

Expresión de Proteínas Recombinantes



Herramientas de la Biotecnología

- ✓ La determinación de la estructura de doble hélice del ADN (Premio Nobel de medicina en 1962 James Watson y Francis Crick)
- ✓ Información genética es traducida a proteínas, catalizadores naturales de las distintas funciones biológicas
- ✓ A comienzos de los años 70...

Endonucleasas de restricción, ADN ligasas, ADN polimerasas...



Tecnología del ADN recombinante

Que son las proteínas recombinantes?

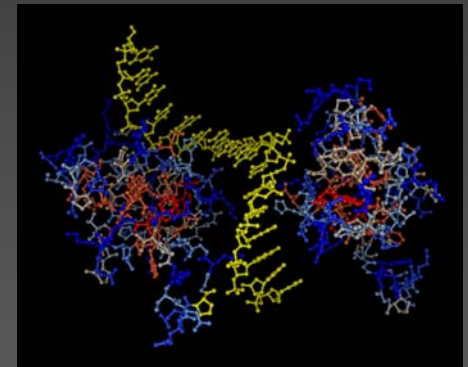
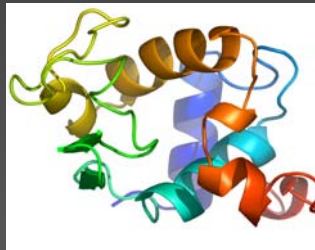
Proteínas producidas artificialmente a partir de genes clonados

Aislamiento de la secuencia génica (ARNm) y traducción de la proteína blanco
Introducción en un organismo (Procariota / Eucariota)
Expresión y purificación de la proteína blanco

Para que sirven?

Áreas básicas

Biología, Cristalografía
Biofísica, Bioquímica,
Microbiología, etc



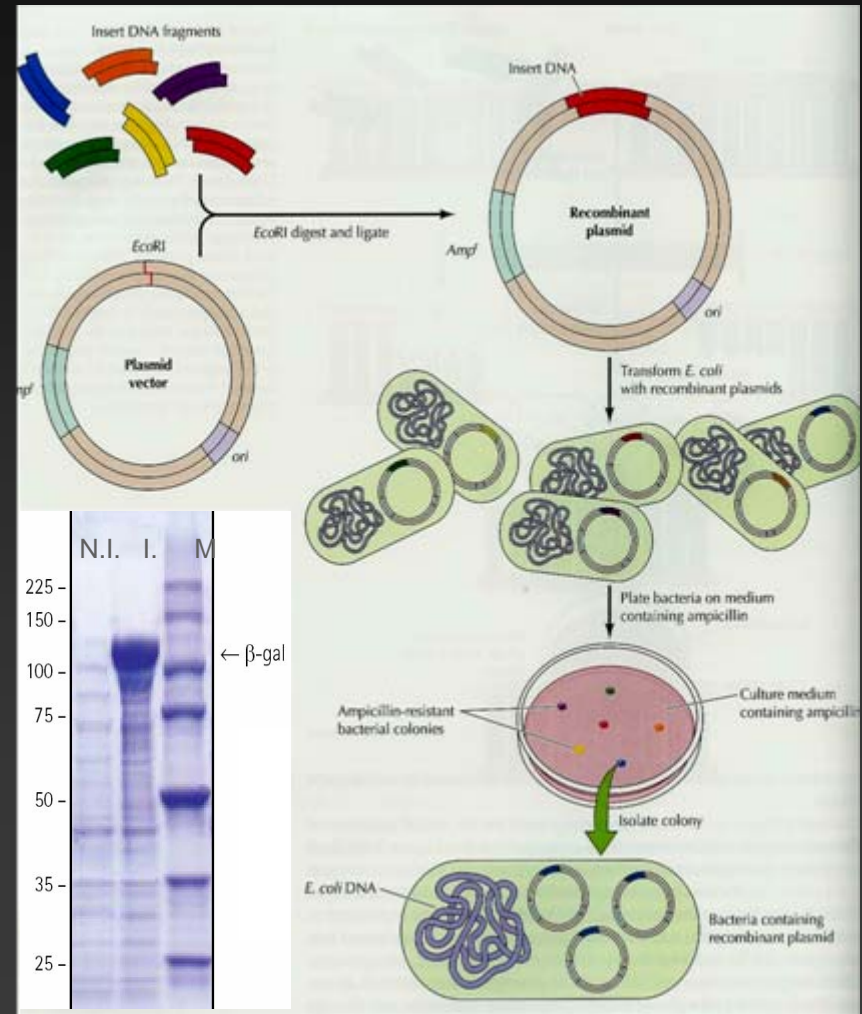
Áreas aplicadas

- Salud:
- Biotecnología
- Agricultura, etc.

