

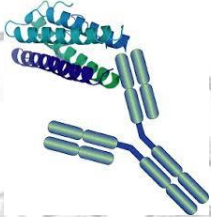


Sistemas de Expresión de proteínas

Una pequeña introducción...

Por qué nos interesaría expresar y purificar proteínas?

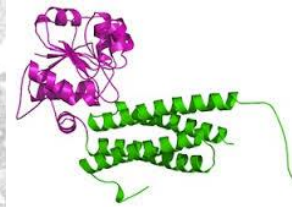
- Anticuerpos



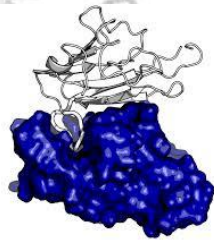
- Estudios de actividad (ie. Interacción)



- Estudios estructurales (Cristalografía o RMN)



- Estudio de dominios



- Proteínas de fusión



- Industria farmacéutica (Usos Terapéuticos)



- Industria Textil



- Industria Alimenticia



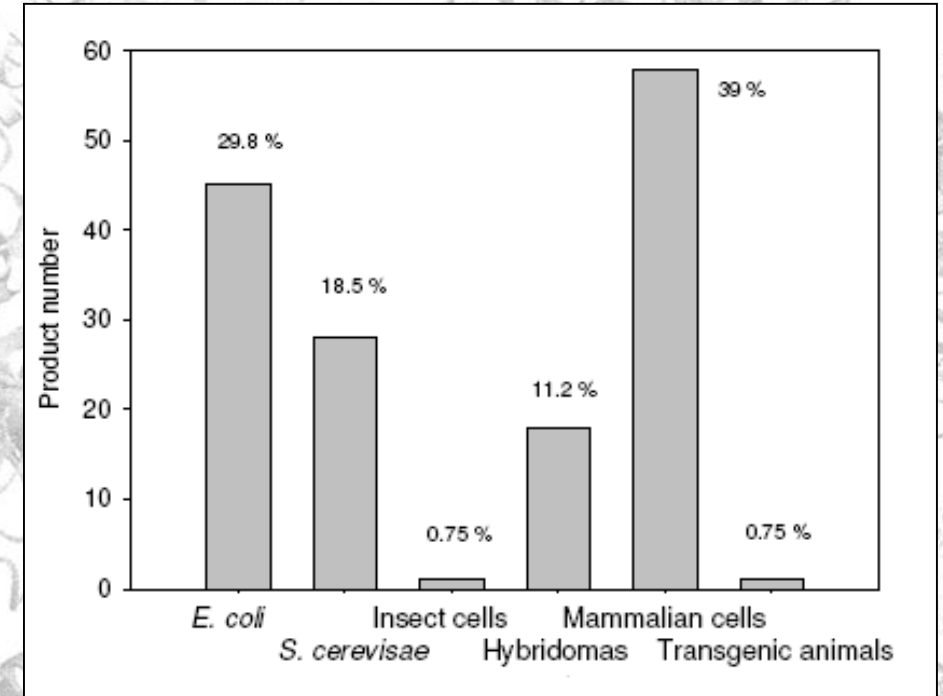
- Enzimas para Biología molecular



Cómo seleccionar el sistema de expresión?

- Investigación o producto comercial
- Para uso en humanos o en veterinaria
- Soluble (Nativa) o insoluble
- Conservar la actividad
- Modificaciones postraduccionales
- Naturaleza proteica

Splicing
Glicosilación
Miristoilacion
Acilación
Ubiquitinación



Productos aprobados por la FDA, según el Sistemas de expresión

- Eficiencia
- Costos
- Manipulación



Sistemas de expresión

Procariotas

- Bacillus Sp.*
- Lactococcus*
- Pseudomonas*
- Escherichia Coli*

Cell-Free Systems (In vitro)

- Rabbit Reticulocyte*
- Wheat germ*
- Lisados celulares*

Eucariotas

Levaduras

- S. Cerevisiae.*
- Pichia Pastoris*

Células de Insecto

- Sf9, Sf21
- Drosophila melanogaster*
- S2 cells

Células de mamífero

- 293T
- Vero
- BHK
- COS

Plantas

- Tobacco*
- Arabidopsis thaliana*

Bioreactores
(Animales transgénicos,
embriónes de pollo, orugas)

Opciones

- Expresión transitoria o estable
- Método de transformación
- En suspensión o adherentes

Cell-Free Systems (Traducción o Transcripción/traducción)

Enzymes and factors for translation :

IF1, IF2, IF3

EF-G, EF-Tu, EF-Ts

RF1, RF2, RF3, RRF

Aminoacyl-tRNA synthetase (ARS)

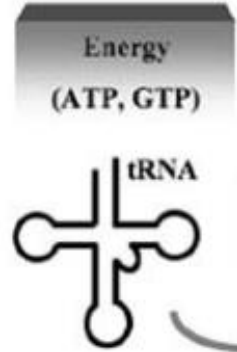
Methionyl-tRNA transformylase (MTF)



