

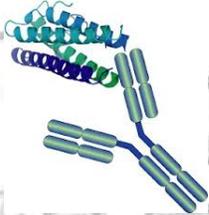
The background of the slide is a dense, repeating pattern of blue protein ribbon structures. These structures are rendered in a light blue color and show various complex folds, including alpha-helices, beta-sheets, and loops, typical of protein tertiary structures. The overall effect is a textured, scientific background.

# **Sistemas de Expresión de proteínas**

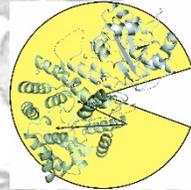
**Una pequeña introducción..**

# Por qué nos interesaría expresar y purificar proteínas?

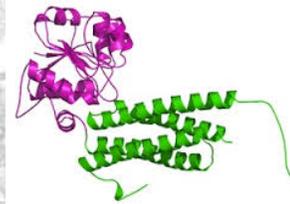
- Anticuerpos



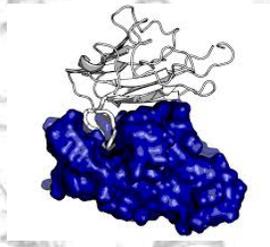
- Estudios de actividad (ie. Interacción)



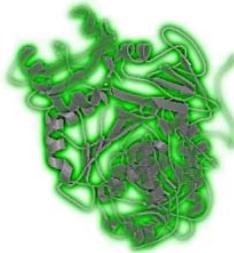
- Estudios estructurales (Cristalografía o RMN)



- Estudio de dominios



- Proteínas de fusión



- Industria farmacéutica (Usos Terapéuticos)



- Industria Textil



- Industria Alimenticia



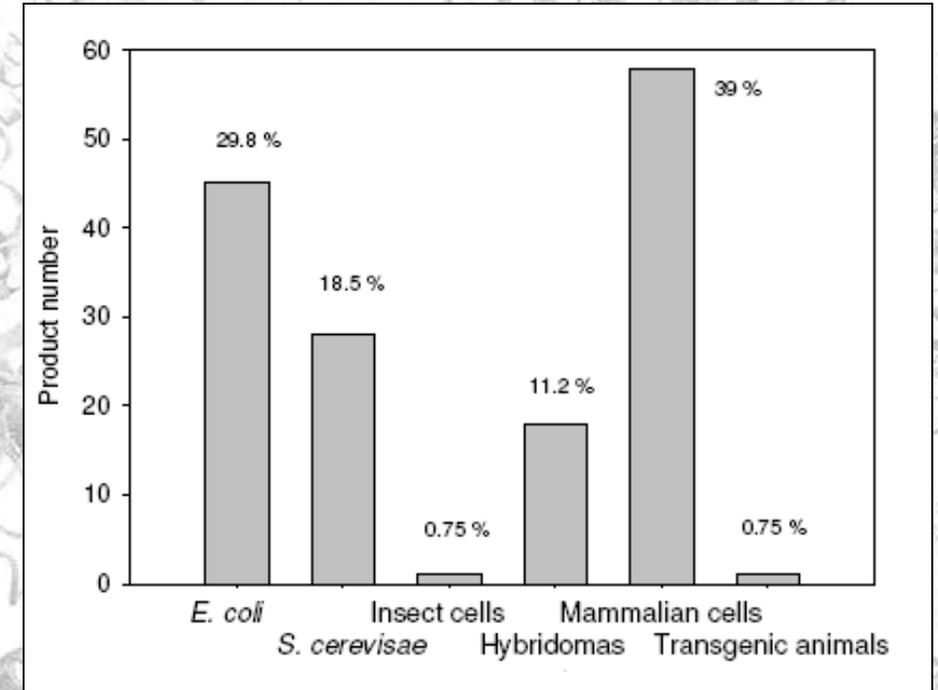
- Enzimas para Biología molecular



# 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)

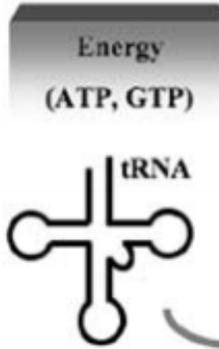
Methionyl-tRNA transformylase (MTF)



Amino acids



Ribosome

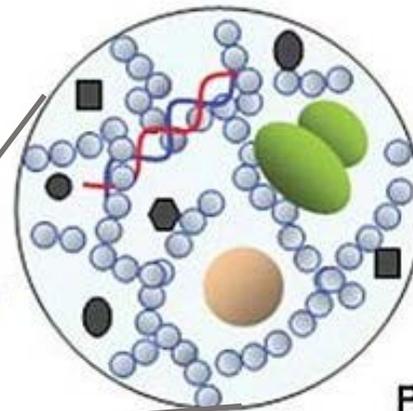
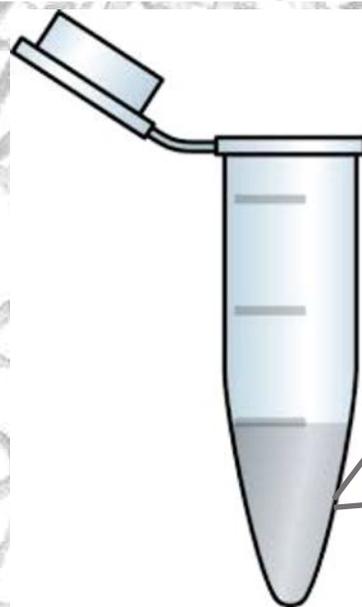


Energy  
(ATP, GTP)

