ricombinante (Bentley and Kompala, 1990).

Generalmente il tasso di crescita specifico delle cellule che esprimono il gene ricombinante è inversamente correlata con il tasso di sintesi della proteina eterologa (Dong et al., 1995; Hoffmann and Rinas, 2004).

La risposta a stress da parte delle cellule in condizioni di energia limitante, è estremamente complessa. Per cui, l'espressione della proteina ricombinante induce ulteriormente un aumento generale della sintesi proteica dell'ospite. In generale comunque, mentre la proteina ricombinante è altamente espressa, l'espressione dei geni dell'ospite è sottoregolata (Hoffmann et al., 2002). La risposta include la riprogrammazione dei pattern di espressione e l'attivazione di pathway alternativi per la produzione di energia, la sottoregolazione della maggior parte dei geni coinvolti nella trascrizione, traduzione e biosintesi degli amminoacidi (Chang et al., 2002). L'aggiunta degli appropriati amminoacidi può alleviare questo fenomeno, noto come risposta stringente.

L'altro tipo di risposta è l'aumento della proteolisi della proteina ricombinante. Questo fenomeno può essere aggirato con l'utilizzo di ceppi deficienti per alcune proteasi, la co-espressione di chaperonine e inibitori di proteasi (Dong et al., 1995; Trepod and Mott, 2002).

### **1.2.3 Fermentazioni industriali per la produzione di proteine di interesse terapeutico**

La produzione di proteine in *E. coli* può essere incrementata significativamente con l'utilizzo di sistemi colturali ad alta densità cellulare. Questi possono essere classificati in tre gruppi: batch, fed-batch e continuo. Questi metodi permettono di raggiungere una produzione di biomassa superiore ai 100 g (peso cellulare umido)/litro e possono abbassare fortemente i costi di produzione (Yee and Blanch 1992; Lee, 1996; Yamane, et Shimizu. 1984).

La composizione del mezzo colturale in questi casi, deve essere attentamente formulate a monitorata poiché potrebbe avere un importante effetto metabolico sia sulla crescita cellulare, sia sulla produzione proteica.

Le colture batch rappresentano il modo più semplice per la produzione di proteine ricombinanti. In una coltura batch tutti i nutrienti che occorrono per la crescita cellulare sono presenti dall'inizio. Le colture senza nessun fattore limitante, sono caratterizzati comunemente da alterazioni durante la crescita che possono essere, ad esempio, limitazione dell'ossigenazione e cambiamento del pH. Inoltre, alcuni pathway metabolici possono cambiare e anche portare all'accumulo nel mezzo di intermedi catabolici che inibiscono la crescita. Di fatto, con le colture batch normalmente si possono ottenere solo modeste densità cellulari e livelli di produzione (Lee,1996).

Comunemente, per ottenere elevate densità cellulari e un alto livello di produzione di proteine ricombinanti, si fa ricorso alle colture fed-batch. Nelle colture fed-batch, la fonte

carboniosa è aggiunta in proporzione al consumo. Così facendo, l'“overflow metabolism” e l'accumulo di prodotti inibenti la crescita sono limitati (Kleman et al.,1991).

Per le fed-batch, normalmente sono utilizzati dei terreni definiti in modo tale che tutti i nutrienti sono noti e possono essere così controllati durante la crescita. Ciò li rende maggiormente riproducibili rispetto alle crescite in terreni complessi. D'altra parte, talvolta l'aggiunta di mezzi complessi, come l'estratto di lievito, è necessaria per ottenere livelli elevati di proteina target. Un aspetto importante che riguarda l'“overflow metabolism”, è rappresentato dall'acetato, un agente lipofilico, prodotto da *E. coli* alla presenza di un eccesso di glucosio o in condizioni limitate di ossigenazione (Kleman et al.,1994). Concentrazioni troppo elevate di acetato riducono il tasso di crescita, il livello massimo di densità cellulare ottenibile e la produzione di proteina target. Diventa così importante mantenere i livelli di acetato sotto la concentrazione di inibizione. Questo può essere ottenuto controllando la coltura in vario modo: il tasso di crescita può essere controllato tramite un nutriente limitante la crescita; utilizzando glicerolo o fruttosio invece che glucosio come fonte carbonata; aggiungendo glicina o metionina o abbassando la temperatura di crescita o tramite l'ingegnerizzazione metabolica (Riesenberget al.,1991, Korz et al.,1995; Aristidou et al.,1999; Han et al.,1993; Hahm et al.,1994; Aristidou et Bennett,1995). Per esempio, il gene *alsS* di *Bacillus subtilis*, codificante per l'acetolattato sintasi, è stato introdotto in *E. coli* con successo. La riduzione dell'accumulo di acetato causa un miglioramento significativo alla produzione di proteina ricombinante (Luli and Strohl 1990).

### **1.3 Introduzione al Quorum Sensing**

L'espressione genica dei batteri può essere regolata da una vasta gamma di segnali intra e extra cellulari. Infatti, i cambiamenti ambientali inducono, tramite segnali chimici e fisici, cambiamenti sia morfologici che fisiologici. Alcune risposte di adattamento dipendono dalla percezione chimica e dal processamento dell'informazione che in modo transiente,

altera i pattern di espressione genica. La scoperta che i batteri stessi possono produrre segnali chimici extracellulari per una comunicazione intercellulare, ha introdotto un nuovo paradigma per la regolazione genica per i monocellulari.

Il Quorum Sensing (QS) è quel meccanismo di coordinazione delle attività microbiologiche di gruppo che permette il controllo della regolazione genica da parte della densità cellulare tramite la produzione, il rilascio e la percezione di composti a basso peso molecolare, chiamati autoinduttori.

Nella maggior parte dei casi, la concentrazione extracellulare dell'autoinduttore aumenta in concomitanza dell'aumento della densità cellulare. Quando la concentrazione molecolare dell'autoinduttore supera una soglia critica, induce una trasduzione del segnale e una risposta di espressione genica.

Questo modello generale di coordinamento dell'espressione genica, si è evoluto per permettere ai microrganismi l'accesso ai nutrienti complessi, a nicchie ecologiche o per aumentare l'efficienza di difesa per la popolazione contro altri microrganismi o contro le risposte di difesa degli ospiti eucariotici.

Ritrovato per la prima volta in due specie di batteri marini associato al fenomeno della bioluminescenza in *Vibrio harveyi* e *Vibrio fischeri* (Nealson et al., 1970; Nealson et Hastings, 1979), il QS è risaputo essere ampiamente diffuso sia tra i Gram-negativi che Gram-positivi (Fuqua et Greenberg, 1998; Miller et Bassler, 2001; Williams et al., 2000; Withers et al., 2001; Bassler, 1999).

I Gram-positivi utilizzano come autoinduttori del QS dei peptidi con modifiche post-traduzionali. Questi per essere esportati nel mezzo extracellulare si servono di specifici trasportatori che legano l'ATP e sono tradotti attraverso sistemi a due componenti (Lazazzera et al., 1997). Infatti, una volta che la concentrazione del peptide segnale raggiunge una concentrazione extracellulare critica, dipendente dalla densità di popolazione, si lega al proprio recettore chinasi che inizia la cascata di fosforilazione che

termina con la fosforilazione e l'attivazione della proteina regolatrice di riferimento. Il regolatore attivo, può dunque legare il DNA e indurre un cambiamento dell'espressione genica. Esempi di QS di Gram positivi includono il sistema di competenza ComD/ComE di *Streptococcus pneumoniae*, il sistema di competenza e sporulazione ComP/ComA di *Bacillus subtilis* e il sistema di virulenza AgrC/AgrA di *Staphylococcus aureus* (Haverstein et Morrison, 1999; Solomon et al., 1995; Norvick, 1999).

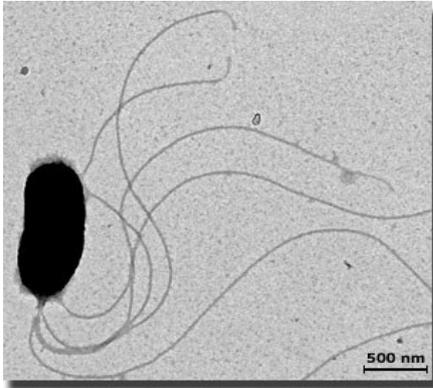
Diversamente dai positivi, i Gram-negativi, utilizzano di solito, molecole appartenenti alla classe delle omoserine lattone (HSL), con catene carboniose di diversa lunghezza, che diffondono la membrana. Il modello di QS dei Gram-negativi è strutturato su due famiglie proteiche, LuxR e LuxI (Fuqua et al., 1996). La famiglia proteica di LuxI, è composta dalle HSL-sintasi, mentre quella di LuxR è costituita da fattori trascrizionali dipendenti dal legame con l'HSL. Il legame specifico HSL/LuxR assicura un elevato grado di selettività e di complessità. Le HSL sono prodotte da più di 50 specie di batteri e differiscono solo per i gruppi acili e specie batterica può rispondere a diversi HSL.

Esempi importanti includono il sistema della bioluminescenza di *V. fischeri*, il sistema di virulenza LasI/LasR RhlI/RhlR di *Pseudomonas aeruginosa* e il sistema di virulenza TraI/TraR di *Agrobacterium tumefaciens* (Fuqua et al., 1996; Parsek et Greenberg, 2000; Piper et al 1993).

### **1.3.1 La bioluminescenza e la scoperta del QS in *V. fischeri***

La bioluminescenza fa riferimento a quel fenomeno di emissione della luce visibile negli organismi viventi tramite l'ossidazione dei composti organici mediante catalisi enzimatica.

Gli organismi luminescenti che includono batteri, funghi, pesci, insetti, alghe, sono presenti sia in ambienti marini che terrestri. Tra essi, i batteri sono i più diffusi e abbondanti organismi luminescenti presenti in natura. Sebbene il loro ambiente di origine sia l'oceano, impegnati in relazioni simbiotiche e asimbiotiche, saprofitiche o parassitiche, molti batteri luminescenti sono ritrovati anche in ambienti terrestri.



**Figure 1-2 *Vibrio fischeri***



**Figure 1-3. *Euprymna scolopes***

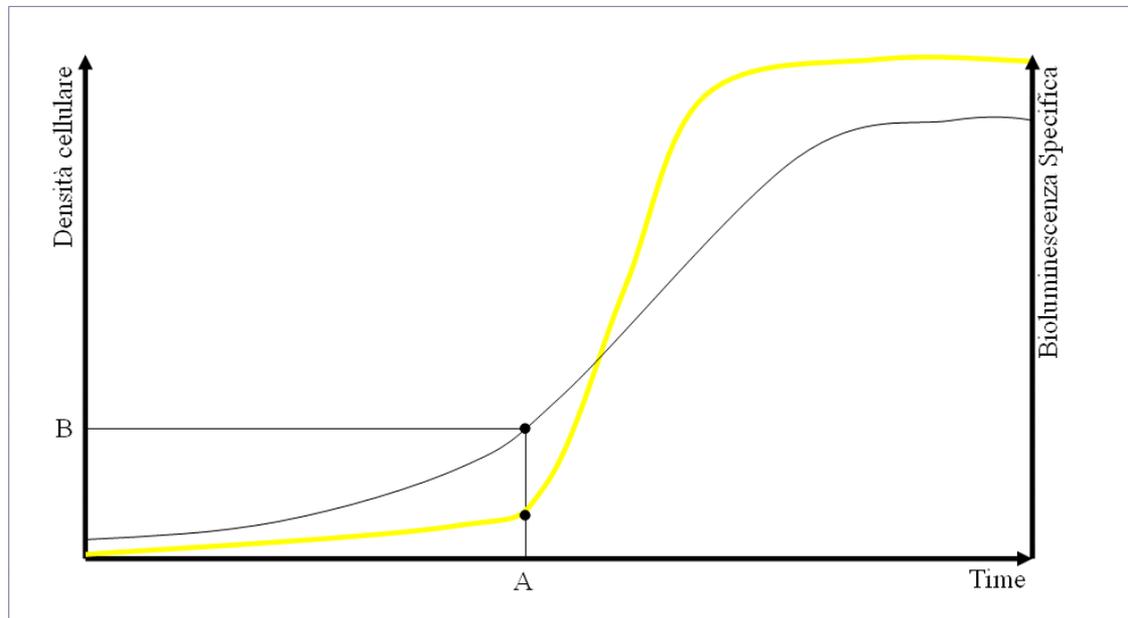
Sono state ampiamente studiate molte luciferasi dai batteri marini del genere *Vibrio* e *Photobacteria*, da quelli terrestri appartenenti al genere *Xenorhabdus*.

L'espressione della luminescenza in molti batteri, è stata ritrovata essere altamente dipendente dalla densità cellulare.

Nel 1970 Nealson and Hastings, scoprirono che nel controllo della bioluminescenza vi era un interessante meccanismo di regolazione genica (fig. 1-4).

L'osservazione era che i batteri non emettevano luce in quantità apprezzabile fino a che non fosse raggiunta una densità cellulare elevata. La regolazione genica dipendente dalla densità cellulare fu scoperta e dimostrata dal comportamento nei due stati naturali di *V. fischeri* (fig. 1-2), quello in forma planctonica e quello in forma simbiotica. Quando sospeso nell'ambiente marino, il batterio è alla concentrazione approssimativa di 100 UFC/ml o meno, e non produce alcun fenomeno apprezzabile di luminescenza poiché

l'autoinduttore non riesce mai a superare la concentrazione critica. Quando il batterio invece raggiunge una concentrazione di  $10^{10}$ - $10^{11}$  CFU/ml, come quando colonizza gli organi luminosi di *Euprymna scolopes* (fig. 1-3), esprime l'operone *lux* della luminescenza.



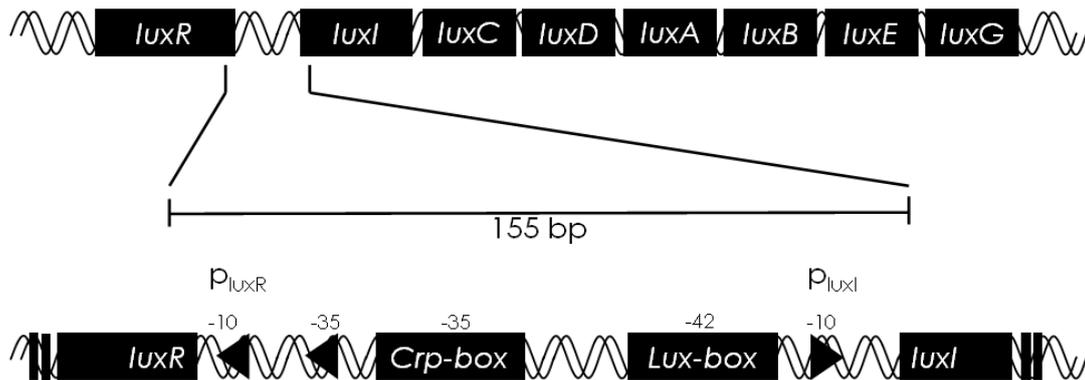
**Figure 1-4 Induzione della bioluminescenza in *V. fischeri*. Durante la crescita avviene l'induzione della bioluminescenza (A). L'induzione, in condizioni di crescita specifiche, è determinato da una concentrazione cellulare specifica (B) che determina il raggiungimento della concentrazione critica dell'HSL per il legame a LuxR.**

In questo modo il batterio è molto utile al polipetto notturno, cancellando il cono d'ombra generato dalla luce lunare che illumina il polipetto da sopra, rendendolo invisibile ai predatori da sotto. In cambio della bioluminescenza fornita, il batterio riceve un modo di proliferazione in un ambiente riparato e ricco di sostanze nutritive.

### 1.3.2 Struttura e regolazione del regulone lux in *V. fischeri*

I primi risultati importanti che hanno permesso di capire i meccanismi molecolari della bioluminescenza in *V. fischeri* nonché del primo circuito di QS, hanno riguardato negli anni '80 l'identificazione dell'autoinduttore e l'isolamento dei geni della luminescenza. Eberhard et al. (1981) identificò nella 3-ossosanoil-L-omoserinalattone (3O-C6-HSL) l'autoinduttore di *V. fischeri* e dimostrò che il composto sintetico aveva piena attività biologica. Engebrecht et al. (1983) isolò il frammento cromosomico di *V. fischeri* MJ-1 che

clonato in *E. coli* aveva la capacità di indurre la bioluminescenza con un comportamento da QS.



**Figure 1-5 Organizzazione dei geni lux nel regulone per la bioluminescenza di *V. fischeri* e particolare della regione regolatrice.**

I geni *lux* di *V. fischeri* sono organizzati su due unità trascrizionali divergenti, *luxR* e *luxICDABEG*, l'“operone *lux*” (fig.1-5) (Engebrecht and Silverman, 1984).

Il primo gene dell'operone, *luxI*, e il gene singolo dell'unità trascrizionale divergente, *luxR*, sono i due geni regolatori. LuxI è la HSL sintasi, mentre LuxR è l'attivatore dell'operone *lux* in risposta all'autoinduttore (Engebrecht et al., 1983; Engebrecht and Silverman, 1984).

Il gene *luxR* e l'operone *lux* sono separati da 219 bp che contiene la regione regolativa in *cis* del regulone *lux*. Questa regione contiene i due promotori divergenti per *luxR* e l'operone *lux*. Il promotore di *luxR* consiste delle due regioni -10 e -35, simili alle sequenze consenso per i promotori “housekeeping” di *E. coli*. Vi è inoltre, un sito di legame per il “cyclic AMP receptor protein” (CRP) in posizione -59. L'operone *lux* invece ha la regione -10, ma non una regione -35 paragonabile alle sequenze consenso di *E. coli*. Centrata alla posizione -40, infatti, vi è una sequenza palindromica di 20 basi, chiamata “lux box”. Questo rappresenta il cuore regolativo dell'intero regulone, poiché è la sequenza richiesta

per l'attivazione dell'operone *lux*, nonché il sito di legame del complesso LuxR-HSL. Studi in vitro hanno dimostrato che *luxRΔN* e l'RNA polimerasi proteggono il *luxBox* dall'attività nucleasica della DNasi I (Stevens et al., 1994). È stato suggerito che LuxR può legare RNA polimerasi in soluzione, facilitando così il legame delle due proteine al *lux box* (Stevens and Greenberg, 1997).

Nell'operone, i geni *luxA* e *luxB* codificano per l' $\alpha$  e la  $\beta$  subunità della luciferasi, mentre *luxC*, *luxD* e *luxE* codificano per i polipeptidi del complesso reduttasico per la bioluminescenza (reduttasi, acil-trasferasi, acil-proteina sintasi) che sono specifici per la sintesi e il riciclaggio dei substrati aldeidici della luciferasi (Boylan et al., 1985; 1989). L'ultimo gene dell'operone, *luxG*, è seguito da un forte terminatore trascrizionale e non è richiesto per un elevato livello di produzione di luce (Swartzman et al., 1990).

Tutti i geni dell'operone *luxICDABEG* sono regioni intergeniche molto brevi. Meno di 50 basi separano molti geni. *luxE* e *luxG* sono così vicini che l'RBS di *luxG* è nella regione codificante di *luxE*.

Il terminatore trascrizionale del messaggio policistronico è costituito da un hairpin loop ricco di GC, immediatamente seguito da una successione di poly T. Questo tipico terminatore rho dipendente si trova poco a valle del gene *luxG*.

Diversi studi provano un sito di legame debole per LuxR è presente nel gene *luxD*. L'ipotesi proposta è che questo sito può interagire con l'operatore *lux* tramite il ripiegamento del DNA per reprimere l'espressione di *luxR*. In questo modo, l'eccessiva presenza di LuxR reprime l'espressione di *luxR* (Swartzman et al., 1990). L'RNA policistronico dell'operone è stato identificato tramite Northern blotting. La maggior parte dell'mRNA sembra iniziare da *luxD* o *luxA* e terminare dopo *luxB*. Questa osservazione è consistente con gli alti livelli di sintesi della luciferasi (*luxA*, *luxB*). Ciò potrebbe dipendere da segnali di inizio e fine della trascrizione interni all'operone *lux* o da un processamento post-trascrizionale dell'mRNA. Inoltre, è noto che nel regulone *lux* vi sono siti multipli di

inizio della trascrizione (Engebrecht and Silverman, 1987; Shadel et al., 1990; Van Tilburg et al., 1996).

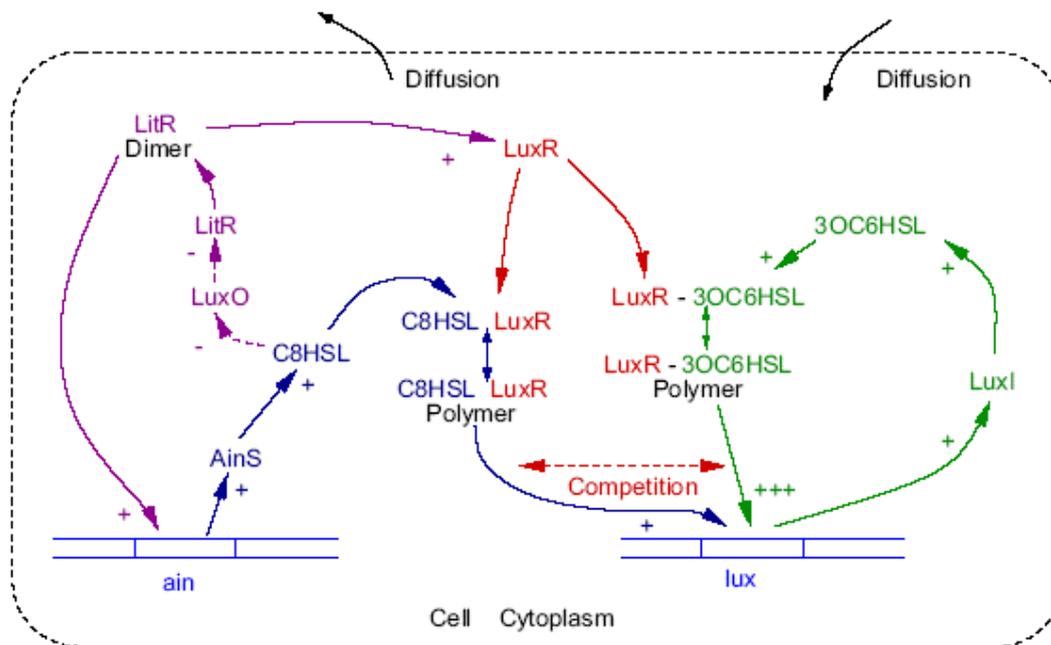
### **1.3.3 Modello molecolare della regolazione genica dipendente dalla densità cellulare.**

L'organizzazione e la funzione dei geni *lux* conducono a un modello semplice di regolazione. Un aspetto centrale è dato dalla permeabilità di membrana della molecola segnale HSL (Kaplan and Greenberg, 1985). Appena la concentrazione cellulare di *V. fischeri* aumenta, la concentrazione di HSL gradualmente aumenta nel mezzo e nelle cellule. La sintesi *de novo* di HSL risulta dalla presenza di LuxI prodotta per un livello basale di espressione. Quando la concentrazione della HSL supera la concentrazione limite per il legame con LuxR, il complesso LuxR-HSL può interagire con l'RNA polimerasi, facilitando la sua interazione con il promotore  $P_{luxI}$  (Stevens and Greenberg, 1997).

L'attivazione dell'operone conduce a un aumento autocatalitico nella sintesi della molecola segnale, poiché LuxI fa parte dell'operone indotto. Ciò conduce a un rapido aumento della concentrazione della HSL e dell'espressione dell'operone stesso (Eberhard et al., 1991).

Per quanto riguarda la regolazione di LuxR invece, il promotore di *luxR* è attivato dal recettore per l'AMP ciclico (CRP). Inoltre, alti livelli di HSL e LuxR possono reprimere l'espressione di *luxR* sia con meccanismi trascrizionali che post-trascrizionali (Shadel and Baldwin, 1991; 1992).

*V. fischeri* ha due sistemi di QS basati su HSL che lavorano in modo sequenziale (fig. 1-6). Oltre al sistema LuxR-LuxI ha, infatti, anche il sistema AinS, (Lupp et al., 2003; Gilson et al., 1995; Visik, 2005). AinS produce l'ottanoil omoserina lattone (C8-HSL) che ad una concentrazione critica interagisce con il recettore AinR per indurre una cascata di segnali. Il legame di C8-HSL a AinR, reprime LuxO, permettendo la trascrizione dell'attivatore trascrizionale LitR (Lupp et al., 2003). Quando LuxO è represso, LitR è capace di



**Figure 1-6 Sistema di regolazione della bioluminescenza in *V. fischeri*, includente i sistemi *lux* e *ain* (da Kuttler ed Hense, 2007)**

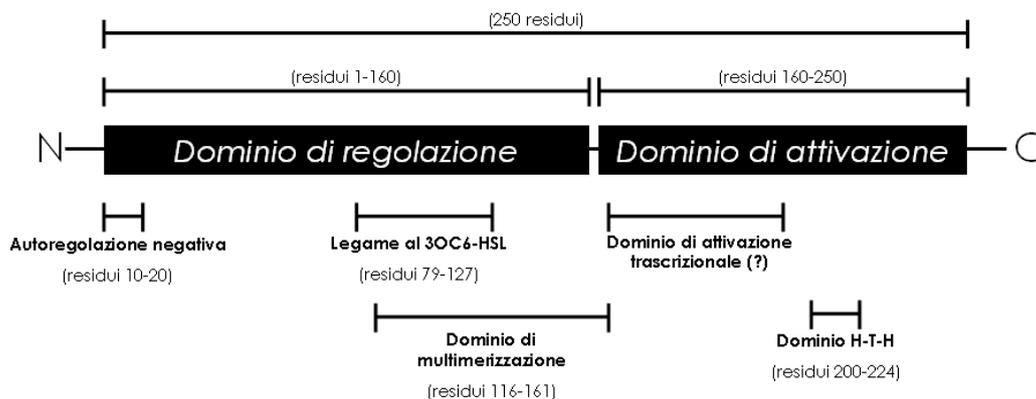
aumentare l'espressione di molti geni, tra cui dello stesso *luxR* (Siegl 2004). LuxR può interagire con C8-HSL per indurre debolmente la trascrizione dell'operone *lux*, stimolando il QS del sistema *luxR-luxI*.