Amino acids



Ribosome

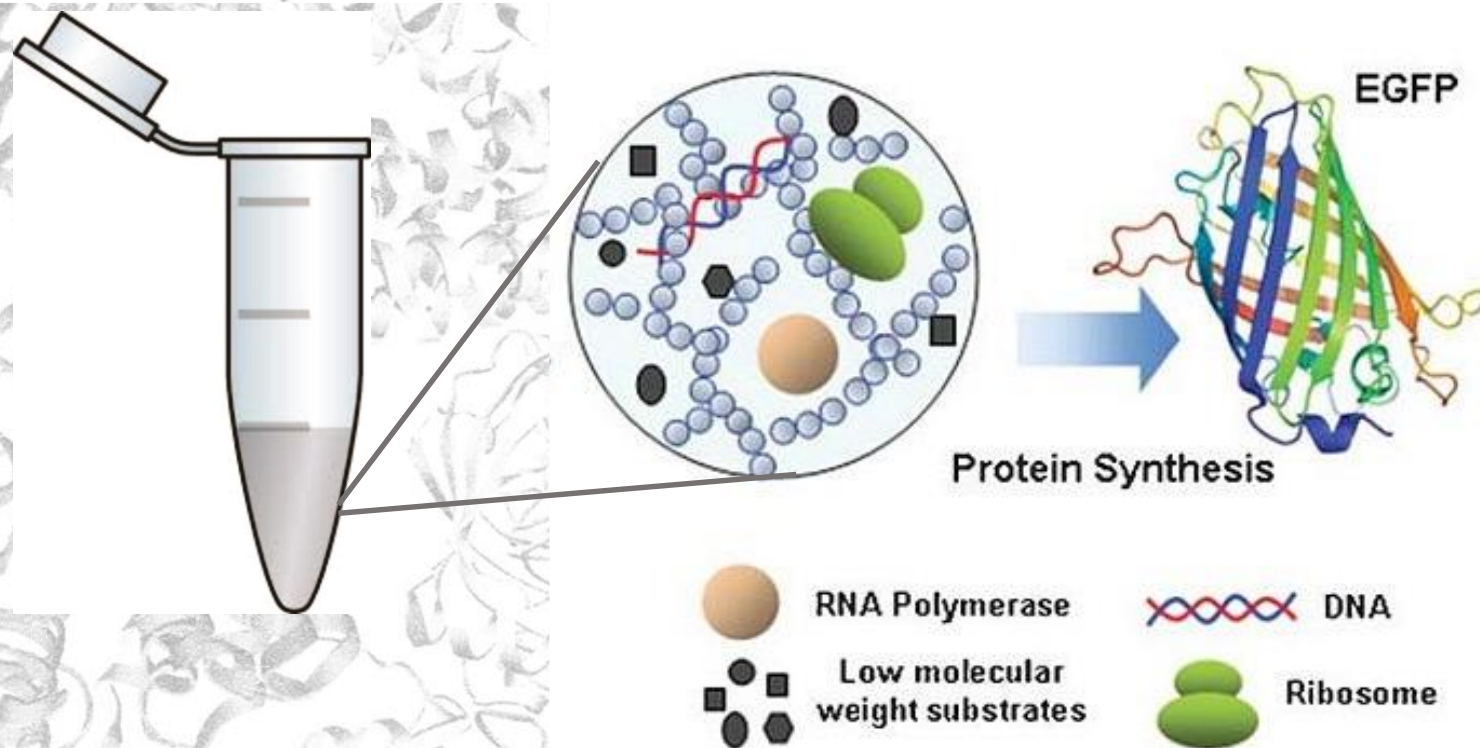


Energy
(ATP, GTP)

Template DNA

T7 RNA
polymerase

mRNA



Ventajas

- Expresión de Proteínas tóxicas
- Marcado isotópico (u otros)
- Incorporación de aminoácidos no naturales
- Producción de pequeñas cantidades de proteína pura

Expresión de proteínas en Plantas

Ventajas

- Bajo costo de producción
- Producción a gran escala
- Sistema de producción amigable con el ambiente
- Menor riesgo de exposición a patógenos humanos/animales

Producción de vacunas orales

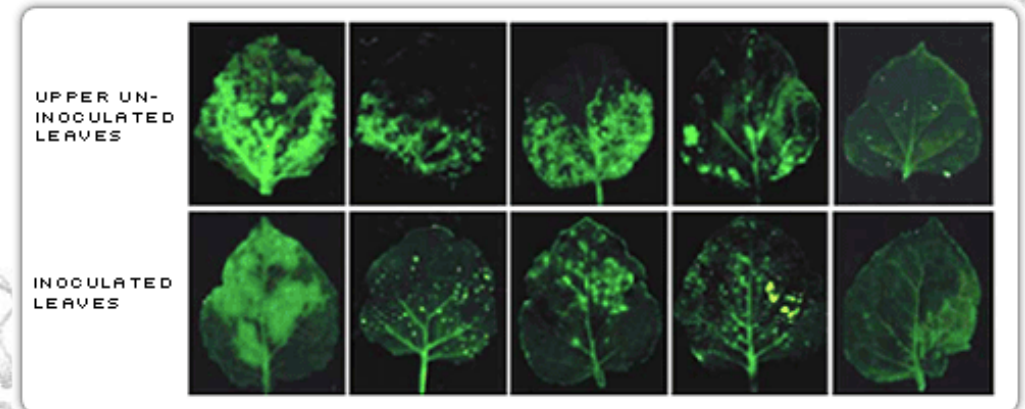


Vacuna contra
la enfermedad
de Newcastle



Vacuna contra
el virus de la
diarrea viral bovina

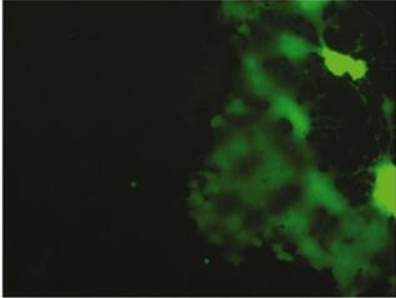
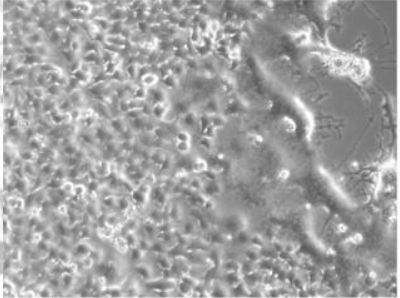
Estudio del sistema de RNAi



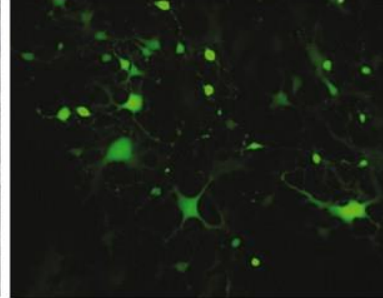
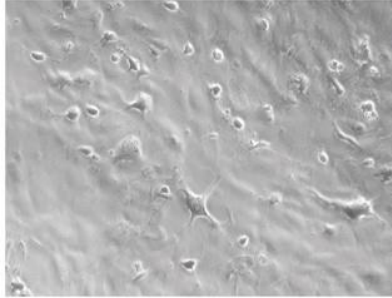
Proteínas de uso farmacológico e industrial
/e. Expresión de Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF) en plantas de tabaco.

