

Ingeniería Genética II

Unidad XIII

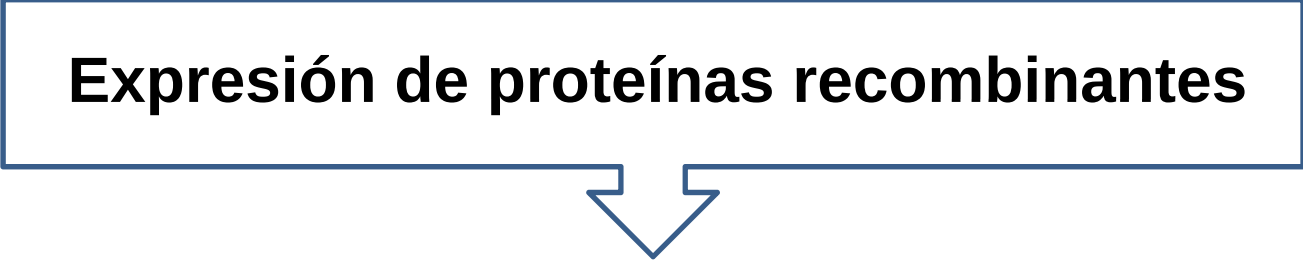
Sistemas de expresión de proteínas

Sistemas de expresión

- Las **proteínas recombinantes** son **polipéptidos producidos** en **sistemas heterólogos** (organismos diferentes al portador natural del gen).
- En general, se **producen** en **grandes cantidades** y su utilización final es diversa.
- Numerosas **aplicaciones biotecnológicas** se basan en la expresión de **proteínas recombinantes**.
- Para su **producción**, es necesario atravesar todas las etapas del **clonado molecular** dado que es necesario generar construcciones genéticas.

Sistemas de expresión

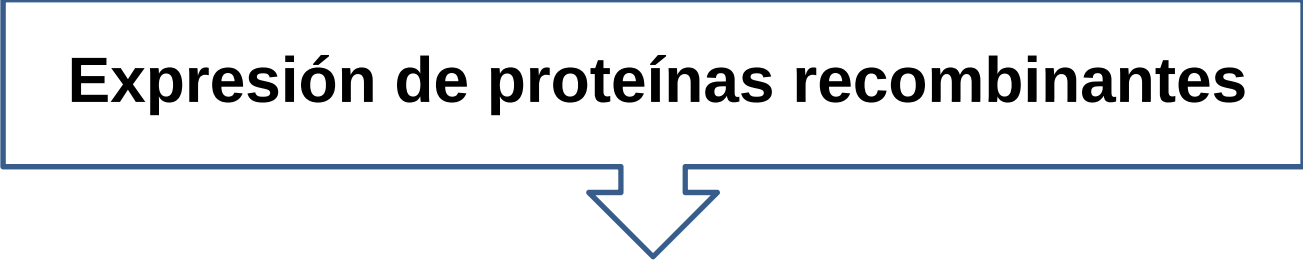
Expresión de proteínas recombinantes



- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

Sistemas de expresión

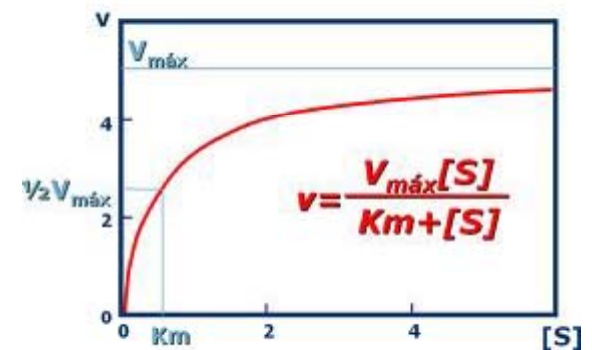
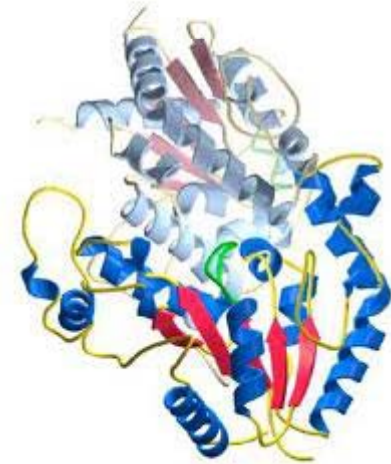
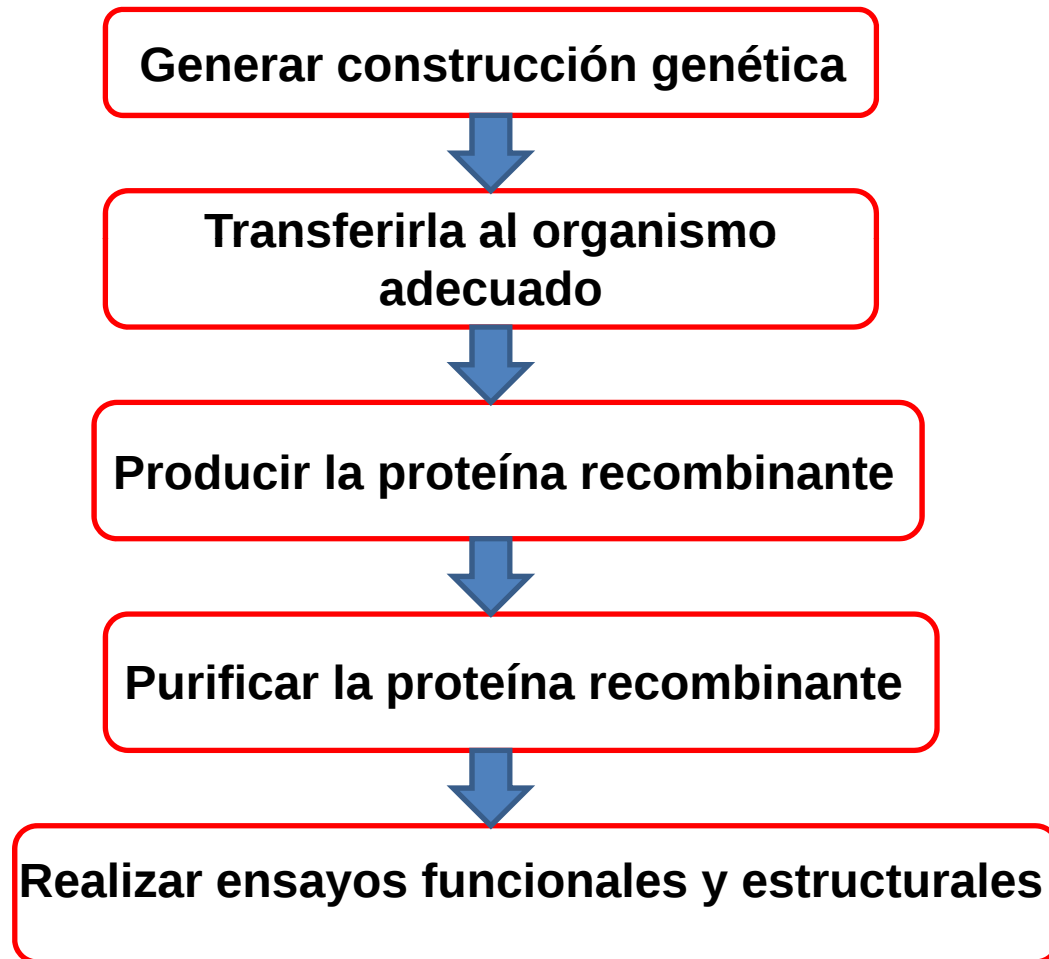
Expresión de proteínas recombinantes



- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

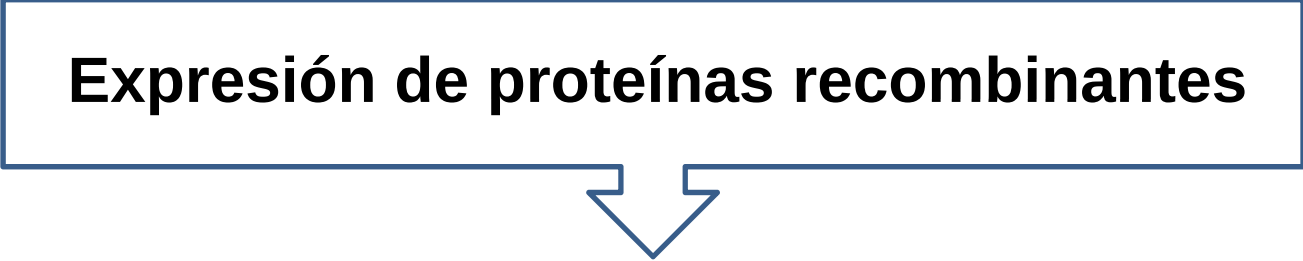
Expresión de proteínas recombinantes

Para la caracterización de las mismas



Sistemas de expresión

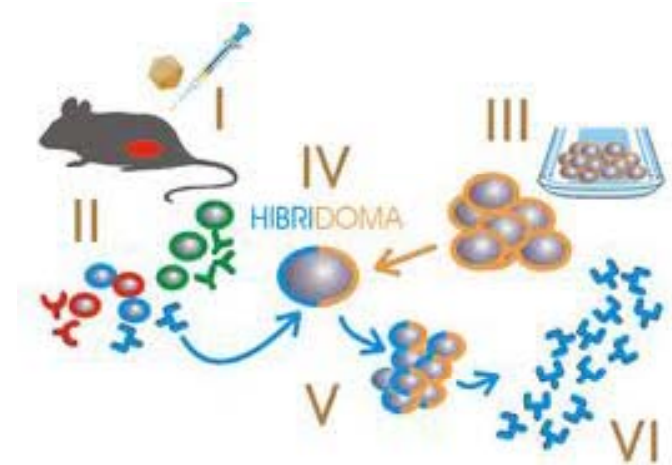
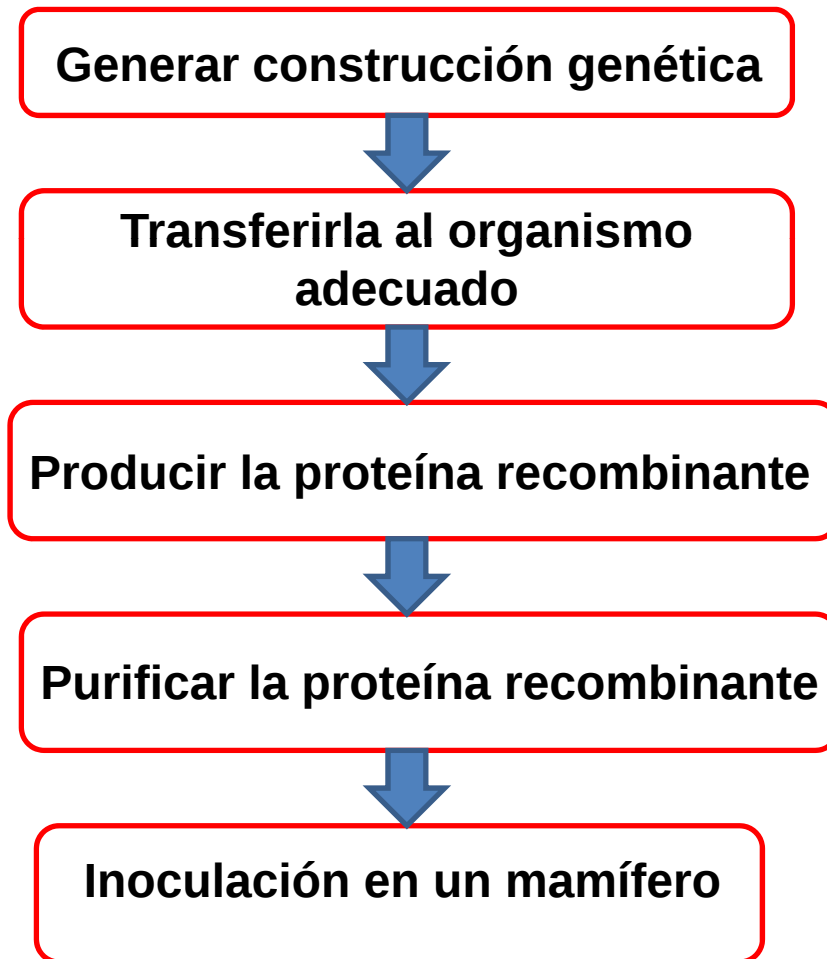
Expresión de proteínas recombinantes



- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

Expresión de proteínas recombinantes

Para generar anticuerpos



Clonado molecular

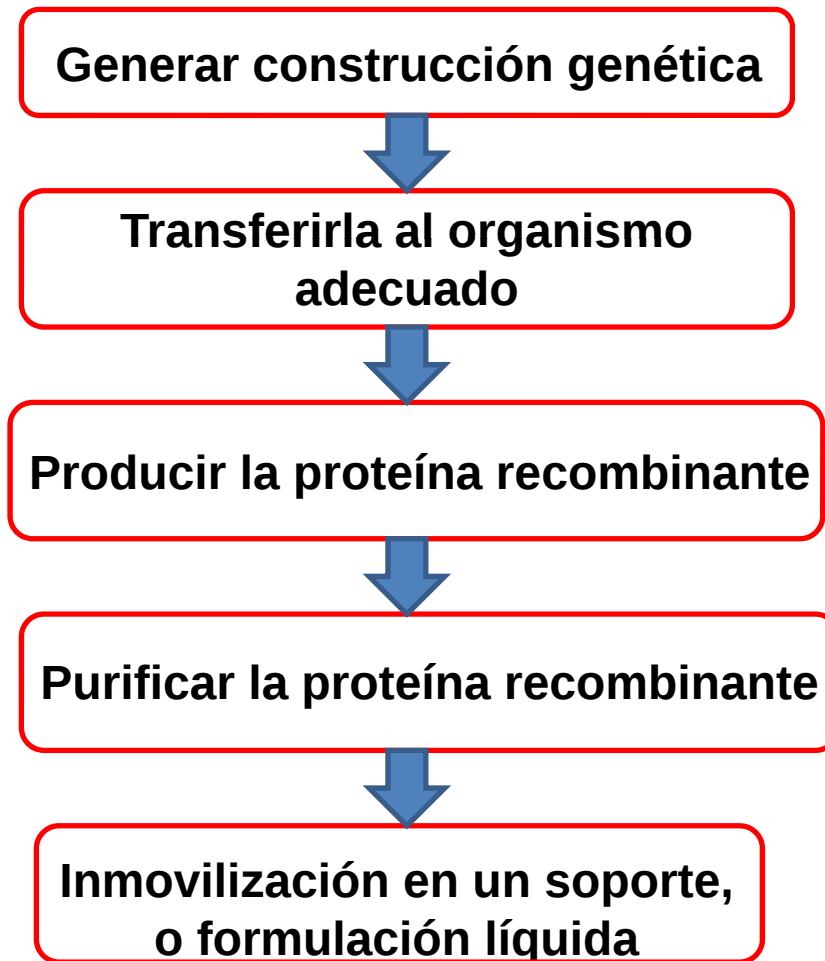
Expresión de proteínas recombinantes



- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

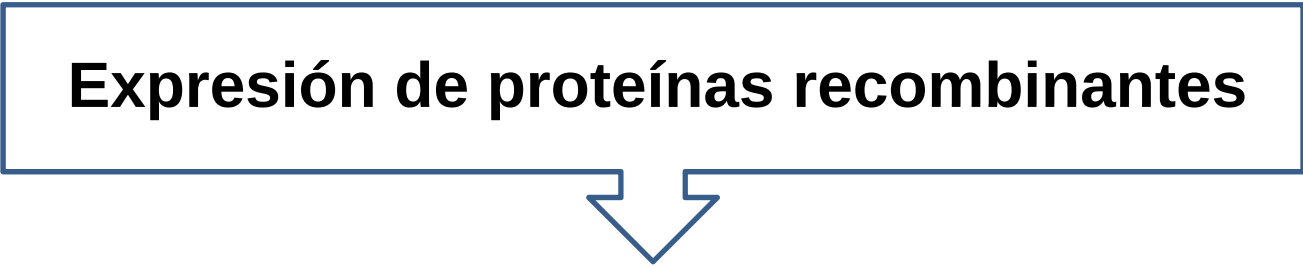
Expresión de proteínas recombinantes

Para generar antígenos para el diagnóstico



Sistemas de expresión

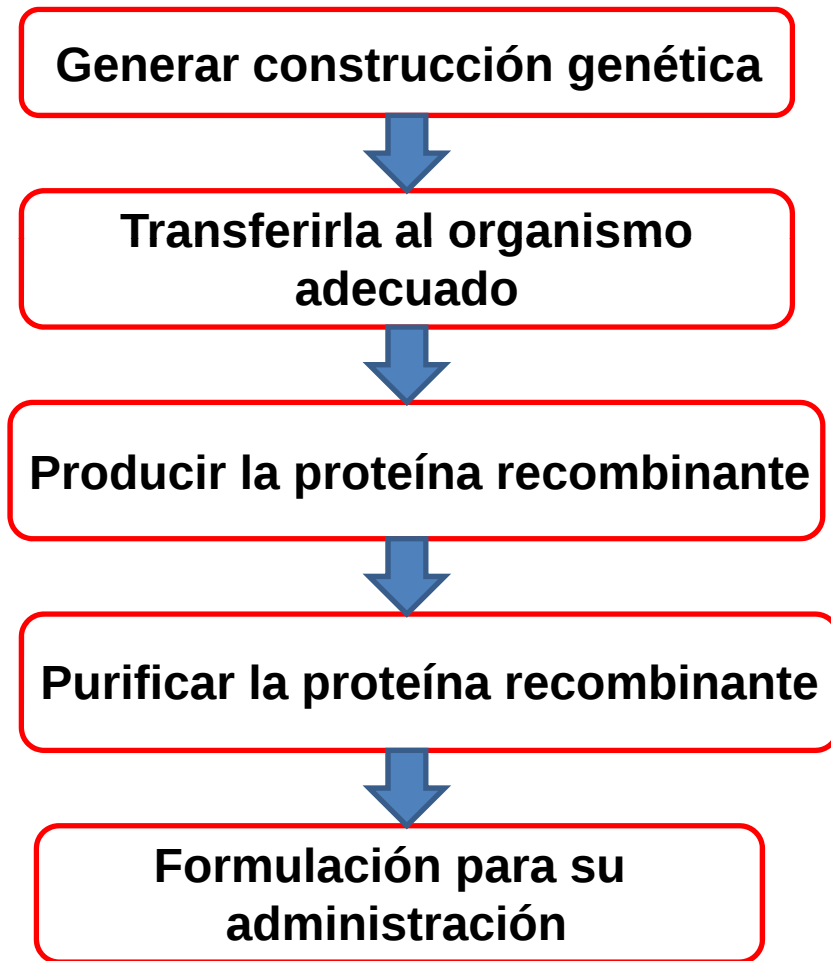
Expresión de proteínas recombinantes



- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

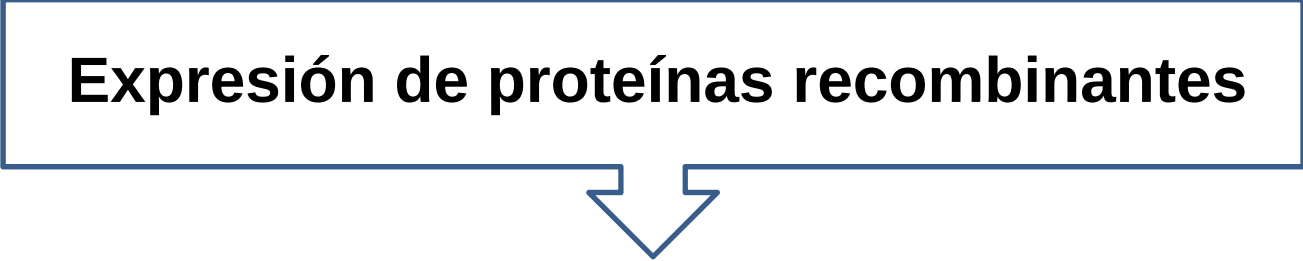
Expresión de proteínas recombinantes

Para generar agentes terapéuticos



Sistemas de expresión

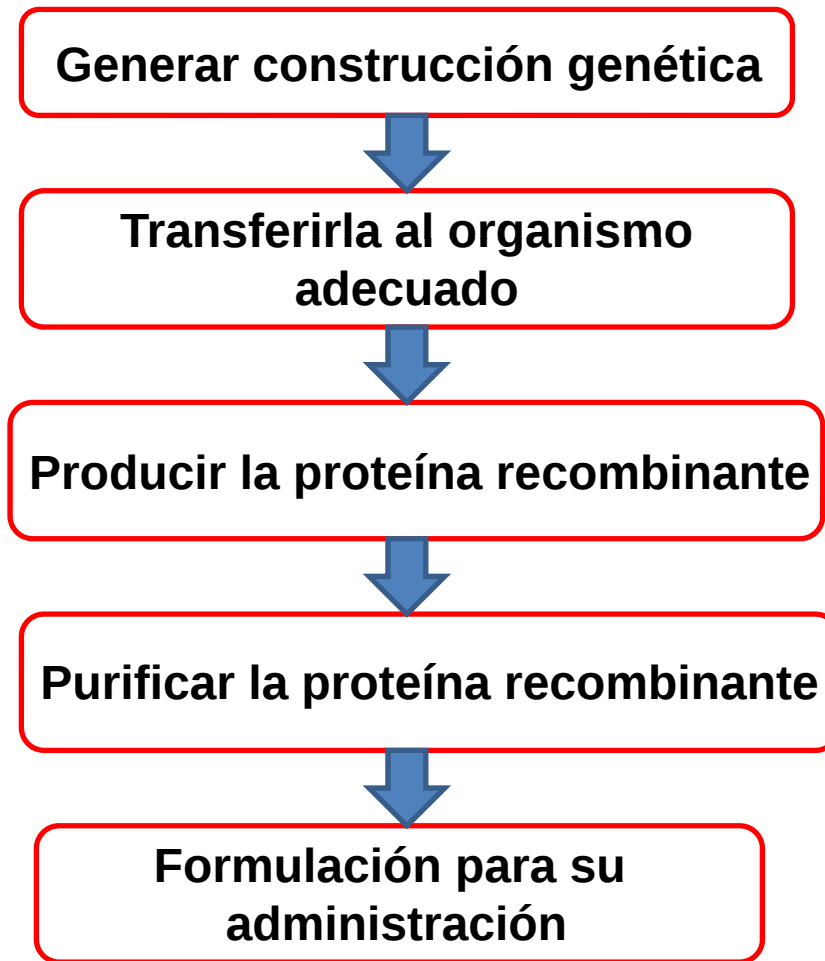
Expresión de proteínas recombinantes



- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

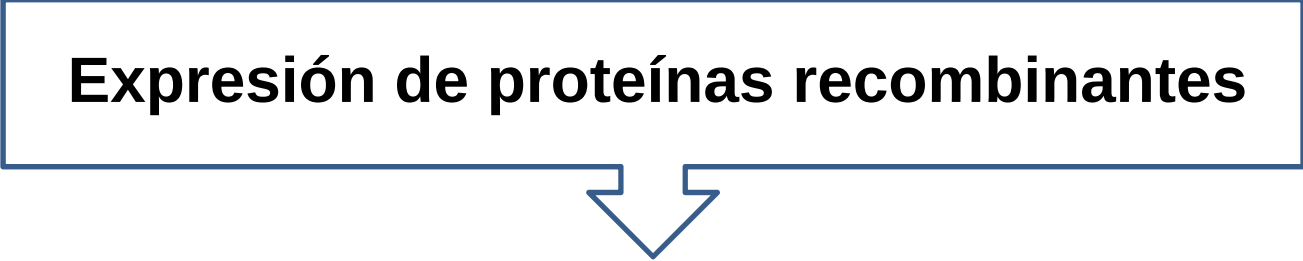
Expresión de proteínas recombinantes

Para generar vacunas a subunidad



Sistemas de expresión

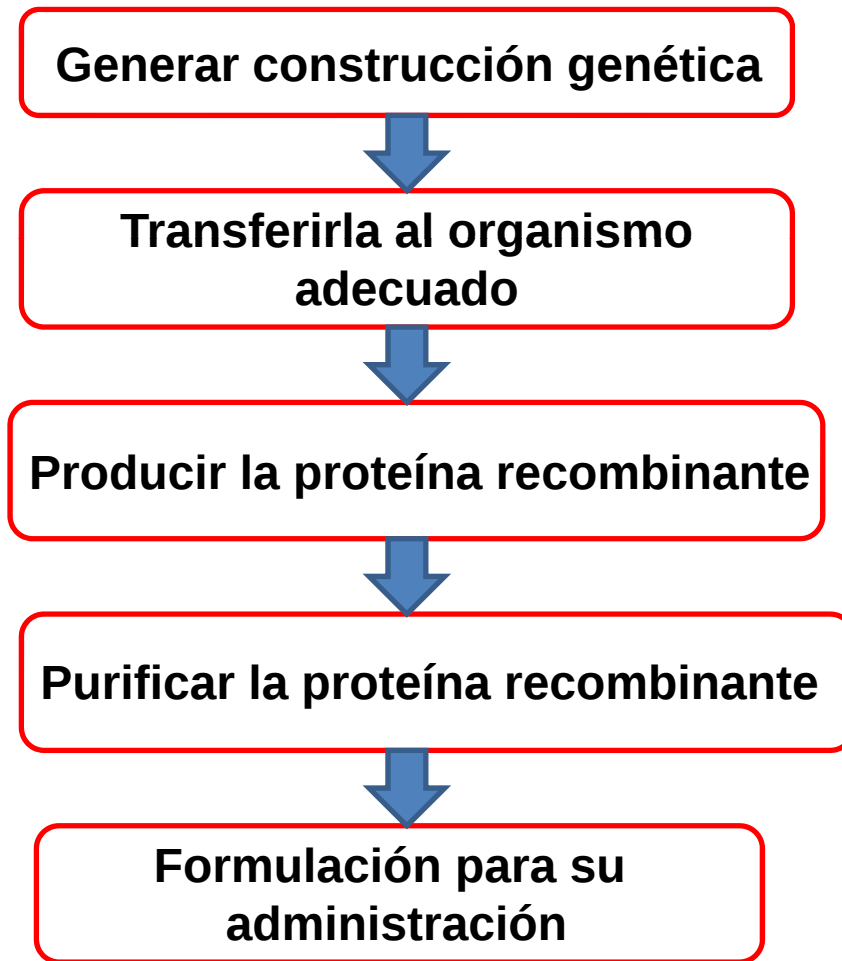
Expresión de proteínas recombinantes



- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

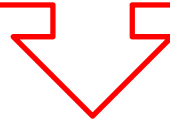
Expresión de proteínas recombinantes

Para generar enzimas de aplicación industrial



Expresión de proteínas recombinantes

La **expresión** de **proteínas** en **contextos heterólogos** requiere de **elegir las mejores opciones** en la generación del **fenotipo de interés**.



GENOTIPO + **AMBIENTE** = **FENOTIPO**

Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



organismo



proteína

Construir un gen que exprese la proteína de interés

Seleccionar el organismo adecuado para la expresión del gen

Evaluar la producción de la proteína de interés

Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Plásmidos/PCR/RNA Maquinaria <i>in vitro</i>	
Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de inecto
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Plásmidos/PCR/RNA Maquinaria <i>in vitro</i>	
Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insecto
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