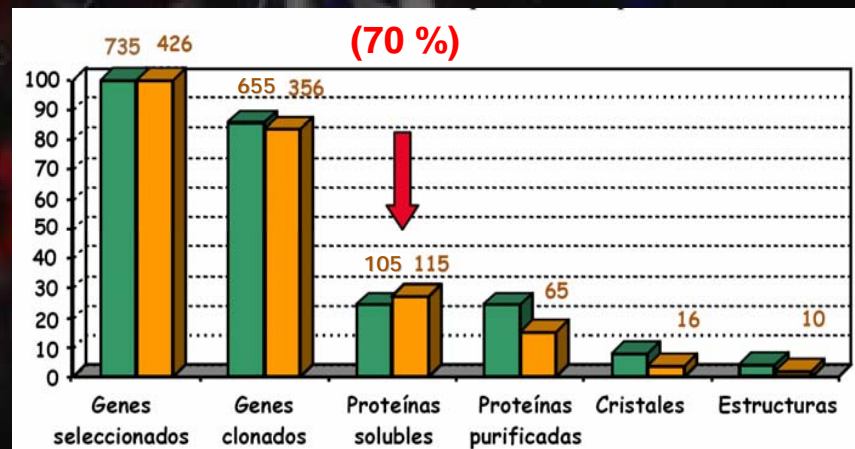
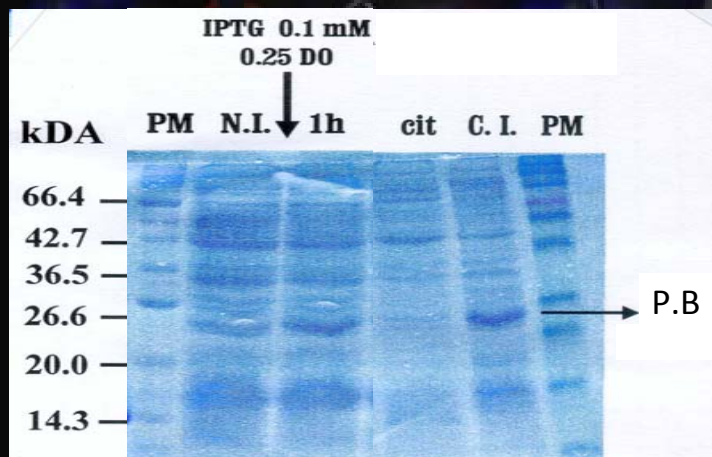
Insulina humana recombinante (EEUU en 1982)
Anticuerpos Recombinantes (Rituzimab, Scott 1998)
Resistencia a plagas y herbicidas. (Alcalde et al 2000)

Expresión de proteínas recombinantes. Generalidades

- ✓ Amplificación por PCR del gen de interés
- ✓ Obtención del vector de clonado
- ✓ Digestión de ambos productos con enzimas de restricción
- ✓ Ligación y transformación en el sistema elegido
- ✓ Selección clonal del organismo con el vector recombinante
- ✓ Cultivo del clon e inducción de la expresión proteica



Expresión de proteínas recombinantes. Solubles & Insolubles



■ TB Structural Genomics European Consortium
■ Unité du Biochimie Structurale (IPP)

✓ **Sobreexpresión de la proteína recombinante**

✓ **Origen heterólogo de la proteína recombinante**

Solubilización de proteínas recombinantes en *E. Coli*

Optimización de los vectores de expresión

- Capaz de transportar dos o mas secuencia de ADN recombinante → Co-expresión
- Posibilidad de utilizar promotores fuertes o débiles (T7 o T5) → No saturar la maquinaria traduccional bacteriana
- Capacidad de exportar la proteína al espacio periplasmico → Puentes disulfuros
- Distintos orígenes de replicación → Elevado número de copias
- Con proteínas de fusión → Ayudar al plegado de la proteína blanco
- Con distintos “tags” → Ayudar a la purificación de la proteína blanco

Solubilización de proteínas recombinantes en *E. Coli*

Optimización de la cepa huésped

- Enzimas implicadas en el sistema redox
(*Origami, Novagen*) → Generar puentes di-sulfuros en citosol
- Cepas deficientes en proteasas
(*BL21 D3, Novagen*) → Estabilidad de la proteína recombinante
- Permeasas mutadas (*lac permeasa*)
(*Tuner, Novagen*) → Sensibles a distintas concentraciones del inductor
- Suplementadas con codones raros
(tRNA eucariotas) → Expresión de proteínas heterólogas

Solubilización de proteínas recombinantes en *E. Coli*

La solubilidad de cada proteína es intrínseca a su función, a su origen y a su microambiente celular

El plegamiento proteico sigue siendo un área desconocida.

No existen recetas mágicas...

Solubilización de proteínas recombinantes en *E. Coli*

| Strain | Strain | Strain |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| B834 | Origami(DE3)pLysS ⁺ | Rosetta-gami™ 2 ⁺ |
| B834(DE3) ⁺ | | |
| B834(DE3)pLysS ⁺ | Origami 2 ⁺ | Rosetta-gami 2(DE3) ⁺ |
| BL21 | Origami 2(DE3) ⁺ | |
| BL21(DE3) ⁺ | | Rosetta-gami 2(DE3)pLysS ⁺ |
| BL21(DE3)pLysS ⁺ | Origami 2(DE3)pLysS ⁺ | |
| BLR | | Rosetta-gami B ⁺ |
| BLR(DE3) ⁺ | Origami™ B ⁺ | |
| BLR(DE3)pLysS ⁺ | Origami B(DE3) ⁺ | Rosetta-gami B(DE3) ⁺ |
| HMS17.4 | | |
| HMS17.4(DE3) ⁺ | Origami B(DE3)pLysS ⁺ | Rosetta-gami B(DE3)pLysS ⁺ |
| HMS17.4(DE3)pLysS ⁺ | | |
| NovaBlue | Rosetta™ | Tuner™ |
| NovaBlue(DE3) | Rosetta(DE3) ⁺ | Tuner(DE3) |
| NovaBlue(DE3)pLysS ⁺ | Rosetta(DE3)pLysS ⁺ | Tuner(DE3)pLysS |
| NovaBlue T1 ⁺ | Rosetta 2 | Rosetta 2(DE3)pLysS ⁺ |
| NovaXG | Rosetta 2(DE3) ⁺ | RosettaBlue™ |
| NovaXGF | Rosetta 2(DE3)pLysS ⁺ | RosettaBlue(DE3) |
| | RosettaBlue™ | RosettaBlue(DE3)pLysS |
| | RosettaBlue(DE3) | Rosetta-gami™ ⁺ |
| Origami™ ⁺ | RosettaBlue(DE3)pLysS | |
| Origami(DE3) ⁺ | Rosetta-gami™ ⁺ | Rosetta-gami (DE3) ⁺ |