Expresión de proteínas en células de mamífero

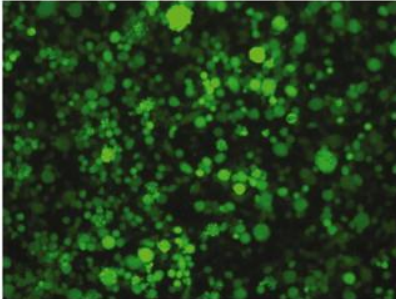
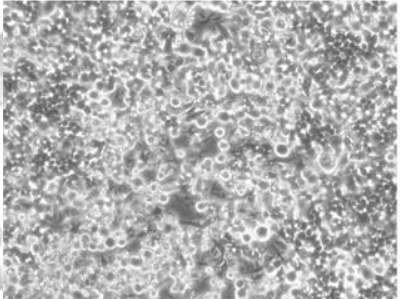
HeLa (human)



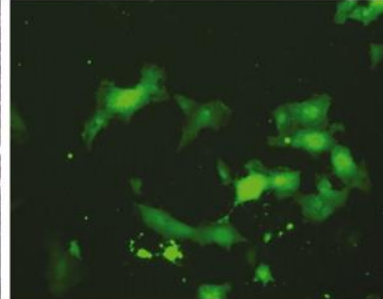
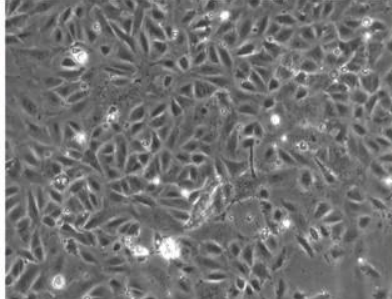
L2 (rat)



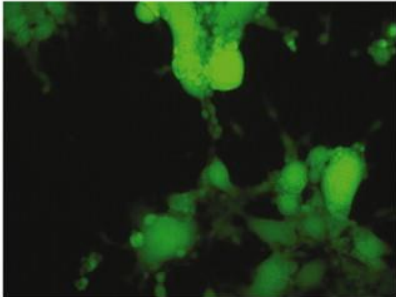
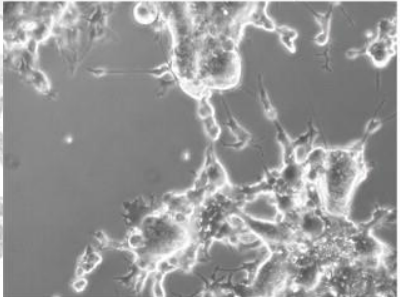
BHK (hamster)



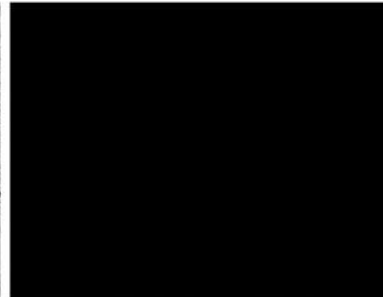
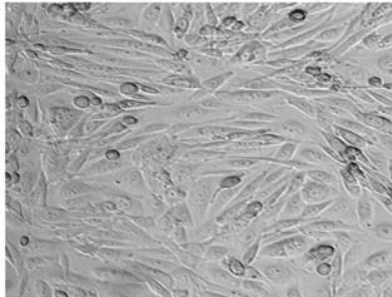
4/4RM-4 (rat)



293T (human)



CHO (hamster)



Ventajas

- Patrones de Glicosilación complejos u otras modificaciones postraduccionales
- Posibilidad de adaptar al crecimiento en suspensión

Usos más comunes:

- Producción de proteínas recombinantes
- Producción de anticuerpos recombinantes
- Producción de *virus-like particles* de virus de mamíferos
- Estudios funcionales (le. localización celular)

Métodos de transfección o transformación

Fosfato de calcio

DEAE-Dextran

Liposomas

Dendrimeros

Electroporación

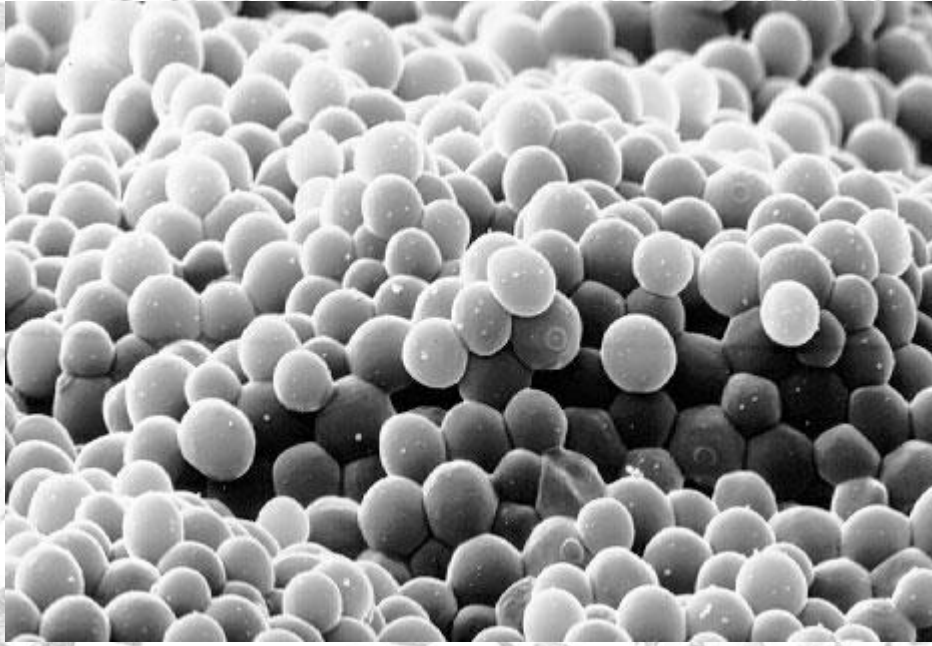
Vectores
Virales

Baculovirus
Vaccinia
Herpes

Plásmidos para
integración

-Recombinación
Homóloga
-Transposones

Expresión de proteínas en levaduras



Ventajas

- Posibilidad de Glicosilación u otras modificaciones postraduccionales
- Crecimiento en suspensión a altas densidades
- Fácil manejo en el laboratorio
- Fácil manipulación del DNA
- Bajo costo