La natura sequenziale dei due sistemi dà a *V. fischeri* la capacità di distinguere e rispondere a tre diverse condizioni di popolazione: una a bassa densità cellulare, quando non è percepito nessun autoinduttore; una situazione intermedia di densità cellulare, in cui C8-HSL regola un set specifico di geni; una condizione di alta densità cellulare, in cui sia C8-HSL che 3OC6-HSL inducono una risposta. Un tale arrangiamento sequenziale porta a un controllo temporale sull'espressione di vari geni (Antunes, 2007).

### 1.3.3.1 LuxR

Sono stati effettuati numerosi studi con forme mutate di LuxR di *V. fischeri* o di altre proteine appartenenti alla famiglia LuxR. Inoltre è stata risolta la struttura tridimensionale dell'omologo di LuxR, TraR di *Agrobacterium tumefaciens*, in complesso con la rispettiva HSL, la N-3-ossottanoil-L-omoserine lattone e la sequenza di DNA (Vannini et al., 2002; Zhang et al., 2002; Chai & Winans, 2004; Choi & Greenberg, 1991; Hanzelka & Greenberg, 1995; Kiratisin et al., 2002; Lamb et al., 2003; Luo et al., 2003a; Shadel et al., 1990; Slock et al., 1990) (fig. 1-7)

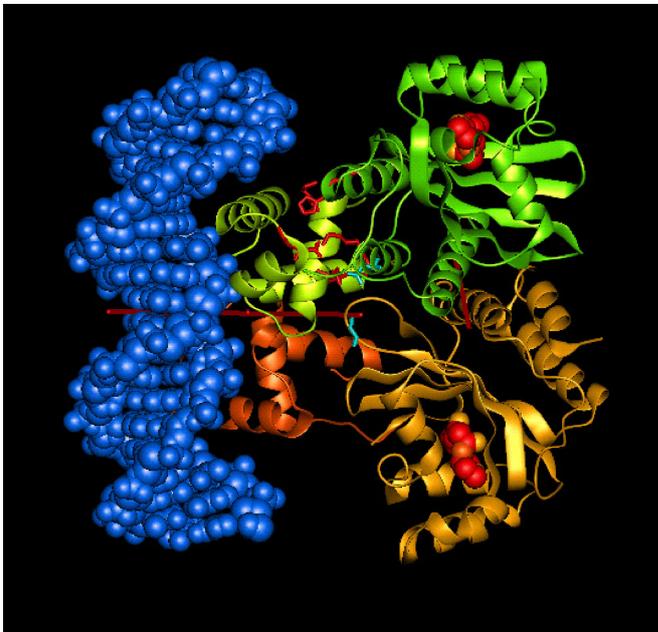
I vari studi hanno portato all'assunzione che LuxR (250 amminoacidi) è costituita da due domini polipeptidici (Stevens and Greenberg, 1999) (fig.6).



**Figure 1-7 Domini funzionali di LuxR.**

Il dominio N terminale (NTD) della proteina, apparentemente associato anche con la membrana cellulare, è coinvolto nel legame con l'autoinduttore. In assenza di autoinduttore, blocca l'attività del dominio C terminale (CTD) che invece è coinvolto nel legame con il DNA. LuxR dovrebbe essere attivo in forma multimerica, probabilmente in dimero (Choi & Greenberg, 1992a).

Il dominio CTD ha un'elevata similarità con i domini elica-giro-elica (HTH) della superfamiglia di fattori trascrizionali LuxR-FixJ (Choi and Greenberg, 1992a; Fuqua *et al.*, 1994; Eglan and Greenberg, 2001). La possibilità di trasformare LuxR in un repressore, tramite la delezione del NTD, indica la sua capacità di legare in modo forte e specifico il luxbox (Eglan & Greenberg, 2000). La mutagenesi di alcuni residui amminoacidici nella regione 190-224, identificata come regione putativa HTH, risulta in mutanti incapaci di legare il lux-box in un promotore artificiale *lacZ* (Eglan and Greenberg, 2001).



**Figure 1-7 TraR di *Agrobacterium tumefaciens*. TraR è un omologo di LuxR. Il suo folding è descritto come come una farfalla con le ali dietro la schiena.**

LuxR $\Delta$ N purificato funziona *in vitro* come attivatore del promotore dell'operone lux, indipendente dalla molecola segnale (Choi & Greenberg, 1991; Stevens *et al.*, 1994). È in aggiunta, capace di legare la sequenza in cis solo in combinazione con *il*  $\delta_{70}$  dell'RNA

Non è noto se questa regione è coinvolta nel legame specifico al DNA poiché la forma attiva full length non è stata purificata al fine di esperimenti di legame specifico *in vitro*.

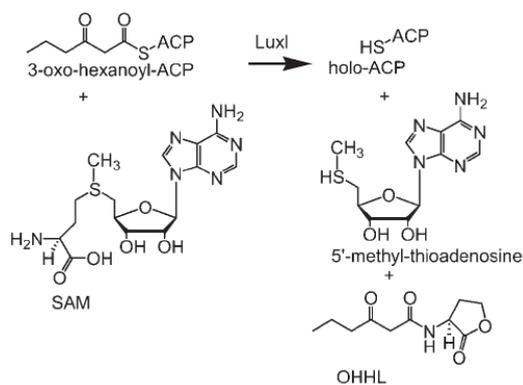
Eglan e Greenberg (2001) hanno identificato due varianti di luxR, W201A e I206A, che possono legare il DNA del luxbox, ma incapaci di attivare la trascrizione dell'operone lux. Siccome non sono stati ottenuti varianti dello stesso tipo per mutazioni a valle del residuo 206, si ritiene che la "regione attivatrice" è poco a monte del motivo HTH.

polimerasi di *E. coli* (Stevens *et al.*, 1994). Quindi non è possibile concludere se LuxRΔN lega il DNA direttamente.

Un'ipotesi alternativa per il funzionamento della regolazione si basa sull'assunzione che il complesso LuxR-HSL potrebbe funzionare rilasciando la repressione dell'operone lux.

La sintesi di LuxR in forma attiva e il legame dello stesso LuxR alla HSL è migliorata da GroEL, indicando che l'attività delle scaperonine è importante per stabilizzare la proteina (Hanzelka and Greenberg, 1995).

### 1.3.3.2 LuxI e HSL



**Figure 1-8 Sintesi del 3OC6-HSL da parte di LuxI. I substrati utilizzati sono normalmente presenti nella cellula poiché derivano da altre vie metaboliche fondamentali. Il 3OC6-ACP è un intermedio della sintesi degli acidi grassi, mentre la S-adenosin-metionina (SAM) è un donatore ubiquitario di gruppi metilici.**

residui conservati tra i membri della famiglia proteica LuxI (Hanzelka *et al.*, 1997).

Il primo gene dell'operone lux è luxI che dirige la sintesi di una proteina di 25kDa che in *E. coli* è necessaria e sufficiente per produrre l'autoinduttore 3O-C6-HSL di *V. fischeri* (Kuo *et al.*, 1996).

Sono state identificate in diversi batteri molte HSL sintasi con un elevato grado di similarità (25-35% di identità) con LuxI (Lewenza *et al.*, 1999).

Analisi mutazionali definiscono due regioni importanti per la sua attività come HSL sintasi: la regione che comprende i residui amminoacidici 25-70 dovrebbe costituire il sito attivo dell'enzima; la regione 104-164 coinvolta nel riconoscimento specifico del substrato. Quest'ultima regione contiene dei

È stato dimostrato che LuxI produce il 3O-C6-HSL dal 3-ossoesanoil-proteina trasportatrice di acili (ACP) e S-adenosilmetionina (Hanzelka and Greenberg, 1996) (fig. 1-8).

Gli autoinduttori prodotti dalle proteine omologhe a LuxI, sono simili per struttura chimica e sono tutti formati da un N acil-L-omoserina lattone con differenza di lunghezza della catena di acili.

Gli autoinduttori sono molecole estremamente mobili e possono facilmente permeare la membrana. In oltre sono composti biologici labili. L'anello lattonico, infatti, è soggetto all'idrolisi alcalina (Voelkert et Grant, 1970).

Inoltre, altri fattori possono influenzare l'effettiva concentrazione degli HSL, in modo sia positivo che negativo. C'è l'evidenza per esempio, che le lattonasi o altri enzimi possono degradare l'autoinduttore. È stato anche dimostrato che i furanoni alogenati interferiscono con la comunicazione batterica. Infatti, spiazzano i normali ligandi dalle proteine della famiglia LuxR e promuovono la loro rapida degradazione (Manefield et al., 1999).

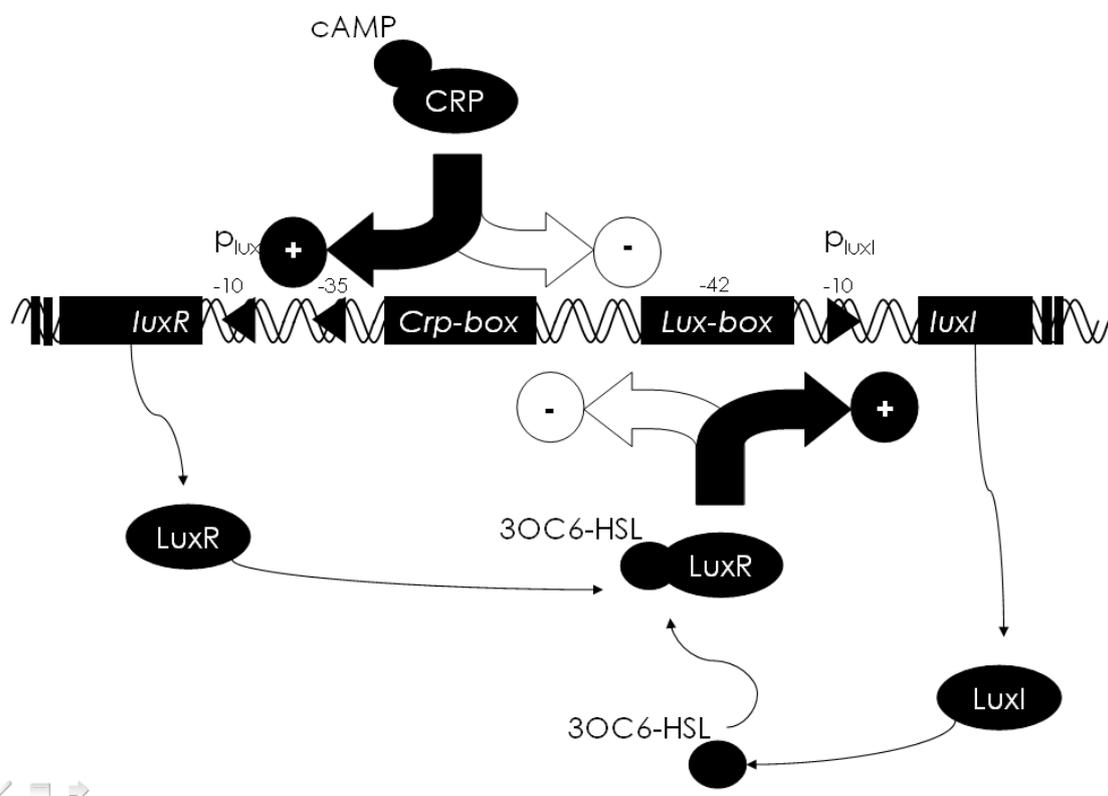
#### **1.3.4 Controllo gerarchico del QS in *V. fischeri***

Il meccanismo di QS in *V. fischeri* è controllato dalla concentrazione intracellulare di AMP ciclico, tramite la cAMP Receptor Protein (CRP). Per la trascrizione di *luxR* è richiesto il complesso cAMP\CRP. I primi studi verificarono una repressione transiente della luminescenza mediata dalla presenza di glucosio nel mezzo (Ruby and Nealson, 1976; Friedrich and Greenberg, 1983). La repressione catabolica fu dimostrata con l'utilizzo dei mutanti per *cya* e *crp* di *E. coli* (vedi fig. 1-10).

L'attivazione della trascrizione di *luxR* tramite il complesso cAMP\CRP potenzia la risposta da QS tramite un aumento della concentrazione cellulare di LuxR.

Una complessità regolatoria addizionale deriva da una repressione da 2 a 10 volte, dell'espressione dell'operone *lux* dallo stesso complesso cAMP\CRP (Dunlap and Kuo, 1992).

L'effetto della repressione catabolica, rappresenta il controllo esercitato sulla bioluminescenza dallo stato nutrizionale della cellula. In condizioni di limitazione nutrizionale e di crescita, i livelli di cAMP sono elevati e stimolano il QS. In condizione di rapida crescita, quando i livelli cellulari di cAMP ciclico sono bassi, abbassano la risposta al QS o la bloccano del tutto.



### 1-10 Elementi regolatori dell'operone *lux*

Diverse condizioni influenzano la crescita e la luminescenza di *V. fischeri* in modo opposto, favorendo l'una e sopprimendo l'altra, e includono oltre che la presenza di glucosio, l'ossigenazione e la disponibilità di ferro (Ruby and Nealson, 1976; Nealson and Hastings, 1977; Haygood and Nealson, 1985a; 1985b; Hastings et al., 1987).

Tutti i batteri luminosi, eccetto *X. luminescens* esibiscono una repressione da ferro e l'induzione del sistema lux in condizioni di limitazione di ferro (Haygood and Nealson, 1985). Parallelamente, i batteri luminosi che crescono in condizioni di ossigeno limitanti la crescita, mostrano un comportamento diversificato per quel che riguarda l'espressione della luminescenza. Per *V. fischeri* si ha un aumento della bioluminescenza in condizioni di bassa ossigenazione. (Nealson and Hastings, 1977)

### 1.3.5 Applicazioni del lux System

La “synthetic biology” sta emergendo come branca della biologia, come alternativa alla “system biology” nel descrivere la trama di principi che costituiscono i sistemi biologici complessi e si sta affermando come una disciplina ingegneristica con promettenti applicazioni nel settore biomedico, industriale e biotecnologico.

Attraverso una maggiore comprensione di come i componenti individuali agiscono e interagiscono, è possibile costruire complessi circuiti genici artificiali con un predeterminato scopo. Gli studi pionieristici in questa area hanno portato alla classificazione di pochi regolatori trascrizionali naturali, tra i quali TetR, LacI e CI. Recentemente, anche i componenti dei QS batterici, sono entrati a far parte di circuiti genetici di complessità sempre maggiore.

Il fatto che la regolazione genica dipendente alla densità cellulare sia stato ritrovato in combinazione ad un fenomeno tanto affascinante come la bioluminescenza, lo ha indirizzato in modo ancora più decisivo verso l'applicazione come bioreporter.

Un sistema plasmidico utilizzato come reporter per le HSL è stato costruito da Winson et al (1998) che risponde all'attivazione di LuxR e dei suoi omologhi LasR e RhIR. Infatti l'espressione dell'operone luxCDABE è stata abinata al controllo rispettivamente, dei promotori  $P_{luxI}$ ,  $P_{lasI}$  e  $P_{rhII}$ .

In un altro approccio, *luxI* è stato inserito nel genoma del fago  $\lambda$  per costruire un sistema fagico per il rilevamento dei ceppi di *E. coli* ambientali (Ripp et al., 2006). La molecola

segnale sintetizzata dopo l'infezione è rilevata, in questo sistema, da un bioreporter bioluminescente specifico per l'HSL, basato su luxCDABE. Questo sistema è in grado di rispondere autonomamente all'infezione fagica per concentrazioni di *E. coli* in un range da  $1 \times 10^8$  a 1 CFU/ml.

Il QS di *V. fischeri* è stato anche utilizzato per costruire e caratterizzare un circuito di controllo della popolazione che autonomamente regola la densità cellulare di *E. coli* (You et al., 2004). In questo circuito alla regolazione del QS corrisponde la regolazione del tasso di morte, guidato dall'espressione di una proteina tossica (CcdB).

Un'applicazione molto ingegnosa ha associato la capacità di invadere le cellule di mamifero alla capacità batterica di percepire la densità cellulare, abinando l'espressione del gene *inv* che codifica per l'invasina, sotto il controllo di un circuito genetico di QS (Anderson et al., 2006). La sola espressione del gene *inv* in *E. coli* è sufficiente per indurre nel batterio l'invasione delle linee cellulari di mamifero che esprimono le integrine  $\beta 1$  (Isbergety et al., 1987). Quando *inv* è sotto il controllo degli elementi LuxR-LuxI, l'invasione è verificabile solo ad alte densità cellulari del batterio.

Ci sono molti esempi di regolazione genica che prevedono un feedback positivo nei circuiti regolativi biologici, ma tra questi, i sistemi di QS sono tipicamente noti per attivarsi a concentrazioni di induttore molto basse. Infatti, è noto che luxR può rispondere a una concentrazione minore di 10 nM di HSL che corrisponde a circa 6 molecole di HSL per cellula (il volume cellulare di *E. coli* è nell'ordine di  $1 \times 10^{-15}$  L). A questa estrema sensibilità si abbina la capacità autocatalitica, dipendente dal fatto che l'espressione dell'HSL sintasi risponde alla HSL stessa, in un circuito che si autoamplifica. Con l'avvento della "synthetic biology", circuiti genetici di questo tipo rispondono sempre meglio alla loro capacità di essere modificati e utilizzati per vari scopi (Sayut et al., 2006).

## 2 Scopo della tesi

I sistemi di induzione genica per alte produzioni di proteine ricombinanti sono stati studiati intensivamente a causa della loro importanza nella ricerca e nell'industria. Tutti i sistemi di espressione, volti alla produzione di proteine di interesse, in un organismo ospite, che preferibilmente resta essere *Escherichia coli*, possono essere raggruppati in tre grandi classi.

I sistemi di espressione costitutiva, che fanno uso, per esempio, di un promotore forte del fago  $\lambda$ , sono riportati raramente in letteratura. Essi infatti, a causa del carico metabolico a cui è sottoposta la coltura e alle concentrazioni tossiche raggiunte dalla proteina, di frequente causano una forte instabilità segregazionale e strutturale oltre che l'inibizione della crescita.

I moderni sistemi di espressione utilizzati, invece, sfruttano la loro capacità di essere indotti, permettendo la separazione della fase di accrescimento veloce della biomassa microbica da quella di forte espressione della proteina di interesse. Il sistema inducibile più utilizzato è, senza dubbio, il sistema pET sotto il controllo del promotore *lacUV5* inducibile con IPTG. Tra i più importanti, ricordiamo "pBAD Expression System", "Trc/Tac Promoter Systems" e " $\lambda$  PR Promoter". Questi, talvolta, richiedono induttori costosi, come l-arabinosio e l'IPTG. L'IPTG in oltre è tossico per l'uomo e pone dei problemi di applicabilità quando si vogliono produrre proteine di interesse terapeutico. Una fine regolazione, tale da permettere una netta chiusura della trascrizione basale e un'induzione omogenea nella coltura, sarebbero delle caratteristiche sempre auspicabili in questi sistemi.

La terza classe di sistemi di espressione genica, definiti "self-inducible", fa uso di promotori che rispondono ai cambiamenti metabolici dell'ospite, endogeni o indotti: crescita stazionaria, cambiamenti di pH, livello di ossigenazione, osmolarità, fonte carbonata, ecc. Nonostante l'approccio teorico più stimolante rispetto ai già affermati metodi di "induzione" vera e propria, i sistemi autoinducibili oggi presenti necessitano di

substrati o condizioni colturali limitanti talvolta la crescita microbica, spesso non permettono una reversione dell'induzione e/o hanno un'attività basale significativa.

Una caratteristica definita dei sistemi viventi è l'abilità di percepire i cambiamenti nell'ambiente e rispondere in modo corretto. Le cellule possono rispondere a centinaia di stimoli che includono gradienti di sostanze nutritive, segnali chimici, temperatura, stress meccanici, luce e suono. L'evoluzione molecolare ha così selezionato sistemi complessi che monitorano l'ambiente e che rapidamente alterano l'espressione genica e l'attività proteica in risposta alle condizioni mutate ( J.Monod, 1970).

La regolazione dell'operone *lac* di *E. coli*, elucidato nel 1961 da Jacob e Monod fu il primo esempio ben caratterizzato di risposta genica a un cambiamento esterno. Oggi, è ormai chiaro che molti batteri, proprio con la finalità di adattarsi all'ambiente, possono produrre, percepire e rispondere a segnali provenienti da altri batteri alterando in modo transiente il pattern di espressione genica.

Nel presente lavoro si propone un sistema di autoinduzione dell'espressione genica, basato sui meccanismi di "cell-to-cell communication". Il Quorum Sensing ha appunto la capacità di percepire la densità cellulare al fine di innescare dei processi ad essa connessa. Sebbene il meccanismo del QS si basi generalmente sui tre sistemi di segnale, percezione e induzione, essi vengono tradotti in ambito biologico in modo molto diverso e la complessità dei sistemi risulta essere ampia.

Tra i vari sistemi di QS presi in considerazione, quello per l'induzione del regulone *lux* per la bioluminescenza in *Vibrio fischeri* include molte caratteristiche potenzialmente vantaggiose per la costruzione di un sistema di autoinduzioni dell'espressione genica per la produzione di proteine ricombinanti.

Ci sono solo due geni essenziali per la regolazione dell'operone *lux*: *luxR* e *luxI*. *luxI* codifica per l'autoinduttore (AI) sintasi mentre *luxR* per l'attivatore dell'operone dipendente dal co-attivatore AI.

È stato trasferito il sistema regolativo dell'operone *lux* di *V. fischeri* in *E. coli* al fine di ottenere un'induzione di un gene eterologo in *E. coli* che sottostà ad un meccanismo che tenga conto della densità cellulare.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 PLASMIDI E CEPPI BATTERICI

I ceppi di *E. coli* utilizzati in questo lavoro con le loro più importanti caratteristiche genotipiche e fenotipiche e la loro provenienza sono elencati in tab. 3-1. I plasmidi, le loro caratteristiche e la provenienza in tab. 3-2.

**Table 3-1** Ceppi di utilizzati in questo lavoro.

CEPPI	CARATTERISTICHE	PROVENIENZA
V.fischeri ATCC7744		ceppoteca ATCC
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17( r <sub>k</sub> , m <sup>+</sup> <sub>k</sub> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ <sup>-</sup>	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str <sup>r</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> MM294.1		Novartis Collection
<i>E. coli</i> MM294.1::luxI	F <sup>-</sup> supE44 hsdR17 endA1 thi-1 lambda <sup>-</sup>	Questo lavoro

BL21(DE3)	<p>F- supE44 hsdR17 endA1 thi-1 lambda- metE::eryluxl.</p> <p>F- ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</p>	Novagen
-----------	---	---------

**Table 3-2.** Lista di plasmidi utilizzati in questo lavoro.

Plasmidi	CARATTERISTICHE	PROVENIENZA
----------	-----------------	-------------

pGlow TOPO	TA cloning vector per prodotti di PCR; Neor <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup> origine pBR322 origine f1 T7 promoter gfp orf	Invitrogen
pGlow TOPO+ <i>metE::ery</i>	pGlow con gene <i>metE</i> interrotto da Ery <sup>r</sup>	Questo lavoro
pGLlux506	pGlow con frammento di PCR per luxR- luxI e con gfp in orf con <i>P<sub>luxI</sub></i> .	Questo lavoro
pCRII	TA cloning vector per prodotti di PCR:KanR, AmpR. Origine pUC origine f1, lacZa	Invitrogen
pCRII MHTT		Questo lavoro
pCR-MT	pCRII-frammento MT	Questo lavoro
pCRII- <i>luxR<sub>T1A</sub>\luxC<sub>ATG</sub>-AatII</i>	MluI- pCRII-frammento MT	Questo lavoro
pLAIR32	pCRII-frammento <i>luxR<sub>T1A</sub>\luxC<sub>ATG</sub></i> con i siti per MluI e AatII.	Questo lavoro
pLAIR42	pCRII-frammento MT-luxR-luxI	Questo lavoro
pLAJET32	pCRII-frammento MHTT-luxR-luxI	Questo lavoro
pMKSaI	Ori pBR322 Amp <sup>r</sup> -frammento MT-luxR-luxI	Questo lavoro
pMKSaI-GFP	Ori pBR322, Kan <sup>r</sup> , promotoreT7, luxI- opt.,luxR-opt.	Questo lavoro

pMKSΔluxI-	pMKSΔluxI, gfp in orf con $P_{luxI}$	Questo lavoro
pMKSΔluxI-GFP	pMKSΔluxI con <i>luxI</i> troncato tramite I siti KpnI	Questo lavoro
pKobeg	pMKSΔluxI-; gfp in orf con $P_{luxI}$ .	Chaverocche et al.,2000
pGLEM	Espressione dei geni <i>gam</i> , <i>bet</i> ed <i>exo</i> per favorire la ricombinazione omologa	Collez. Novartis
pGLEM-luxI	Neo <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> origine pBR322 origine f1 promotore T7  gfp orf gene <i>metE</i> interrotto da Ery <sup>r</sup> pGLEM-luxI nel sito AscI	Questo lavoro

### 3.1.1 Terreni e condizioni culturali

Per *V. fischeri* è stato utilizzato come terreno l'LBS, contenente 10 g di Bacto Tryptone-Peptone, 5 g estratto di lievito, 50 ml of 1 M Tris base (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a pH 7.5, e 20 g di NaCl a litro ( JessicaMcCann et al.2003)

I ceppi di *E. coli* sono stati fatti crescere sia in colture solide che liquide. I terreni solidi sono stati ottenuti aggiungendo 1.5% di agar a quelle liquide. I terreni utilizzati sono stati: LB (Bactotriptone 1%, estratto di lievito 0.5%, NaCl 0.5%), YE3× (45 g/l estratto di lievito,

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 g/l, glicerolo 15 g/l), e terreno minimo ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/l, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, tiamina 1 mM, FeSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> 1 mM, , KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 g/l, glicerolo 15 g/l). Le crescite sono state effettuate a 37°C, 30°C e a 25°C a seconda dei casi. Ampicillina, cloramfenicolo e kanamicina sono stati aggiunti dove necessario alle concentrazioni di 100 µg/ml, 40 µg/ml e 20 µg/ml rispettivamente. Il glucosio è stato aggiunto nei casi e nelle quantità indicate.

### **3.1.2 Estrazione DNA genomico**

Per l'estrazione del DNA genomico da *E. coli* è stato utilizzato il kit "Genomic DNA from tissue" (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germania). Per l'estrazione erano rispettate le condizioni consigliate dal manuale.