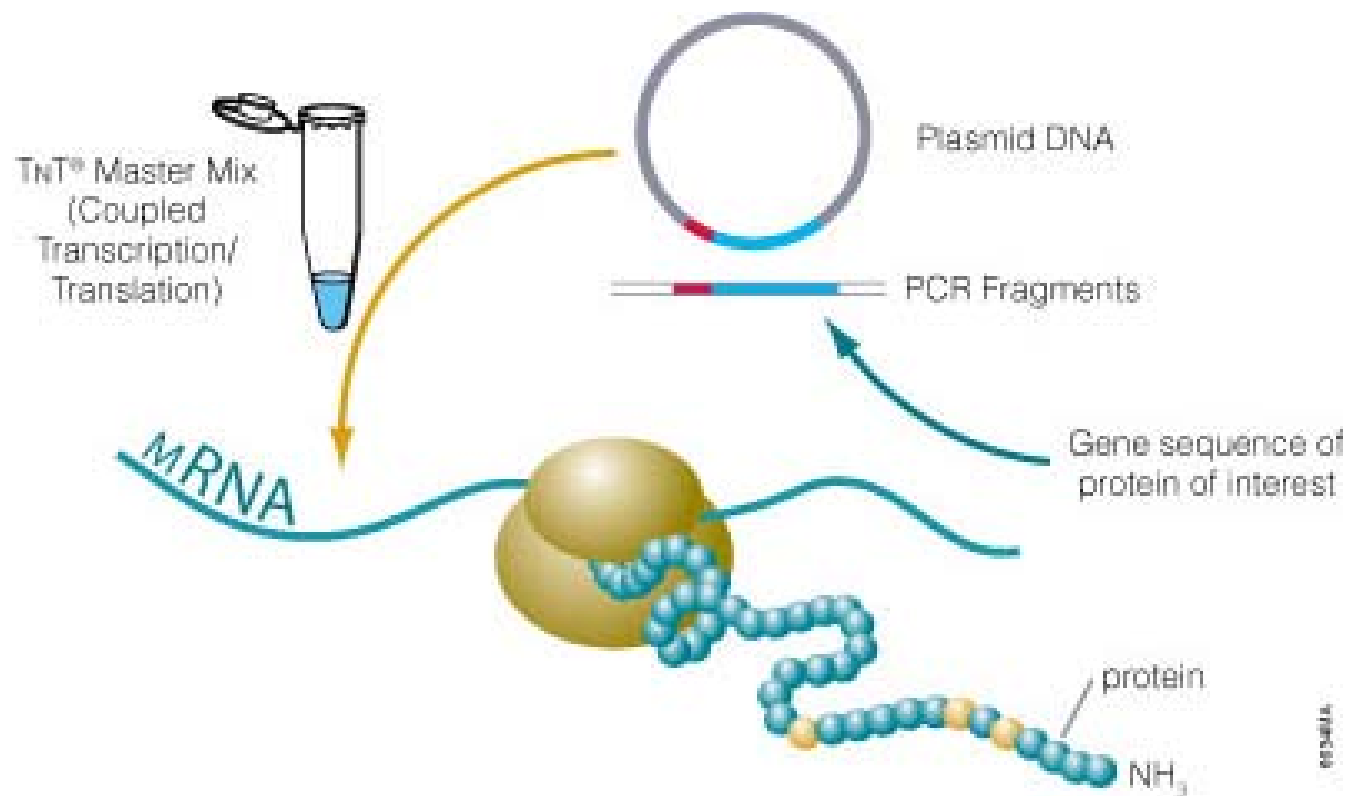
Expresión de proteínas recombinantes

Sistemas libres de células

- Existen **sistemas** muy sencillos de **expresión de proteínas** sin necesidad de utilizar ningún **organismo**.
- En estos sistemas, es **necesario** aportar el **gen** (producto de PCR o construcción genética) **o** el **transcripto** (un mRNA sintetizado *in vitro*).
- El **ambiente** que “lee” el mensaje será un **extracto derivado** de algún **organismo**, conteniendo maquinaria transcripcional y nucleótidos (si se parte de DNA), y maquinaria traduccional (tRNAs, aminoácidos, rRNAs).
- Incluso, se **pueden introducir chaperonas** para mejorar el plegamiento y **sistemas** para hacer **modificaciones post-traduccionales** (microsomas –vesículas de RE-). **Incluso, marcar** a la **proteína** con fluoróforos, isótopos u otro tipo de marcas para posteriores usos.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistemas libres de células



Expresión de proteínas recombinantes

Sistemas libres de células

Sistemas más utilizados



	<i>E.coli</i> S30 extract	Rabbit reticulocyte lysate	Wheat germ extract
Reported protein yield	6 mg/ml ⁸	6 µg/ml*	4 mg/ml ⁹
Post-translational modifications	No	Yes	Yes
Synthesised protein	Many incomplete polypeptides	Mainly full length	Mainly full length
Recommended template source*	Mainly bacteria	Animal, plant, bacteria, mammalian virus and plant virus	Animal, plant, bacteria and plant virus

Expresión de proteínas recombinantes

Sistemas libres de células

- Estos **sistemas** son **útiles** cuando **no** se necesitan **grandes cantidades** de proteína, **o** de un **suministro constante** de la misma.
- Además, son **empleados** para **generar proteínas marcadas** necesarias para llevar a cabo otros estudios moleculares.
- Los **tiempos de ejecución** son relativamente **cortos**, lo cual permite **producir** muchas proteínas diferentes **simultáneamente**.
- Esta particularidad hace que se puedan **adaptar** para **análisis high throughput** del tipo **interactómicos**.

Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO

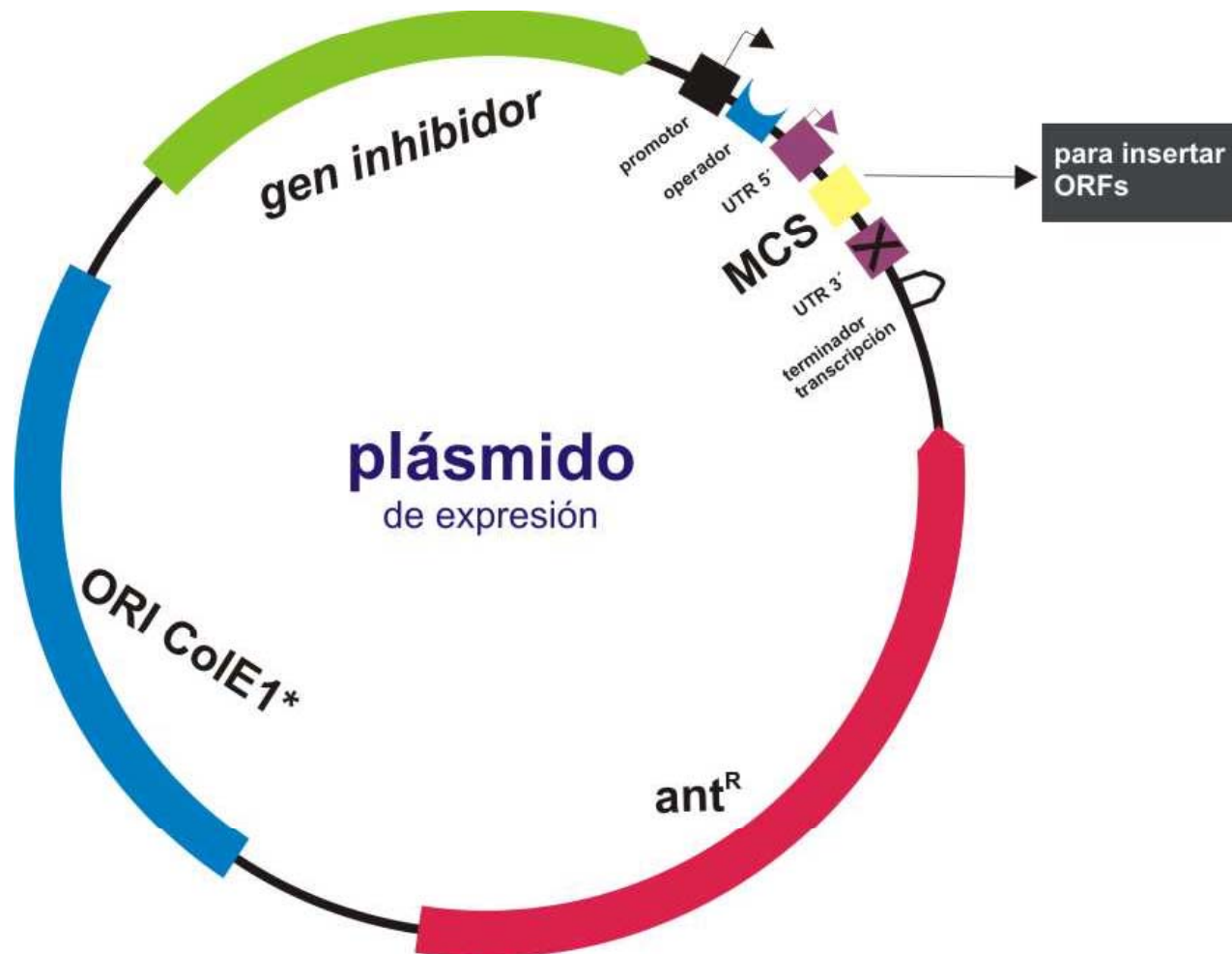


Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insectos
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



Expresión de proteínas recombinantes

Plásmidos de expresión procariotas



Expresión de proteínas recombinantes

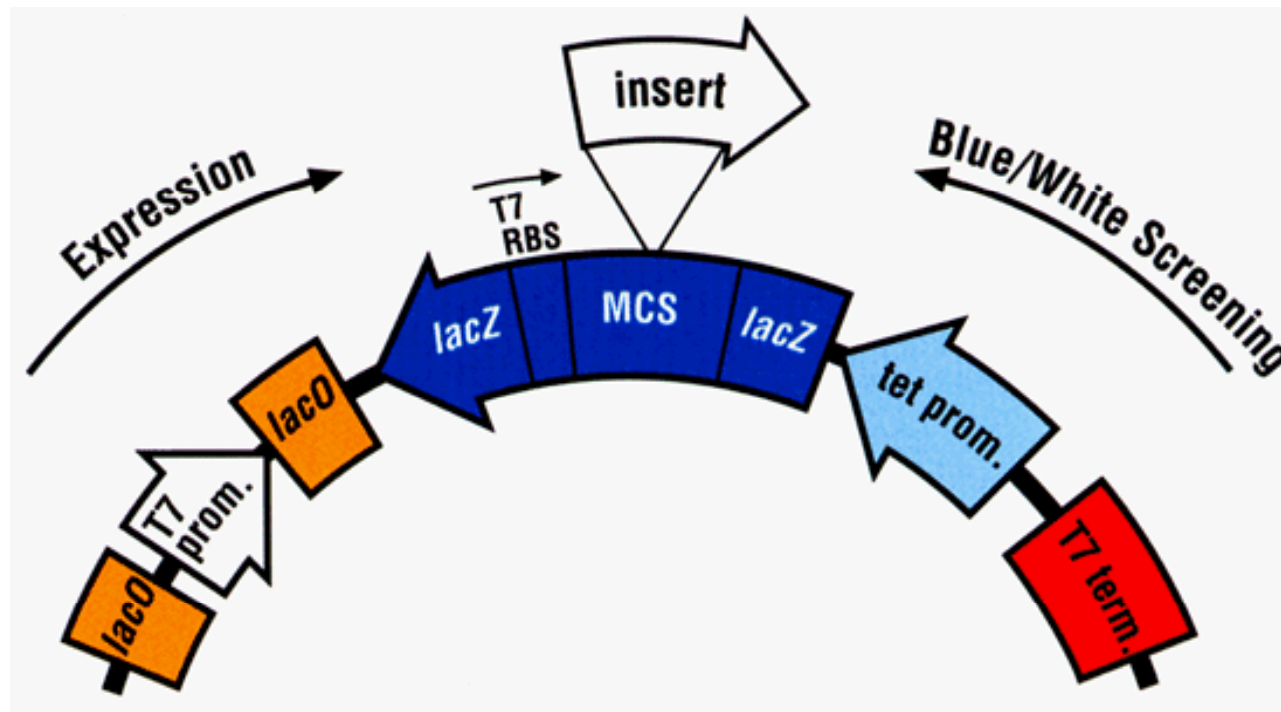
Construcción del gen: selección de vector

Región de clonado del vector pET-22b

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTTGT
Promotor T7 *Operador lacI*
TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCGGGCG
RBS *NdeI* *pel B*
ATGGCTGGCCATGGATATCGGAATTAATTTCCGGATCCGGATATCCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCCCTCGAGCAC
pel B *NcoI* *BamHI* *EcoRV* *SacI* *Sall* *HindIII* *XhoI*
ACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAG
His-tag *STOP*
CATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT
Terminador T7