Vacunas aprobadas por la FDA

**nature
REVIEWS** MICROBIOLOGY

THE HUMANIZATION OF N-GLYCOSYLATION PATHWAYS IN YEAST

Stefan Wildt and Tillman U. Gerngross†*

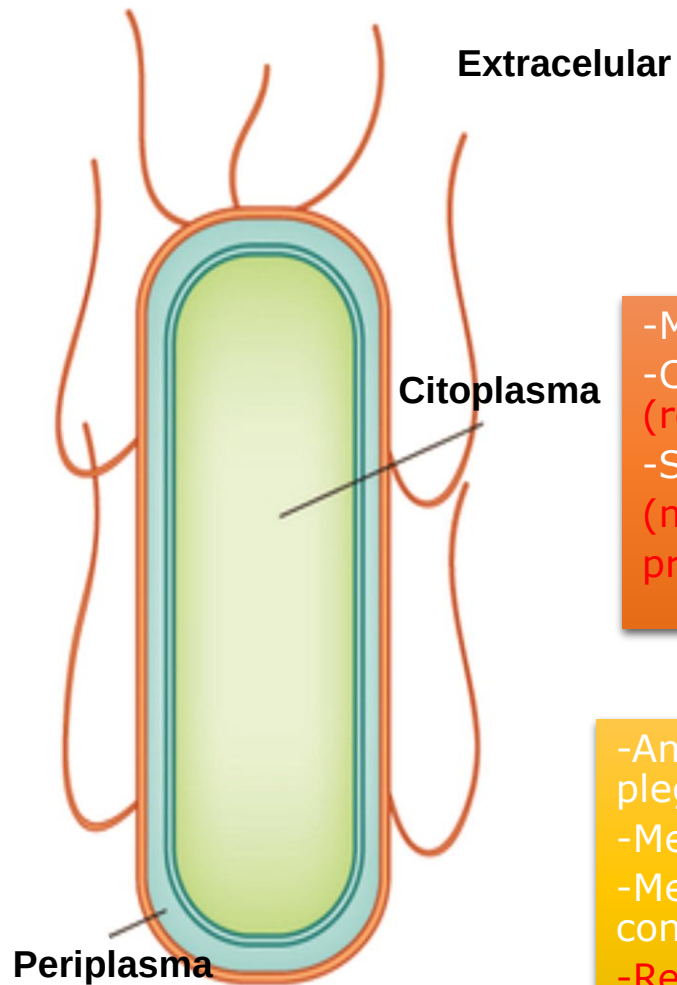
Abstract | Yeast and other fungal protein-expression hosts have been extensively used to produce industrial enzymes, and are often the expression system of choice when manufacturing


GARDASIL®
Human Papillomavirus Vaccine
Types 6,11,16,18

engerix®**b**
hepatitis B surface antigen recombinant (yeast)


Recombivax HB

Expresión de proteínas en *Escherichia Coli*



-Mínima cantidad proteínas
-Mínima actividad proteasas
-Fácil purificación
-No hay sistemas eficaces en *E. coli* para la translocación a través de las 2 membranas

-Máximo rendimiento
-CI, fácil Purificación (replegado)
-Soluble/Plegado (mayor concentración de proteasas)

-Ambiente oxidante favorece plegado
-Menor cantidad de proteasas
-Menor cantidad de proteínas contaminantes
-Rendimiento limitado

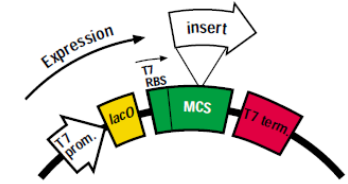
Ventajas

- Sistema de expresión universal
- Crecimiento en suspensión a altas densidades
- Fácil manejo en el laboratorio
- Fácil manipulación del DNA
- Bajo costo

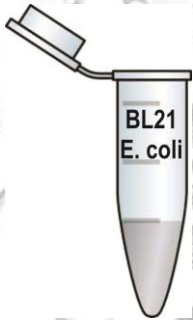
Strain	Improvement
BL21 (DE3) pLysS	Tight regulation of T7 promoter
BL21-AI	
BL21 codon plus	Codon bias correction
Rosetta	
NEB Express lq	Expression of Plac, Ptac and Ptrc based vectors
BL21 (DE3) pLysS	Tight regulation of T7 promoter
BL21-AI	
SHuffle Origami BL21trxB	Improved disulphide bond formation
ArcticExpress	Improved folding