### **3.1.3 Estrazione DNA plasmidico**

Per l'estrazione dei plasmidi sono state utilizzate due diverse metodiche a seconda della quantità e qualità di plasmide necessarie: minipreparazioni, per piccole quantità a media purezza, midipreparazioni, per quantità maggiori ad alta purezza.

#### **3.1.3.1 Minipreparazioni di DNA plasmidico da *E. coli***

Per le preparazioni di DNA plasmidico da *E. coli* è stato utilizzato il kit "QIAprep Miniprep" (Qiagen, Hilden, Germania). Sono state rispettate le procedura da manuale.

#### **3.1.3.2 Midipreparazioni di DNA plasmidico da *E. coli***

Per le preparazioni consistenti di DNA plasmidico da *E. coli* (fino a 100 µg), è stato usato il "Plasmid DNA Purification" (MACHEREY-NAGEL). Sono state rispettate le procedura da manuale.

### **3.1.4 Reazioni di restrizioni**

Le digestioni di DNA plasmidico sono state utilizzate per scopi preparativi e analitici. La miscela di digestione era così composta:

- DNA templato
- Buffer di restrizione
- Endonucleasi di restrizione
- H<sub>2</sub>O.

Le reazioni analitiche sono state condotte in un volume finale di 20 µl; per ogni restrizione sono stati digeriti dai 100 ai 500 ng di DNA plasmidico e le reazioni incubate a 37°C per almeno 2-3 h.

Le restrizioni preparative per i clonaggi sono state invece condotte in un volume finale di 50 µl digerendo da 500 ng ad 1 µg di DNA plasmidico. Tali reazioni sono state effettuate a 37°C o a 25°C a seconda delle necessità per 2-3h od o/n.

Sono stati utilizzati 5-10 U di enzima (Biolabs, CELBIO s.p.a., Milano, Italia).

### **3.1.5 Deprotezione e precipitazione primer**

Gli oligo neosintetizzati (Novartis, Siena, Italia) contenuti in una colonnina sono stati messi ad incubare a 65°C per 2h con 2ml di NH<sub>4</sub>OH al 30%. Dopo la fase di raffreddamento l'oligo è stato eluito nella soluzione di ammoniaca fissando una siringa da insulina nella parte alta della colonnina e spipettando diverse volte. La boccetta è stata conservata a 4°C. 40 µl CH<sub>3</sub>COONa 3M pH=5.2 e 1 ml di Et-OH 100% (freddo) sono stati aggiunti a 360 µl di oligo eluito e la miscela incubata a -20°C 2h o o/n. Il campione è stato centrifugato a 13000 rpm in una microcentrifuga (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Milano, Italia) per 30 min a 4°C. Il pellet è stato lavato per due volte con Et-OH 70% (freddo), seccato all'aria per 10-15 min, risospeso in 100 µl di H<sub>2</sub>O e quantificato allo spettrofotometro ad una λ=260 nm (DU<sup>®</sup> 530 Spectrofotometer, Beckman, Milano, Italia).

### 3.1.6 Condizioni di PCR convenzionale

Le reazioni di amplificazione sono state effettuate con il termociclatore GeneAmp PCR System ( MI-SS, Corona, California, USA). Tutte le reazioni sono state condotte in un volume finale di 25 o 50  $\mu$ l a seconda del successivo utilizzo dei prodotti di amplificazione.

I componenti utilizzati nelle reazioni di amplificazione sono:

- Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Milano, USA)\Platinum DNA polymerase (Invitrogen, Milano, USA) (1 U per reazione)
- Tampone di reazione 10 $\times$  (Invitrogen, Milano, USA).
- miscela di nucleosidi trifosfato (Invitrogen)
- set di primer (0.5  $\mu$ M, Novartis)

Il termociclo per la reazione di amplificazione prevedeva :

1)	94°C X 5 min,	Denaturation
2) x30cycles	94°C X 30'	Denaturation
	x1°C X 30'	Annealing
	72°C X x2 min	Elongation
3)	72°C X 5min	Elongation
4)	4°C to $\infty$	

In cui  $x_1$  e  $x_2$  dipende dalla temperatura di annealing dei primer e dalla lunghezza dell'aplicato atteso.

In tabella sono riportati i primer utilizzati nel presente studio.

**Table 3-3 Lista di primer utilizzati**

<b>Nome</b>	<b>Sequenza</b>
<b>LuxFr</b>	AAGCTTACTTACGTACTTAACTTTA
<b>LuxRv</b>	TCATTATTTCCCCTATAATACTTAGT
<b>LFrMlulT</b>	TTTTACGCGTACTTACGTACTTAACTTTA
<b>LRvAatlIT</b>	TTTTGACGTCTTCATTATTTCCCCTATAATA
<b>pETORIAMPmluIFr</b>	TTTTACGCGTGAGAAGCAGGCCATTATCGC
<b>pETORIAMPNdeIRv</b>	TTTTCATATGATTCAGGTGGCACTTTTCG
<b>GFPECori</b>	GAATTCATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAGT
<b>GFPnoti</b>	GCGGCCGCTTATTTGTAGAGCTCATCCA
<b>GFPECorill</b>	GAATTCATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAGT
<b>LxlAscIF</b>	TTTTGGCGCGCCCATATTTCCCCTATAATACTTAGTA
<b>LxlAscIR</b>	TTTTGGCGCGCCTAAAACGGTAATAGATTGACA
<b>metEL</b>	GAAAAGTACTGCTTGTAGCGTTTCAGGTG
<b>metER</b>	GAAAAGTACTGGGAAGAAGTCGCTGTAATG
<b>LuxI4</b>	TCAAATGTCAATCTATTACCG
<b>LuxI5</b>	TCCTTACCTATTGTTTGTCG

### **3.1.7 Assembling PCR**

Per ottenere i frammenti MT e MHTT, è stata utilizzata la procedura da Rydzaniczat al.2005 e il programma Assembly PCR oligo maker, accessibile dal sito <http://publish.yorku.ca/~pjohnson/AssemblyPCRoligomaker.html>.

Nel programma sono state inserite le due sequenze disegnate MTe MHTT. In base alle impostazioni visualizzabili in fig. 3-2 erano ottenute le liste di primer per lo step di PCR

assembling e una coppia di primer per la “full length PCR”. Sono riportate le sequenze disegnate e inserite.

### 3.1.7.1 Sequenza MT

Sequenza MT

```

HinIII MluI KpnI AatII EcoRI SalI XhoI NotI Stop Codons BglIII SpeI
5' AAGCTTACGCGTGGTACCAAGACGTCGAAGAATTCCGTCGACTCGAGCGGCCGCGTGACTGACTGAAGATCTACTAGTAG
3' TTCGAATGCGCACCATGGTTCTGCAGCTTCTTAAGGCAGCTGAGCTCGCCGGCGCACTGACTGACTTCTAGATGATCATC
(Thr)SerLysAsnSerValAspSerSerGlyArgValThrAsp***

```

```

t1 ter rrnB NdeI
CTTTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTGCAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTAATCTGCATATG 5'
GAAAGTTTATTTTGGCTTCCGAGTCACGTTTCTGACCCGAAAGCAAATTTGACGTATAC 3'

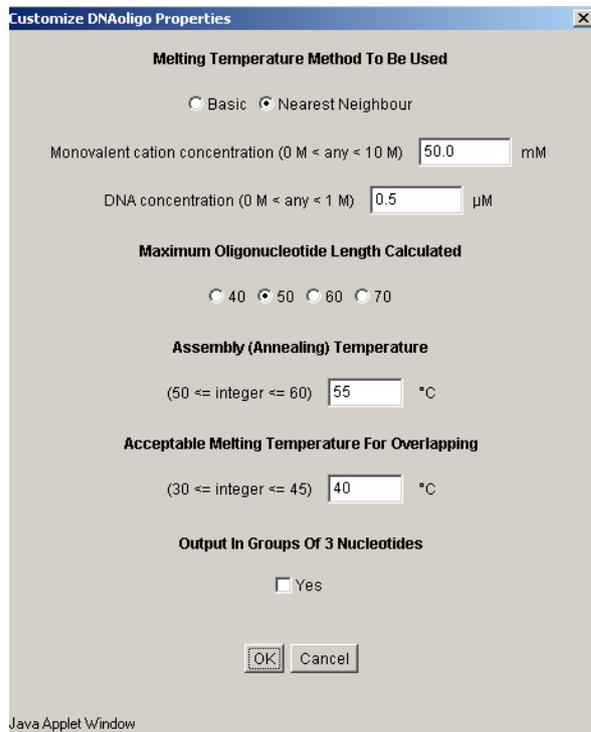
```

```

5' TTTTAAGCTT ACGCGTGGTA CCAAGACGTC GAAGAATTCCG TCGACTCGAG CGGCCGCGTG
ACTGACTGAA GATCTACTAG TAGCTTTCAA ATAAAACGAAA GGCTCAGTGC AAAGACTGGG
CCTTTCGTTT TAATCTGCAT ATGTTTT 3'

```

**Figure 3-1 Sequenza MT con le più importanti caratteristiche, che comprendono il MCS, i tre codoni di stop nelle tre ORF possibili e il terminatore trascrizionale dal 5S rRNA.**



**Figure 3-2. Condizioni utilizzate per il design degli oligo.**

6 assembly oligos:

**Apo1**

5'-TTTTAAGCTTACGCGTGGTACCAAGACGTCGAAG-3'

length: 34

**Apo2**

5'-GGCCGCTCGAGTCGACGGAATTCTTCGACGTCTTGGTACCA-3'

length: 41

**Apo3**

5'-GTCGACTCGAGCGGCCGCGTGACTGACTGAAGATCTACTAGTAG-3'

length: 44

**Apo4**

5'-**CTGAGCCTTTCGTTTTATTTGAAAGCTACTAGTAGATCTTCAGTCAGTC**-3'

length: 49

**Apo5**

5'-**CTTTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTGCAAAGACTGGGCCTTTCGT**-3'

length: 46

**Apo6**

5'-**AAAACATATGCAGATTA AAAACGAAAGGCCAGTCTTTGC**-3'

length: 39

Flanking primers:

**ApoF**

5'-TTTTAAGCTTACGCGTGGTACC-3'

length: 22

**ApoR**

5'-AAAACATATGCAGATTA AAAACGAAAGGC-3'

length: 28

Assembly Tm: 55.80 °C

Flanking primers Tm:56.35 °C -56.51 °C

**TTTTAAGCTTACGCGTGGTACCAAGACGTCGAAG**AATTCC**GTCGACTCGAGCGGCCGCGT**  
AAAATTCGAATGCGC**ACCATGGTTCTGCAGCTTCTTAAGGCAGCTGAGCTCGCCGG**CGCA

**GACTGACTGAAGATCTACTAGTAGCTTTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTGCAAAGACTG**  
**CTGACTGACTTCTAGATGATCATCGAAAGTTTATTTTGCTTCCGAGTC****ACGTTTCTGAC**

**GGCCTTTCGT**TTTAATCTGCATATGTTTT  
**CCGGAAAGCAAAATTAGACGTATACAAAA**

### 3.1.7.2 Sequenza MHTT

Sequenza MHTT

```
HindIII MluI KpnI AatII Tev protease site
5' ...AAGCTTACGCGTGGTACCAAGACGTCG CAT CAT CAT CAT CAT CAC GAA AAC CTG TAC TTC CAG GGC
3' TTCGAATGCGCACCATGGTTCGTCAGC GTA GTA GTA GTA GTA GTA CTT TTG GAC ATG AAG GTC CCG
(Thr)Ser His His His His His His His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
```

```
EcoRI SalI XhoI NotI Stop Codons BglIII SpeI t1 ter rrnB
AAGAATTCGGTCGACTCGAGCGGCCGCGTGACTGACTGAAGATCTACTAGTAGCTTTCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTGCA
TTCTTAAGGCAGCTGAGCTCGCCGGCGCACTGACTGACTTCTAGATGATCATCGAAAGTTATTTTGCCTTCCGAGTCACGT
LysAsnSerValAspSerSerGlyArgValThrAsp***
```

```
NdeI
AAGACTGGGCCTTTCGTTTTAATCTGCATATG 5'
TTCTGACCCGGAAGCAAATTTGACGTATAC 3'
```

```
5' TTTTAAGCTT ACGCGTGGTA CCAAGACGTC GCATCATCAT CATCATCAG AAAACCTGTA
CTTCCAGGGC AAGAATTCCG TCGACTCGAG CGGCCGCGTG ACTGACTGAA GATCTACTAG
TAGCTTTCAA ATAAAACGAA AGGCTCAGTG CAAAGACTGG GCCTTTCGTT TTAATCTGCA
TATGTTTT 3'
```

**Figure 3-3 Sequenza MHTT con le più importanti caratteristiche, che comprendono il MCS, l' His tag, il sito di taglio per la TEV-proteasi, i tre codoni di stop nelle tre ORF possibili e il terminatore trascrizionale dal 5S rRNA.**

6 assembly oligos:

**Apom1**

5'-TTTTAAGCTTACGCGTGGTACCAAGACGTCGCATCATCATCA-3'

length: 42

**Apom2**

5'-

CTTGCCCTGGAAGTACAGGTTTTTCGTGATGATGATGATGATGCGACGTCTTGG-

3'

length: 53

**Apom3**

5'-AACCTGTA~~CTTCCAGGGCAAGAATTCCGTCGACTCGAGCGGCCGCGTG~~-3'

length: 48

**Apom4**

5'-

~~TTCGTTTTATTTGAAAGCTACTAGTAGATCTTCAGTCAGTCACGCGGCCGCTC~~-3'

length: 53

**Apom5**

5'-

~~AAGATCTACTAGTAGCTTTCAAATAAAAACGAAAGGCTCAGTGCAAAGACTGGG~~

~~CCT~~-3'

length: 56

**Apom6**

5'-AAAACATATGCAGAT~~TAAAACGAAAGGCCAGTCTTTGCACT~~-3'

length: 42

Flanking primers:

ApomFFr

5'-TTTTAAGCTTACGCGTGGTACC-3'

length: 22

ApomFRv

5'-AAAACATATGCAGAT~~TAAAACGAAAGGC~~-3'

length: 28

Assembly Tm:

55.80 °C

Flanking primers Tm:

56.35 °C

56.51 °C

Apom1

1 **TTTAAAGCTT ACGCGTGGTA CCAAGACGTC GCATCATCAT CA**TCATCACG  
AAAATTCGAA TCGCACCAT **GGTTCTGCAG CGTAGTAGTA GTAGTAGTGC**

Apom2

Apom3

51 AA**AAACCTGTA CTTCCAGGGC AAGAATTCCG TCGACTCGAG CGGCCGCGTG**  
**TTTTGGACAT GAAGGTCCCG TTC**TTAAGGC AGCTGAG**CTC GCCGGCGCAC**

Apom4

Apom5

101 ACTGACTG**AA GATCTACTAG TAGCTTCAA ATAAAACGAA AGGCTCAGTG**  
**TGACTGACTT CTAGATGATC ATCGAAAAGT TATTTTGCTT** TCCGAG**TCAC**

Apom6

151 **CAAAGACTGG GCC**TTCGTT TTAATCTGCA TATGTTTT  
**GTTTCTGACC CGGAAAGCAA AATTAGACGT ATACAAAA**

### 3.1.8 Elettroforesi in gel di agarosio

L'elettroforesi orizzontale su gel di agarosio è stata utilizzata per scopi analitici e preparativi. Sono stati utilizzati come marcatori il DNA ladder 100 bp, il  $\lambda$ DNA/*Hind*III e il  $\lambda$ DNA/*Eco*RI+*Hind*II (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania). Le concentrazioni di agarosio utilizzate variavano da 0,5 a 3 %, a seconda del frammento di DNA da visualizzare. Come marcatore intercalante del DNA è stato utilizzato il SYBR® Safe (Invitrogen).

### 3.1.9 Purificazione dei frammenti di DNA da gel

Per la purificazione di prodotti di PCR e di frammenti di DNA di dimensioni comprese tra i 100 e i 12000 bp, è stato utilizzato il kit “PCR clean-up Gel extraction” (MACHEREY-NAGEL). Sono state rispettate le procedura da manuale .

Il DNA è stato quantificato al Nanodrop (Thermo scientific) e conservato a -20°C.° Tutti i frammenti ottenuti sono stati sequenziali (Novartis).

### 3.1.10 Reazioni di ligazioni

I vettori pGlow-TOPO e pCRII-TOPO Topo TA cloning (Invitrogen) sono stati utilizzati per i sottoclonaggi. Le reazioni di legazioni erano effettuate secondo manuale.

Là dove necessario, era effettuata la reazione di defosforilazione prima della legazione. Era quindi aggiunta direttamente alla miscela di digestione la fosfatasi alcalina (0.75 U/ $\mu$ g di vettore) per defosforilare le estremità coesive del vettore. La miscela è stata incubata per 30 min a 37°C.

Per la reazione di ligasi dei frammenti nei diversi vettori è stata utilizzata la miscela riportata in Tab 3-4., rispettando i rapporti molari di 1\1, 1\3 o 1\5 di vettore\inserto.

**Table 3-4 Reazione della topoisomerasi.**

<b>COMPONENTE</b>	<b>QUANTITA'</b>
Tampone ligasi 5x	4.0 $\mu$ l
T4 DNA ligasi (0.4U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Inserto	0,1-50 ng(0.2 pmol)
Vettore	50-100 ng (0.015-0.03 pmol)
H <sub>2</sub> O .	~ 20 $\mu$ l

La reazione è stata protratta per 16 h a 16°C, e poi inattivata mediante incubazione a 70°C per 10 min.

### **3.1.11 Preparazione e trasformazione di *E. coli* DH5 $\alpha$ chimicamente competenti.**

Le cellule chimicamente competenti erano ottenute inoculando una singola colonia di *E. coli* DH5 $\alpha$  in 5 ml di LB o/n a 37°C a 180-200 rpm. Dopo aver proceduto ad una diluizione 1/100 della coltura in 500 ml di LB fresco la coltura era riposta in incubatore fino ad OD<sub>590</sub> tra 0.5 e 1. A questo punto la coltura era raffreddata in ghiaccio e centrifugata a 4000 g per 10 min a 4°C. Il pellet era risospeso in 250 mL di CaCl<sub>2</sub> 0.1 M sterile e freddo. La coltura era nuovamente incubata in ghiaccio per 10 min per poi procedere con un ulteriore passaggio di centrifuga. Il pellet è stato poi risospeso in 15 ml di glicerolo 15% e CaCl<sub>2</sub> 0.1 M. Dopo un'ulteriore incubazione in ghiaccio per 30 min le cellule erano dispensate in aliquote da 60  $\mu$ l in eppendorf preventivamente raffreddate e congelate in Azoto liquido. Erano quindi stoccate per la conservazione a -80°C.

Le cellule elettrocompetenti di *E. coli* DH5 $\alpha$  erano scongelate in ghiaccio per 2-5 min e addizionate di 1-20  $\mu$ l della miscela di ligasi già descritta. Tale sospensione cellulare è stata miscelata delicatamente e posta in ghiaccio per 5-30 min. Le cellule chimicamente competenti, erano sottoposte a shock termico (42°C per 30 sec). Dopo l'aggiunta di 250  $\mu$ l di SOC medium a ciascuna eppendorf, si procedeva con il periodo di espressione fenotipica (1 h a 37°C su un agitatore orizzontale alla velocità di 200 rpm). 150-100-50  $\mu$ l di ogni miscela di trasformazione sono stati piastrati su LB contenenti l'opportuno antibiotico ed incubate o/n a 37°C.

### **3.1.12 Suclonaggio di geni**

Il metodo di TA cloning (Invitrogen) è stato utilizzato per inserire direttamente e rapidamente i prodotti di PCR, amplificato con *Taq* polimerasi, nei vettori di subclonaggio. I prodotti di PCR, sono stati ligati nel vettore pGlow-TOPO o pCRII-TOPO, utilizzando la seguente miscela:

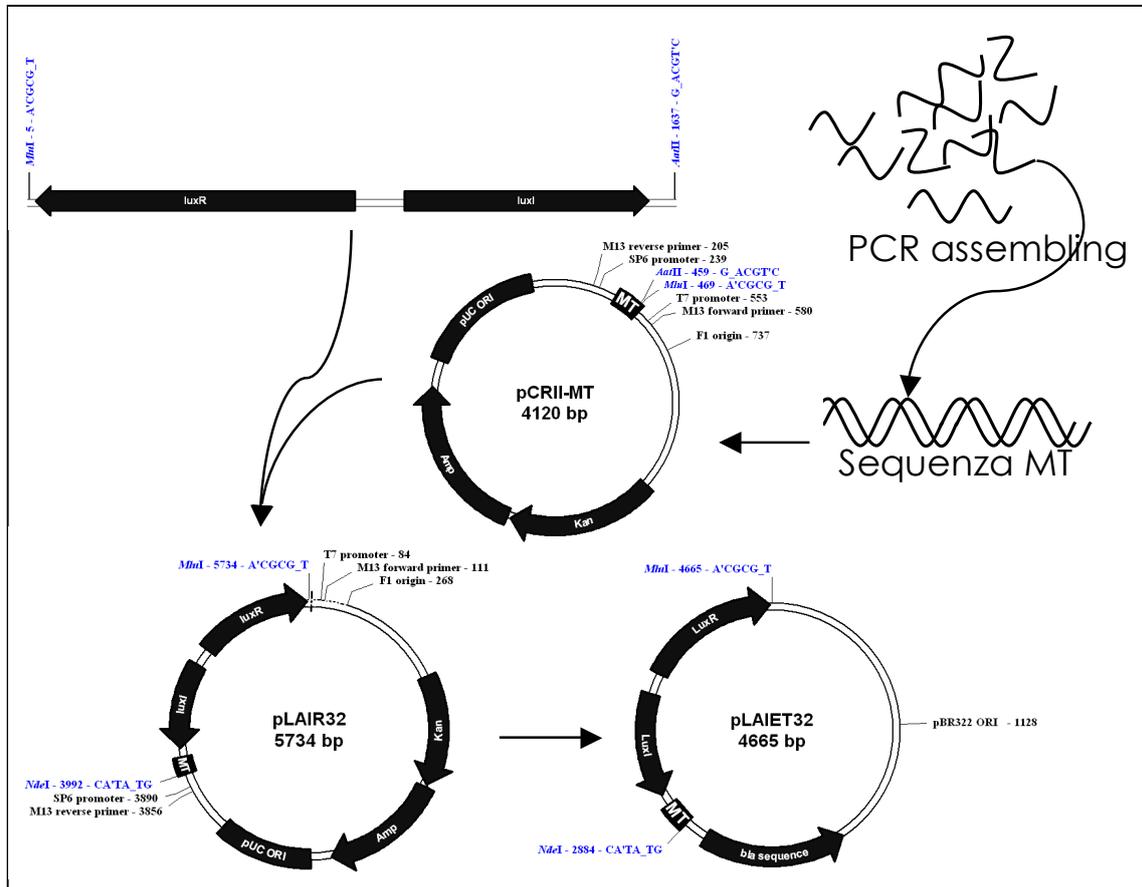
- 1  $\mu$ l di vettore TOPO (10 ng/ $\mu$ l)
- 0.5-4  $\mu$ l del prodotto di PCR (10-20 ng/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l di soluzione di sali (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl<sub>2</sub>)
- H<sub>2</sub>O necessaria per portare a volume (V<sub>f</sub> di 5  $\mu$ l)

La miscela è stata incubata a 22°C per 20 min e successivamente posta in ghiaccio fino al momento della trasformazione chimica. Quest'ultima è stata eseguita aggiungendo 2  $\mu$ l della miscela di reazione ad un'aliquota di cellule chimicamente competenti per la trasformazione (Top10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen). L'assenza di errori introdotti in fase di amplificazione è stata verificata mediante sequenziamento (Novartis Vaccines and Diagnostics, Research Centre)

### **3.1.13 Costruzione dei plasmidi**

Per la costruzione del plasmide pGLLux506, è stata utilizzata la coppia di primer LuxFr\LuxRv, per amplificare dal genoma di *V. fischeri* ATCC7744, il frammento dell'operone *lux* contenente i geni *luxR*, *luxI*, la regione regolatrice tra essi compresa, e la regione intergenica *luxI-luxC* (frammento *luxR*<sub>TTA</sub>\*luxC*<sub>ATG</sub>), in modo tale che l'ATG del gene *luxC* si trovasse in ORF con l'ATG del gene *gfp* nel vettore pGLOW (Invitrogen)

dopo la reazione della topoisomerasi.



**Figure 3-4 Step di costruzione dei vettori pLAI: le due sequenze sono state ottenute tramite Assembling PCR, e inserite in pCRII. Nei siti di AatII e MluI del vettore ottenuto, è stata inserito il frammento *luxR*, la regione regolatrice, *luxI* e la regione intergenica *luxI-luxC*. pLAIR32 e pLAIET32 si diversificano per l'origine di replicazione e per alcuni siti unici nel MCS. D) MCS delle due serie di vettori pLAI.**

I frammenti MT e MHTT, assemblati come altrove descritto, sono stati inseriti nei siti di TA del plasmide pCRII (Invitrogen) (fig.3-4). Sono stati così ottenuti i plasmidi pCRII-MT e pCRII-MHTT. Parallelamente, il frammento *luxR*<sub>TTA</sub>*luxC*<sub>ATG</sub> è stato sottoclonato con i primer LFrMluIT\LRvAatII nel vettore pCRII, per ottenere pCRII-

MluI luxR<sub>TTA</sub> luxC<sub>ATG</sub> AatII, e riestratto con la coppia di enzimi MluI/AatII, per avere le estremità compatibili per la legazione con pCRII-MT e pCRII-MHTT digeriti con gli stessi enzimi di restrizione. Sono stati così ottenuti i plasmidi pLAIR32 e pLAIR42.

Tramite la coppia di primer pETORIAMP MluI Fr/pETORIAMP NdeI Rv, è stato amplificato dal plasmide pET21a il frammento contenente la sequenza per l'ORI di pBR322 e il gene *bla* per la resistenza all'ampicillina. Il prodotto di PCR, digerito con MluI/NdeI è stato ligato con il frammento MluI/NdeI del plasmide pLAIR32, per generare il plasmide pLAIET32.

La sequenza contenuta nei siti BglII/SpeI del plasmide pMKSsal è stata fatta sintetizzare dalla GeneArt.