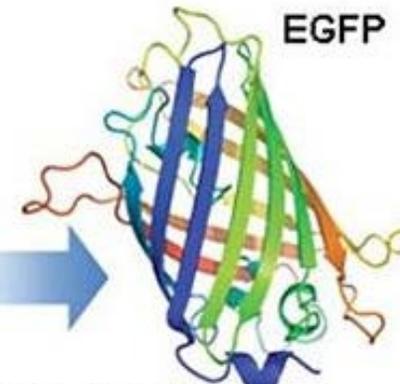
Template DNA

T7 RNA  
polymerase

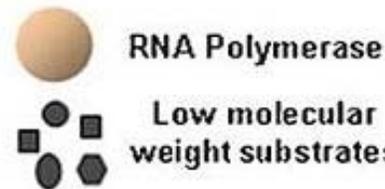
mRNA



Protein Synthesis



EGFP



RNA Polymerase

Low molecular  
weight substrates



DNA



Ribosome

## 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

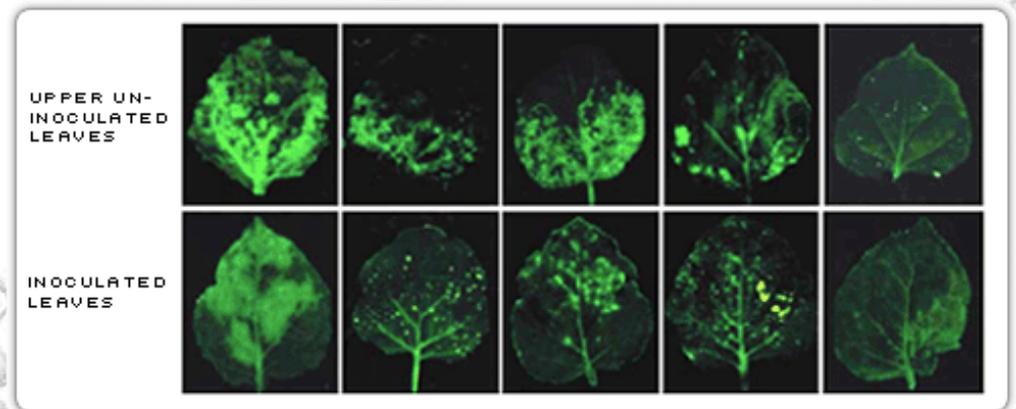


Vacuna contra la enfermedad de Newcastle



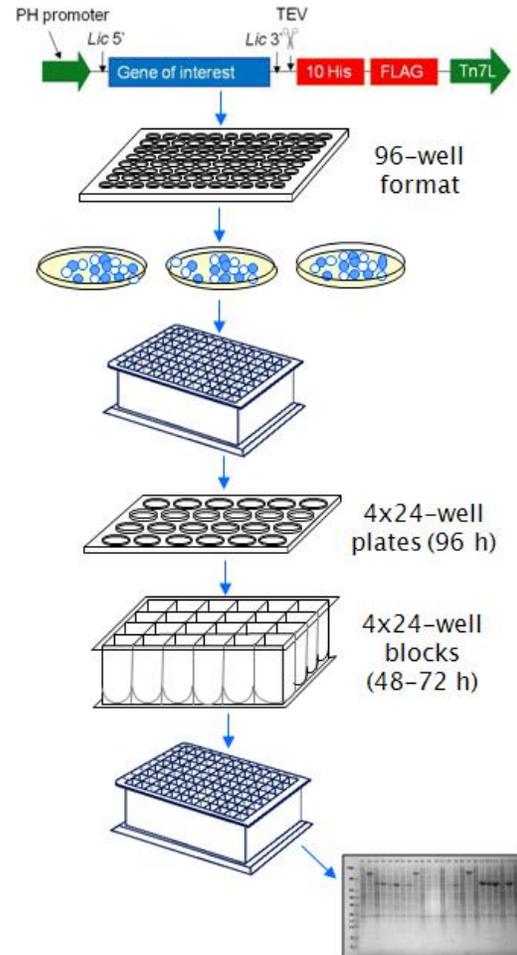
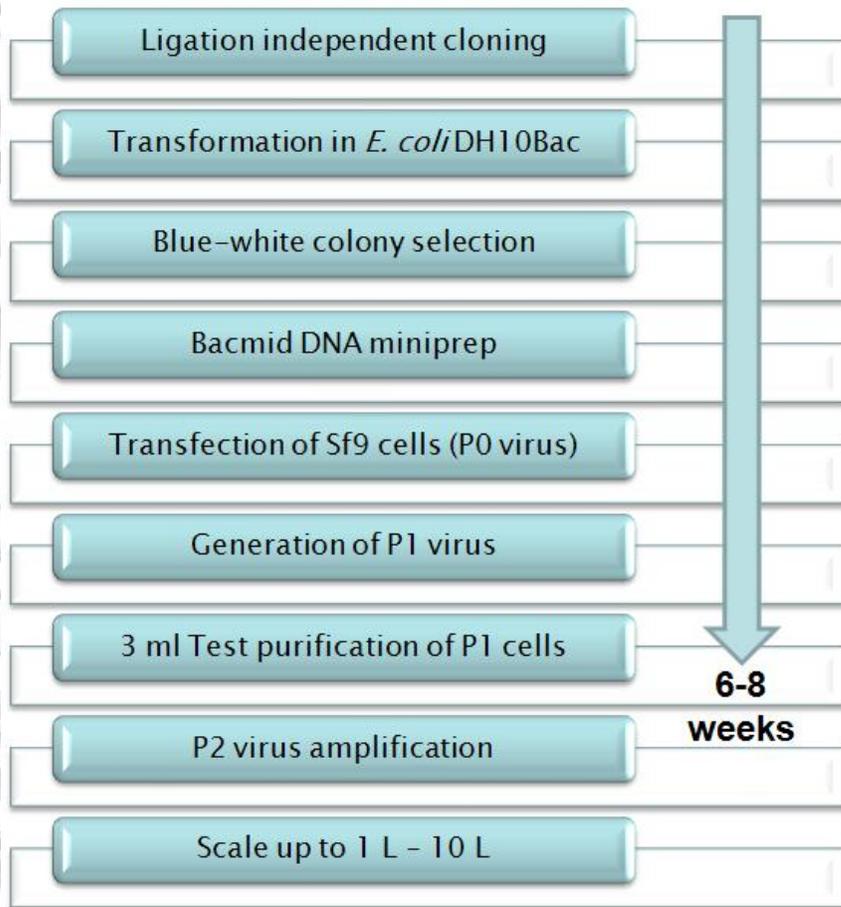
Vacuna contra el virus de la diarrea viral bovina