Esquema de trabajo general

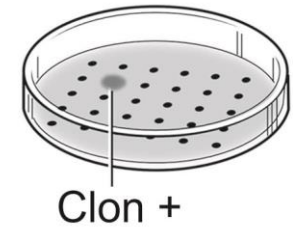
Clonado (cepa de clonado) →



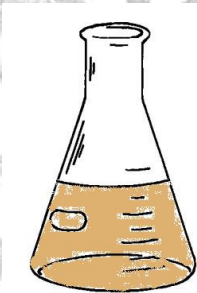
← Transformación en cepa de expresión



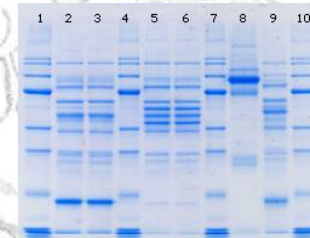
Selección del clon optimo →



← Puesta a punto de la expresión



Análisis de los resultados



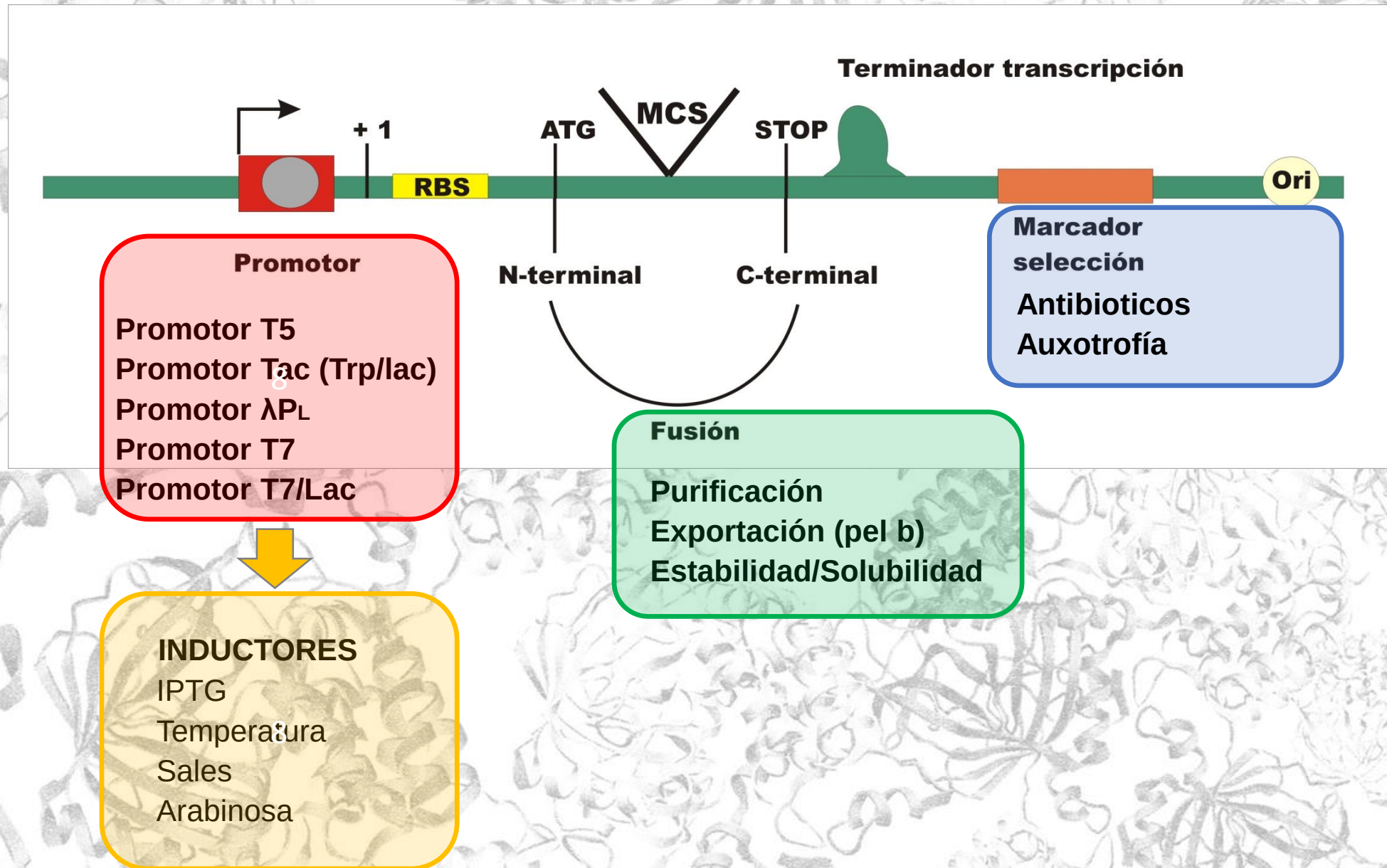
← Puesta a punto de la purificación



Escalado de la expresión y la purificación →



Vectores de expresión (en general...)



Factores a tener en cuenta...

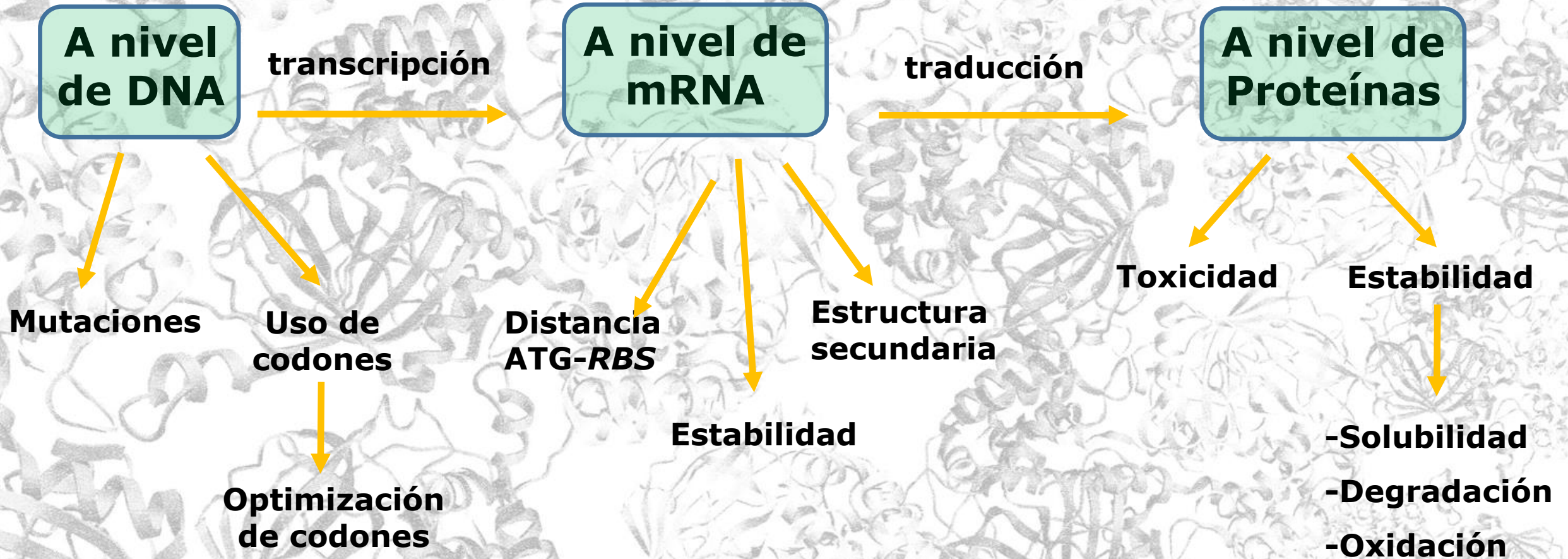


Table 1. Commonly used fusion tags for purification and enhancing the solubility of proteins

Tag	Size	Tag placement	Uses
Affinity tags			
His tag	6 or 8 amino acids (aa)	N-, C- or internal	Purification
Strep II tag	8 aa		Purification
T7- tag	11 or 16 aa	N-, internal	Purification
FLAG tag	8 aa	N-, C-	Purification
S-tag	15 aa	N-, C-	Purification
HA tag	9 aa	N-, C-	Purification
c-Myc tag	11 aa	N-, C-	Purification
DHFR	25 kda	N-	Purification
Chitin binding domain	51 aa	N-, C-	Purification
Calmodulin binding domain	26 aa	N-, C-	Purification
Cellulose binding domain	27–129 aa	N-, C-	Purification
Solubility-enhancing tags			
GST	211 (26 kDa)	N-	Enhances solubility & purification
MBP	396 (40 kDa)	N-, C-	Enhances solubility & purification
T7 gene10	260 aa	N-	Enhances solubility & purification
NusA	495 aa (54.8 kDa)	N-	Enhances solubility
Thioredoxin	109 aa	N-, C-	Enhances solubility
SUMO	100 aa	N-	Enhances solubility
Ubiquitin	76 aa	N-	Enhances solubility

Agregado de secuencias heterólogas, y su posterior eliminación

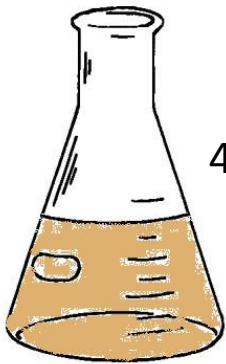
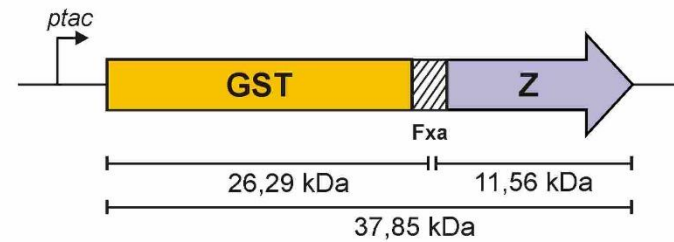
Aumento de la solubilidad
Fácil purificación