Expresión de proteínas recombinantes

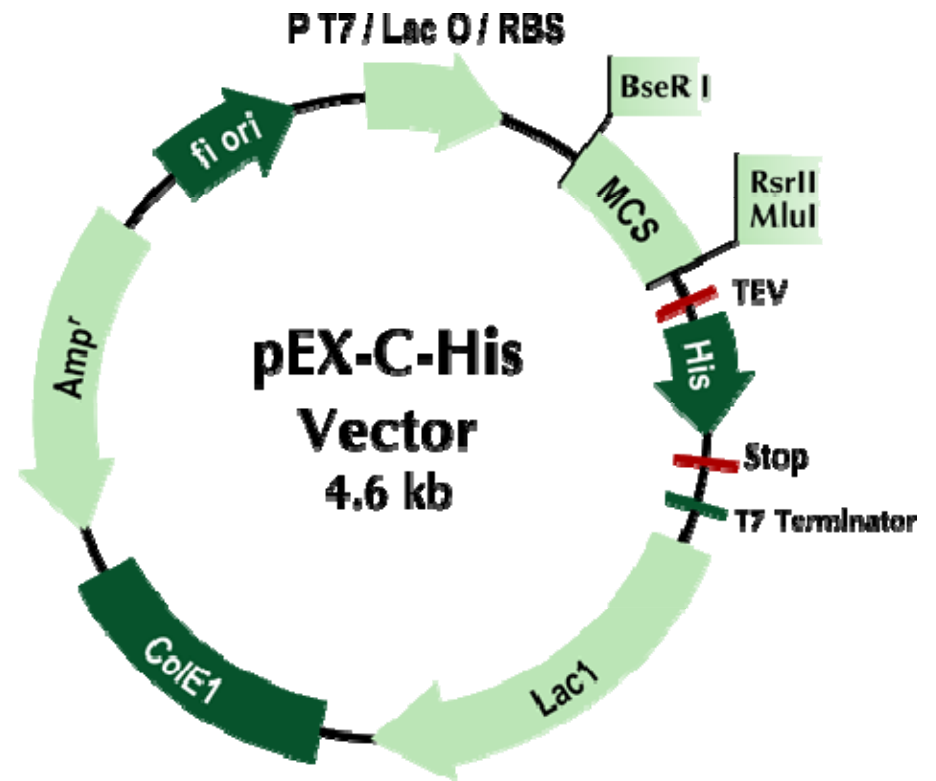
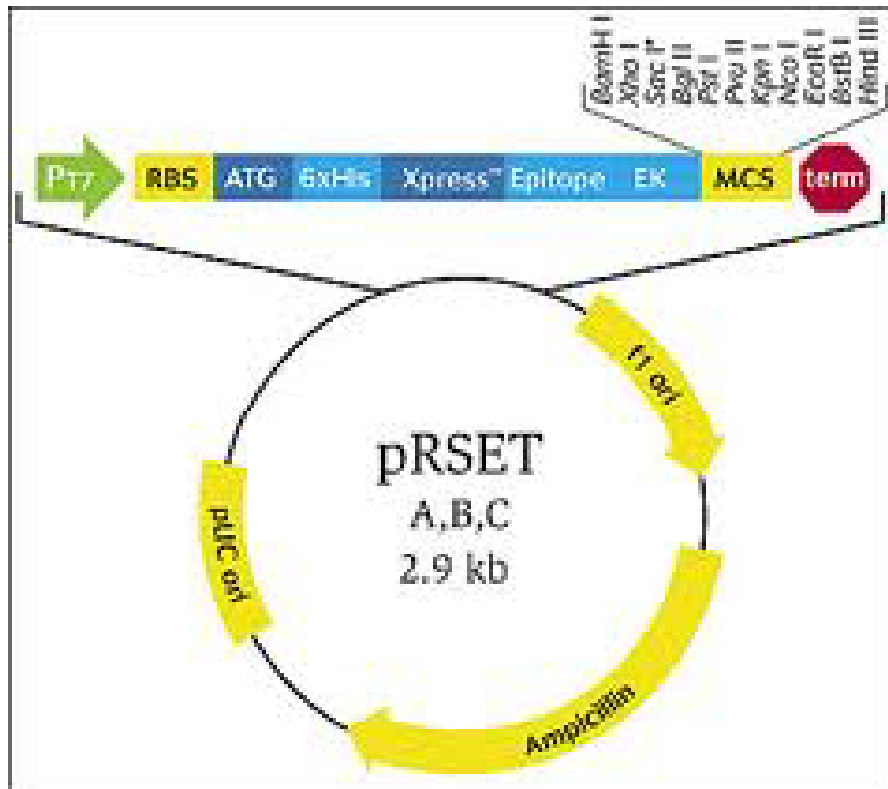
Construcción del gen: selección de vector



pET-Blue (Novagen)

Expresión de proteínas recombinantes

Construcción del gen: selección de vector



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/bacterias

- La **expresión de proteínas recombinantes en bacterias** comprende el **sistema más simple y económico**, tanto en **escala de laboratorio** como **industrial**.

- La **principal desventaja** radica en que ciertas **proteínas de mamíferos no** pueden ser **expresadas correctamente**, ya sea por problemas de **plegamiento**, por sus **efectos tóxicos** en las bacterias, y/o porque estos microorganismos no cuentan con las **rutras de modificación postraducciona** típicas de los eucariotas.

Expresión de proteínas recombinantes

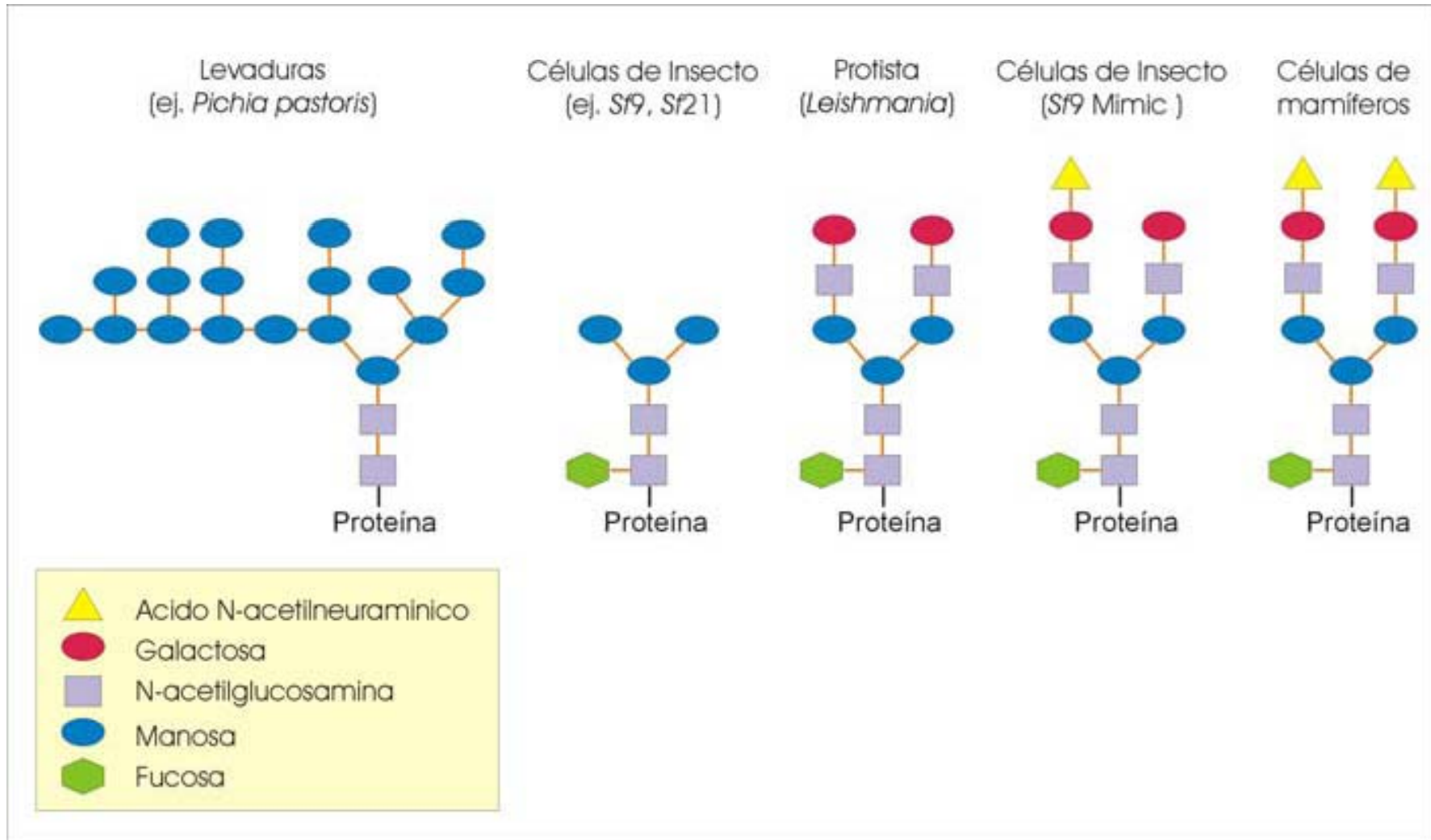
Sistema plásmidos/bacterias

- La **expresión de proteínas recombinantes en bacterias** comprende el **sistema más simple y económico**, tanto en **escala de laboratorio** como **industrial**.

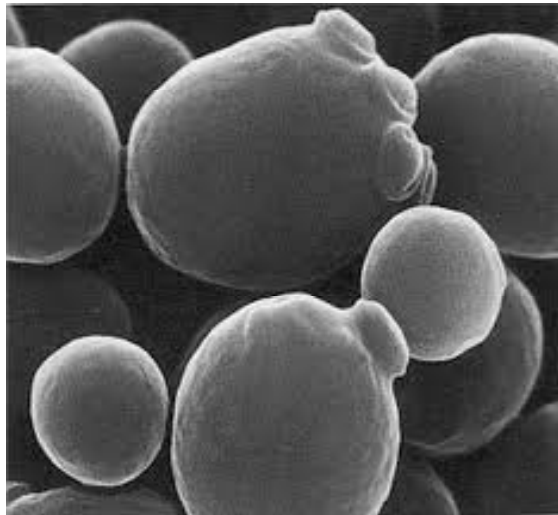
- La **principal desventaja** radica en que ciertas **proteínas de mamíferos no** pueden ser **expresadas correctamente**, ya sea por problemas de **plegamiento**, por sus **efectos tóxicos** en las bacterias, y/o porque estos microorganismos no cuentan con las **rutras de modificación postraducciona** típicas de los eucariotas.