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 insecto (Baculovirus)



- ## Ventajas
- Bajo costo de producción (vs. Células mamíferos)
  - Modificaciones postraduccionales
  - Altos niveles de expresión
  - Cultivo en suspensión
  - Posibilidad de eliminar el suero
  - "Algunas" modificaciones postraduccionales

## Vacunas aprobadas por la FDA

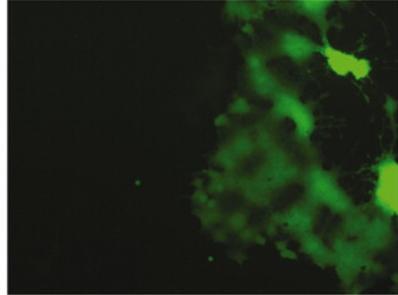
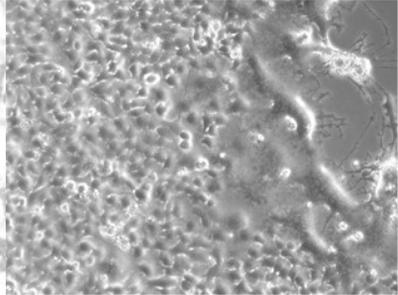
**Flublok<sup>®</sup>**  
Influenza vaccine

**PROVENGE<sup>®</sup>**  
(sipuleucel-T)

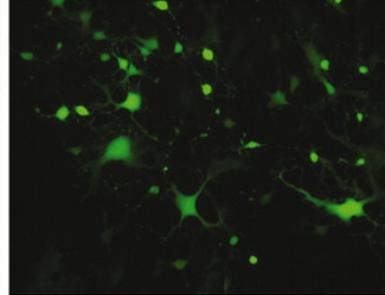
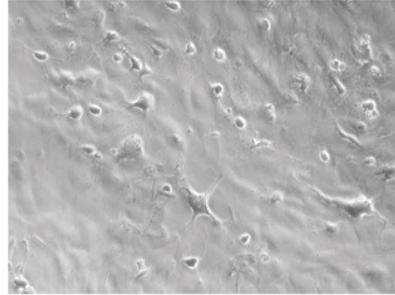
**Cervarix<sup>®</sup>**  
Human Papillomavirus Bivalent  
(Types 16 and 18) Vaccine, Recombinant

# Expresión de proteínas en células de mamífero

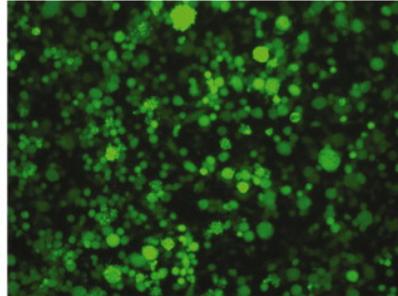
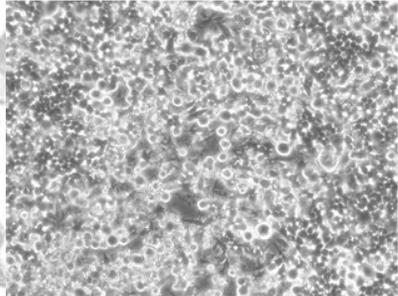
HeLa (human)



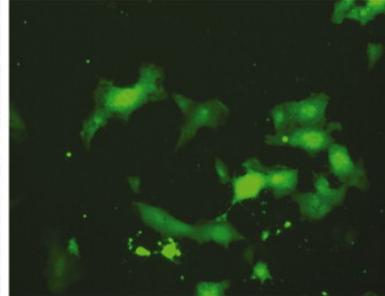
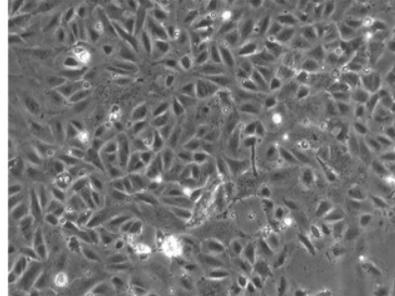
L2 (rat)



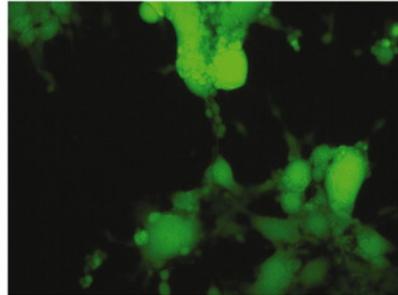
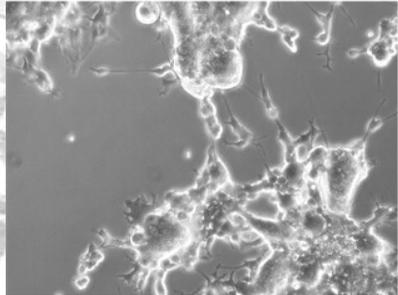
BHK (hamster)



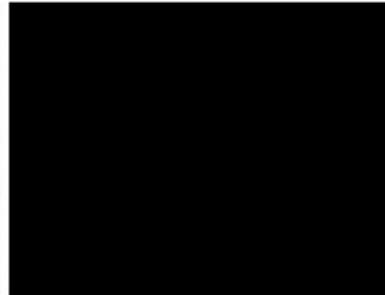
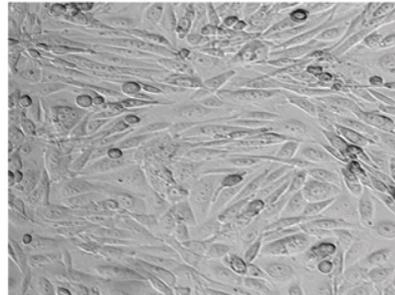
4/4RM-4 (rat)



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 (ie. localización celular)