| Vector |
|-----------------|
| pET-3a-d |
| pET-9a-d |
| pET-11a-d |
| pET-14b |
| pET-15b |
| pET-16b |
| pET-17b |
| pET-19b |
| pET-20b(+) |
| pET-21a-d(+) |
| pET-22b(+) |
| pET-23a-d(+) |
| pET-24a-d(+) |
| pET-25b(+) |
| pET-26b(+) |
| pET-27b(+) |
| pET-28a-c(+) |
| pET-29a-c(+) |
| pET-30a-c(+) |
| pET-30 Ek/LIC |
| pET-30 Xa/LIC |
| pET-31b(+) |
| pET-32a-c(+) |
| pET-32 Ek/LIC |
| pET-32 Xa/LIC |
| pET-33b(+) |
| pET-39b(+) |
| pET-40b(+) |
| pET-41a-c(+) |
| pET-41 Ek/LIC |
| pET-42a-c(+) |
| pET-43.1a-c(+) |
| pET-43.1 Ek/LIC |
| pET-44a-c(+) |
| pET-45b(+) |

Temperaturas de Cultivo

x 3

D.O. de inducción

x 2

30 %
51
15 cepas

35
10 vectores

5 cond
cultivo

750
pruebas

Solubilización de proteínas recombinantes en *E. Coli*

Probar la mayor cantidad de condiciones de
expresión posibles en el menor tiempo...



Tecnología robótica

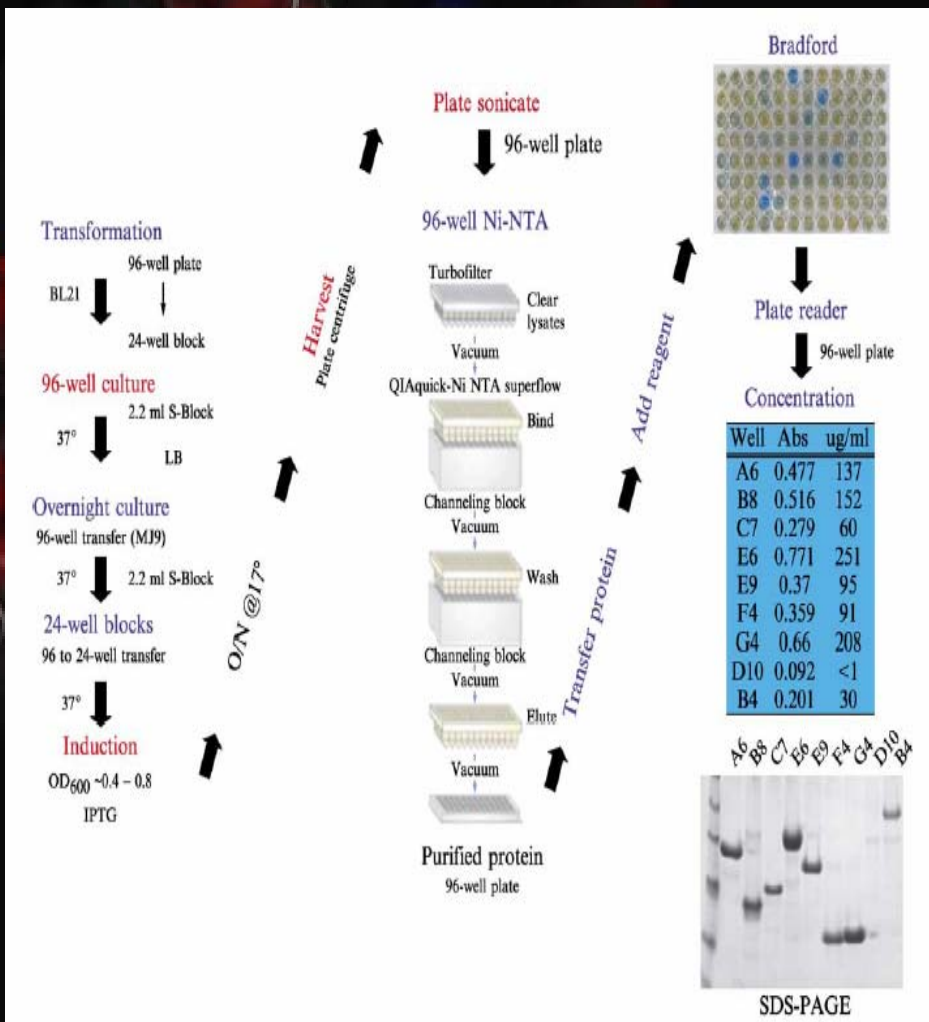
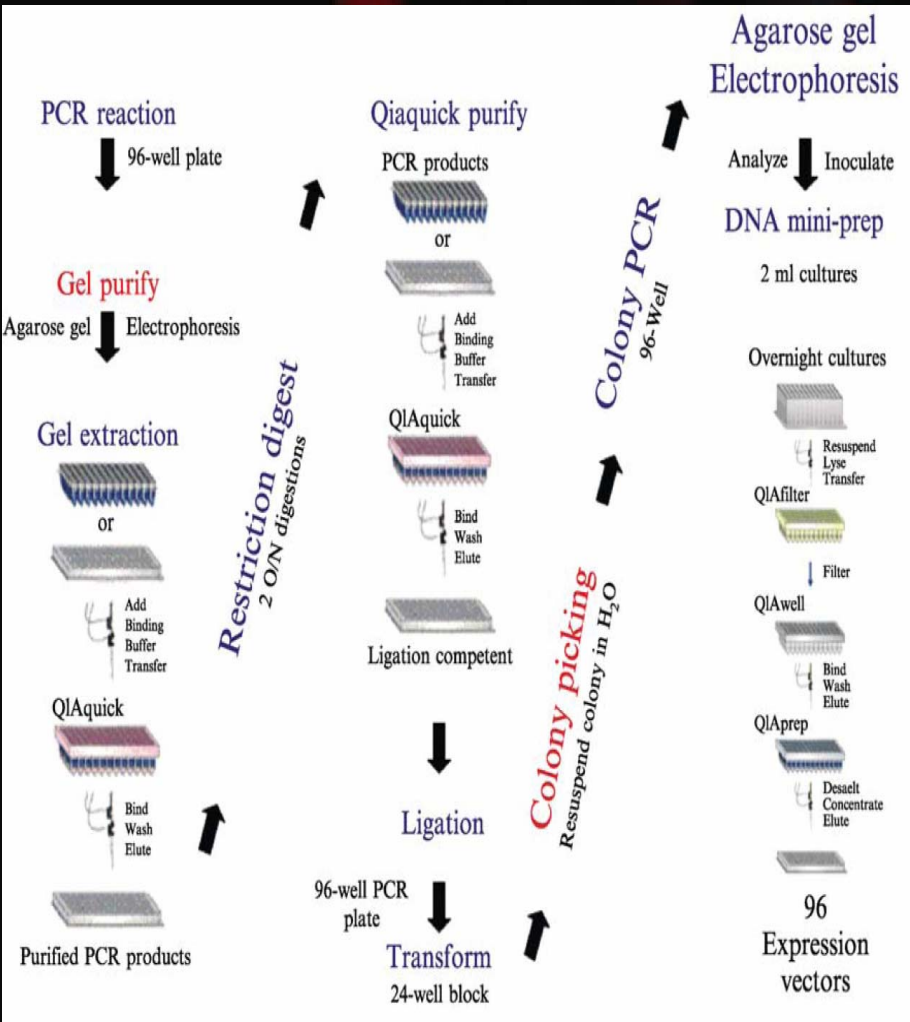
Solubilización de proteínas y plataformas robóticas