Table 2. Proteases commonly used for tag removal

Protease	Cleavage site	Location	Residual amino acids	pH range	Chaotrope sensitivity	Salt sensitivity	Enzyme-to-target ratio
TEV, AcTEV, ProTEV	ExxYxQ↓(G/S)	N C	G/S ExxYxQ	5.5–8.5	2 M urea	≤0.1 M	1–3% (wt/wt)
Thrombin (fIIa)	LVPR↓G	N C	G LVPR	6–9	≤0.1 M urea	≤0.15 M	1–10% (wt/wt)
Factor Xa (fXa)	IEGR↓x	N C	none IEGR	6–9	≤0.1 M urea	≤0.15 M	1–10% (wt/wt)
Enterokinase (EK)	DDDDK↓x	N C	none DDDDK	7–8			0.1% (wt/wt)
SUMO proteases	C-terminus of SUMO↓x	N only	none	6–9	≤0.1 M GnCl ≤2 M urea	≤0.5 M	0.1% (wt/wt)
Immobilized subtilisin BPN	C-terminus of propeptide↓x	N only	none	7.2	≤4 M urea		1:1 (mol/mol)

Un ejemplo....

Expresión de GST-Z (pGZ-Fxa) en *E. Coli* (BL21)



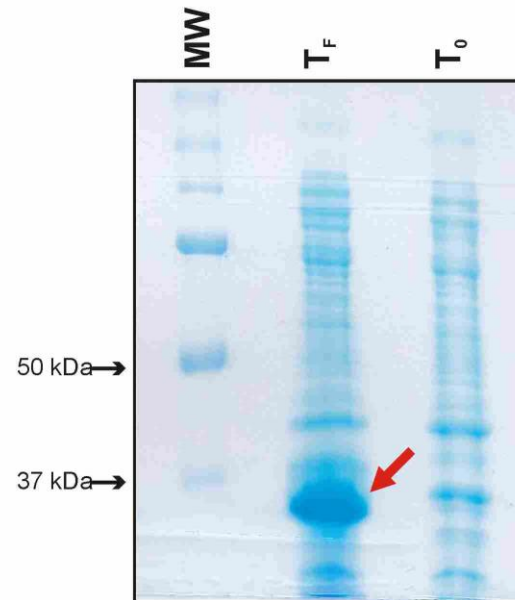
LB 100 μ M ZnSO₄

400 μ M IPTG a DO₆₀₀: 0,7