# Métodos de transfección o transformación

Fosfato de calcio

DEAE-Dextran

Liposomas

Dendrimeros

Electroporación

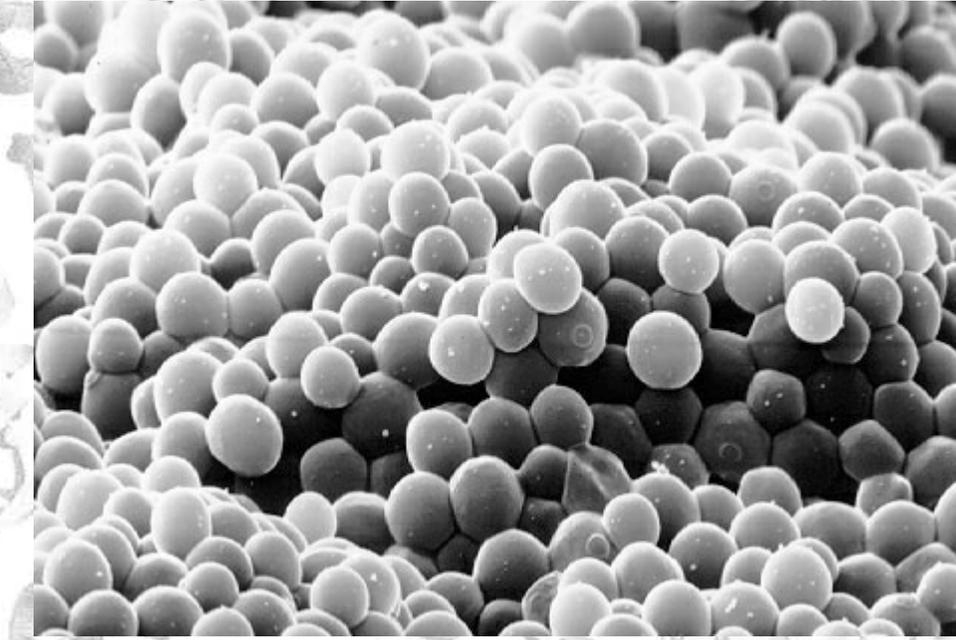
Vectores  
Virales

*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\*

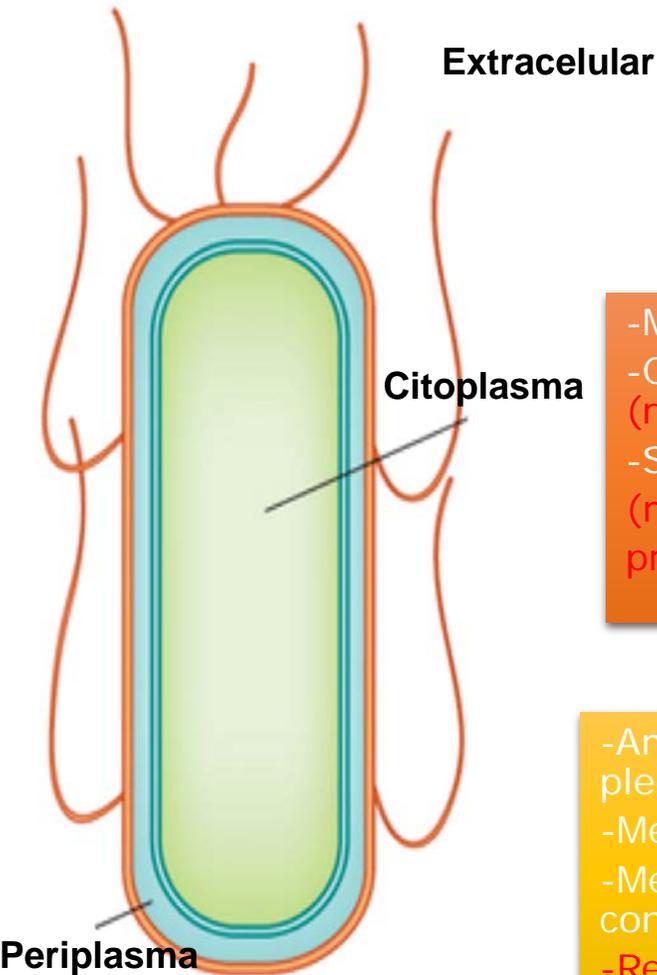
Abstract | Yeast and other fungal protein-expression hosts have been extensively used to produce industrial enzymes, and are often the expression system of choice when manufacturing

  
**GARDASIL**<sup>®</sup>  
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)

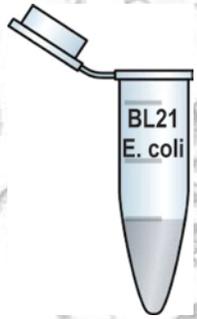
- Ambiente oxidante favorece plegado
- Menor cantidad de proteasas
- Menor cantidad de proteínas contaminantes
- Rendimiento limitado

## Ventajas

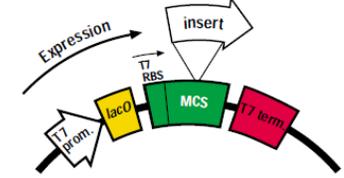
- Sistema de expresión universal
- Crecimiento en suspensión a altas densidades
- Fácil manejo en el laboratorio
- Fácil manipulación del DNA
- Bajo costo