[8] Robotic Cloning and Protein Production Platform of the Northeast Structural Genomics Consortium

By THOMAS B. ACTON, KRISTIN C. GUNSALUS, RONG XIAO,
LI CHUNG MA, JAMES ARAMINI, MICHAEL C. BARAN, YI-WEN CHIANG,
TERESA CLIMENT, BONNIE COOPER, NATALIA G. DENISSOVA,
SHAWN M. DOUGLAS, JOHN K. EVERETT, CHI KENT HO,
DAPHNE MACAPAGAL, PARANJI K. RAJAN, RITU SHASTRY,
LIANG-YU SHIH, G.V.T. SWAPNA, MICHAEL WILSON,
MARGARET WU, MARK GERSTEIN, MASAYORI INOUE,
JOHN F. HUNT, and GAETANO T. MONTELIONE

METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 394

Copyright 2005, Elsevier Inc.
All rights reserved.
0076-6879/05 \$35.00



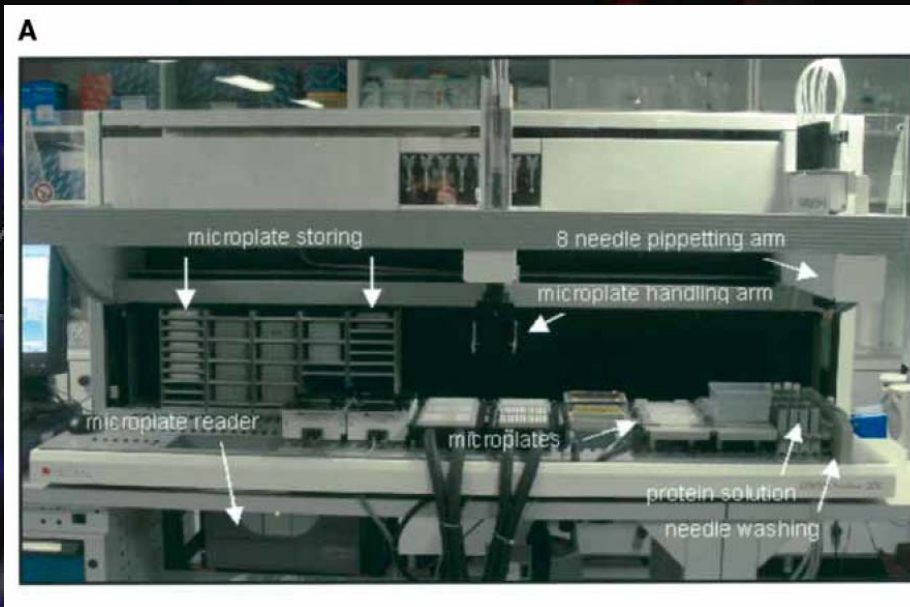
Solubilización de proteínas y plataformas robóticas