Il plasmide pMKSsal-ΔluxI è stato ottenuto tramite la restrizione del plasmide pMKSsal con KpnI e l'autocircolarizzazione.

Il gene della *gfp* è stato amplificato da pGLOW (Invitrogen) con i primer GFP<sub>ecoriIII</sub>GFP<sub>noti</sub> e con GFP<sub>ecori</sub>GFP<sub>noti</sub>. I due amplificati sono stati digeriti con EcoRI e NotI per essere clonati nei plasmidi pMKSsal, pMKSsal-ΔluxI, pET21.

Per la costruzione del plasmide pGLEM-luxI, il gene luxI è stato amplificato con i primer LxIAscIF/LxIAscIR. Il frammento, digerito con AscI, è stato inserito in pGLEM, nel sito per lo stesso enzima di restrizione.

### **3.1.14 Integrazione genomica di luxI**

Per l'integrazione stabile del gene *luxI* nel cromosoma batterico di *E. coli* MM294.1 è stata utilizzata la ricombinazione omologa con frammento lineare, resa possibile da un plasmide helper (pKobeg).

Il plasmide pKobeg è un vettore con replicazione temperatura sensibile (replica solo a 30°C) che codifica per tre geni tutti posti sotto il controllo del pBAD promoter: *exo* (che codifica per un esonucleasi 5'-3' che agisce su dsDNA), *bet* (che codifica per una proteina che lega il ssDNA ed è capace di accoppiare ssDNA complementari così che stimola la

ricombinazione da parte di *recA*) e *gam* (che codifica per una proteina che inibisce le esonucleasi RecBCD dell'ospite in modo tale che Exo e Bet possano favorire l'evento di ricombinazione omologa).

Il frammento contenente i siti di ricombinazione omologa per *metE*, il gene di resistenza all'eritromicina, e il gene *luxI*, è stato assemblato su pGLEM-luxI. Per ottenerlo linearizzato, è stato amplificato mediante la coppia di primer metEL/metER.

Le cellule di *E. coli* MM294.1 contenente il plasmide helper sono state rese competenti per l'*uptake* del frammento lineare e per la ricombinazione omologa. A tale scopo è stato coltivato *E. coli* MM294.1/pKopeg in 20 ml di terreno LB e si incubava a 30°C o/n. Alla densità cellulare di OD<sub>590</sub> 0.2. è stato aggiunto alla coltura L-arabinosio ad una concentrazione finale dello 0.2% per indurre l'espressione dei geni *gam*, *bet* ed *exo* del plasmide helper,. Le cellule sono riposte in incubatore a 30°C fino al raggiungimento di un OD<sub>590</sub> di 1.

*E. coli* MM294.1/pKobeg rese elettrocompetenti sono state trasformate con almeno 1 µg di frammento lineare. Dopo la trasformazione 150-100 e 50 µl di cellule sono state piastrate su LB+ery 100 µg/ml e su LB+kan 40 µg/ml. Successivamente ad incubazione a 37°C o/n alcune delle colonie apparse sono state ristriciate su LB+ clm 20 µg/ml e poi su LB+ery 100 µg/ml o su LB+kan 40 µg/ml ed incubate o/n a 30°C per assicurarsi che i trasformanti avessero perso il plasmide helper. Sono stati eseguiti successivi passaggi a 37°C fino alla perdita del plasmide helper.

L'evento di ricombinazione omologa e, quindi, la selezione del mutante, è stata caratterizzata mediante PCR con i primer LuxI5\LuxI6 e Southern, come descritto.

### **3.1.15 Southern blot**

L'integrazione cromosomica di *luxI* nel genoma di *E. coli* MM294.1, è stata verificata tramite Southern blot.

È stato utilizzato il sistema “Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems”.

Per la sonda, marcata con la perossidasi come da manuale, è stata utilizzato il prodotto di PCR ottenuto con i primer LuxI5\LuxI6 che amplificano una sequenza di circa 500 basi del gene *luxI*.

Per il saggio è stato utilizzato come controllo positivo il prodotto di PCR con LuxI5\LuxI6 e il DNA plasmidico di pGLLux506 dopo digestione con XmaI e AatII. Gli stessi enzimi sono stati utilizzati per digerire il DNA genomico del clone che risultava essere resistente all'eritromicina ed non ad Ampicillina e Cloranfenicolo, dopo l'evento di ricominazione omologa, come altrove descritto. Come controllo negativo è stato utilizzato il DNA genomico di *E. coli* MM294.1.

### **3.1.16 Estrazione proteica**

Per l'estrazione proteica i campioni erano standardizzati a 3 OD590/ml.

Per le proteine totali i campioni standardizzati sono stati pellettati mediante centrifugazione (13000 rpm per 5 min) e risospesi in 1 ml di buffer B-PER (Thermo scirntific), 10µl di lisozima (100 mg/ml) e 20 µl di DNasi (1000 kunits/ml). I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per circa 30 min e vortexati di tanto in tanto. Al termine dell'incubazione sono stati prelevati 120 µl di campione e addizionati a 40 µl di Loading Sample Buffer 6× (0.4 M DTT, 8% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% blu di bromofenolo, 40% glicerolo). Prima del caricamento su gel SDS-PAGE, i campioni sono stati denaturati facendoli bollire per 10 min.

Per la frazione solubile il rimanente volume dei campioni è stato centrifugato per 30 min a 13000 rpm a 4°C al fine di ottenere la frazione solubile. Al termine della centrifugazione 120 µl sono stati prelevati e addizionati a 40 µl di LSB. I campioni sono stati denaturati facendoli bollire per 10 min.

La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il saggio Bradford (BioRad Laboratoires, Hercules, USA).

### **3.1.17 Sds-page**

In seguito all'estrazione 10 µl di ogni campione sono stati caricati su gel di poliacrilammide ad una percentuale idonea alla visualizzazione corretta della proteina ricombinante.

Sono stati utilizzati gel di poliacrilammide ad una percentuale variabile dal 4% al 12% (Invitrogen) in tampone MOPS 1× (Invitrogen). La corsa elettroforetica è stata impostata a 180 V.

A fine corsa i gel sono stati rimossi dai vetri e posti nella Staining Solution, così composta:

- R-250 Coomassie Blue                      0.01% p/v
- Acido Acetico glaciale                      7% v/v
- Etanolo    23% v/v
- MilliQ-H<sub>2</sub>O                                      fino a 1 L

I gel sono stati colorati nella Staining Solution per più di 30 min e successivamente decolorati utilizzando 250 ml di Destaining Solution (7% v/v di acido acetico, 23% v/v di metanolo e MilliQ-H<sub>2</sub>O fino a volume) fino a quando le bande non presentavano l'intensità di colore desiderata.

### **3.1.18 Western blot**

Dopo l'SDS-page, è stato effettuato, il trasferimento delle proteine da gel di poliacrilammide su membrana di nitrocellulosa. Il gel di poliacrilammide è stato posizionato a contatto con la membrana di nitrocellulosa; esternamente ad entrambi sono stati messi due foglietti di carta assorbente e, allo stesso modo, due spugne. Il tutto è stato

introdotto in una griglia di trasferimento e posizionata nell'apposita cameretta (BioRad), in maniera tale da avere il gel di poliacrilammide dalla parte del polo negativo e la membrana dalla parte del polo positivo della cella. La corsa è stata effettuata in tampone TG ( 3 g di Tris Base e 14.4 g di Glicina) e 20% di etanolo a 200 mA, amperaggio costante per 30 min. Alla fine della corsa, la membrana è stata posizionata in una vaschetta contenente il colorante Red di Ponceau e posto in agitazione per circa 2 min, per visualizzare il corretto trasferimento proteico sulla membrana e segnare l'eventuale marker o proteina di interesse.

Dopo tale colorazione la membrana è stata lavata con H<sub>2</sub>O milliQ e con PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM) per 1 o 2 min tutto sotto agitazione, per eliminare il Red Ponceau. Una volta eliminata ogni traccia di colorante la membrana è stata saturata per due volte con la soluzione blocking buffer (3% di latte in PBS e 0.1% di Triton X-100). Dopo aver scartato la soluzione di saturazione, la membrana è stata incubata con anticorpo primario diluito 1:2500 nella soluzione appena descritta per 1 h a temperatura ambiente o per 16 h a 4°C. La membrana è stata successivamente lavata per due volte con blocking buffer ed incubata per 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario anti-coniglio o anti-topo perossidato (a seconda del primario utilizzato), diluito 1:4000 nella soluzione di saturazione. Sono stati quindi effettuati 2 lavaggi con blocking buffer, 2 con PBS e due TrisCl 50mM pH 6.8 per circa 15 min sotto agitazione. Lo sviluppo del western è stato effettuato tramite Opti-4CN detection kit, a base di 1-cloro4-naftolo (BioRad); la membrana è stata incubata con tale soluzione fino all'ottenimento di bande dell'intensità voluta e successivamente lavata con acqua.

### **3.2 Misurazione della fluorescenza**

Per la misurazione della fluorescenza, è stato utilizzato sia un Fluorescence *activated cell sorting* (FACS), che un fluorimetro per micropiastre (Infinite M200-Tecan)

### **3.2.1 Saggio FACS**

Per il saggio della fluorescenza al FACS (LSR-II, Becton–Dickinson) i campioni provenienti dalle crescite, erano standardizzati a un OD590 di 0,5 tramite centrifugazione a 6000 g per 5 minuti. Dopo due lavaggi in PBS, il pellet era risospeso nello stesso volume di PBS e formaldeide al 2%. I batteri erano lasciati a temperatura ambiente per 20 minuti, dopodichè erano effettuati due lavaggi in PBS e stoccati per l'aquisizione al FACS. Per ogni campione erano acquisiti dai 5000 ai 10000 eventi. L'elaborazione dei dati è avvenuta tramite l'utilizzo del programma FlowJo (Tree Star).

Come controllo negativo negativo erano utilizzati colture di *E. coli* BL21(DE3)\pET21b, e come controllo positivo *E. coli* BL21(DE3)\pET21b-gfp. Entrambe le colture erano incubate a 25 o a 32°C e indotte con 1mM di IPTG alla densità cellulare di OD590 di 0,5. Il campionamento avveniva dopo due ore di induzione.

### **3.2.2 Saggio di fluorimetria in micropiastre.**

Per la lettura della fluorescenza durante la crescita è stato utilizzato il lettore di microplate Infinite M200 (Tecan). Sono state utilizzate piastre nere di diverso volume a fondo piatto o sferico (Corning).

I diversi ceppi di *E. coli*, normalizzati per la crescita tramite coltura ON, erano saggiate in 3 o 5 repliche, standardizzati a 0,01 OD590 in M9, LB e YE3X con opportuno antibiotico.

Sono sia state effettuate crescite a temperatura e agitazione controllata, con lettura on-line della fluorescenza (Eccitazione a 460nm e emissione a 510) e dell'assorbanza a 590nm che letture singole da colture nelle condizioni altrove descritte.

Per la lettura dell'assorbanza, è stata costruita una retta di taratura per estrapolare in OD590 i dati di assorbanza del Tecan nelle condizioni considerate.

### 3.2.3 Random Mutagenesis PCR

Le condizioni di RM-PCR sono quelle descritte da Cadwell e Joyce (2008) per una randomizzazione delle mutazioni. Sono riportate nelle tabelle le concentrazioni dei componenti (tab 3-5) e le condizioni di reazione (tab. 3-6).

**Table 3-5 Reazioni di RM-PCR**

	Stand.	Mut 1	Mut 2
pGL506lux	2 ng	2 ng	2 ng
Buffer 10x	10 micl	10 micl	10 micl
LuxFr	30 pmoles	30 pmoles	30 pmoles
LuxRv	30 pmoles	30 pmoles	30 pmoles
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	7 mM	7 mM
dATP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
dTTP	0,2 mM	1 mM	1 mM
dCTP	0,2 mM	1 mM	1 mM
dGTP	0,2 mM	1 mM	0,2 mM
MnCl <sub>2</sub>	-	0,5 mM	0,5 mM
Tac pol Platinum	2,5 U	5U	5 U
H <sub>2</sub> O to 100 micl	64,4	23,9	31,9

**Table 3-6. Cicli utilizzati per 13 RM-PCR**

94°C X 2'	X1
-----------	----

94°C X30"	X30
53°C X30"	
72°C X 2'	
72°C X 2'	X1
4°C	X $\omega$

Per ogni reazione, 2  $\mu$ l di prodotto di PCR erano clonati nel vettore pGLOW (Invitrogen).

Le colonie fluorescenti erano riincolate in terreno fresco con antibiotico, normalizzati tra loro per la crescita tramite coltura ON, e saggiate per la loro capacità di esprimere la fluorescenza nel saggio di fluorimetria in micropiastre. I cloni in 3 o 5 repliche, erano standardizzati a 0,01 OD590 in 200 $\mu$ l di LB\Ampicillina100gamma.

### **3.3 Saggio del 3OC6-HSL**

É stato messo appunto un saggio semiquantitativo per la molecola segnale del QS, 3OC6-HSL. Il saggio si basa sull'utilizzo del plasmide pMKSsal- $\Delta$ luxI-GFP, che ha il gene luxI troncato per il frammento KpnI. Il ceppo MM294.1\ pMKSsal- $\Delta$ luxI-GFP è incapace di produrre la molecola segnale, per cui l'espressione del gene *gfp* dipende dalla molecola segnale contenuta nel mezzo.

Il ceppo MM294.1\ pMKSsal- $\Delta$ luxI-GFP è stato cresciuto in YE3X a 25°C. Le crescite erano bloccate in ghiaccio alla densità cellulare di OD590 uguale a 3. La biomassa è stata standardizzata a 1 OD590/ml, per un volume finale di 200 $\mu$ l. Dopo il lavaggio in PBS, in pellet era risospeso in uguale volume di surnatante.

Il surnatante proveniva dai campioni da testare, centrifugandoli a 10000g per 10 minuti. Il surnatante era sterilizzato tramite filtri da 0,22  $\mu$ m.

Come controllo negativo, era utilizzato il surnatante proveniente dalla crescita del ceppo MM294.1\ pMKSsal- $\Delta$ luxI-GFP e trattato come quello dai campioni da testare. Come

controllo positivo, allo stesso terreno era aggiunto 3OC6-HSL sintetico a una concentrazione finale di 500nM.

Ciascun surntante era testato per la capacità di indurre l'espressione della GFP dipendente dalla concentrazione di 3OC6-HSL nel mezzo da parte del ceppo bioreporter MM294.1\ pMKSaI- $\Delta$ luxI-GFP.

A ciascun surnatante era aggiunto di trimetoprim 10 $\mu$ g/ml, per bloccare la crescita del ceppo bioreporter e saggiato da 3 a 5 repliche.

I campioni così preparati erano incubati in micropiastre nere da 96 (Croning) per il saggio di fluorimetria (Tecan) per 10 ore a 25°C.

Sono mostrati solo dati confermati da almeno tre esperimenti indipendenti.

Il 3OC6-HSL sintetico usato nello studio è stato fornito dalla Sigma (Bornem, Belgium) e conservato a -20°C in acqua demonizzata come soluzione stock da 200 mM

### **3.4 Processi batch**

É stato utilizzato il terreno: YE3 $\times$  (45 g/l estratto di lievito, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16 g/l, glicerolo 15 g/l). A seconda del vettore da caratterizzare sono state effettuate delle aggiunte. Dove necessario sono stati aggiunti gli antibiotici ampicillina e kanamicina. I processi sono stati effettuati a alla temperature di 25°C e ai pH di 6.2 e 7.2 ( $\pm$ 0.1). L'ossigenazione era monitorata con incremento dello stirrer da 200 a 800 rpm per livelli di ossigenazione inferiori a un dO<sub>2</sub> del 70%. Sequenzialmente, il controllo dell'ossigenazione avveniva tramite feed di O<sub>2</sub> a 0,05VVM per livelli di ossigenazione inferiori al 65%.

La crescita cellulare è stata monitorata effettuando dei prelievi intermedi ogni ora e leggendo l'assorbanza a 590 nm dopo appropriata diluizione (Beckman). Tali campioni sono stati utilizzati per le successive analisi. Per la produzione su larga scala di proteine ricombinanti sono stati utilizzati bioreattori da 2 e 5 litri di volume di lavoro (Applikon Analytical B.V., Ac Schiedam, Norvegia), ADI 1030 (Applikon) per il controllo dello

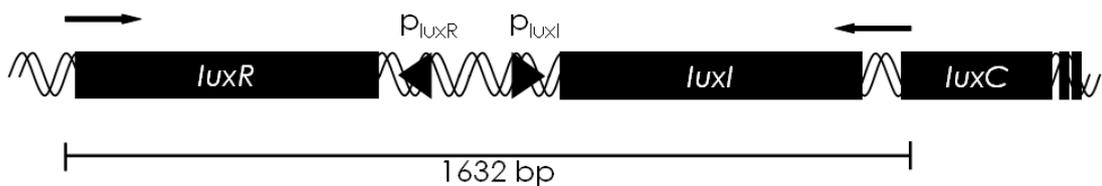
stirrer, pH, ossigenazione e temperatura e il software Bioexpert (Applikon) per il monitoraggio continuo di tali parametri.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 “Proof of concept”.

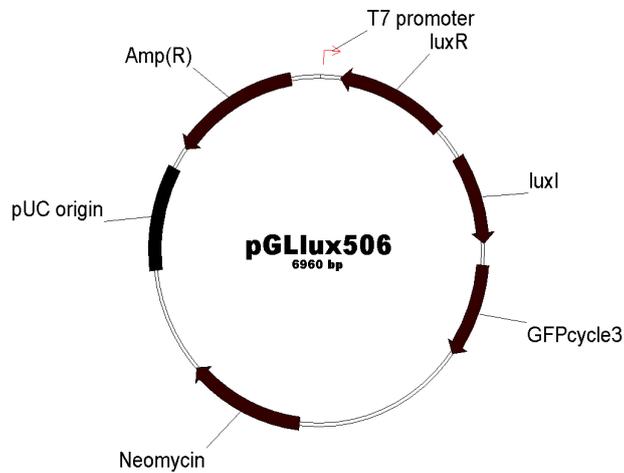
La capacità dell’operone *lux* di *V. fischeri* di regolare l’espressione dal promotore  $P_{luxI}$  in *E. coli* in relazione alla densità cellulare è ormai accertata (Kuo et al., 1996; Ripp et al., 2006; You et al., 2004).

È stato amplificato dal DNA genomico di *V. fischeri* ATCC7744 il frammento dell’operone *lux* contenente gli elementi regolativi associati, tramite PCR, utilizzando come primer LuxFr e LuxRv (vedi fig. 4-1). L’operone *lux* del ceppo ATCC7744 è stato descritto e sequenziato da Devine et al. (1988). Il frammento amplificato contiene *luxR*, la regione intergenica *luxR-luxI*, *luxI*, la regione intergenica *luxI-luxC* fino al codone di start di *luxC*. Il frammento è stato amplificato in modo da essere clonato nei siti TA del vettore pGLOW-topo (Invitrogen) in ORF con il gene *gfp* (vedi fig. 4-2).



**Figure 4-1 Frammento amplificato dal DNA genomico di *V. fischeri* ATCC7744.**

Sono stati ottenuti così i cloni recanti il plasmide pGLOW con la GFP sotto il controllo trascrizionale del promotore  $P_{luxI}$  (vedi fig. 4-2). I cloni positivi erano capaci di emettere la fluorescenza quando esposti agli UV poiché in grado si esprimere la *gfp* (fig. 4-3). A questa selezione fenotipica, ne sono seguite altre due molecolari, costituite dall’analisi di PCR e di restrizione, al fine di determinare il giusto senso dell’inserimento dell’inserito.



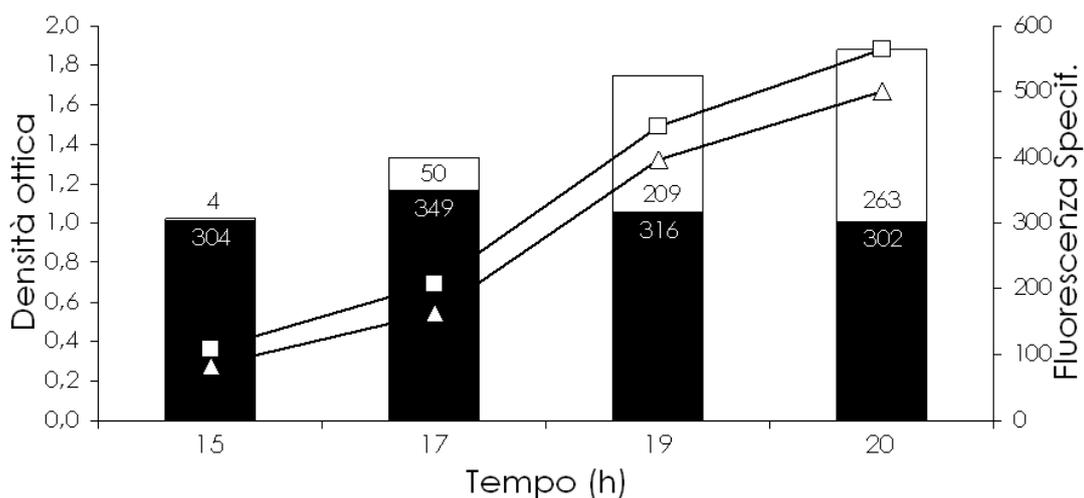
**Figure 4-2. Plasmide pGLlux506**



**Figure 4-3 Fenotipo fluorescente dei cloni che esprimono la fluorescenza**

Sono state effettuate delle prove colturali preliminari per mettere appunto un protocollo di monitoraggio dell'espressione della GFP al FACS. Esso è servito a vagliare la risposta del sistema di autoinduzione dell'espressione genica alle varie condizioni fermentative,

tenendo conto dell'importanza della repressione catabolica e del pH sul sua regolazione. Le prove colturali hanno mostrato che il sistema di autoinduzione ha una forte induzione della fluorescenza dipendente dalla densità cellulare. I ceppi di *E. coli* MM294.1/pGLlux506 e *E. coli* MM294.1/pGlow, usato come controllo negativo, sono stati cresciuti in LB dopo coltura "over night" per standardizzare le crescite. Le crescite erano monitorate per la densità cellulare e campioni fissati in paraformaldeide per essere acquisiti al FACS. Si è osservato una forte induzione della fluorescenza specifica a una densità ottica (590 nm) tra 0,5 e .0,7 (fig.4-4).



**Figure 4-4** Induzione dell'espressione della *gfp* dipendente dalla densità cellulare. La barra di istogramma in nero e le crescite contrassegnate da □, fanno riferimento rispettivamente alla fluorescenza specifica e alla densità cellulare nel tempo per *E. coli*/pGlow (controllo negativo). Le crescite contrassegnate da Δ si riferiscono alla densità cellulare di *E. coli*/pGLlux506 e in bianco la sua fluorescenza specifica netta. ( medi di tre esperimenti).

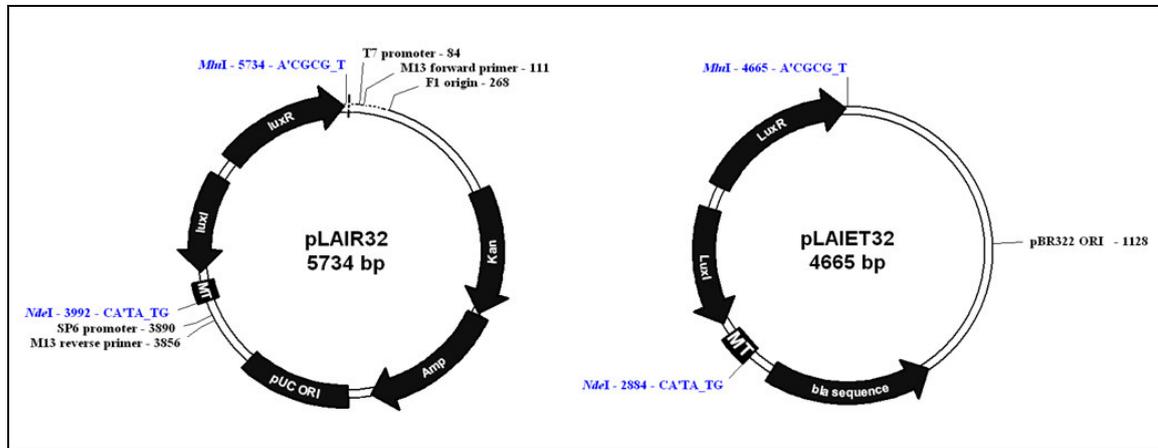
## **4.2 Design del vettore di espressione**

Al fine di ottenere il vettore di espressione, sono stati inclusi un MCS, tre codoni di terminazione traduzionale nelle tre ORF possibili e il terminatore trascrizionale T1 del gene *rrnaB*. Sono state create quindi due serie di vettori che si diversificano per il gene di resistenza e per l'origine di replicazione (vedi figura 4--5).

Nella strategia di clonaggio, sono state disegnate due sequenze MT e MHTT, recanti i siti di restrizione utili per i sottoclonaggi e le sequenze che si volevano introdurre all'interno dei vettori (vedi MATERIALI e METODI, fig. 3-1, 3-3). Il frammento MHTT si diversifica dal frammento MT per la presenza del His-tag e della sequenza per il sito di taglio della Tev-proteasi.

La sintesi dei due frammenti è avvenuta assemblando dei primer di 40 basi circa (serie Apo e Apom per il frammento MT e per MHTT rispettivamente, vedi materiali e metodi), "overlappanti" per sequenze complementari e aventi la stessa temperatura di appaiamento. I frammenti sono stati ottenuti tramite una "PCR-Assembling" in due step (Rydzanicz et al., 2005).