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

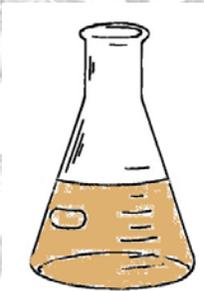
# Esquema de trabajo general



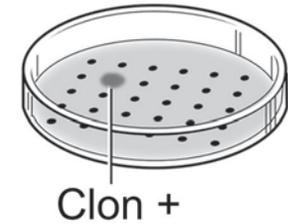
Clonado (cepa de clonado) →



← Transformación en cepa de expresión

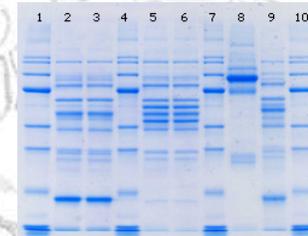


Selección del clon optimo →



← Puesta a punto de la expresión

Análisis de los resultados



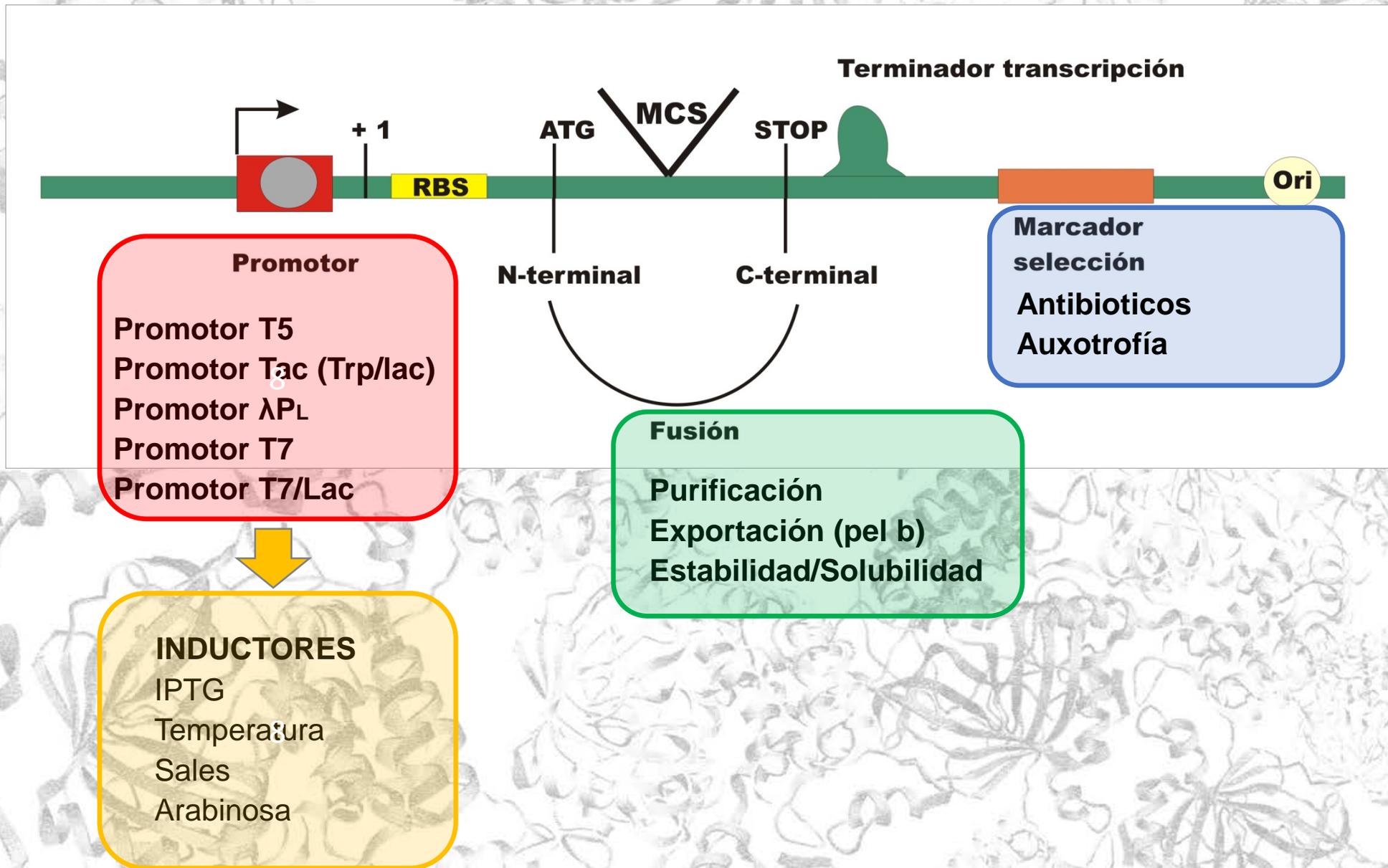
← Puesta a punto de la purificación



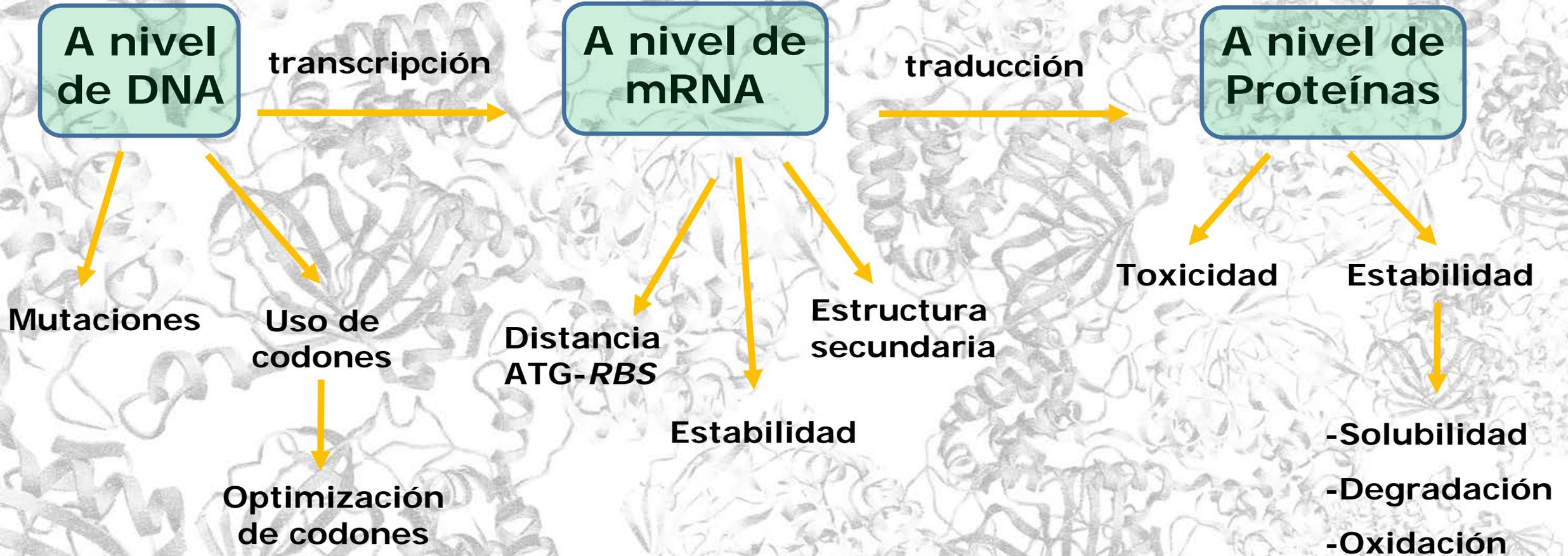
Escalado de la expresión y la purificación →