Protein  Science

High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies

Renaud Vincentelli, Stéphane Canaan, Valérie Campanacci, Christel Valencia, Damien Maurin, Frédéric Frassinetti, Loréna Scappucini-Calvo, Yves Bourne, Christian Cambillau and Christophe Bignon

Protein Sci. 2004 13: 2782-2792
doi:10.1110/ps.04806004



| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|--|--|--------------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|------------------------|---|
| A | pH 4, β -MSH, Arg | pH 4, KCl, β -MSH, NDSB256 | pH 5, NaCl 200 mM | pH 5, KCl, glucose | pH 6, KCl | pH 7 | pH 7, NDSB201, Arg | pH 8, KCl, β -MSH, NDSB201, Arg | pH 8, β -MSH | pH 9, NDSB195, Arg | * GSH 5 mM | * GSH 5 mM, GSSG 5 mM, DabA 10 mM |
| B | pH 4, β -MSH, NDSB256 | pH 4, β -MSH, NDSB201, glucose | pH 5, NDSB256 | pH 5, cocktail | pH 5, NDSB256, glucose | pH 7, KCl | pH 7, PEG 4000, β -MSH | pH 8, glucose | pH 8, NDSB201 | pH 8, NaCl 100 mM, glucose | * GSH 5 mM, GSSG 2 mM | * GSH 2 mM, GSSG 5 mM, DabA 10 mM |
| C | pH 4, NaCl 100 mM, β -MSH | pH 4, KCl, NDSB195 | pH 5, EDTA, β -MSH, NDSB201 | pH 6, PEG 400, β -MSH, NDSB201 | pH 6, glycerol, β -MSH | pH 7, NaCl 200 mM, NDSB201 | pH 7, NDSB195, glucose | pH 8 | pH 9, PEG 4000, β -MSH, NDSB195, Arg | pH 9, β -MSH, NDSB195, Arg | * GSH 5 mM, GSSG 5 mM | * GSSG 5 mM, DabA 10 mM |
| D | pH 4, glycerol | pH 4, PEG 4000, glucose | pH 5, β -MSH, glycerol | pH 5, β -MSH, NDSB195, glucose | pH 6, EDTA | pH 7, glycerol, β -MSH | pH 7, EDTA, β -MSH, NDSB195 | pH 8, PEG 4000, NDSB195 | pH 9, KCl, β -MSH, NDSB201, glucose | pH 9, PEG 400 | * GSH 2 mM, GSSG 5 mM | * GSSG 10 mM, DabA 10 mM |
| E | pH 4, PEG400, glucose | pH 5, EDTA, Arg | pH 5, PEG 400, β -MSH, Arg | pH 6, glycerol, NDSB256, Arg | pH 6, NaCl 100 mM, β -MSH, NDSB195 | pH 7, PEG 4000, NDSB256, Arg | pH 7, cocktail | pH 8, β -MSH, glucose | pH 8, β -MSH | pH 9 | * GSSG 5 mM | * dBGroEL 10 mM |
| F | pH 4, EDTA | pH 5, NaCl 100 mM, Arg | pH 5, β -MSH, NDSB256 | pH 6, NaCl 200 mM, β -MSH, glucose | pH 6 | pH 7, NaCl 100 mM, NDSB201 | pH 8, Arg | pH 8, NaCl 100 mM, β -MSH, NDSB256 | pH 9, NaCl 100 mM, NDSB256 | pH 9, EDTA, β -MSH, Arg | * GSSG 10 mM | * dBGroEL 10 mM, DabA 10 mM |
| G | pH 4, NDSB201 | pH 5, PEG 4000, β -MSH, NDSB201 | pH 5, glycerol, β -MSH, NDSB195 | pH 6, β -MSH, NDSB201, Arg | pH 6, PEG 4000, Arg | pH 7, β -MSH, Arg | pH 8, EDTA, NDSB256, glucose | pH 8, NaCl 200 mM, β -MSH, NDSB195 | pH 9, β -MSH, NDSB195 | pH 9, NDSB195, Arg | * GSH 5 mM, DabA 10 mM | * GSSG 10 mM, dBGroEL 10 mM, DabA 10 mM |
| H | pH 4, NaCl 200 mM, β -MSH, NDSB195, Arg | pH 5, NaCl 200 mM, NDSB195 | pH 5, β -MSH | pH 6, PEG 400, β -MSH, NDSB256 | pH 6, PEG 400, β -MSH, NDSB256 | pH 7, PEG 400, β -MSH, glucose | pH 7, β -MSH | pH 8, glycerol, β -MSH | pH 8, PEG 400, NDSB195 | pH 9, NaCl 200 mM, β -MSH, NDSB256 | pH 9, cocktail | * GSH 5 mM, GSSG 2 mM, DabA 10 mM |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0.306 | 0.937 | 0.909 | 0.866 | 0.819 | 0.905 | 0.543 | 1.239 | 1.296 | 0.901 | 0.379 | 0.763 |
| B | 0.713 | 1.289 | 1.035 | 0.680 | 1.138 | 0.764 | 0.332 | 1.157 | 1.254 | 0.462 | 0.329 | 1.224 |
| C | 0.368 | 0.896 | 0.821 | 0.719 | 0.84 | 0.747 | 0.454 | 1.189 | 1.311 | 0.424 | 0.596 | 0.548 |
| D | 1.126 | 0.734 | 0.408 | 0.655 | 0.608 | 0.732 | 0.423 | 0.454 | 0.427 | 0.559 | 0.518 | 0.327 |
| E | 0.875 | 0.610 | 0.007 | 0.419 | 0.003 | 0.021 | 0.529 | 0.007 | 0.008 | 0.590 | 0.432 | 0.018 |
| F | 0.793 | 0.515 | 0.018 | 0.272 | 0.016 | 0.003 | 0.484 | 0.023 | 0.009 | 0.530 | 0.068 | 0.227 |
| G | 0.778 | 0.314 | 0.009 | 0.295 | 0.005 | 0.002 | 0.438 | 0.046 | 0.004 | 0.862 | 0.413 | 0.188 |
| H | 0.843 | 0.823 | 0.406 | 0.467 | 0.779 | 0 | 0.244 | 0.517 | 0.743 | 0.287 | 0.500 | 0.856 |