I frammenti MT e MHTT sono stati inseriti in un vettore di subclonaggio per inserire l'isola regolatrice del regulone LUX e ottenere in fine la serie di plasmidi.



```

luxI                               EcoRI
pLAIET32  5' CAG TCT TAA ATT AAT ATTGTTAATCATTAAATTTTATTTAAATACTAAGTATATTTATAGGGGAATA ATG AAG ACG TCG AAG AAT TCC
           Ala Val Leu Asn ***                               Met Lys Thr Ser Lys Asn Ser
Sali  XhoI  NotI  Stop codons  BglII SpeI  rrnB transcriptional terminator  NdeI
GTC GAC TGC AGC GGC CGC GTG ACT GAC TGA AGATCTACTAGTAGCTTTC AAT AAAACGAAAGGCTCAGTGCAAAGACTGGGCCTTCGTTTAACTGCATATG-3'
Val Asp Ser Ser Gly Arg Val Thr Asp ***

luxI                               His 6X-Tag
pLAIET42  5' CAG TCT TAA ATT AAT ATTGTTAATCATTAAATTTTATTTAAATACTAAGTATATTTATAGGGGAATA ATG AAG ACG TCG CAT CAT CAT CAT
           Ala Val Leu Asn ***                               Met Lys Thr Ser His His His His
Tev-protease site clivage  EcoRI Sali XhoI NotI  Stop codons  BglII SpeI
CAT CAC GAA AAC CTG TAC TTC CAG GGC AAG AAT TCC GTC GAC TCG AGC GGC CGC GTG ACT GAC TGA AGATCTACTAGTAGCTTTC AAT AAAACGAA
His His Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Lys Asn Ser Val Asp Ser Ser Gly Arg Val Thr Asp ***

rrB T1 transcriptional terminator
GGCTCAGTGCAAAGACTGGGCCTTCGTTTAACTGCATATG-3'

```

Figure 4-5 Caratteristiche generali e MCS delle due serie di vettori pLAI.

### 4.3 Repressione del circuito di autoinduzione.

Durante le colture di pre-inoculo per le fermentazioni industriali, possono essere raggiunte densità cellulari molto elevate. In questi casi però l'induzione dell'espressione della proteina eterologa è da evitare perchè può compromettere lo stato di vitalità batterica e la produzione in bioreattore (Grossman et al.,1998). Un sistema di espressione indotto dalla densità cellulare può mancare di un meccanismo di repressione nelle condizioni di preinoculo.

La repressione catabolica può essere un utile strumento per ritardare l'autoinduzione. È noto che la presenza del glucosio nel mezzo reprime la fluorescenza dell'operone *lux* in *E.*

*coli* (Dunlap and Kuo, 1992). Tuttavia, al fine di ottenere un sistema accessorio per reprimere l'autoinduzione ad alte densità cellulari, è stato considerato anche un circuito regolativo alternativo.

Nel sistema ideato, il promotore  $P_{T7}$  è in posizione convergente a  $P_{luxR}$  e nei ceppi DE3 indotti con IPTG si osserva un silenziamento della *gfp* (fig. 5-7).

La trascrizione convergente definisce una situazione in cui due promotori sono disposti faccia a faccia. L'attività simultanea *in vivo* di un promotore generalmente induce la repressione trascrizionale di quello opposto, sia nei sistemi eucariotici che in quelli procariotici (Elledge and Davis, 1989; Eszterhas et al., 2002). L'interferenza trascrizionale è spesso asimmetrica, con il promotore più forte che riduce l'espressione di quello più debole. Questo meccanismo molecolare è stato approfondito in diversi studi in *E. coli* e negli eucariotima comunque, i meccanismi di interferenza sono speculativi (Padidam and Cao, 2001; Eszterhas et al., 2002; Prescott and Proudfoot, 2002).



**Figure 4-6 Organizzazione dei due promotori convergenti  $P_{T7}$  e  $P_{luxR}$ .**

I ceppi inoculati su piastre Petri agarizzate, contenenti 1mM di IPTG, mostrano una fluorescenza agli UV simile ai controlli negativi, mentre quelli inoculati su piastre senza IPTG mostravano una forte fluorescenza (fig. 4-7).

Dalla letteratura è noto che LuxR è necessario per la regolazione dell'espressione da  $P_{luxI}$  e il sistema di repressione di *luxR* tramite interferenza trascrizionale testato in questo studio, prova essere semplice e fine per la repressione del sistema di espressione (Shadel et al., 1992). Anche altri promotori regolabili possono essere utili in questo senso.

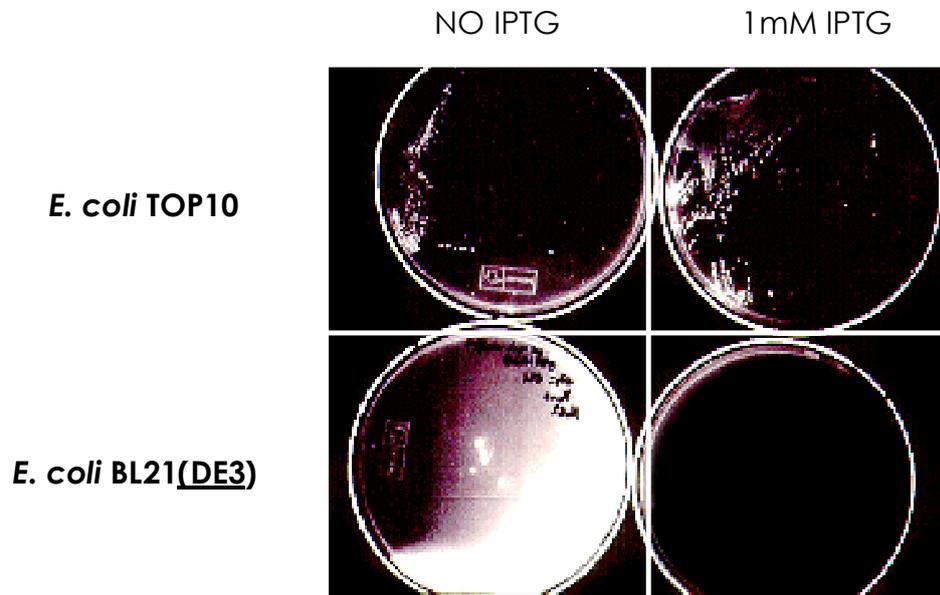


Figure 4-7 L'induzione del promotore  $P_{T7}$  nel ceppo BL21DE3 cresciuto su LB agar, 1mM IPTG, reprime l'espressione di LuxR, il QS e l'espressione della GFP.

#### **4.4 Modulazione dell'espressione dipendente dai mezzi colturali e dalla repressione catabolica sul sistema di espressione pLAI.**

Qual è l'effetto esercitato dalla crescita batterica in terreni diversi sulla regolazione dell'espressione della proteina target nel sistema pLAI?

In generale è noto che sono molti i fattori legati alla crescita che possono avere un effetto sull'espressione della proteina ricombinante, specie quando questa diventa la più rappresentata tra le proteine totali all'interno della cellula. Nello specifico, in un sistema di espressione regolato proprio dalla densità cellulare, condizioni di crescita differenti possono diversificare sostanzialmente i pattern di espressione della proteina di interesse. Il regulone *lux* è soggetto alla regolazione della repressione catabolica tramite il sito di legame nell'operatore di  $P_{luxR}$  per il complesso CAPcAMP; il glucosio blocca l'espressione

dei geni *lux* di *V. fischeri* anche in *E. coli* e la concentrazione di LuxR è molto bassa quando i batteri sono cresciuti in concentrazioni elevate di glucosio (Dunlap and Kuo, 1992).

#### 4.4.1 Diverse formulazioni di terreni per regolare l'induzione e la rata di espressione

Per valutare l'effetto esercitato dai mezzi colturali sulla regolazione dell'espressione della GFP nel sistema pLAI, sono state effettuate crescite in differenti terreni liquidi, con e senza glucosio. Sono stati testati tre differenti terreni: uno sintetico, M9 con glicerolo 5g/l, e due complessi, LB e estratto di lievito (YE3X). Per valutare l'effetto della repressione catabolica, i terreni erano addizionati di glucosio in due concentrazioni (0.5 e 2.5 g/l). In fig. 4-8 le crescite sono state monitorate per densità ottica e fluorescenza (dati in triplicato).

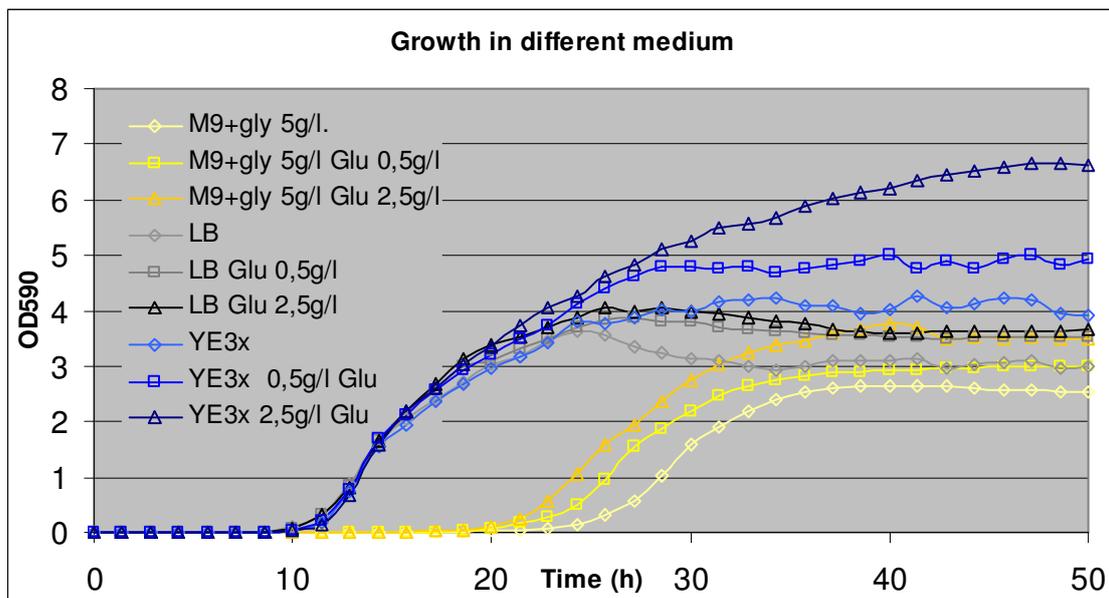
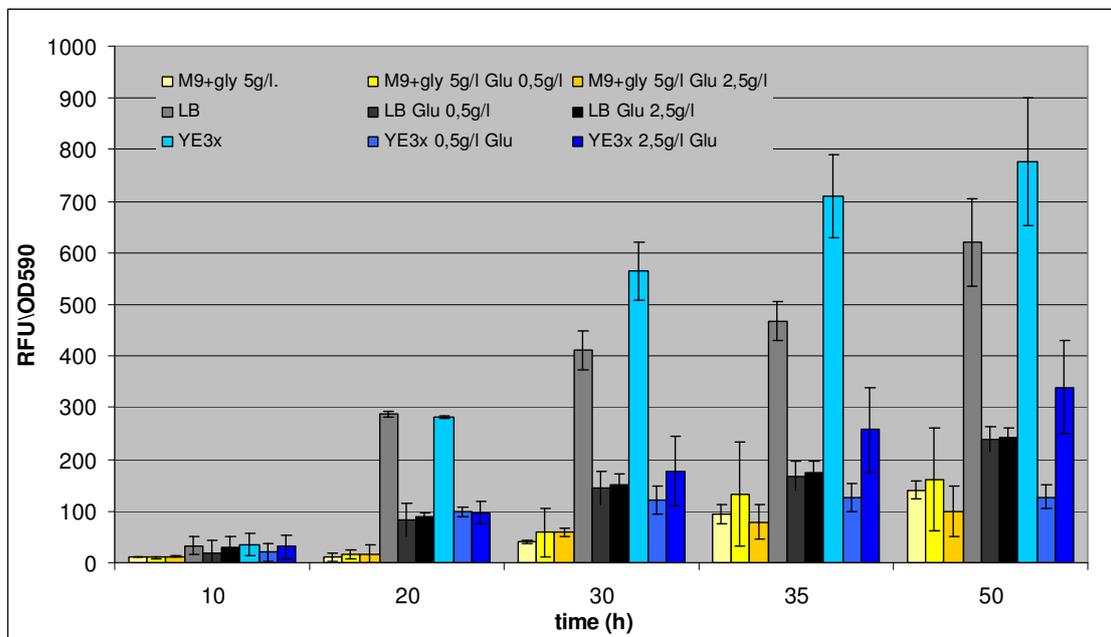


Figure 4-8 Crescite di *E.coli* DH5αpGL506 in diversi mezzi colturali con diverse concentrazioni di glucosio .

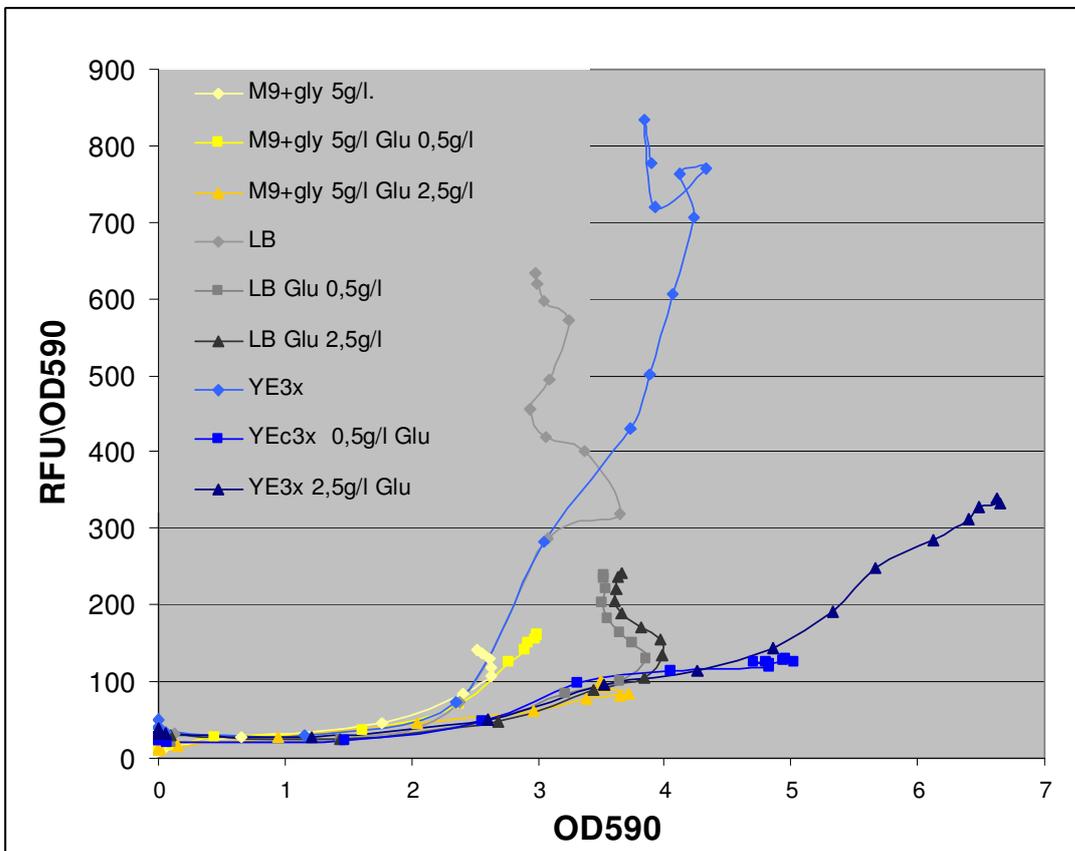


**Figure 4-9** Fluorescenza specifica delle colture (*E.coli* DH5αpGL506). Le fluorescenze sono al netto della fluorescenza dei terreni e della fluorescenza specifica della biomassa. I dati fanno a tre esperimenti indipendenti.

Il terreno sintetico, l'M9, è il mezzo culturale in cui il livello di espressione basale, in condizioni non indotte della GFP (considerato all'ora 10 per tutte le crescite) è il minore (fig. 4-9, 4-10).

Tuttavia, in questo terreno, nelle condizioni considerate, non si osserva un effetto significativo da presenza di glucosio.

Con 0,5 g/l di glucosio la repressione è presente nei due terreni complessi. Si può tuttavia osservare un effetto diverso nei due terreni complessi. Si può considerare che il sistema è indotto, in assenza di glucosio, in un range di densità cellulare tra 1,5 e 2,5 OD590 (fig. 4-10). In LB non si osserva nessuna differenza tra le due concentrazioni di glucosio considerate e l'effetto repressivo è pressoché identico. In estratto di lievito 45g/l invece si può osservare una differenza statisticamente significativa dall'ora 35. La maggiore



**Figure 4-10** Repressione da glucosio in funzione delle diverse capacità dei terreni e delle densità cellulari raggiunte.

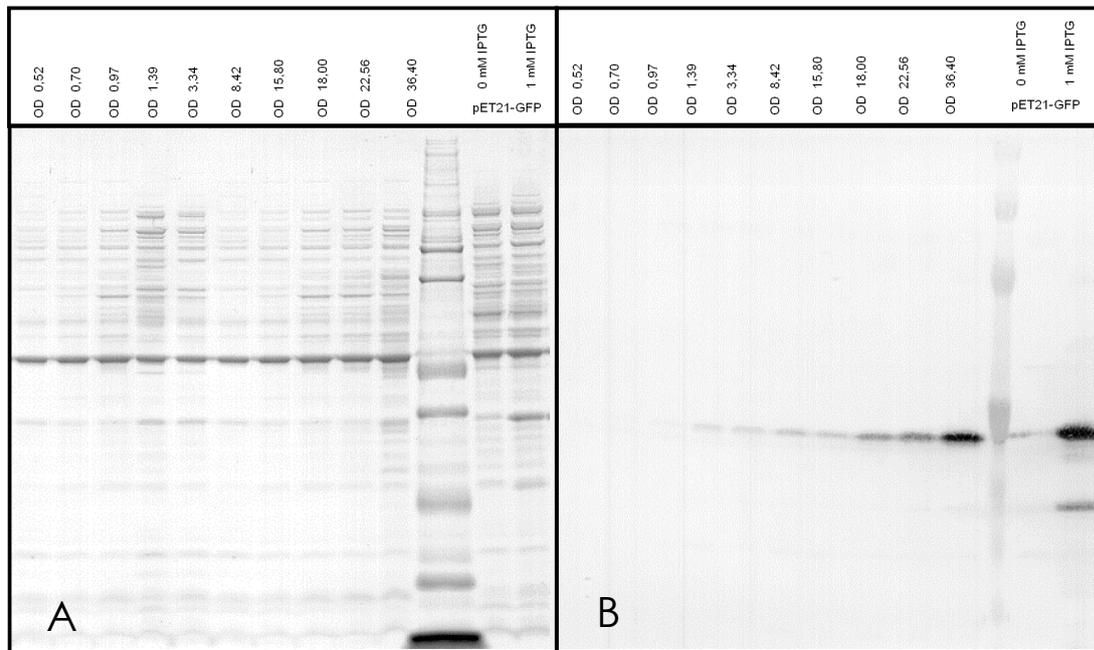
concentrazione di glucosio sembra aver giocato un ruolo duplice in questo caso: la sua concentrazione maggiore ha permesso una fase di crescita più lunga e il raggiungimento di una densità cellulare più elevata. In fig. 4-10 è evidente per la crescita in YE3X 2,5 g/l glucosio, l'incremento della fluorescenza specifica per densità cellulari maggiori di 5OD590.

Il sistema di espressione basato su  $P_{luxI}$  mostra di essere particolarmente modulabile per pattern diversi di espressione, da tutte le formulazioni di substrato considerate. Inoltre,

concentrazioni diverse di glucosio possono regolare l'induzione e la rata di espressione in condizioni di crescita diverse.

#### 4.4.2 Chiusura del sistema in condizioni non indotte

In fig. 4-11 si possono osservare l' SDS-page (A) e il Western Blotting (WB;B) dei campioni provenienti da una coltura batch in bioreattore per l'espressione della GFP. Il WB mostra che nelle condizioni considerate l'espressione della GFP non è rilevabile per densità cellulari inferiori a 1 OD<sub>590</sub>.



**Figure 4-11 SDS page (A) e WB ( $\alpha$ -GFP) (B) per campioni di una batch in bioreattore. Come controllo positivo è stato utilizzato il sistema pET indotto con 1mM di IPTG per l'espressione della GFP.**

La chiusura del sistema pLAI in condizioni non indotte, a basse densità cellulari, risulta essere particolarmente forte. È riportato dalla letteratura che un sistema di espressione basato sul promotore *P<sub>luxI</sub>* è stato costruito per la fine regolazione ed espressione di proteine

tossiche. Nel sistema però non c'era un *luxI* funzionale e l'induzione dipendeva dall'aggiunta esogena del 3OC6-HSL. Il carattere autoinducibile del sistema pLAI non sembra aver modificato la chiusura dell'espressione basale in condizioni non indotte.

#### **4.5 Ottimizzazioni delle sequenze**

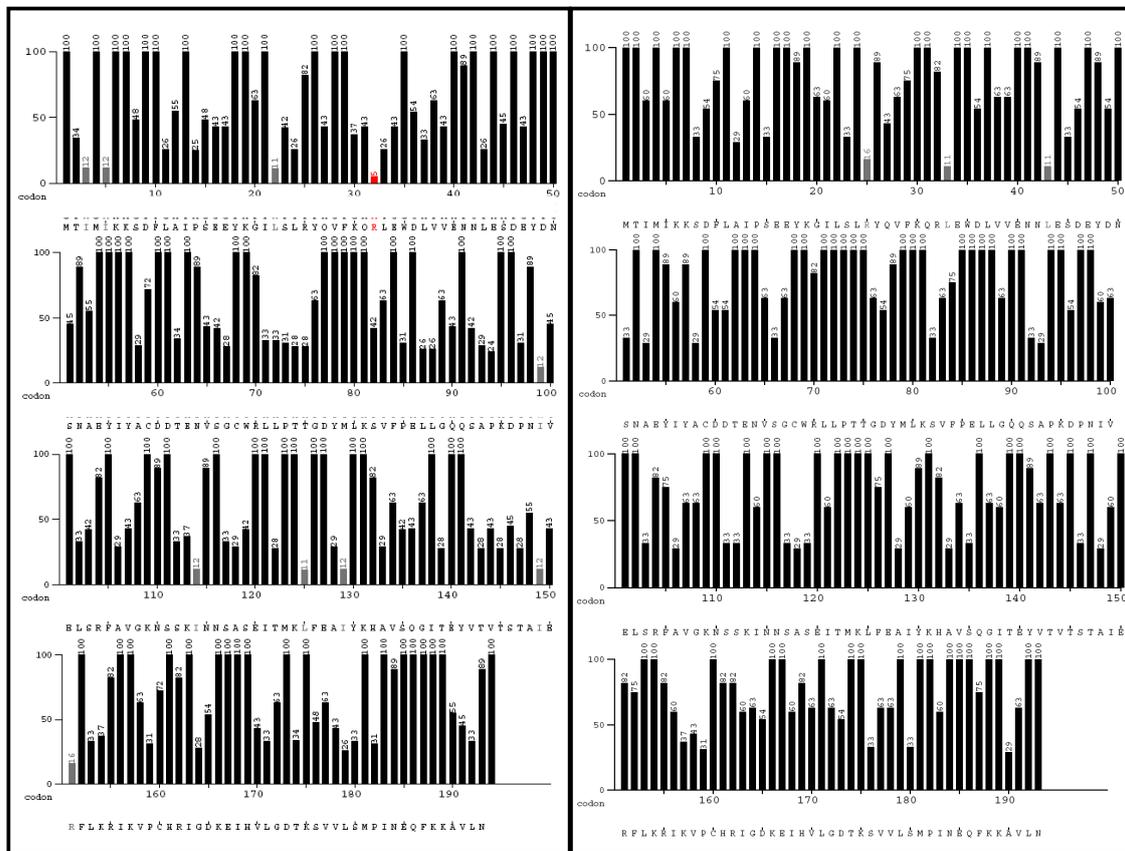
Al fine di massimizzare il controllo e l'espressione della proteina target sono state ottimizzate le sequenze dei geni regolatori dell'operone *lux* di *V. fischeri*, *luxI* e *luxR* (fig 4-12, 4-13). Infatti, l'analisi della sequenza rivela che la traduzione dei due geni comporta l'utilizzo di tRNA rari per *E. coli*. Le sequenze geniche sono state completamente ridisegnate per l'ottimizzazione del "codon usage" di *E. coli*, per l'eliminazione di alcuni siti di restrizione nelle sequenze, per l'introduzione di altri che saranno presi in considerazione in seguito.

Nell'ottimizzazione della produzione proteica, le procedure di screening dei diversi sistemi di espressione prevedono necessariamente il clonaggio del gene di interesse nel vettore di espressione. Le strategie di clonaggio generalmente si basano su metodi dipendenti dagli enzimi di restrizione e dalle DNA ligasi. La possibilità di avere lo stesso MCS su diversi sistemi di espressione, facilita il clonaggio e lo screening dei diversisistemi di espressione. Per questo motivo, il nuovo plasmide di espressione, basato sui geni *luxI* e *luxR* ottimizzati per l'espressione in *E. coli*, è stato munito di un MCS compatibile per i clonaggi con molti sistemi di espressione utilizzati. Le sequenze ridisegnate e assemblate, sono state sintetizzate dalla "GeneArt" per la costruzione del vettore finale pMKSal (fig.4-14).

Il nuovo vettore ha mostrato avere un livello di espressione fortemente aumentato rispetto al vecchio. Nella figura 15 è riportato il maggiore livello di produzione della proteina target raggiunto con il vettore pMKsal per l'espressione della GFP. Sono state considerate le due concentrazioni cellulari a 0.5 e a 10 OD590, come le due condizioni di pre-induzione e

induzione dell'espressione. Il plasmide pMKS<sub>Sal</sub>-GFP ha un livello di fluorescenza, in condizioni indotte (10 OD<sub>590</sub>) 2,5 volte maggiore del vettore pLAI-GFP.

Tuttavia, come atteso, il livello basale di espressione risulta essere aumentato rispetto al vettore che reca le sequenze di *luxI* e *luxR* non ottimizzate per *E. coli*. Il vettore pLAI-GFP infatti, mostra nuovamente una forte stringenza di repressione dell'espressione e la sua fluorescenza è non rilevabile e uguale al controllo negativo (pLAI vuoto).



**Figure 4-12 Ottimizzazione per l'uso dei codoni di *E. coli* per il gene *luxI*. Si osserva che, rispetto alla sequenza originale (A), sono stati cambiati diversi codoni nella sequenza ottimizzata (B) che mostra una percentuale di identità rispetto alla sequenza originale del 76,411%. Da un contenuto di 32% di GC si è passato al 46% in quella**

ottimizzata. Nella sequenza di *luxI*, inoltre, sono stati inseriti due siti di restrizione per ciascuno dei due enzimi di restrizione KpnI e XbaI.