# 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
<b>Affinity tags</b>			
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
<b>Solubility-enhancing tags</b>			
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

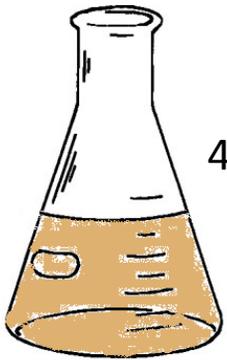
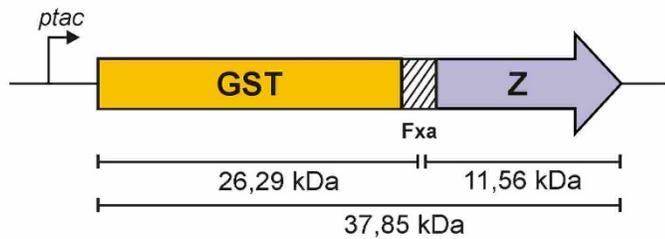
Aumento de la solubilidad  
Fácil purificación

**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)

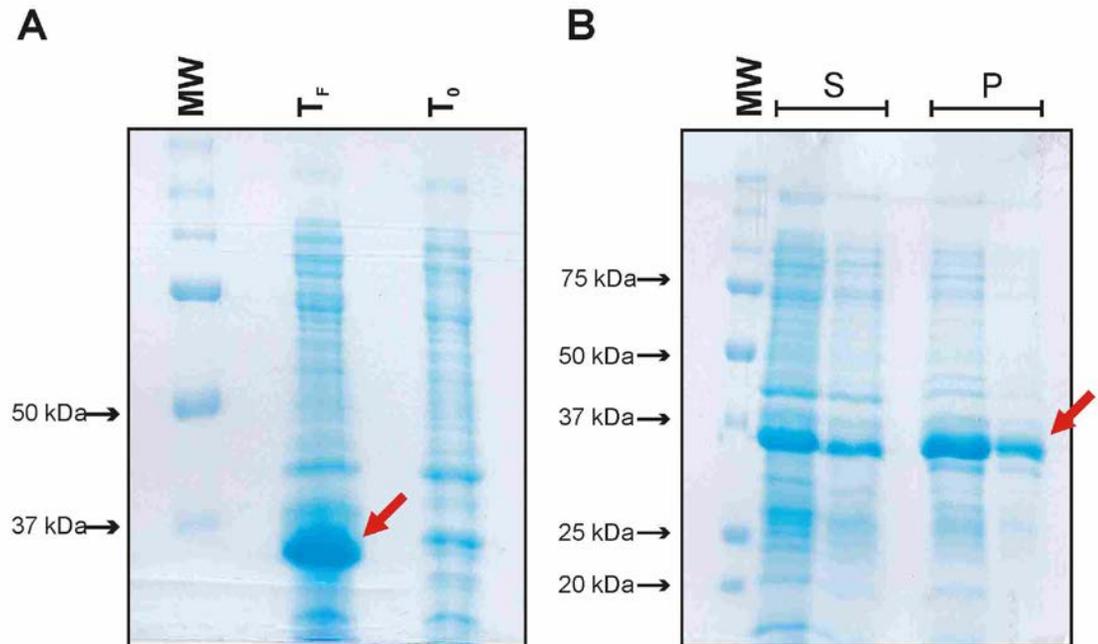
# Un ejemplo....

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



LB 100 $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>  
400 $\mu$ M IPTG a DO<sub>600</sub>: 0,7  
20hs a 20°C a 220rpm

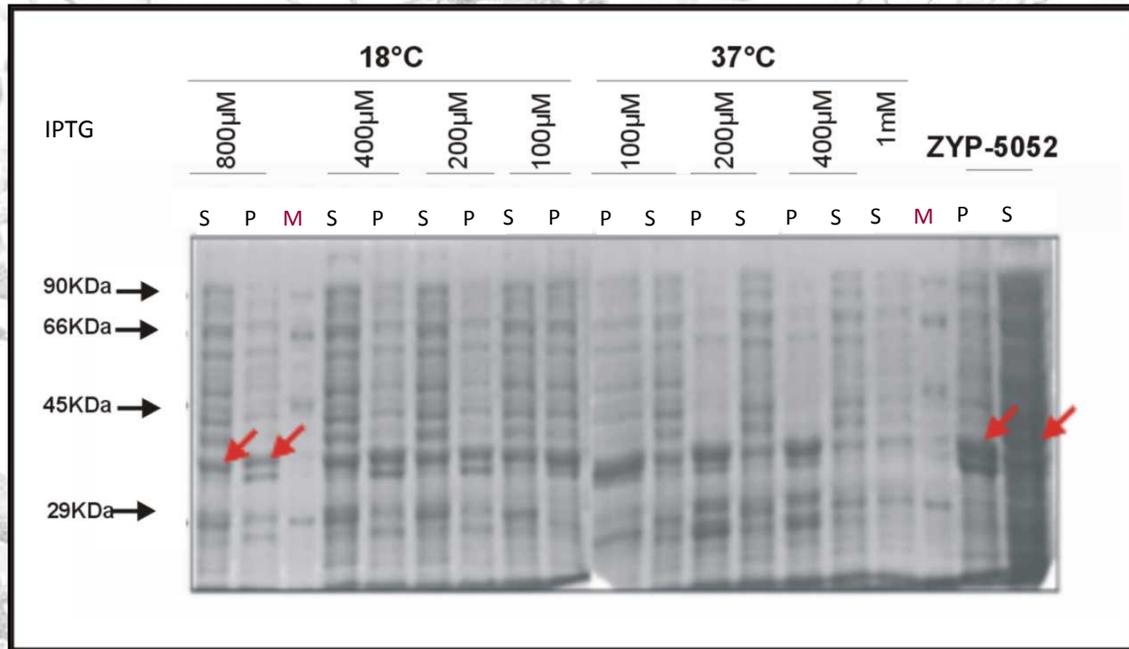
**Solución de Lisis**  
PBS 200mM NaCl  
Triton 1% final  
100 $\mu$ M DTT  
Inhibidor de Proteasas