**Solubilización de
proteínas
recombinantes en
Uruguay**

Vectores de expresión y cepas

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|-----------------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------------------|-----------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------------|
| Vectores | pFP 1400 | pQE-30 | pQE-Tri system | pTrcHis | pET- 28a | pET-21d o pET-29a | pET-32a | pET-43.1a | pGEX- 4T-2 | pMAL-c2E o pMAL-p2E |
| Promotores y « tags » | T5 Sin Histag | T5 + N-terminal | T5 + C-terminal | T5 ⁺⁺ + N-term | T7 + N-terminal | T7 + C-terminal | T7 Fusion Trx | T7 Fusion NUS | T5 fusion GST | T5 fusion malE |
| Cepas | 1 - 6 | 1 - 6 | 1 - 6 | 1 - 6 | 1 - 5 | 1 - 5 | 1 - 5 | 1 - 5 | 1 - 5 | 1 - 5 |

Células Competentes

1 = HMS174 (DE3)

Mutación en RecA. Estabilización de ciertos genes tóxicos

2 = Rosetta (DE3)

RNA^t de mamíferos

3 = Origami

Derivada de K-12 (formación de ptes disulfuros)

4 = Rosetta-Gami (DE3)

IPTG sensible + ptes disulfuros + RNA^t mamíferos

5 = Tuner (DE3)

Sensible a distintas concentraciones de IPTG

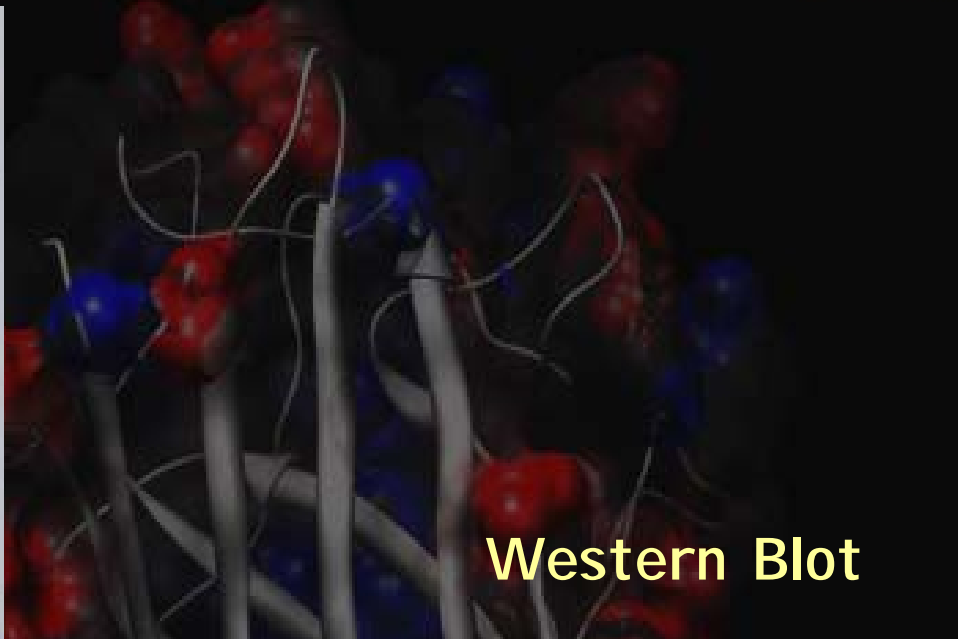
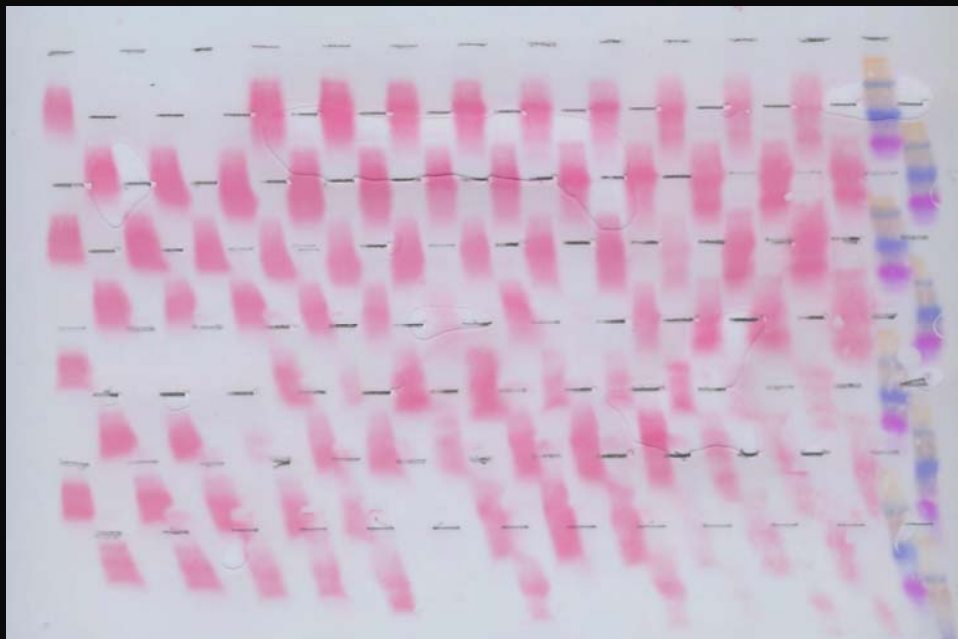
6 = DH5 - α