Expresión de proteínas recombinantes

Algunas modificaciones: las glicosilaciones



Expresión de proteínas en levaduras



Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insectos
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



Expresión de proteínas recombinantes

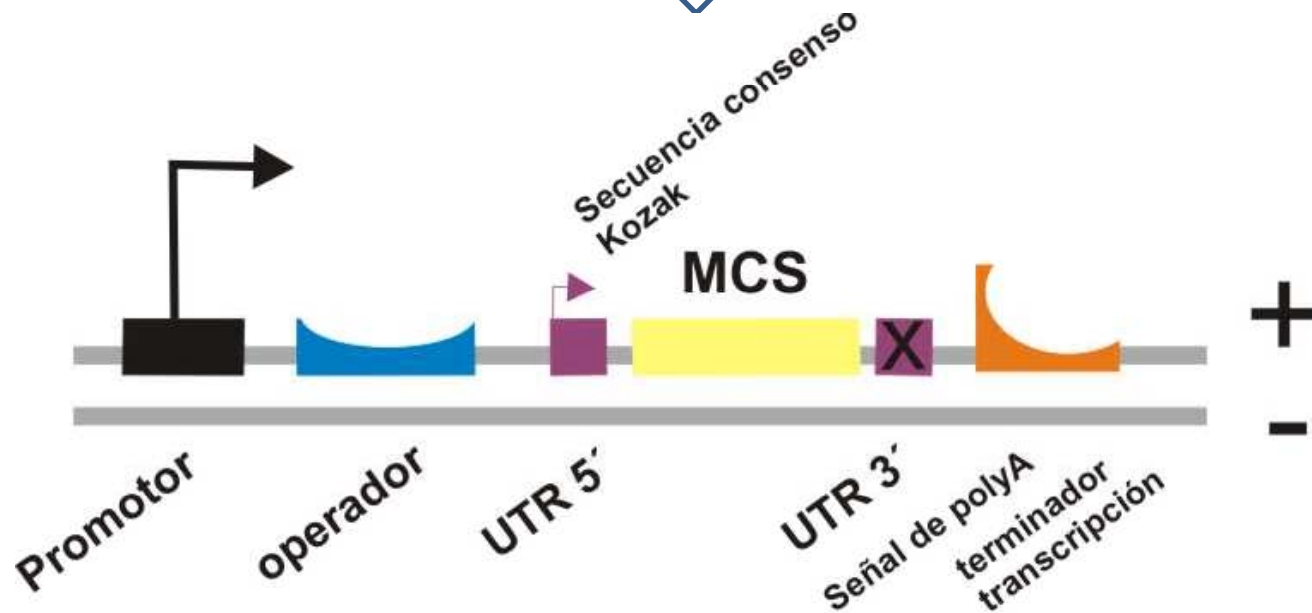
Sistema plásmidos/levaduras

- La **expresión de proteínas recombinantes en levaduras** comprende el **sistema eucariota** más **simple y económico**, tanto en **escala de laboratorio** como **industrial**.
- Las **levaduras** son **organismos eucariotas unicelulares** de **fácil manejo**, con **altas tasas de crecimiento** en medios de cultivo líquidos y conteniendo mecanismos moleculares propios de Eukarya.
- En vistas de su naturaleza, las levaduras permiten la correcta **formación de puentes disulfuro** en las proteínas que así lo necesiten, y permiten la **adición covalente** de **diferentes compuestos** a las cadenas laterales de algunos aminoácidos (acetilaciones, fosforilaciones, miristilaciones, glicosilaciones, etc.).
- Cuando se construyen los genes para su expresión en sistemas eucariotas, deben considerarse las **necesidades y requisitos** de la **genética eucariota**.

Expresión de proteínas recombinantes

Casete de clonado para un gen eucariota

Entre las consideraciones en la construcción del gen, deben incorporarse todos los componentes típicos de la sintaxis génica eucariota



Expresión de proteínas recombinantes

Secuencia consenso de Kozak

La **secuencia de Kozak** es una región consenso que junto con el **Cap** (o en su defecto un IRES) es **importante** para la correcta **traducción de los mRNA eucariotas**.

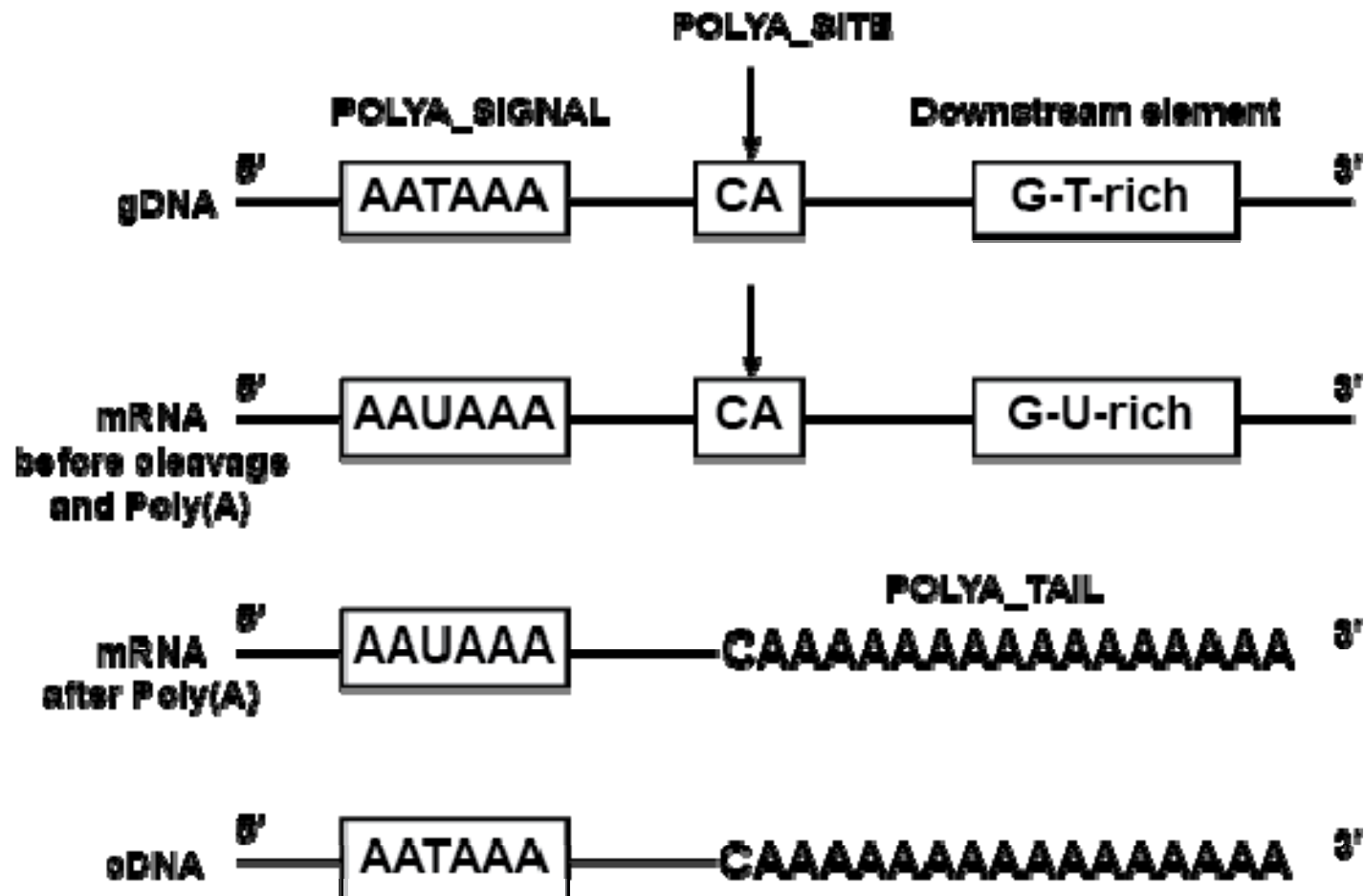
GCCGCC(A/G)⁻³CCA¹UGG⁺⁴

└→ +1 de traducción

Las purinas **A** o **G** en posición -3 y **G** inmediatamente después del codón AUG son las que permiten la óptima iniciación de la traducción