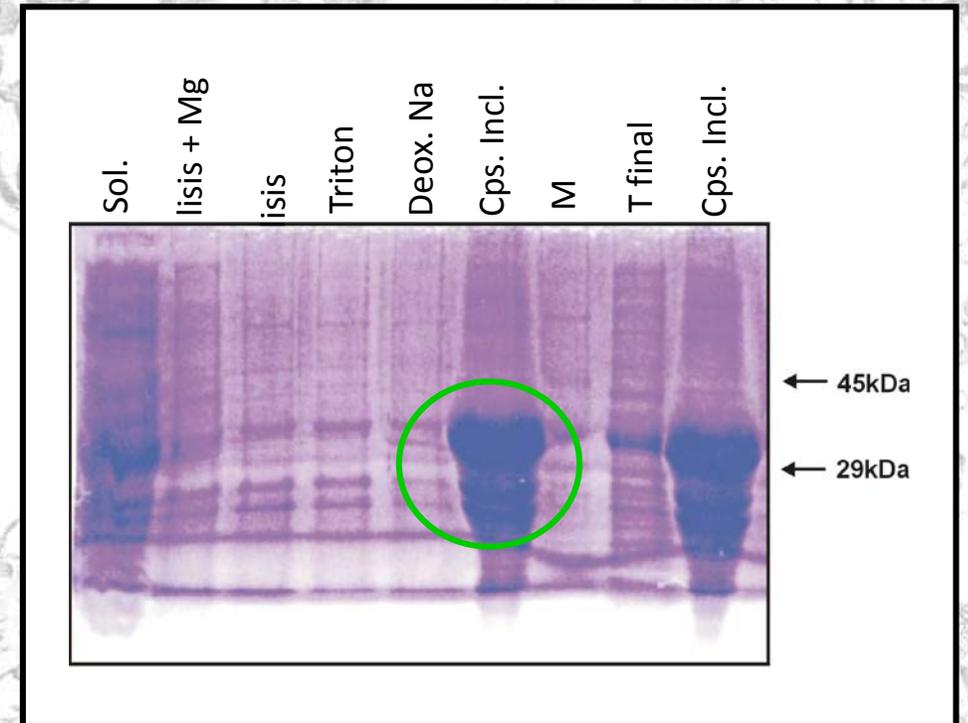
# Un ejemplo....

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

### Optimización de la expresión

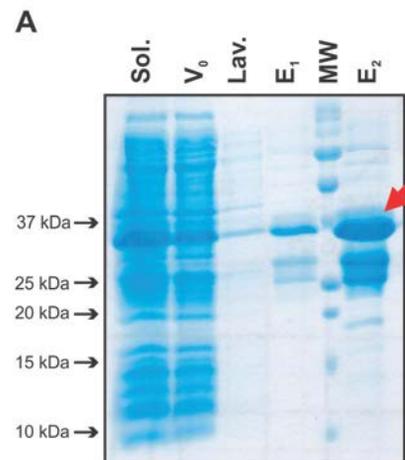


### Purificación a partir de Cuerpos de Inclusión

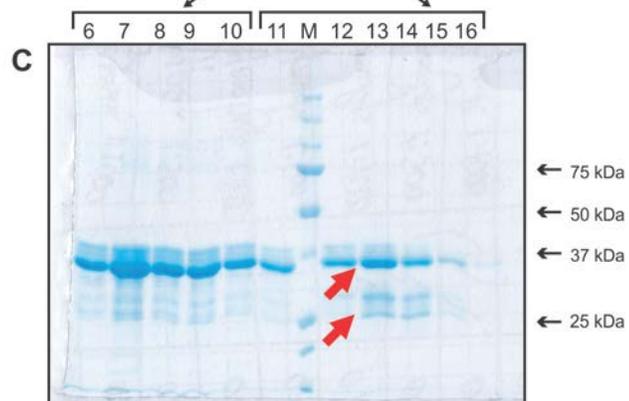
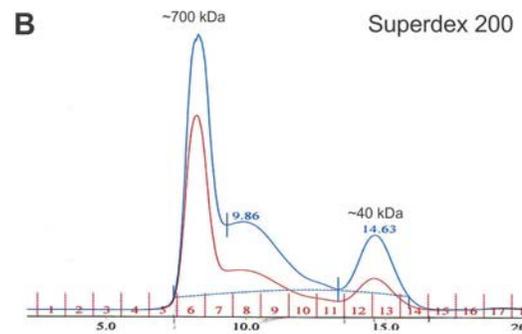