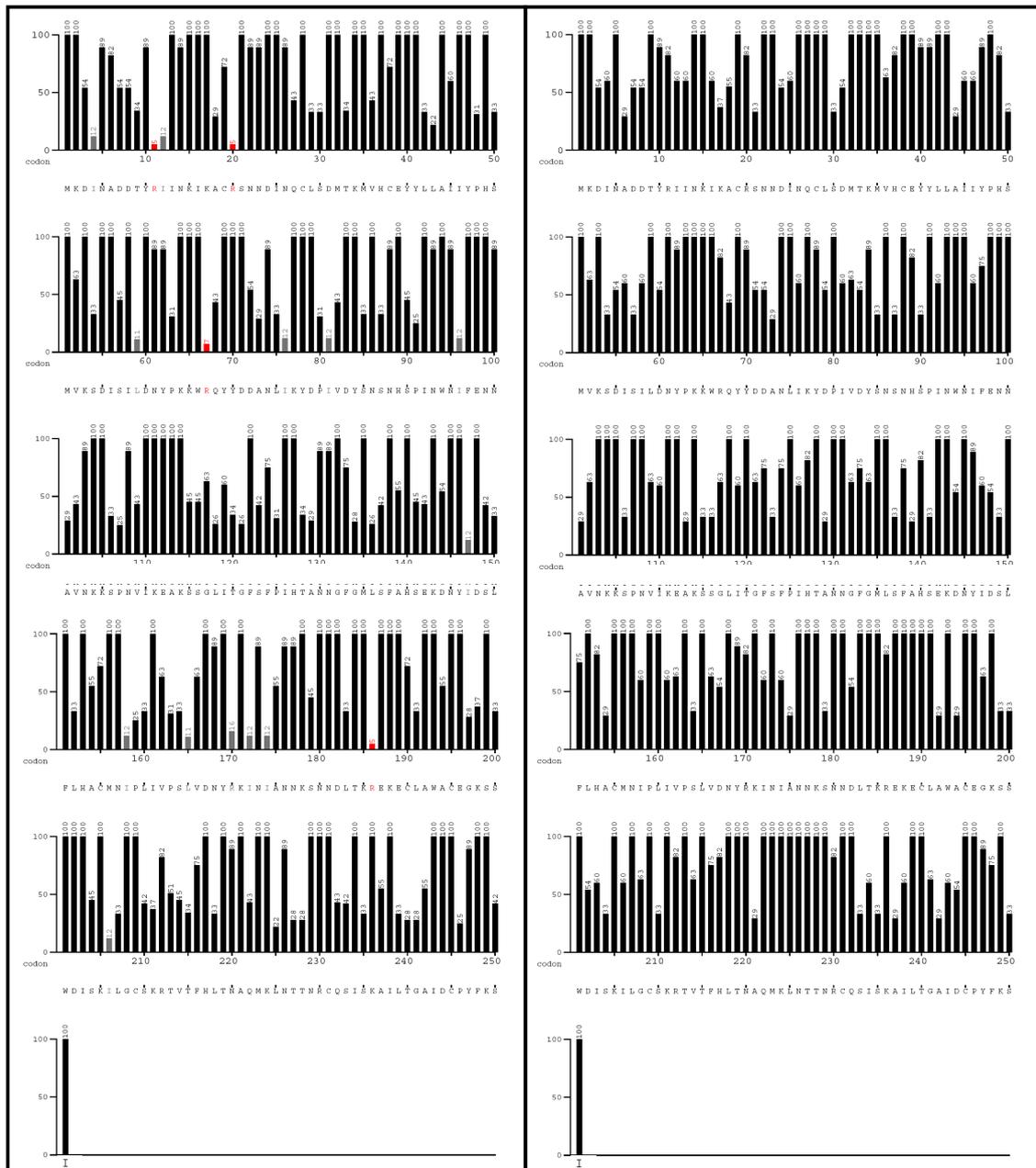
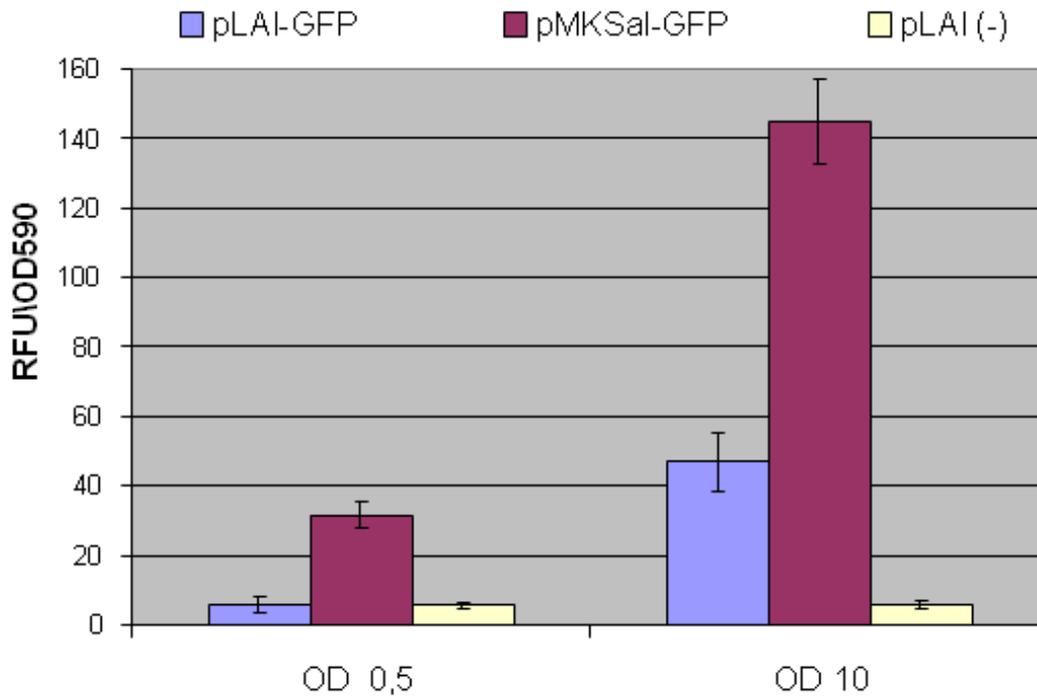


Figure 4-13 Ottimizzazione per l'uso dei codoni di *E. coli* per il gene *luxR*. Rispetto alla sequenza originale (A), sono stati cambiati diversi codoni nella sequenza ottimizzata (B) che mostra una percentuale di identità rispetto alla sequenza originale del 76,411%. Per quanto riguarda il GC%, si è passati dal 30 al 46%.



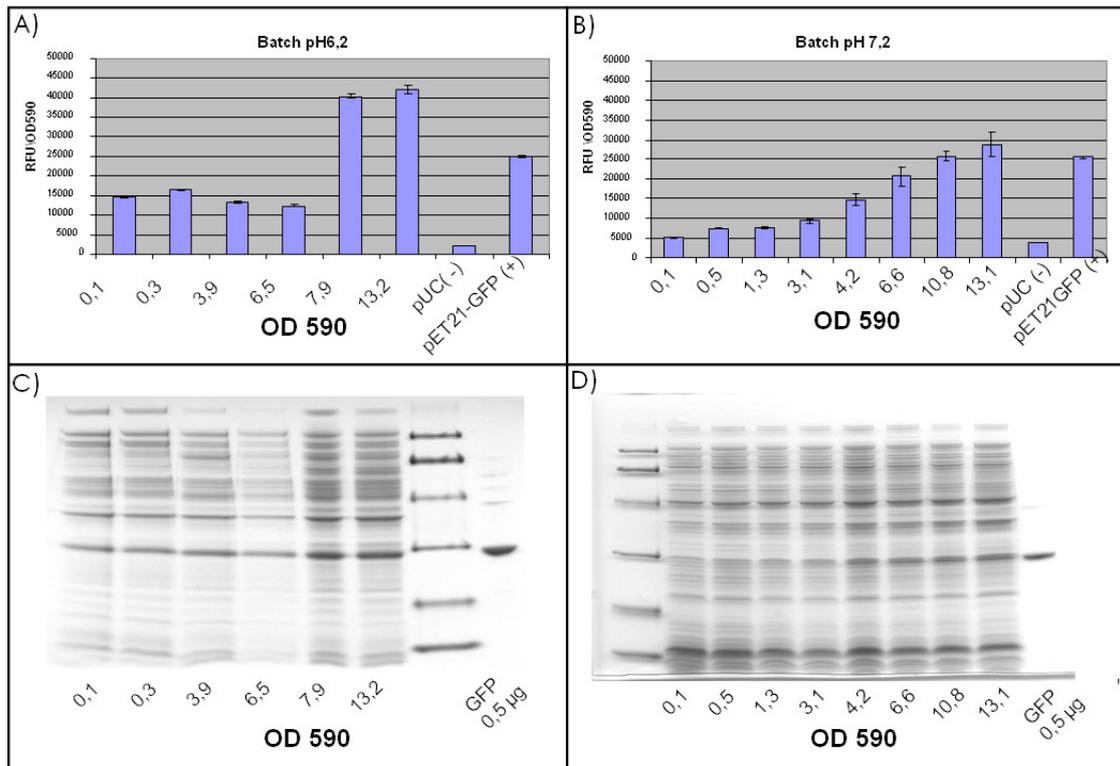


**Figure 4-15** Diverso comportamento di espressione della fluorescenza specifica dei vettori pLAI-GFP e pMKSal-GFP (dati come medie di tre esperimenti indipendenti).

#### **4.6 Effetto pH**

E' noto dalla letteratura che l'HSL è una molecola labile altamente sensibile al pH. L'anello lattonico infatti è soggetto all'idrolisi alcalina (Voelkert et Grant, 1970, Eberhard et al. 1981, Leadbetter et Greenberg 2000). Un aumento del pH da 6.2 a 7.2 ha un effetto importante sulla densità cellulare alla quale avviene l'autoinduzione.

Qual è l'effetto del pH sulla stabilità della molecola segnale e che effetto ha sul raggiungimento della concentrazione critica per attivare l'espressione del promotore  $P_{lux}$  tramite LuxR? In che modo la regolazione del pH delle coltura cellulare può considerarsi come uno strumento utile per l'induzione e la rata di espressione?



**Figure 4-16 Saggio di fluorescenza e SDS page dei campioni provenienti da colture batch ai setpoint di pH di 6,2 (A-C) e 7,2 (B-D).**

Sono riportate i dati provenienti da due colture batch in bioreattore. È stato saggiata l'espressione della fluorescenza e della GFP a pH 6,2 e 7,2. In fig 4-16 A-B, vi sono i saggi di fluorescenza nelle due condizioni di pH.

A pH 6,2, si osserva una fluorescenza specifica molto forte anche a basse densità cellulari (0,1 OD590) se confrontato con il controllo negativo (pUC). La fluorescenza specifica ha un forte incremento a circa 8 OD, con un livello di espressione della GFP paragonabile a quello del "pET system". Il dato è stato confermato anche dall'SDS-page (fig 4-16 C).

In condizioni invece leggermente alcaline, l'espressione dal promotore  $P_{luxI}$  segue un andamento legato strettamente ad una tipica regolazione da QS. A basse densità cellulari, la

fluorescenza specifica non è statisticamente differente dal controllo negativo. L'incremento della fluorescenza segue l'aumento della densità cellulare fino alla densità cellulare di 10 OD590. A questa densità cellulare, il sistema di espressione risulta pienamente indotto. L'osservazione è stata confermata sia dall'analisi della fluorescenza che dall' SDS-page (fig. 4-16).

#### 4.6.1 Rilevamento del 3OC6-HSL nel surnatante colturale

Per confermare che la concentrazione della molecola segnale nel mezzo dipende dal pH, e per stimare le variazioni della molecola segnale del QS durante i processi fermentativi, è stato effettuato un saggio semiquantitativo per 3OC6-HSL.

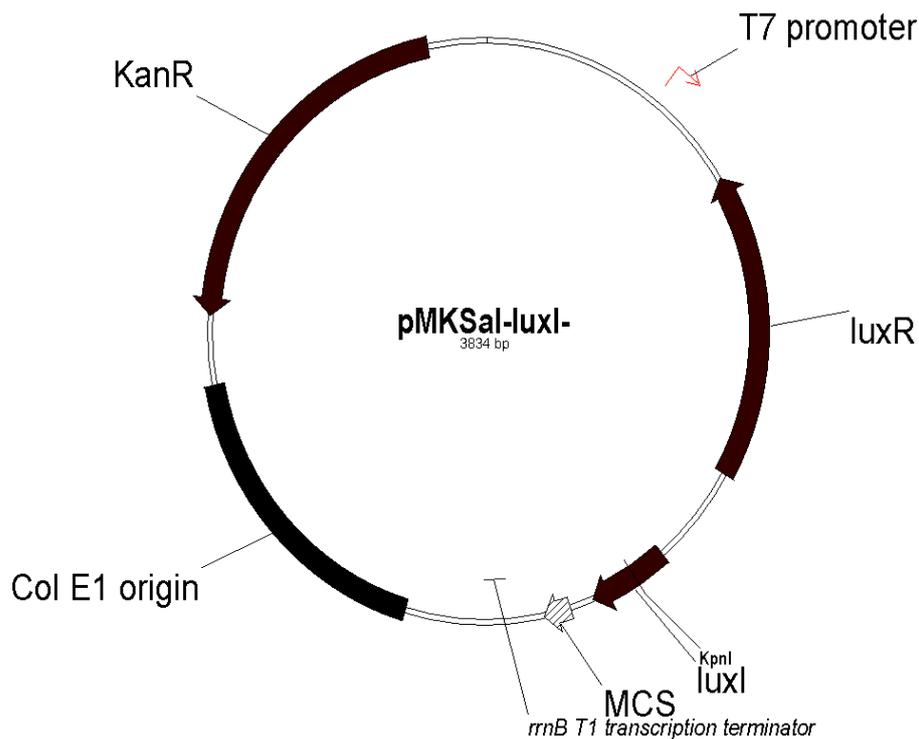
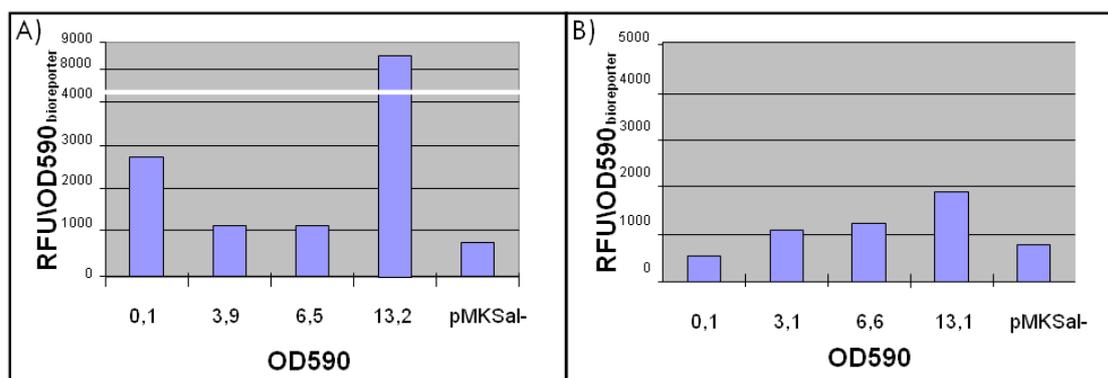


Figure 4-17 Plasmide pMKSsal-luxI-.

Il plasmide bioreporter pMKSsal-luxI-GFP (fig. 4-17), deriva da pMKSsal. La sequenza di *luxI*, ottimizzata per l'espressione in *E. coli*, è stata disegnata inserendo due siti di restrizione per KpnI che coprono circa il 70% del gene. La restrizione enzimatica e l'auto-ricircularizzazione di pMKSsal ha prodotto un plasmide che produce un LuxI non funzionale. La coltura di *E. coli* MM294.1\pMKSsal-luxI-GFP in piena attività metabolica è stata normalizzata per biomassa, bloccata per la capacità di dividersi con l'inibitore della sintesi del DNA trimetoprima (Kwon et al., 2008), e risospeso nel surnatante filtrato dei campioni provenienti dalle crescite in condizioni diverse (vedi MATERIALI E METODI).



**Figure 4-18 Saggio semiquantitativo di 3OC6-HSL nel surnatante colturale. I campioni provengono da crescite a pH 6,2 (A) e pH 7,2 (B) (medie di 5 ripetizioni da saggi indipendenti con tre repliche, sottratti della fluorescenza al tempo T0 di incubazione con il bioreporter; vedi testo).**

L'andamento della concentrazione di 3OC6-HSL segue sempre le modalità di espressione della GFP di fig.4-16, sia a pH 6,2 (fig.18-A) che a pH 7,2 (fig.18-B).

Al pH di 6,2, con una densità cellulare di 0,1, la fluorescenza del bioreporter ha circa tre volte la fluorescenza del bioreporter nel surnatante da colture alla stessa densità cellulare ma a pH di 7,2. In quest'ultimo caso, la fluorescenza è paragonabile a quella del controllo negativo (pMKSsal-: MM294.1\pMKSsal-luxI-GFP incubato con un surnatante proveniente da una coltura di pMKSsal-luxI).

L'instabilità della molecola segnale dipendente dal pH è necessaria e sufficiente per i diversi pattern di espressione osservati in fig.16.

#### **4.7 Controllo del “dosaggio genico” di *luxI***

Tra gli approcci che sono stati sviluppati per un fine controllo dell'espressione genica, è stato preso in considerazione la riduzione del dosaggio genico per la HSL-sintasi LuxI. Infatti, l'espressione basale dal promotore  $P_{luxI}$  permette la traduzione di LuxI e della molecola segnale 3OC6-HSL fino alla concentrazione critica per la formazione del complesso LuxR\3OC6-HSL. Nelle condizioni non indotte, quindi, un ruolo importante è la concentrazione cellulare di LuxI. Ci si attende che in queste condizioni, la riduzione del dosaggio genico di *luxI* comporti una diminuzione della concentrazione cellulare di LuxI e un tasso di sintesi di 3OC6-HSL più lento e più controllabile.

Per disaccoppiare i dosaggi dei geni per LuxI e per la proteina di interesse sullo stesso plasmide, *luxI* è stato integrato nel cromosoma batterico per ricombinazione omologa (fig.4-19).

In fig. 4-20 sono riportati le fluorescenze specifiche durante le crescite, dipendenti dai diversi pattern di espressione delle diverse combinazioni ospite plasmide riportati in tabella 4-1.

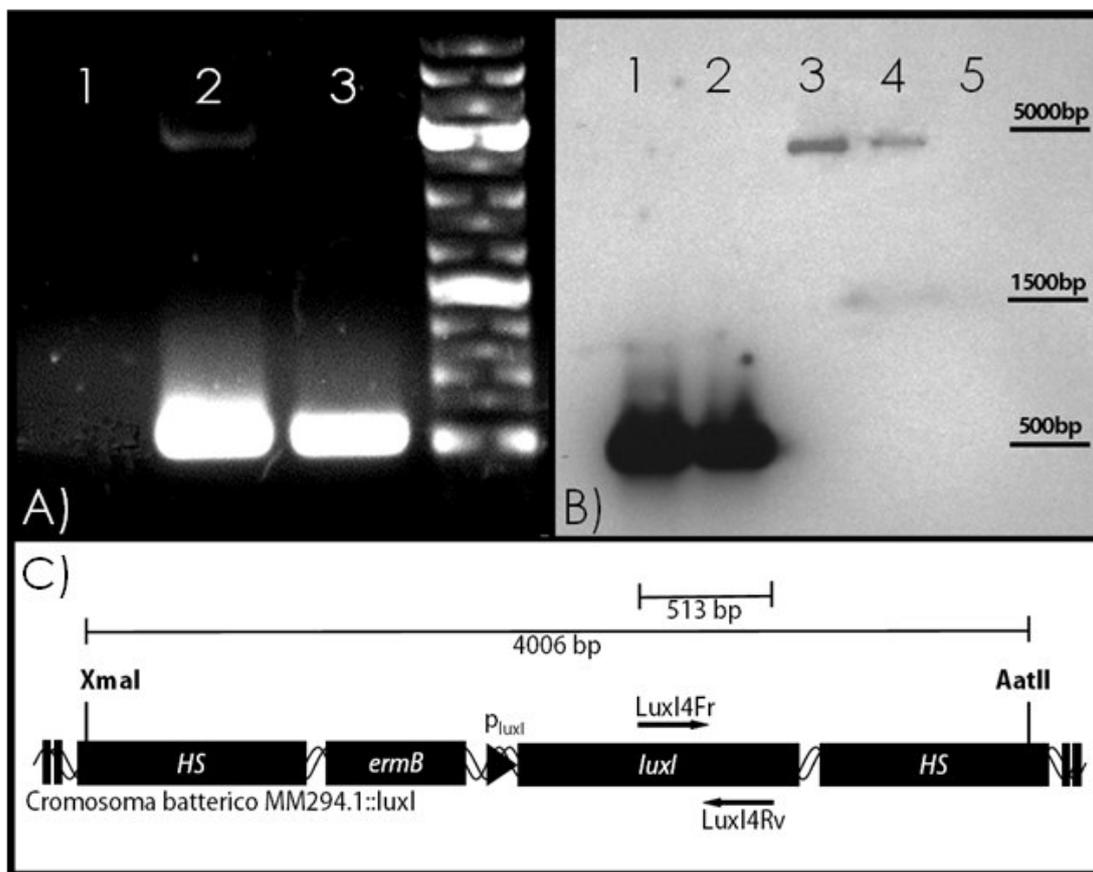
La combinazione MM294.1\pMKSsal-GFP rappresenta la soluzione che ha l'induzione alla densità cellulare più bassa ( 0,5-0,7 OD590 nelle crescite riportate), in condizioni standard. L'induzione della fluorescenza resta essere la più forte.

Per la combinazione MM294.1\pGLLux506, è riconfermato una forza di espressione minore rispetto alla combinazione MM294.1\pMKSsal-GFP, con un'induzione del sistema di espressione a circa una densità cellulare tra 1,5-2,2 OD590. L'induzione risulta essere graduale.

La nuova combinazione costruita, con una copia di *luxI* per cellula nel ceppo MM294.1::*luxI* e con il plasmide pMKSsal- $\Delta luxI$ -GFP, è indotto ad una densità cellulare tra

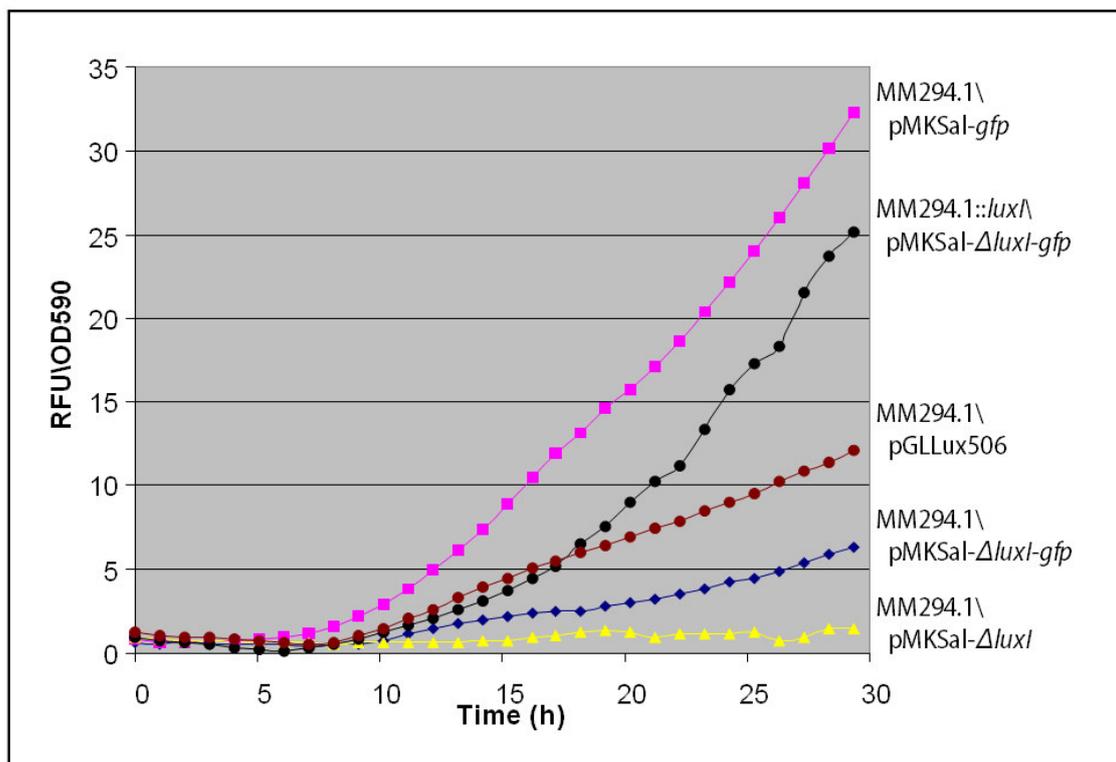
4,5 e 6 OD590. Dall'induzione il "feedback-positivo" della fluorescenza è il più evidente tra le soluzioni considerate, con un alto livello finale di fluorescenza.

Per il controllo MM294.1\pMKSaI- $\Delta luxI$ -GFP, si osserva il livello di fluorescenza basale. Tuttavia nelle crescite considerate non è stata considerato né l'effetto pH né l'effetto glucosio, che come dimostrato, rappresentano un utile strumento di controllo del sistema anche per aumentare la tringenza della repressione in condizioni non indotte.



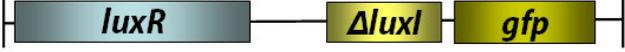
**Figure 4-19** Caratterizzazione molecolare del ceppo MM294.1::*luxI*. A) Prodotto di PCR utilizzando la coppia di primer LuxI4Fr/LuxI4Rv utilizzando come template DNA genomico di MM294.1 (pozzetto1, controllo negativo), MM294.1::*luxI* (3) e DNA plasmidico di pGLLux506 (2, controllo positivo). B) Southern Blotting utilizzando

come sonda il prodotto di PCR come in A), pozzetto 2). In 1 e 2 Sono stati caricati i due prodotti di PCR in A), pozzetto 2 e 3. In 3 e 4 il DNA plasmidico di pGLEM-luxI, utilizzato per assemblare il frammento lineare per la ricombinazione omologa ( vedi Materiali e metodi) e quello genomico di MM294.1::*luxI* rispettivamente, digeriti con gli enzimi di restrizione XmaI e AatII. Nel pozzetto 5, il DNA genomico di MM294.1, digerito come MM294.1::*luxI*. In C) la cassetta per *luxI* nel DNA genomico di MM294.1.