Vectores de expresión con promotores del tipo T5

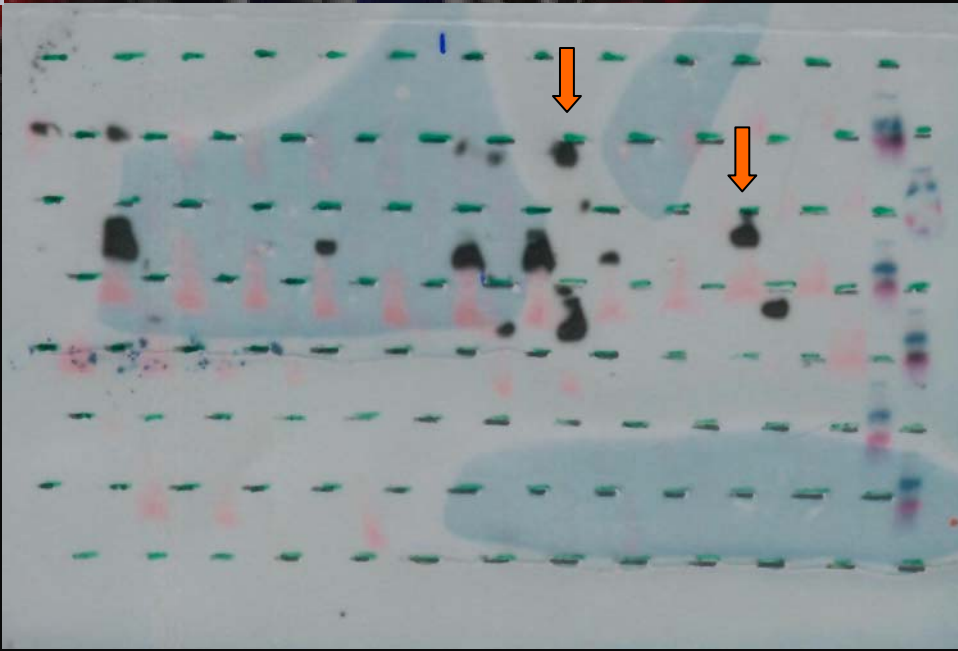
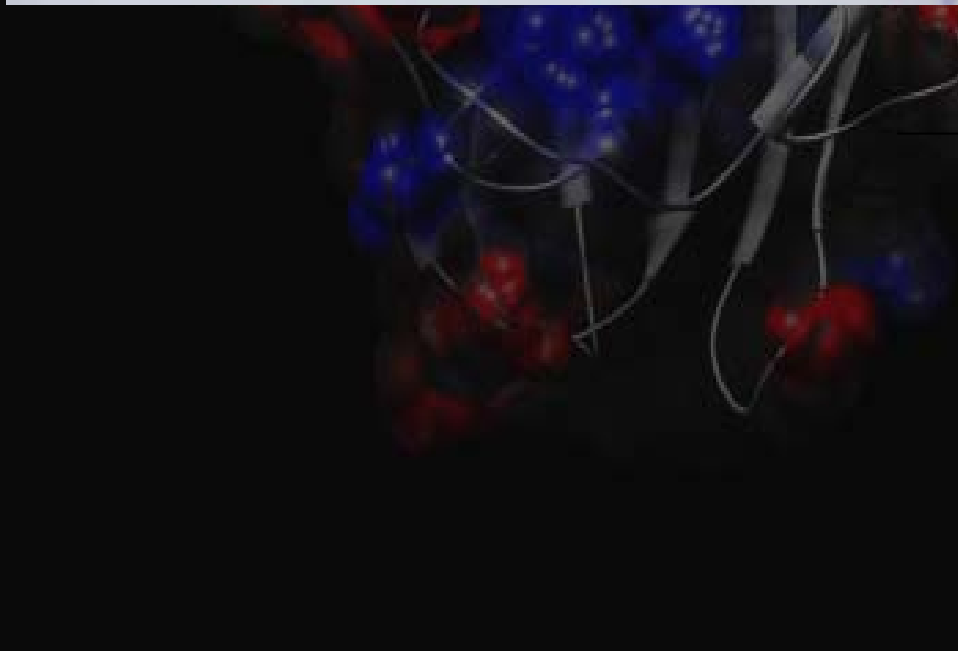
Metodología