# Un ejemplo....

## Purificación de GST-Z (pGZ-Fxa)



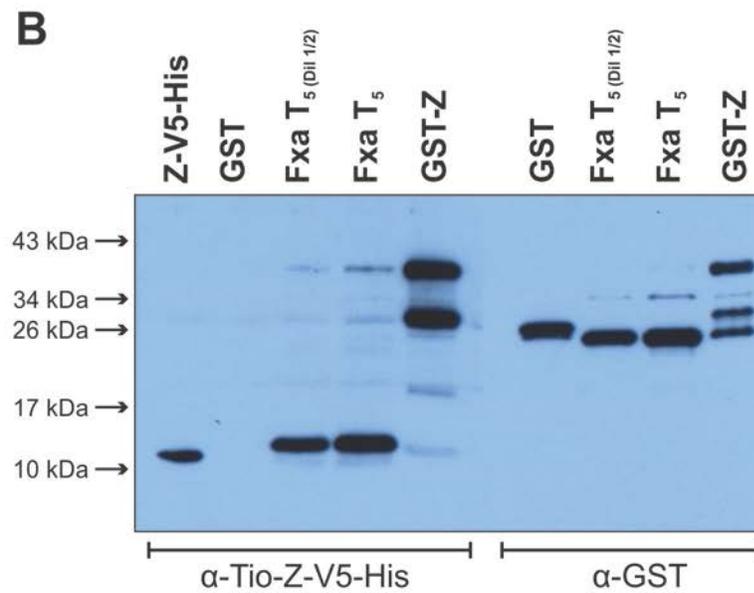
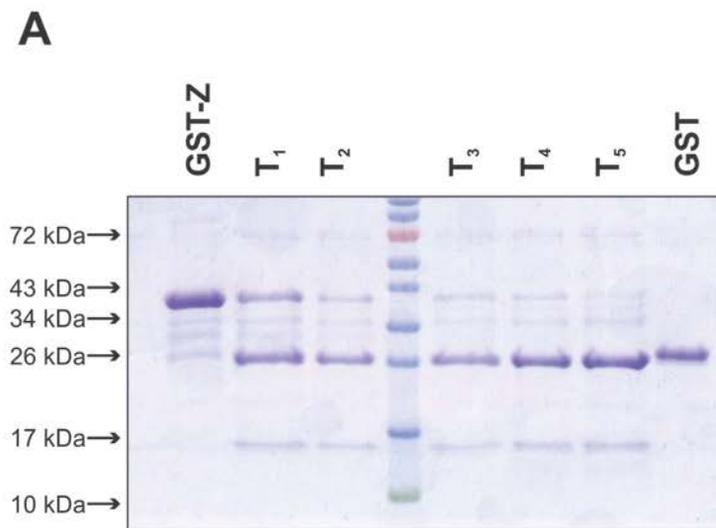
**Cromatografía  
de Afinidad**



**Cromatografía de exclusión  
Molecular**

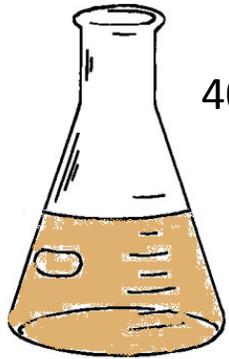
# Un ejemplo....

## Purificación de GST-Z (pGZ-Fxa)



# Un ejemplo más....

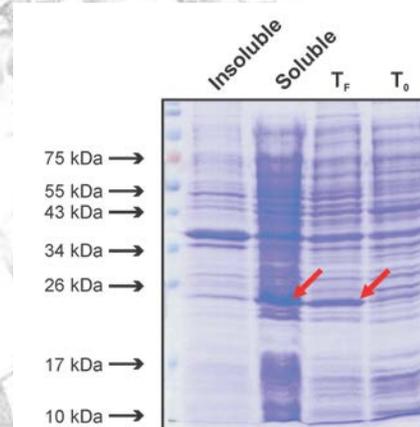
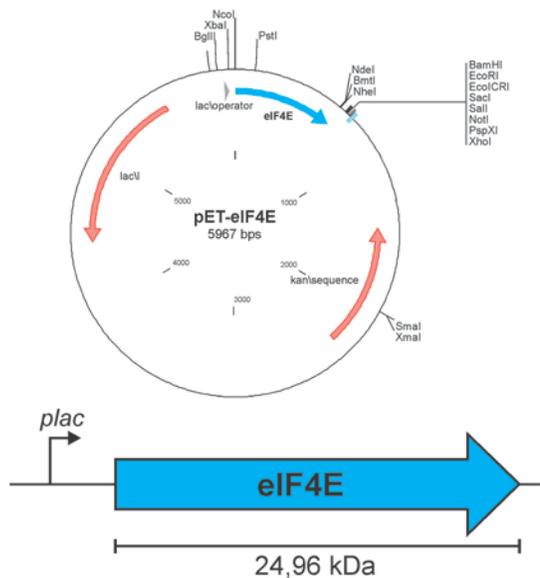
## Expresión de eIF4E (pET-eIF4E) en *E. Coli* (BL21)



**Medio M9ZB\***  
400 $\mu$ M IPTG a DO<sub>600</sub>: 0,7  
4hs a 37°C a 220rpm

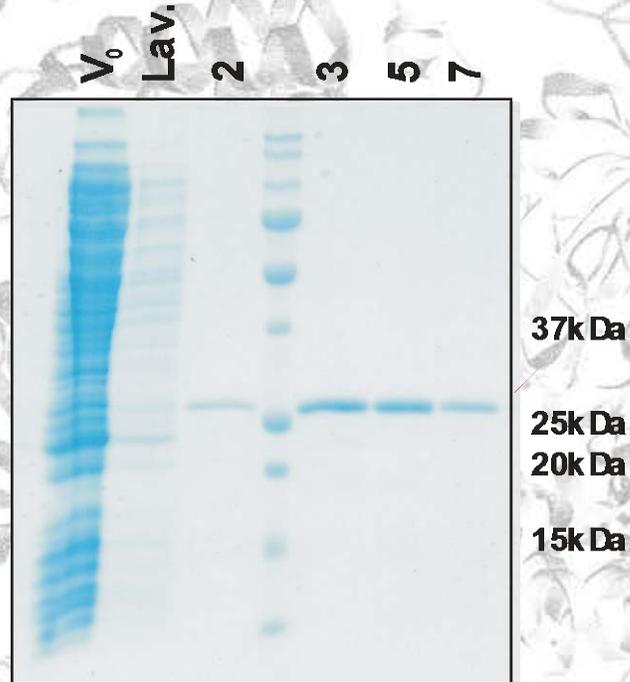
\* 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
90mM NaCl  
20mM NH<sub>4</sub>Cl  
2mM MgSO<sub>4</sub>

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



# 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* 70µM 7-Methyl-GDP