20hs a 20°C a 220rpm

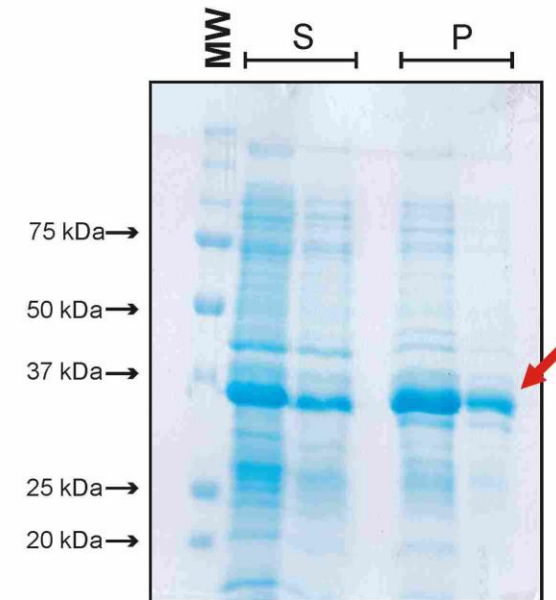
Solución de Lisis

PBS 200mM NaCl
Triton 1% final
100 μ M DTT
Inhibidor de Proteasas

A



B



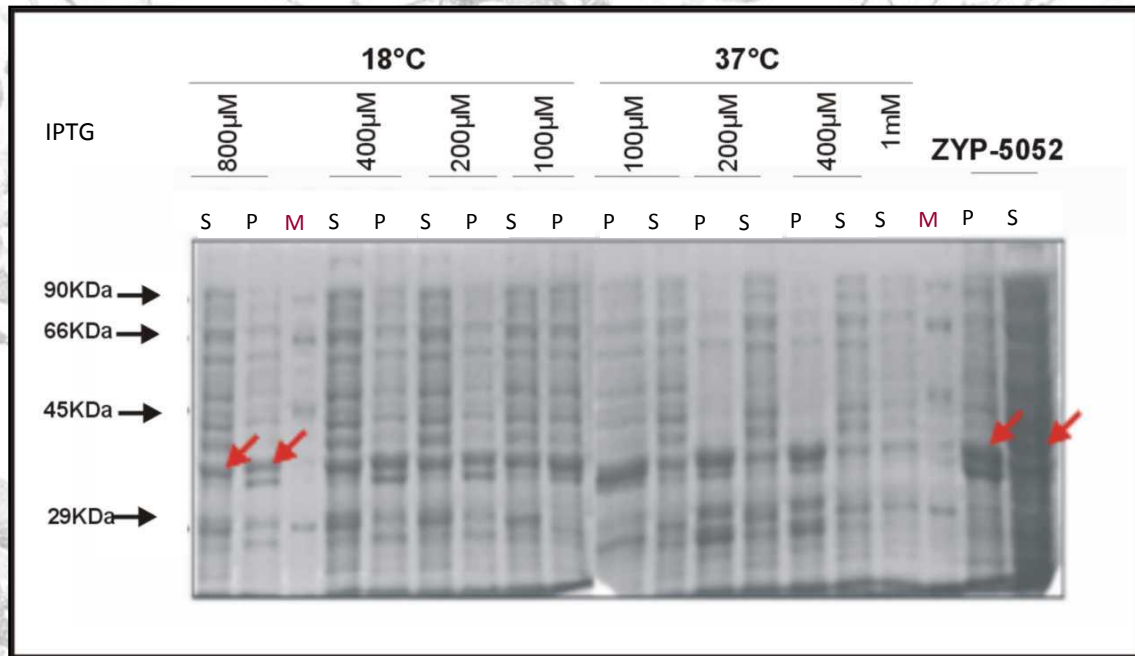
A

72 kDa→
43 kDa→
34 kDa→
26 kDa→
17 kDa→
10 kDa→

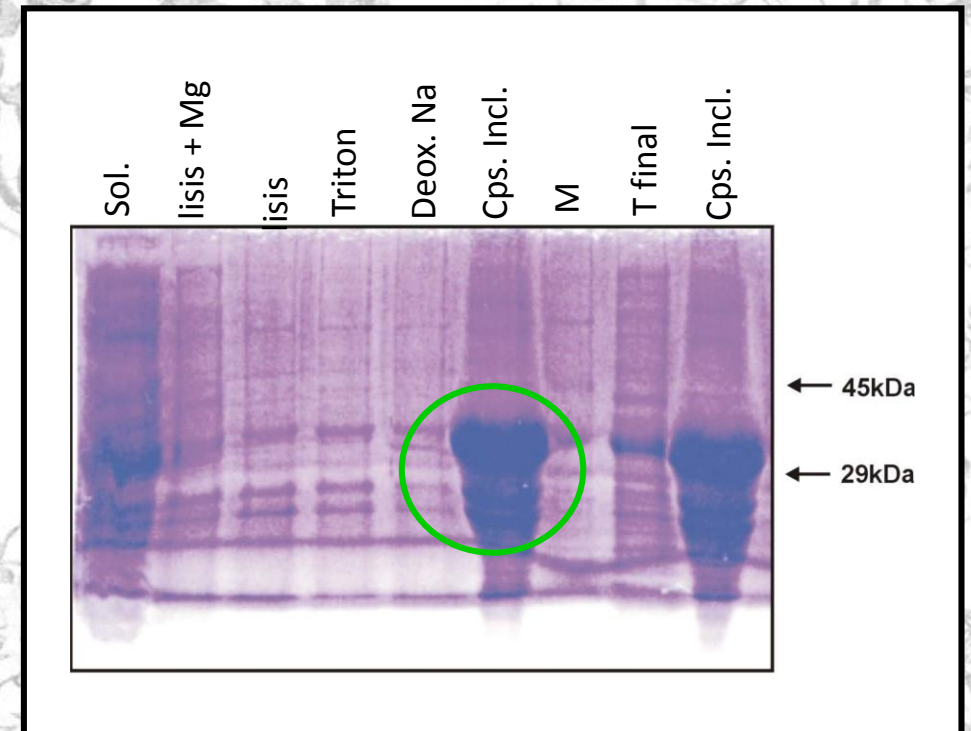
Un ejemplo....

Expresión de GST-Z (pGZ-Fxa) en *E. Coli* (BL21)

Optimización de la expresión

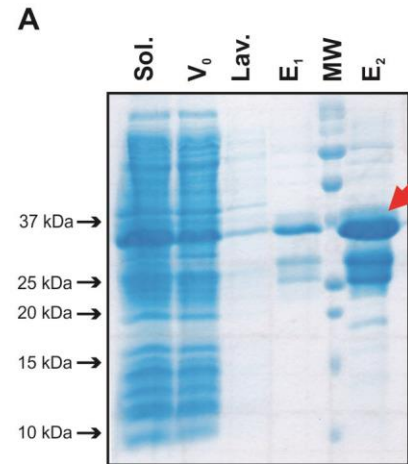


Purificación a partir de Cuerpos de Inclusión

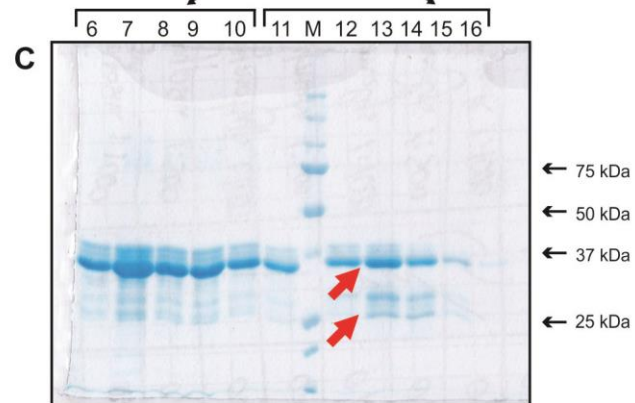
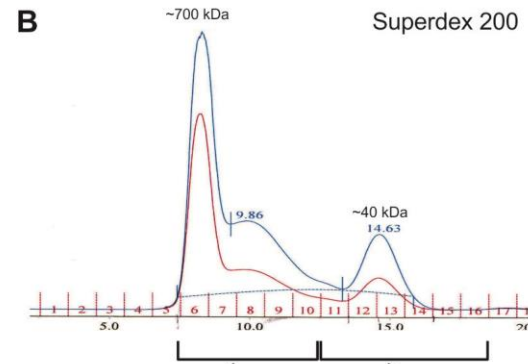


Un ejemplo....

Purificación de GST-Z (pGZ-Fxa)



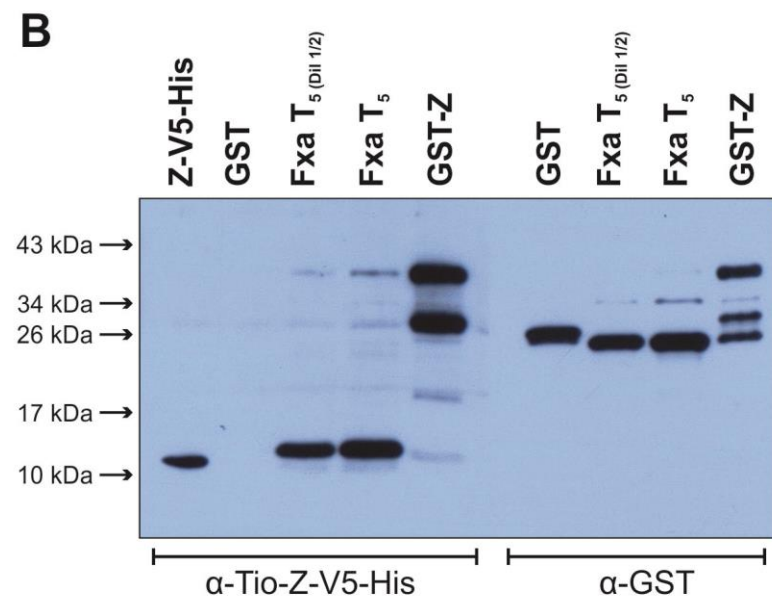
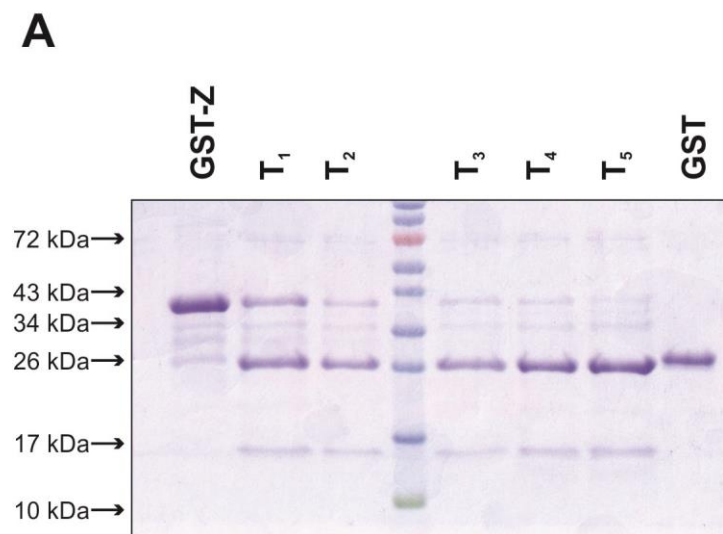
**Cromatografía
de Afinidad**



**Cromatografía de exclusión
Molecular**

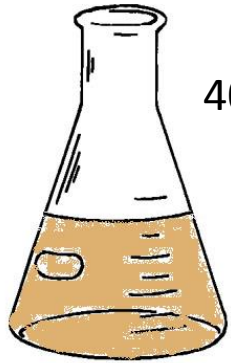
Un ejemplo....