- ✓ Digestión del cDNA recombinante y del vector de expresión
- ✓ Ligación y transformación
- ✓ Inoculación del minicultivo ON
- ✓ Inoculación del cultivo bacteriano con el minicultivo ON.
- ✓ Inducción con IPTG y expresión ON
- ✓ Evaluación de la solubilidad por SDS-PAGE y/o Western Blot

SDS-PAGE



Western Blot



Test de solubilidad de una proteína recombinante en la plataforma robótica TECAN

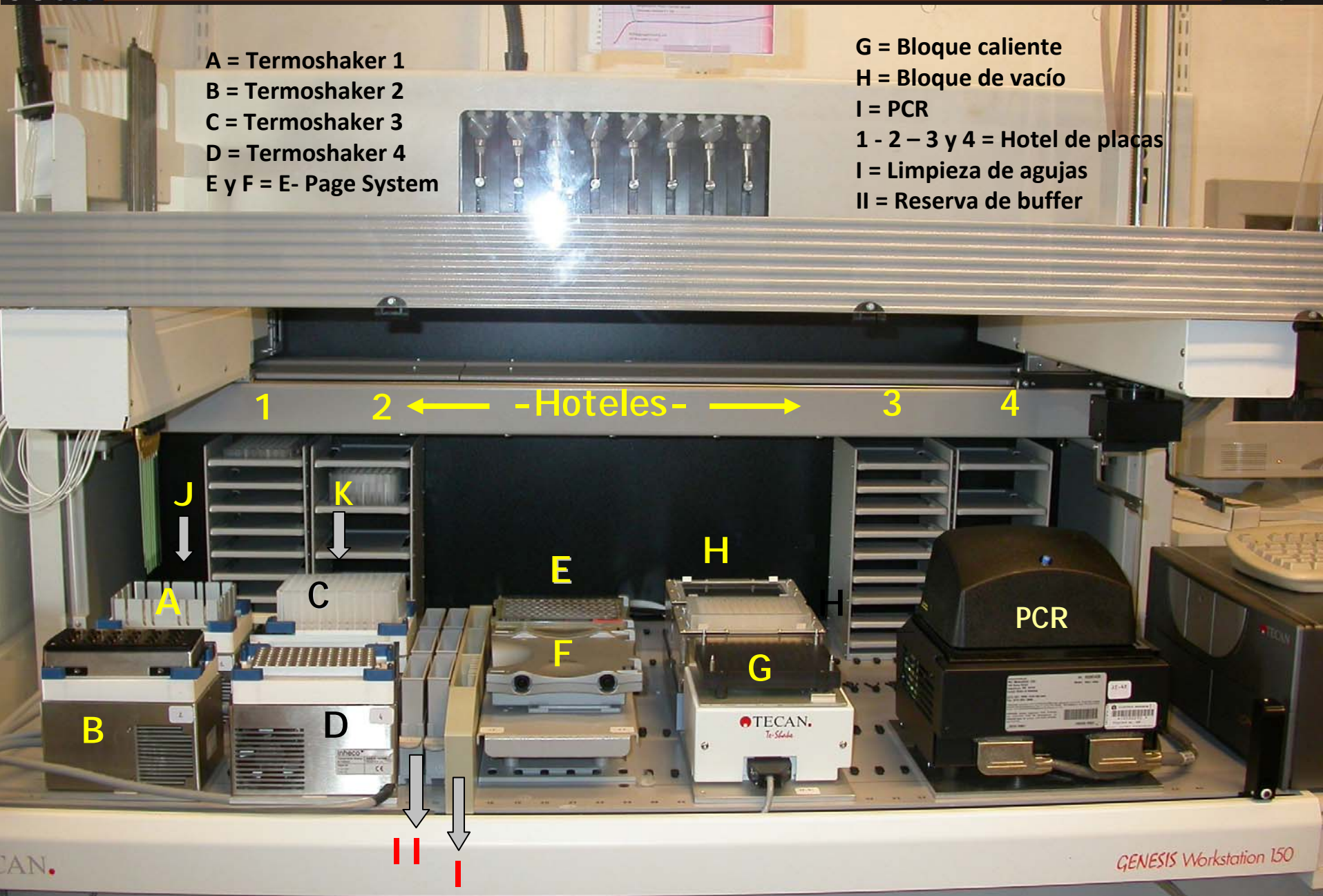
Evaluación en
7 días de:

- ✓ 8 vectores diferentes
- ✓ 6 cepas distintas de *E. Coli*
- ✓ Condiciones de induction:
 - * 2 Abs (600 DO) diferentes
 - * 2 concentraciones de IPTG diferentes
- ✓ 2 condiciones de temperatura distintas
- ✓ **Total de 176 condiciones diferentes**

En 7 días y manual  **42 condiciones diferentes**

A = Termoshaker 1
B = Termoshaker 2
C = Termoshaker 3
D = Termoshaker 4
E y F = E- Page System

G = Bloque caliente
H = Bloque de vacío
I = PCR
1 - 2 - 3 y 4 = Hotel de placas
I = Limpieza de agujas
II = Reserva de buffer



Gracias...



Institut Pasteur Paris - Francia
Unidad de Bioquímica Estructural
Dr Pedro Alzari, Dr Frederic Roussel



Institut Pasteur Paris - Francia
Plataforma PF 6
Dr Ahmed Haouz



TECAN Paris - Francia
Ing. Henry Tibeau



Institut Pasteur Montevideo
Unidad de Proteínas Recombinantes
Cecilia Abreu, Agustín Correa y
Florencia Palacios