**Figure 4-20** Le colture sono state normalizzate per le crescite tramite pre-culture a saturazione e diluizioni in terreno fresco. Medie di 5 ripetizioni per ciascuna crescita. Per una descrizione maggiore delle combinazioni vedi Tab1

Table 4-1 Combinazioni ospite\plasmide utilizzati nell'esperimento di fig.21

Plasmidi	Ceppi <i>E. coli</i>
<p><b>pMKSsal-gfp</b></p> 	MM294.1
<p><b>pMKSsal-ΔluxI-gfp</b></p> 	MM294.1:: <i>luxI</i>
<p><b>pGLLux506</b></p> 	MM294.1
<p><b>pMKSsal-ΔluxI-gfp</b></p> 	MM294.1
<p><b>pMKSsal-ΔluxI</b></p> 	MM294.1

#### 4.8 Error prone PCR

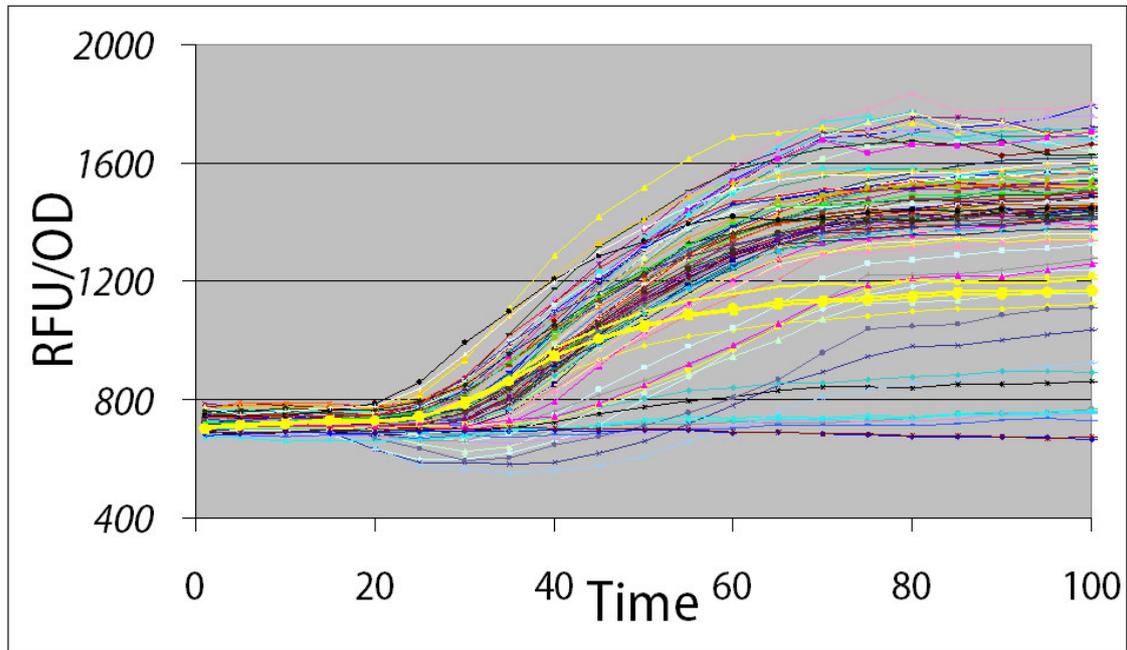
Con l'intento di ampliare la gamma di espressione del sistema pLAI in risposta alla densità cellulare, è stata costruita una libreria di mutanti random, tramite Error Prone PCR (EP-PCR). Sono state utilizzate due condizioni mutanti, come descritte da Cadwell e Joyce (2008). L'EP-PCR è stata utilizzata per amplificare il frammento dell'operone *lux* contenente gli elementi regolativi associati, utilizzando come primer LuxFr e LuxRv. Il frammento amplificato contiene *luxR*, la regione intergenica *luxR-luxI*, *luxI*, la regione intergenica *luxI-luxC* fino al codone di start di *luxC*. Il frammento è stato amplificato in modo da essere clonato nei siti TA del vettore pGLOW-topo (Invitrogen) in ORF con il gene *gfp*.

Sono stati selezionate tutte le colonie che dopo la trasformazione emettevano fluorescenza. Ogni mutante è stato saggiato per la capacità di esprimere la fluorescenza con un comportamento dipendente dalla densità cellulare (fig. 4-21). Tutti i cloni rispondevano ad un comportamento da QS per l'espressione della fluorescenza.

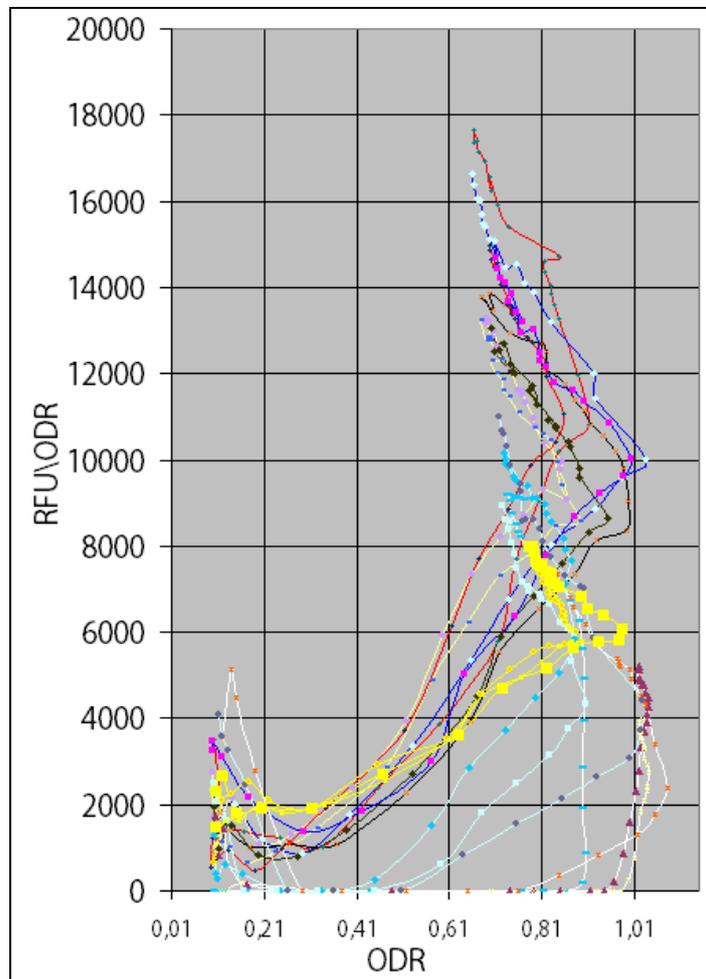
Tra questi, sono stati selezionati quelli che avevano un livello di espressione basale inferiore a quello di controllo (MM294.1\pGLlux506) e con diversi pattern di espressione come mostrato in figura 4-22. Un pattern di espressione può essere caratterizzato da tre stadi: induzione, livello di espressione massimo raggiunto, lo stadio intermedio tra l'induzione e il livello massimo di espressione.

In particolare, i mutanti selezionati si diversificano dal wild type per tutte e tre le caratteristiche menzionate.

I cloni sono stati selezionati in modo da includere tutte le combinazioni utili di espressione e le mutazioni sono state mappate.



**Figure 4-21** Fluorescenza specifica della libreria di mutanti. I cloni sono stati normalizzati per la crescita. Medie di tre ripetizioni, confermati in due esperimenti indipendenti. Nel grafico, i dati con il cerchietto in giallo fanno riferimento al comportamento di espressione di controllo (pGLlux506).



**Figure 4-22 Cloni selezionati in basaii pattern di espressione. In giallo il controllo di riferimento (MM294.1\pGLLux506) (ODR=Densità ottica relativa).**

## 5 CONCLUSIONE

Il lavoro presentato arricchisce di un nuovo sistema di espressione il repertorio degli strumenti a disposizione per la produzione proteica. Il nuovo sistema si basa sul “cell-to-cell communication” e su uno switch molecolare dipendente dal Quorum Sensing. Le sue principali caratteristiche sono la fine regolazione, l’ampia gamma di pattern di espressioni e il carattere autoinduttivo. Le tre caratteristiche confluiscono in un sistema di regolazione che è indipendente da specifiche necessità metaboliche.

Con l’utilizzo del sistema di autoinduzione pLAI, sono stati descritti tre diversi pattern di espressione, tutti con un comportamento da QS:

1. espressione basale non rilevabile e induzione graduale e moderata (MM294.1\serie vettori pLAI);
2. espressione basale non rilevabile e induzione forte e controllata (MM294.1::*luxI* \pMKSa1- $\Delta$ *luxI*);
3. bassa espressione basale e induzione molto forte (MM294.1\pMKSa1).

Differenti strategie sono state applicate per migliorare il controllo e aumentare l’elasticità del sistema di espressione per le diverse esigenze di produzione. Tramite l’ottimizzazione della sequenza per l’espressione in *E. coli*, la fluorescenza del gene reporter è aumentata di circa 3 volte. Tuttavia il livello di espressione basale, in condizioni non indotte, risulta essere significativo. In questi casi, è stato dimostrato che è possibile intervenire sulla regolazione dell’espressione, tramite l’utilizzo di alcune variabili fermentative. Infatti, la caratterizzazione della risposta del sistema pLAI al pH, alla repressione catabolica e ai diversi mezzi colturali considerati, permette l’ utilizzo di queste variabili come “manopole” di controllo.

Nei tre mezzi colturali M9, LB e YE3X, il sistema di espressione ha un comportamento diverso. In YE3X si osserva il maggior effetto da repressione catabolica con una concentrazione di 0,5 g/l di glucosio. In queste condizioni, si ha un forte effetto sulla

chiusura del sistema in condizioni non indotte. In questo terreno si osserva anche la maggiore produzione proteica.

L'effetto del pH sui pattern di espressione è importante. In condizioni di crescita che si diversificano per pH 6.2 e 7.2, l'effetto è consistente sull'espressione basale, sul momento di induzione, sul comportamento di espressione dopo l'induzione e sulla rata massima di espressione. È stato dimostrato che l'effetto del pH è legato alla concentrazione della molecola segnale del QS. Per fare questo, è stato utilizzato un metodo semiquantitativo per la 3OC6-HSL, basato sul ceppo bioreporter costruito *E. coli* MM294.1\pMKSa1-luxI-GFP. È stato verificato che a diversi pH corrispondono differenti trend di concentrazioni di 3OC6-HSL in relazione alla densità cellulare.

I nuovi pattern di espressione che sono stati generati tramite EP-PCR, sono un'ulteriore fonte di ampliamento del comportamento di espressione. I mutanti ottenuti sono stati mappati e le mutazioni sono utili per essere introdotte nella serie di vettori pLAI.

I vettori di espressione sono stati costruiti con importanti caratteristiche che semplificano le operazioni generali di produzione, sia prima che dopo la vera e propria espressione eterologa in *E. coli*. Sono state disegnate le sequenze per un sito di clonaggio multiplo compatibile con gli altri sistemi di espressione, per il tag-fusion e per un'efficiente terminazione trascrizionale e traduzionale. Per soddisfare la richiesta di elevate produzioni, sono stati costruiti vettori con origini di replicazione con medio e alto numero di copie.

Il dosaggio genico di *luxI* è stato ridotto a una copia per cellula tramite integrazione cromosomica. La combinazione MM294.1::*luxI*\pMKSa1- $\Delta$ *luxI*-GFP, ha mostrato una fine regolazione dell'espressione e una forte espressione del gene reporter sul plasmide.

Infine, per soddisfare le esigenze di produzione su larga scala, è stato costruito un sistema di repressione del QS. Nei processi di scaling-up, un promotore inducibile reprime per interferenza trascrizionale, l'attivazione del QS e l'espressione del gene eterologo anche ad elevate densità cellulari.



## 6 BIBLIOGRAFIA

- Adhya, S., and M. Gottesman. 1982. Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell* 29:939–944.
- Anderson, J. C., Elizabeth J. Clarke, Adam P. Arkin and Christopher A. Voigt, 2006. Environmentally Controlled Invasion of Cancer Cells by Engineered Bacteria. *J. Mol. Biol.* 355, 619–627.
- Antunes, L. C., A. L. Schaefer, R. B. Ferreira, N. Qin, A. M. Stevens, E. G. Ruby, and E. P. Greenberg. 2007. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI regulon. *J. Bacteriol.* 189:8387–8391.
- Arechaga, I., Miroux, B., Runswick, M.J., Walker, J.E., 2003. Overexpression of *Escherichia coli* F1F(o)-ATPase subunit a is inhibited by instability of the *uncB* gene transcript. *FEBS Lett.* 547, 97–100.
- Arechaga, I., Miroux, B., Karrasch, S., Huijbregts, R., de Kruijff, B., Runswick, M.J., Walker, J.E., 2000. Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale overproduction of the b subunit of F(1)F(o) ATP synthase. *FEBS Lett.* 482, 215–219.
- Aris A, Corchero JL, Benito A, Carbonell X, Viaplana E, Villaverde A. 1998. The expression of recombinant genes from bacteriophage lambda strong promoters triggers the SOS response in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 60:551–559.
- Aristidou, A. A., San, K. Y. and Bennett, G. N. (1999) *Biotechnol. Prog.* 15, 140–145
- Bailey, J.E., 1993. Host-vector interactions in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 48, 29–52.
- Balbas, P., and F. Bolivar. 1990. Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 185:14–37.
- Baldi L, Muller N, Picasso S, Jacquet R, Girard P, Thanh HP, Derow E, Wurm FM. 2005. Transient gene expression in suspension HEK-293 cells: Application to large-scale protein production. *Biotechnology Progress* 21(1):148-153.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 10(5):411-21.
- Bassler BL How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999, 2:582- 587
- Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E., and Silverman, M.R. 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*, sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Molec. Microbiol.* 9: 773-786.
- Bauer, K. A., A. Ben-Bassat, M. Dawson, V. T. de la Puente, and J. O. Neway. 1990. Improved expression of human interleukin-2 in high-cell density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1296–1302.

- Bentley, W.E., Kompala, D.S., 1990. Optimal induction of protein synthesis in recombinant bacterial cultures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 589, 121–138
- Bentley, W. E., N. Mirjalili, D. C. Andersen, R. H. Davies and D. S. Kompala (1990). "Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria." *Biotechnol. Bioeng.* 35(7): 668-681.
- Binnie, C., J. D. Cossar and D. I. H. Stewart (1997). "Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*." *Trends Biotechnol.* 15(8): 315-320.
- Birnbaum, S. and J. E. Bailey (1991). "Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*." *Biotechnol. Bioeng.* 37(8): 737-745.
- Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, K. Haugan and S. Valla (1997). "Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon." *Appl. Environ. Microbiol.* 63(2): 370-379.
- Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, P. Karunakaran and S. Valla (1997). "Improved broadhost-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria." *Plasmid.* 38: 35-51.
- Boylan, M., Graham, A.F., and Meighen, E.A. 1985. Functional identification of the fatty acid reductase components encoded in the luminescence operon of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 163: 1186-1190.
- Boylan, M., Miyamoto, C., Wall, L., Graham, A.F., and Meighen, E.A. 1989. Lux C, D and E genes of the *Vibrio fischeri* luminescence operon code for the reductase, transferase, and synthetase enzymes involved in aldehyde biosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 49: 681-688.
- Brosius, J., M. Erfle, and J. Storella. 1985. Spacing of the 210 and 235 regions in the *tac* promoter. Effect on its *in vivo* activity. *J. Biol. Chem.* 260:3539–3541.
- Brosius, J., A. Ullrich, M. A. Raker, A. Gray, T. J. Dull, R. G. Gutell, and H. F. Noller. 1981. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rmB* ribosomal RNA operon of *E. coli*. *Plasmid* 6:112–118.
- Cadwell, RC; Joyce, GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* 1992;2:28–33.
- Calderone, T.L., Stevens, R.D., Oas, T.G., 1996. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 262, 407–412.
- Cao, G.J., Pogliano, J., Sarkar, N., 1996. Identification of the coding region for a second poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11580–11585.
- Cereghino GP, Cregg JM. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr Opin Biotechnol* 10(5):422-7.
- Chai, Y. & Winans, S. C. (2004). Site-directed mutagenesis of a LuxR-type quorum-sensing transcription factor: alteration of autoinducer specificity. *Mol Microbiol* 51, 765–776.
- Chang, D.E., Smalley, D.J., Conway, T., 2002. Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol. Microbiol.* 45, 289–306.
- Chart, H., Smith, H.R., La Ragione, R.M., Woodward MJ, 2000. An investigation into the pathogenic properties of

*Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *J. Appl. Microbiol.* 89, 1048–1058.

Chaveroche, M.K., Ghigo, J.M., d'Enfert, C. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* *Nucleic Acids Res.* 28 2000 E97

Chen, W., P. T. Kallio, and J. E. Bailey. 1993. Construction and characterization of a novel cross-regulation system for regulating cloned gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 130:15–22.

Chen, H. Y., M. Bjerknes, R. Kumar, and E. Jay. 1994. Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 22:4953–4957.

Chen, W., P. T. Kallio, and J. E. Bailey. 1995. Process characterization of a novel cross-regulation system for cloned protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 11:397–402.

Choi, S. H. & Greenberg, E. P. (1991). The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11115–11119.

Choi, S.H. and E. P. Greenberg (1992a) Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J. Bacteriol.* 174: 4064-4069

Choi, J. H., K. C. Keum and S. Y. Lee (2006). "Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*." *Chem. Eng. Sci.* 61(3): 876-885.

Chou, C.-H., Aristidou, A.A., Meng, S.-Y., Bennett, G.N., San, K.- Y., 1995. Characterization of a pH-inducible promoter system for high-level expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 47, 186–192.

Clark ED. 2001. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology* 12(2):202-207.

Cregg JM, Higgins DR. 1995. Production of Foreign Proteins in the Yeast *Pichia Pastoris*. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique* 73:S891-S897.

Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, H. W. Boyer and R. B. Helling (1973). "Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 70(11): 3240-3244.

Dai X, Chen Q, Lian M, Zhou Y, Zhou M, Lu S, Chen Y, Luo J, Gu X, Jiang Y. 2005. Systematic high-yield production of human secreted proteins in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332(2):593-601.

Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M., Harrison RG, 1999. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 382–388.

Death, A., Ferenci, T., 1994. Between feast and famine: endogenous inducer synthesis in the adaptation of *Escherichia coli* to growth on limiting carbohydrates. *J. Bacteriol.* 176, 5101–5107.

de Boer, H. A., L. J. Comstock, and M. Vasser. 1983. The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21–25.

del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa and R. Díaz-Orejás (1998). "Replication and control of circular bacterial plasmids." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(2): 434-464.

Derek M. Dykxhoorn, Rebecca St. Pierre, Thomas Linn \* A set of compatible *tac* promoter expression vectors *Gene* 177(1996) 133 136

- Devine, Jerry h, Gerald S: Shadel and Thomas Baldwin. 1988. Identification of the operator of the lux regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc. Natl. Sci. USA*: 86, 5688-5692.
- Diaz Ricci, J. C. and M. E. Hernández (2000). "Plasmid effects on *Escherichia coli* metabolism." *Crit. Rev. Biotechnol.* 20(2): 79-108.
- Dieci, G., Bottarelli, L., Ballabeni, A., Ottonello, S., 2000. tRNAassisted overproduction of eukaryotic ribosomal proteins. *Protein Expr. Purif.* 18, 346–354.
- Dikshit, K.L., Dikshit, R.P., Webster, D.A., 1990. Study of *Vitreoscilla* globin (vgh) gene expression and promoter activity in *E. coli* through transcriptional fusion. *Nucl. Acids Res.* 18, 4149–4155.
- Doherty, A. J., B. A. Connolly, and A. F. Worrall. 1993. Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene* 136:337–340.
- Dong, H., Nilsson, L., Kurland, C.G., 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol.* 177, 1497–1504.
- Donovan, R.S., C.W. Robinson, B.R. Glick, Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter, *J. Indust. Microbiol.* 16 (1996) 145–154.
- Doran PM. 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 11 (2):199-204.
- Dunlap, P.V., and Kuo, A. 1992. Cell density-dependent modulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system in the absence of autoinducer and LuxR protein. *J. Bacteriol.* 174: 2440-2448.
- Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., and Oppenheimer, N.J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochem.* 20: 2444-2449
- Eckart MR, Bussineau CM. 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr Opin Biotechnol* 7(5):525-30.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W. (1989). Position and density effects on repression by stationary and mobile DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 3, 185–197.
- Elvin, Thompson, Argall, Hendry, Stamford, Lilley and Dixon (1990). "Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in *Escherichia coli*." *Gene.* 87(1): 123-126.
- Ehnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., Buchner, J., 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16, 221–229.
- Engbrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. 1983. Bacterial bioluminescence, isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.* 32: 773-781.
- Engbrecht, J., and Silverman, M. (1987) Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic Acids Res* 15: 10455–10467
- Egland, K.A. and E.P. Greenberg (2000) Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator, LuxR, to a repressor. *J. Bacteriol.* 182: 805-
- Egland, K.A. and E.P. Greenberg (2001) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: analysis of the LuxR DNA binding region by alanine

scanning mutagenesis. *J. Bacteriol.* 183: 382- 386

Engebrecht, J., and Silverman, M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 4154-4158.

Englesberg, E., Squires, C., Meronk Jr., F., 1969. The l-arabinose operon in *Escherichia coli* B-r: a genetic demonstration of two functional states of the product of a regulator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 62, 1100–1107.

Eszterhas, S.K., Bouhassira, E.E., Martin, D.I.K., and Fiering, S. (2002). Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Mol. Cell. Biol.* 22, 469–479.

Figge, J., Wright, C., Collins, C.J., Roberts, T.M., Livingston, D.M., 1988. Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by *E. coli* lac repressor in monkey cells. *Cell* 52, 713–722.

Friedrich, W.F., and Greenberg, E.P. 1983. Glucose repression of luminescence and luciferase in *Vibrio fischeri*. *Arch. Microbiol.* 134: 87-91.

Fuqua, C and Greenberg EP Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* 1998, 1:183-189

Fuqua C, Winans SC and Greenberg EP Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 1996, 50:727- 751 .

Fuqua, C., S.C.Winans and E.P. Greenberg. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-response transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275

Gellissen, G., G. Kunze, C. Gaillardin, J. M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis and I. v. d. Klei (2005). "New yeasts expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - A comparison." *FEMS Yeast Res.* 5(11): 1079-1096.

Gerald S. Shade and Thomas Baldwin 1992 Positive Autoregulation of the *Vibrio fischeri* luxR Gene THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY No. 11, 7696-7702.

Giacomini, A., F. J. Ollero, A. Squartini, and M. P. Nuti. 1994. Construction of multipurpose gene cartridges based on a novel synthetic promoter for high-level gene expression in Gram-negative bacteria. *Gene* 144:17–24.

Giladi, H., D. Goldenberg, S. Koby, and A. B. Oppenheim. 1995. Enhanced activity of the bacteriophage  $\lambda$  PL promoter at low temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2184–2188.

Gilson, L., Kuo, A., and Dunlap, P. V. 1995. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* 177: 6946-6951.

Gorski, K., J.-M. Roch, P. Prentki, and H. M. Krisch. 1985. The stability of bacteriophage T4 gene 32 mRNA: a 59 leader sequence that can stabilize mRNA transcripts. *Cell* 43:461–469.

Grabherr, R. and K. Bayer (2002). "Impact of targeted vector design on ColE1 plasmid replication." *Trends. Biotechnol.* 20(6): 257-260.

Grabherr, R., E. Nilsson, G. Striedner and K. Bayer (2002). "Stabilizing plasmid copy number to improve recombinant protein production." *Biotechnol. Bioeng.* 77(2): 142-147.

- Grabski, A., M. Mehler, D. Drott, Unattended high-density cell growth and induction of protein expression with the overnight express TM autoinduction system, in *Novations* 17 (2003) 3–6.
- Gronenborn, B. (1976). "Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*." *Mol. Gen. Genet.* 148: 243-250.
- Grossman, T.H., E.S. Kawasaki, S.R. Punreddy, M.S. Osburne, Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability, *Gene* 209 (1998) 95–103.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J., 1995. Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121–4130.
- Haldimann, A., L. L. Daniels and B. L. Wanner (1998). "Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon." *J. Bacteriol.* 180(5): 1277-1286.
- Hall, M. N., J. Gabay, M. De´barbouille´, and M. Schwartz. 1982. A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature (London)* 295:616–618.
- Hahm, D. H., Pan, J. and Rhee, J. S. (1994) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 100–107
- Han, K., Hong, J. and Lim, H. C. (1993) *Biotechnol. Bioeng.* 41, 316–324
- Hanzelka, B.L., and Greenberg, E.P. 1995. Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J. Bacteriol.* 177: 815-817.
- Hanzelka, B.L., and Greenberg, E.P. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* 178: 5291-5294.
- Hanzelka, B.L., Stevens, A.M., Parsek, M.R., Crone, T.J., and Greenberg, E.P. 1997. Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J. Bacteriol.* 179: 4882-4887.
- Harley, C. B., and R. P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15:2343–2361.
- Hastings, J.W., Makemson, J.C., and Dunlap, P.V. 1987. How are growth and luminescence regulated independently in light organ symbiosis? *Symbiosis.* 4: 3-24.
- Haverstein L and Morrison DA Quorum sensing and peptide pheromones in *Streptococcal* competence for genetic transformation. In *Cell-Cell Signaling in Bacteria (Edited by: Dunney GaW) SC: ASM Press 1999, 9-26*
- Haygood, M.G., and Nealson, K.H. 1985a. The effect of iron on the growth and luminescence of the symbiotic bacterium *Vibrio fischeri*. *Symbiosis.* 1: 39-51.
- Herbst, B., S. Kneip, and E. Bremer. 1994. pOSEX: vectors for osmotically controlled and finely tuned gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* 151: 137–142.
- Hoffmann, F., Rinas, U., 2004. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 89, 73–92.
- Hoffmann, F., Weber, J., Rinas, U., 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production. Part 1. readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnol. Bioeng.* 80, 313–319.
- Hood EE, Jilka JM. 1999. Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 10(4):382-6.

- Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. (1987). Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell*, 50, 769–778.
- Itakura, K., T. Hirose, R. Crea and A. D. Riggs (1977). "Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin." *Science*. 198(4321): 1056-1063.
- Jacquet, A., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Chaudoir, S., Bollen, A., Biemans, R., 1999. Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii*ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. *Protein Expr. Purif.* 17, 392–400.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.
- James DC, Freedman RB, Hoare M, Ogonah OW, Rooney BC, Larionov OA, Dobrovolsky VN, Lagutin OV, Jenkins N. 1995. N-Glycosylation of Recombinant Human Interferon-Gamma Produced in Different Animal Expression Systems. *Bio-Technology* 13(6):592-596.
- Jana, S. and J. K. Deb (2005). "Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 289-298.
- JARED R. LEADBETTER† AND E. P. GREENBERG\* Metabolism of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by *Variovorax paradoxus* *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, Dec. 2000, p. 6921–6926
- Jenny, R.J., Mann, K.G., Lundblad, R.L., 2003. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr. Purif.* 31, 1–11.
- Jones, S. A. and J. Melling (1984). "Persistence of pBR322-related plasmids in *Escherichia coli* grown in chemostat cultures." *FEMS Microbiol. Lett.* 22(3): 239-243.
- Kane, J.F., 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 494–500.
- Kane, J.F., Violand, B.N., Curran, D.F., Staten, N.R., Duffin, K.L., Bogosian, G., 1992. Novel in-frame two codon translational hop during synthesis of bovine placental lactogen in a recombinant strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 20, 6707– 6712.
- Kaplan, H.B., and Greenberg, E.P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163: 1210-1214.
- Kapust, R.B., Tozser, J., Copeland, T.D., Waugh, D.S., 2002. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 949–955.
- Kapust, R.B., Waugh, D.S., 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* 8, 1668–1674.
- Kapust, R.B., Waugh, D.S., 2000. Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease. *Protein Expr. Purif.* 19, 312–318.
- Khlebnikov, A., Keasling, J.D., 2002. Effect of lacY expression on homogeneity of induction from the P(tac) and P(trc) promoters by natural and synthetic inducers. *Biotechnol. Prog.* 18, 672–674.
- Khlebnikov, A., Skaug, T., Keasling, J.D., 2002. Modulation of gene expression from the arabinose-inducible araBAD promoter. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 34–37.
- Khlebnikov A, O Risa, T Skaug, TA Carrier and JD Keasling. 2000. A regulatable

arabinose - inducible gene expression system with consistent control in all cells of a culture. *J Bacteriol* 182: 7029–7034.

Khosla, C., J. E. Curtis, P. Bydalek, J. R. Swartz, and J. E. Bailey. 1990. Expression of recombinant proteins in *Escherichia coli* using an oxygenresponsive promoter. *Bio/Technology* 8:554–558.

Kiratisin, P., Tucker, K. D. & Passador, L. (2002). LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J Bacteriol* 184, 4912–4919.

Kleman, G. L., Chalmers, J. J., Luli, G. W. and Strohl, W. R. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 910–917

Kleman, G. L. and Strohl, W. R. (1994) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, 180–186

Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A. and Deckwer, W. D. (1995) *J. Biotechnol.* 39, 59–65

Kost, T., J. Condreay and D. Jarvis (2005). "Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells." *Nat. Biotechnol.* 23(5): 567-575.

Kremling, A., K. Bettenbrock, B. Laube, K. Jahreis, J.W. Lengeler, E.D. Gilles, The organization of metabolic reaction networks. III. Application for diauxic growth on glucose and lactose, *Metab. Eng.* 3 (2001) 362–379.

Kuo, A., Callahan, S.M., and Dunlap, P.V. 1996. Modulation of luminescence operon expression by N-octanoyl-homoserine lactone in *ainS* mutants of *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* 178: 971-976.

Kurland, C., Gallant, J., 1996. Errors of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 489–493.

Kuttler Christina and Burkhard A. Hense. 2007 Interplay of two quorum sensing regulation systems of *Vibrio fischeri*. *Journal of Theoretical Biology.* 251: 167-180

6.1 Kwon<sup>1</sup>, Y. K., Wenyun Lu<sup>1</sup>, Eugene Melamud<sup>1</sup>, Nurussaba Khanam<sup>2</sup>, Andrew Bogner<sup>2</sup> & Joshua D Rabinowitz<sup>1</sup> (2008) A domino effect in antifolate drug action in *Escherichia coli* *Nature Chemical Biology* 4, 602 - 608

Lamb, J. R., Patel, H., Montminy, T., Wagner, V. E. & Iglewski, B. H. (2003). Functional domains of the RhIR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185, 7129–7139.

Laursen, B.S., Steffensen, S., Hedegaard, J., Moreno, J.M., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U., 2002. Structural requirements of the mRNA for intracistronic translation initiation of the enterobacterial *infB* gene. *Genes Cells.* 7, 901–910.

Lazazzera BA, Solomon JM and Grossman AD An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell* 1997, 89:917-925

Lee, S. Y. 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 14:98–105.

Lee DC, Kim GJ, Cha YK, Lee CY, Kim HS. 1997. Mass production of thermostable D-hydantoinase by batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a constitutive expression system. *Biotechnol Bioeng* 56:449–455.

Lee, J., Cho, M.W., Hong, E.-K., Kim, K.-S., Lee, J., 1996. Characterization of the *nar* promoter to use as an inducible promoter. *Biotechnol. Lett.* 18, 129–134.

Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P., and Sokol, P.A. 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J. Bacteriol.* 181: 748-756.

Lobell, R.B., Schleif, R.F., 1991. AraC-DNA looping: orientation and distance-dependent loop breaking by

the cAMP receptor protein. *J. Mol. Biol.* 218, 45–54.

Loewen, P.C., Strutinsky, B.H.H., Sparling, R., 1998. Regulation in the *rpoS* regulation of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 44, 707–717.

Lořfdahl, S., B. Guss, M. Uhle'n, L. Philipson, and M. Lindberg. 1983. Gene for staphylococcal protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:697–701.

Lopez, P.J., Marchand, I., Joyce, S.A., Dreyfus, M., 1999. The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol. Microbiol.* 33, 188–199.

Luo, Z. Q., Su, S. & Farrand, S. K. (2003b). In situ activation of the quorum-sensing transcription factor TraR by cognate and noncognate acyl-homoserine lactone ligands: kinetics and consequences. *J. Bacteriol* 185, 5665–5672.

Luo, Z. Q., Smyth, A. J., Gao, P., Qin, Y. & Farrand, S. K. (2003a). Mutational analysis of TraR. Correlating function with molecular structure of a quorum-sensing transcriptional activator. *J Biol Chem* 278, 13173–13182.

Luli, G. W., and W. R. Strohl. 1990. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1004–1011.

Lupp, C., M. Urbanowski, E. P. Greenberg, and E. G. Ruby. 2003. The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems *ain* and *lux* sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Mol. Microbiol.* 50:319–331.

Lupp, C., M. Urbanowski, E. P. Greenberg, and E. G. Ruby. 2003. The *Vibrio fischeri* quorum-sensing systems *ain*

and *lux* sequentially induce luminescence gene expression and are important for persistence in the squid host. *Mol. Microbiol.* 50:319–331.

Makrides, S. C. (1996). "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*." *Microbiol. Rev.* 60(3): 512–538

McNulty, D.E., Claffee, B.A., Huddleston, M.J., Kane, J.F., 2003. Mistranslational errors associated with the rare arginine codon CGG in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 27, 365–374.

Martinez, A., Knappskog, P.M., Olafsdottir, S., Doskeland, A.P., Eiken, H.G., Svebak, R.M., Bozzini, M., Apold, J., Flatmark, T., 1995. Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem. J.* 306 (Pt 2), 589–597.

Matin, A. 1994. Starvation promoters of *Escherichia coli*. Their function, regulation, and use in bioprocessing and bioremediation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 721:277–291.

Mertens, N., E. Remaut, and W. Fiers. 1995. Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. *Bio/Technology* 13:175–179.

Michael Manefield<sup>1,2</sup>, Thomas Bovbjerg Rasmussen<sup>2</sup>, Morten Henzter<sup>2</sup>, Jens Bo Andersen<sup>2</sup>, Peter Steinberg<sup>3</sup>, Staffan Kjelleberg<sup>1,3</sup> and Michael Givskov<sup>2</sup> 1999. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover *Microbiology* 148 (2002), 1119–1127

Miller MB and Bassler BL Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001, 55:165–199

- Miyake, T., T. Oka, T. Nishizawa, F. Misoka, T. Fuwa, K. Yoda, M. Yamasaki and G. Tamura (1985). "Secretion of human interferon-alpha induced by using secretion vectors containing a promoter and signal sequence of alkaline phosphatase gene of *Escherichia coli*." *J. Biochem.* 97: 1429-1436.
- Monod Jacques 1970, *Le hazard et la nécessité*, Arnoldo Mondadori Editore S.p.A.
- Morgan-Kiss, R.M., Wadler, C., Cronan Jr., J.E., 2002. Long-term and homogeneous regulation of the *Escherichia coli* araBAD promoter by use of a lactose transporter of relaxed specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7373-7377.
- Mukhija, R., P. Rupa, D. Pillai, and L. C. Garg. 1995. High-level production and one-step purification of biologically active human growth hormone in *Escherichia coli*. *Gene* 165:303-306.
- Mu"ller-Hill, B., L. Crapo, and W. Gilbert. 1968. Mutants that make more lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 59:1259-1264.
- Mujacic, M., K. W. Cooper and F. Baneyx (1999). "Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein." *Gene*. 238(2): 325-332.
- Nakamura, K., and M. Inouye. 1982. Construction of versatile expression cloning vehicles using the lipoprotein gene of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 1:771-775.
- Nealson, K.H., and Hastings, J.W. 1977. Low oxygen is optimal for luciferase synthesis in some bacteria. Ecological implications. *Arch. Microbiol.* 112: 9-16.
- Nealson KH and Hastings JW Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 1979, 43:496- 518
- Nealson KH, Platt T and Hastings JW Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 1970, 104:313-322
- Neubauer, P., K. Hofmann, Efficient use of lactose for the lac promoter-controlled overexpression of the main antigenic protein of the foot-and-mouth-disease virus in *Escherichia coli* under fedbatch fermentation conditions, *FEMS Microbiol. Rev.* 14 (1994) 99-102.
- Neubauer, P., C. Wolff, M. Hecker, K. Hoffmann, L. Meyer, P. Kruschke, H.W. Heinrich, Introduction of the tac-promoter by lactose under fermentation conditions, *Acta Biotechnol.* 11 (1991) 23-29.
- Newbury, S.F., Smith, N.H., Robinson, E.C., Hiles, I.D., Higgins, C.F., 1987. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* 48, 297-310.
- Hoffman, B.J, J.A. Broadwater, P. Johnson, J. Harper, B.G. Fox, W.R. Kenealy, Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3): process control yielding high levels of metal incorporated, soluble protein, *Protein Expression Purif.* 6 (1995) 646-654.
- Neubauer, P.,K. Hofmann, O. Holst, B. Mattiasson, P. Kruschke, Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as an inducer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 (1992) 739-744.
- Nevalainen, K. M. H., V. S. J. Te'o and P. L. Bergquist (2005). "Heterologous protein expression in filamentous fungi." *Trends Biotechnol.* 23(9): 468-474.

- Nishihara, T., T. Iwabuchi, and T. Nohno. 1994. A T7 promoter vector with a transcriptional terminator for stringent expression of foreign genes. *Gene* 145:145-146.
- Norvick R Regulation of pathogenicity in *Staphylococcus aureus* by a peptide-based density-sensing system. In *Cell-Cell Signaling in Bacteria* (Edited by: Dunney GaW) SC: ASM Press 1999, 129-146
- O'Connor, C. D., and K. N. Timmis. 1987. Highly repressible expression system for cloning genes that specify potentially toxic proteins. *J. Bacteriol.* 169:4457-4462.
- O'Connor, M., M. Peifer and W. Bender (1989). "Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*." *Science*. 244(4910): 1307-1312.
- Oka, T., Sakamoto, S., Miyoshi, K., Fuwa, T., Yoda, K., Yamasaki, M., Tamura, G., Miyake, T., 1985. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7212-7216.
- Oxer, M.D., Bentley, C.M., Doyle, J.G., Peakman, T.C., Charles, I.G., Makoff, I.J., 1991. High-level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated *nirB* promoter. *Nucleic Acids Res.* 19, 2889-2892.
- Oppenheim, A. B., H. Giladi, D. Goldenberg, S. Kobi, and I. Azar. February 1996. Vectors and transformed host cells for recombinant protein production at reduced temperatures. International patent application WO 96/ 03521.
- Oppenheim, A. B., H. Giladi, D. Goldenberg, S. Kobi, and I. Azar. February 1996. Vectors and transformed host cells for recombinant protein production at reduced temperatures. International patent application WO 96/ 03521.
- Padidam, M., and Cao, Y. (2001). Elimination of transcriptional interference between tandem genes in plant cells. *Biotechniques* 31, 328-334.
- Parsek MR and Greenberg EP Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:8789-8793
- Piper KR, Beck von Bodman S and Farrand SK Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* 1993, 362:448-450
- Poole, E.S., Brown, C.M., Tate, W.P., 1995. The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14, 151-158.
- Polisky, B., R. J. Bishop and D. H. Gelfand (1976). "A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73(11): 3900-3904.
- Prescott, E.M., and Proudfoot, N.J. (2002). Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8796-8801.
- Rauhut, R., Klug, G., 1999. mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 353-370.
- Regnier, P., Arraiano, C.M., 2000. Degradation of *rfm* RNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays* 22, 235-244.
- Reynolds R, Bermúdez-Cruz RM, Chamberlin MJ. Division of Biochemistry and Molecular Biology, University of California, Berkeley 94720. Parameters affecting transcription termination by *Escherichia coli* RNA polymerase. I. Analysis of 13 rho-independent terminators. *J Mol Biol.* 1992 Mar 5;224(1):31-51.

Riesenberg, D., Schulz, V., Knorre, W. A., Pohl, H. D., Korz, D., Sanders, E. A., Ross, A. and Deckwer, W. D. (1991) *J. Biotechnol.* 20, 17–27

Ringquist, S., Shinedling, S., Barrick, D., Green, L., Binkley, J., Stormo, G.D., Gold, L., 1992. Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* 6, 1219–1229.

Ripp, S.P., Jegier, M., Birmele, C.M., Johnson, K.A., Daumer, J.L., Garland and G.S. Saylor Linking bacteriophage infection to quorum sensing signalling and bioluminescent bioreporter monitoring for direct detection of bacterial agents. *Journal of Applied Microbiology* 100 (2006) 488–499.

Roman Rydzanicz, X. Sharon Zhao and Philip E. Johnson 2005 Assembly PCR oligo maker: a tool for designing oligodeoxynucleotides for constructing long DNA molecules for RNA production *Nucleic Acids Research*, 33:W521–W525

Rosenberg, M., and D. Court. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319–353.

Ruby, E.G., and Nealson, K.H. 1976. Symbiotic association of *Photobacterium fischeri* with the marine luminous fish *Monocentris japonica*, a model of symbiosis based on bacterial studies. *Biol. Bull.* 141: 574–5867.

Ruby, E.G., and Nealson, K.H. 1978. Seasonal changes in the species composition of luminous bacteria in nearshore seawater. *Limnol. Oceanogr.* 23: 530–533.

Sagawa, H., A. Ohshima, and I. Kato. 1996. A tightly regulated expression system in *Escherichia coli* with SP6 RNA polymerase. *Gene* 168:37–41.

Sawers, G., Bock, A., 1989. Novel transcriptional control of the pyruvate formate lyase gene: upstream regulatory sequences and multiple promoters regulate anaerobic expression. *J. Bacteriol.* 171, 2485–2498.

Sayut, D., Yan Niu and Lianhony Sun, 2006. Construction and engineering a positive feedback loop. *ACS Chemical Biology.* 1 (11):692–696.

Schmidt, F. R. (2004). "Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 363–372.

Schumann, W. and L. C. S. Ferreira (2004). "Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*." *Gen. Mol. Biol.* 27(3): 442–453.

Schroeckh, V., MacCarthy, J.E.G., Deckwer, W.D, Riesenberg, D., 1992. Expressionsvektor sowie Verfahren zur Expression rekombinanter Gene unter Stickstoffmangelbedingungen. German patent DE 4102594.

Seetharam, R., Heeren, R.A., Wong, E.Y., Bradford, S.R., Klein, B.K., Aykent, S., Kotts, C.E., Mathis, K.J., Bishop, B.F., Jennings, M.J., et al., 1988. Mistranslation in IGF-1 during over-expression of the protein in *Escherichia coli* using a synthetic gene containing low frequency codons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 518–523.

Skerra, A. (1994). "Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*." *Gene.* 151(1-2): 131–135.

Shadel, G.S., Devine, J.H., and Baldwin, T.O. (1990) Control of the lux regulon of *Vibrio fischeri*. *J Biolumines Chemilumines*5: 99–106.

Shadel, G. S., and Baldwin, T. O. 1991. The *Vibrio fischeri* LuxR protein is capable

of bidirectional stimulation of transcription and both positive and negative regulation of the luxR gene. *J. Bacteriol.* 173: 568-574.

Shadel, G.S., and Baldwin, T.O. 1992a. Identification of a distantly located regulatory element in the luxD gene required for negative autoregulation of the *Vibrio fischeri* luxR gene. *J. Biol. Chem.* 267: 7690-7695.

Shadel, G.S., and Baldwin, T.O. 1992b. Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri* luxR gene. *J. Biol. Chem.* 267: 7696-7702.

Shadel, G. S., Young, R. & Baldwin, T. O. (1990). Use of regulated cell lysis in a lethal genetic selection in *Escherichia coli*: identification of the autoinducer-binding region of the LuxR protein from *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *J Bacteriol* 172, 3980–3987.

Shirakawa, M., T. Tsurimoto, and K. Matsubara. 1984. Plasmid vectors designed for high-efficiency expression controlled by the portable recA promoter-operator of *Escherichia coli*. *Gene* 28:127–132.

Siegl, A. 2004. The regulatory network of LitR in *Vibrio fischeri*: a microarray-based characterization. Diplomarbeit. University of Würzburg, Würzburg, Germany.

Slock, J., VanRiet, D., Kolibachuk, D. & Greenberg, E. P. (1990). Critical regions of the *Vibrio fischeri* LuxR protein defined by mutational analysis. *J Bacteriol* 172, 3974–3979.

Solomon JM, Magnuson R, Srivastava A and Grossman AD Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 1995, 9:547-558

Sørensen, H. P. and K. K. Mortensen (2005). "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in

*Escherichia coli*." *J. Biotechnol.* 115(2): 113-128

Sørensen, H.P., Sperling-Petersen, H.U., Mortensen, K.K., 2003. A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin. *Protein Expr. Purif.* 32, 252–259.

Stenstrom, C.M., Jin, H., Major, L.L., Tate, W.P., Isaksson, L.A., 2001. Codon bias at the 3'-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*. *Gene* 263, 273–284.

Stevens, R.C., 2000. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Struct. Fold Des.* 8, R177–R185.

Stevens, A.M., Dolan, K.M., and Greenberg, E.P. (1994) Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12619–12623.

Stevens, A.M., and Greenberg, E.P. 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J. Bacteriol.* 179: 557-562.

Studier F. W., Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification* 41 (2005) 207–234

Studier, F.W., Auto-induction for protein production in inducible T7 expression systems. 2004. Annual Meeting of the American Crystallographic Association, Chicago, IL, July 17–22, 2004.

Studier, F., A. Rosenberg, J. Dunn and J. Dubendorff (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol.* 185: 60-89.

Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase

to direct selective high-level expression of cloned genes." *J. Mol. Biol.* 189(1): 113-130.

Stueber, D., and H. Bujard. 1982. Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *EMBO J.* 1:1399-1404.

Su, T.-Z., Schweizer, H., Oxender, D.L., 1991. Carbonstarvation induction of the *ugp* operon, encoding the binding protein-dependent sn-glycerol-3-phosphate transport system in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 230, 28-32.

Suter-Crazzolaro, C., and K. Unsicker. 1995. Improved expression of toxic proteins in *E. coli*. *BioTechniques* 19:202-204.

Swartz, J. R. (2001). "Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins." *Curr. Opin. Biotechnol.* 12(2): 195-201.

Swartzman, E., Kapoor, S., Graham, A.F., and Meighen, E. A. 1990. A new *Vibrio fischeri lux* gene precedes a bidirectional termination site for the *lux* operon. *J. Bacteriol.* 172: 6797-6802.

Takahiko Nojima, Angela C. Lin, Teruo Fujii, and Isao Endo, Determination of the transcription termination Efficiency of the terminator using different fluorescent profiles in Green Fluorescent Protein Mutants. *Analytical Sciences* December 2005 vol 21

Terpe, K. (2006). "Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72(2): 211- 222

Thomas, C. D., J. Modha, T. M. Razzaq, P. M. Cullis, and A. J. Rivett. 1993. Controlled high-level expression of the *lon* gene of *Escherichia coli* allows overproduction of *Lon* protease. *Gene* 136:237-242.

Trepod, C.M., Mott, J.E., 2002. A spontaneous runaway vector for production-scale expression of bovine somatotropin from *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 84-88.

Tolentino, G. J., S.-Y. Meng, G. N. Bennett, and K.-Y. San. 1992. A pHregulated promoter for the expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 14:157-162.

Tunner, J. R., C. R. Robertson, S. Schippa, and A. Matin. 1992. Use of glucose starvation to limit growth and induce protein production in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 40:271-279.

Valešová R, Hollerová-Sobotková L, Štěpánek V, Kyslík P (2004) Optimization of the host-plasmid interaction in the recombinant *Escherichia coli* strains overproducing penicillin G acylase. *Enzyme Microbial Technol* 35:74-80

Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. & Marco, S. D. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J* 21, 4393-4401.

Van Tilburg, A.B., Thomas, M.D., and Baldwin, T.O. (1996) Transcript initiation in the *lux* operons of *Vibrio fischeri*. In *Bioluminescence and Chemiluminescence Molecular Reporting with Photons: Proceedings of 9th International Symposium 1996*. Hastings, J.W., Kricka, L.J., and Stanley, P.E. (eds). Woods Hole, MA: John Wiley & Sons, pp. 113-116.

Vasquez, J. R., L. B. Evin, J. N. Higaki, and C. S. Craik. 1989. An expression system for trypsin. *J. Cell. Biochem.* 39:265-276.

Visick, K. L. 2005. Layers of signaling in a bacterium-host association. *J. Bacteriol.* 187:3603-3606.

- Voelkert, E., and D. R. Grant. 1970. Determination of homoserine as the lactone. *Anal. Biochem.* 34:131–137.
- Wang, Z., L. Xiang, J. Shao, A. Wegrzyn and G. Wegrzyn (2006). "Effects on the presence of ColE1 plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism." *Microb. Cell Fact.* 5: 34.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J., Terwilliger, T.C., 1999. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 17, 691–695.
- Walsh, G. (2006). "Biopharmaceutical benchmarks in 2006." *Nat. Biotechnol.* 24(7): 769-776.
- Warne, S. R., C. M. Thomas, M. E. Nugent, and W. C. A. Tacon. 1986. Use of a modified *Escherichia coli* trpR gene to obtain tight regulation of high-copy-number expression vectors. *Gene* 46:103–112.
- Westers, L., H. Westers and W. J. Quax (2004). "*Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism." *Biochim. Biophys. Acta.* 1694(1-3): 299-310.
- Williams P, Camara M, Hardman A, Swift S, Milton D, Hope VJ, Winzer K, Middleton B, Pritchard DI and Bycroft BW Quorum *Microbial Cell Factories* 2002, 1 <http://www.microbialcellfactories.com/content/1/1/5> sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000, 355:667-680
- Williams, S. G., R. M. Cranenburgh, A. M. E. Weiss, C. J. Wrighton, D. J. Sherratt and J. A. J. Hanak (1998). "Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids." *Nucleic Acids Res.* 26(9): 2120-2124.
- Winson, MK, Simon Swift, Leigh Fish, John P. Throup, Frieda Jörgensen, Siri Ram Chhabra, Barrie W. Bycroft, Paul Williams, Gordon S.A.B. Stewart 1998. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiology Letters* 163 (1998) 185^192
- Withers H, Swift S and Williams P Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001, 4:186-193
- Wong, H. C., and S. Chang. 1986. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3233–3237.
- Wu, X., H. Jömvall, K. D. Berndt and U. Oppermann (2004). "Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313(1): 89-96.
- Wu"lfing, C., and A. Plu"ckthun. 1993. A versatile and highly repressible *Escherichia coli* expression system based on invertible promoters: expression of a gene encoding a toxic product. *Gene* 136:199–203.
- Wurm, F. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." *Nat. Biotechnol.* 22(11): 1393-1398.
- Yamada, M., M. Kubo, T. Miyake, R. Sakaguchi, Y. Higo, and T. Imanaka. 1991. Promoter sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia*: construction of strong promoters in *E. coli*. *Gene* 99:109–114.
- Yamane, T., and S. Shimizu. 1984. Fed-batch techniques in microbial processes. *Adv. Biochem. Eng.* 30:147–194.
- Yang, M.-T., H. B. Scott II, and J. F. Gardner. 1995. Transcription termination at the *thr* attenuator. Evidence that the adenine residues upstream of the stem

and loop structure are not required for termination. *J. Biol. Chem.* 270:23330–23336.

Yansura, D. G., and D. J. Henner. 1990. Use of *Escherichia coli* trp promoter for direct expression of proteins. *Methods Enzymol.* 185:54–60.

Yee, L., and H. W. Blanch. 1992. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 10:1550–1556.

Yike, I., Y. Zhang, J. Ye, and D. G. Dearborn. 1996. Expression in *Escherichia coli* of cytoplasmic portions of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: apparent bacterial toxicity of

peptides containing R-domain sequences. *Protein Expression Purif.* 7:45–50.

Yin, J., G. Li, X. Ren and G. Herrler (2007). "Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes." *J. Biotechnol.* 127(3): 335-347.

You L., Robert Sidney Cox III, Ron Weiss & Frances H. Arnold, Programmed population control by cell-cell communication and regulated killing. *Nature* 428:868-871.

Zhang, R. G., Pappas, T., Brace, J. L. & 7 other authors (2002). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 417, 971–974.