Purificación de GST-Z (pGZ-Fxa)



Un ejemplo más....

Expresión de eIF4E (pET-eIF4E) en *E. Coli* (BL21)



Medio M9ZB*

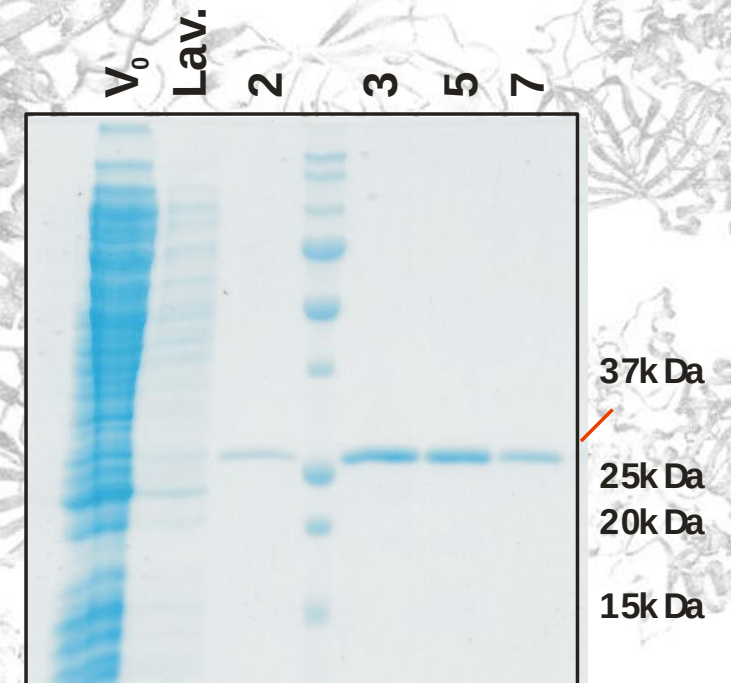
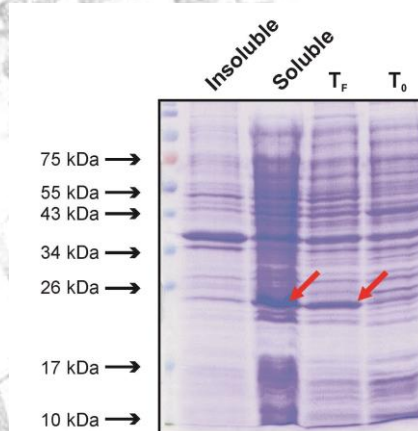
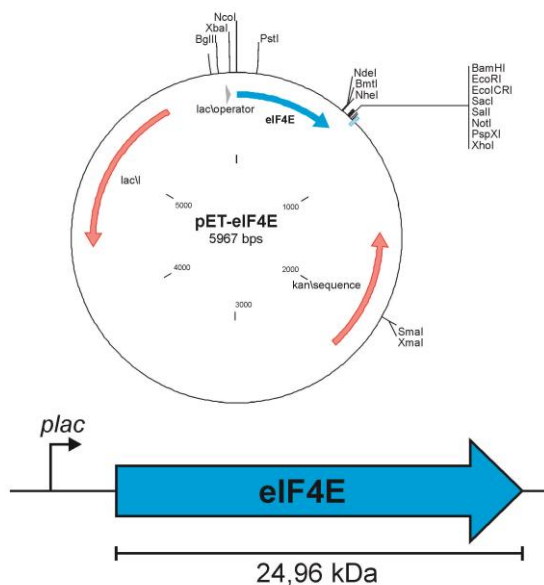
400 μ M IPTG a DO₆₀₀: 0,7
4hs a 37°C a 220rpm

* 30mM NaH₂PO₄
20mM KH₂PO₄
90mM NaCl
20mM NH₄Cl
2mM MgSO₄

Solución de Lisis

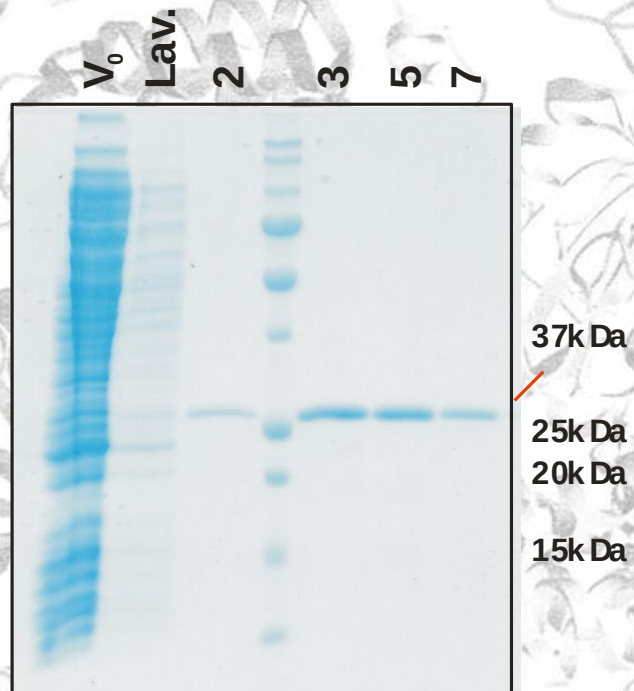
20mM Tris pH 7,5
100mM KCl
1mM EDTA
1mM DTT
Triton 0,1% final
Inhibidor de Proteasas

Purificación de eIF4E en 7-N



Un ejemplo más....

Purificación de eIF4E en 7-Methyl-GTP Sepharose™ 4B



Sc. Lavado: 20mM HEPES pH 7,6
0,1mM EDTA
1mM DTT
10% Glicerol
100mM KCl

Sc. Elución: Sc. Lavado 70 μ M 7-Methyl-GDP