Expresión de proteínas recombinantes

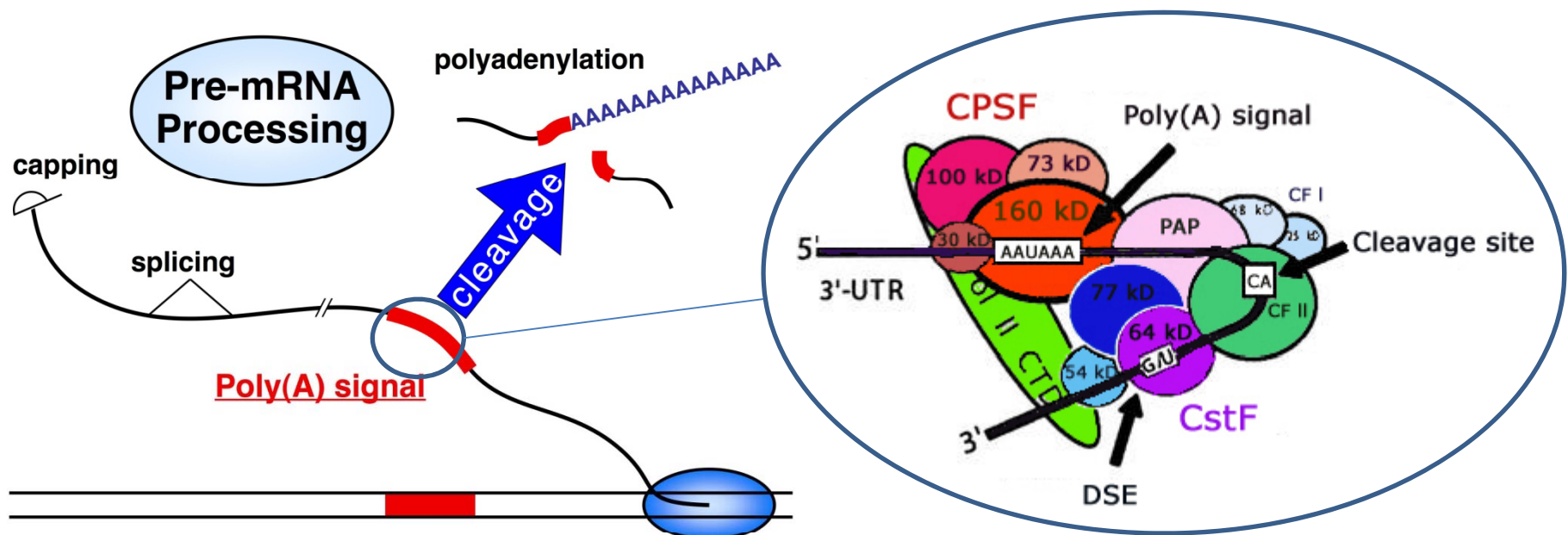
Señal de poliadenilación



Expresión de proteínas recombinantes

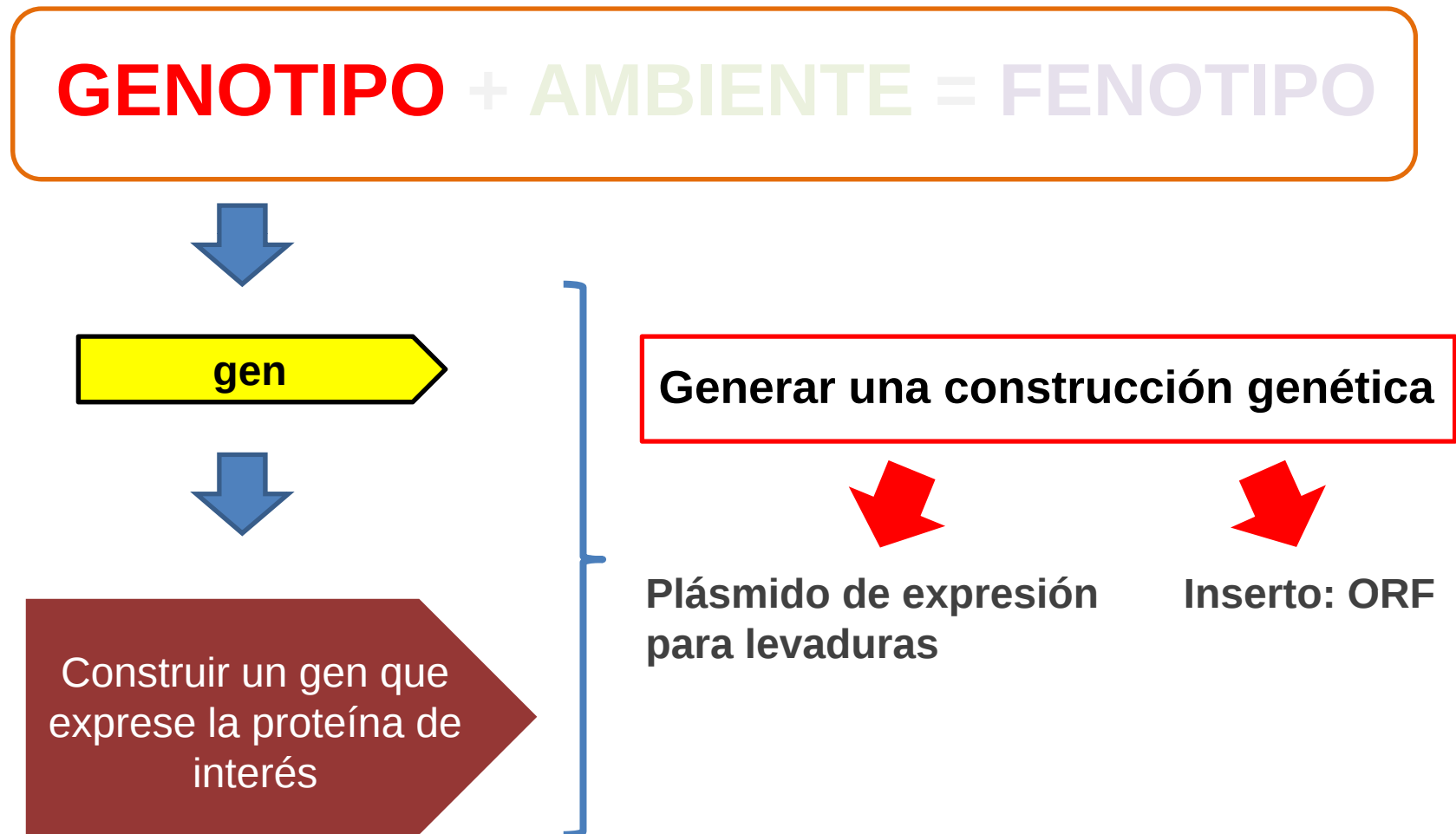
Señal de poliadenilación

Proceso molecular para la **terminación** de la transcripción en eucariotas



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

Los **plásmidos** que replican en **levaduras** poseen los siguientes elementos:

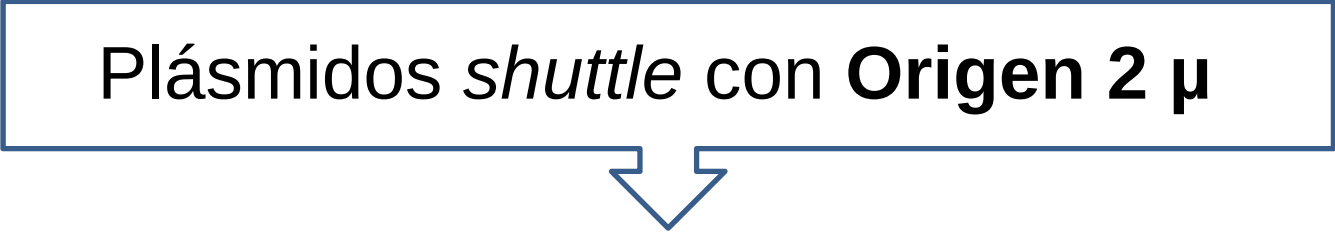
- *Secuencias que permiten la replicación y partición en levaduras.*
- *Genes marcadores que aportan ventajas para su selección en levaduras.*
- *Sitios de clonado múltiple rodeados de elementos genéticos adecuados para construir un gen eucariota.*
- *Secuencias que permiten la replicación y partición en Escherichia coli.*
- *Genes marcadores que aportan ventajas para su selección en bacterias.*

Son plásmidos **shuttle** (replican en dos organismos). En bacterias se realiza la construcción y en levaduras se realiza la expresión.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

Plásmidos *shuttle* con Origen 2 μ

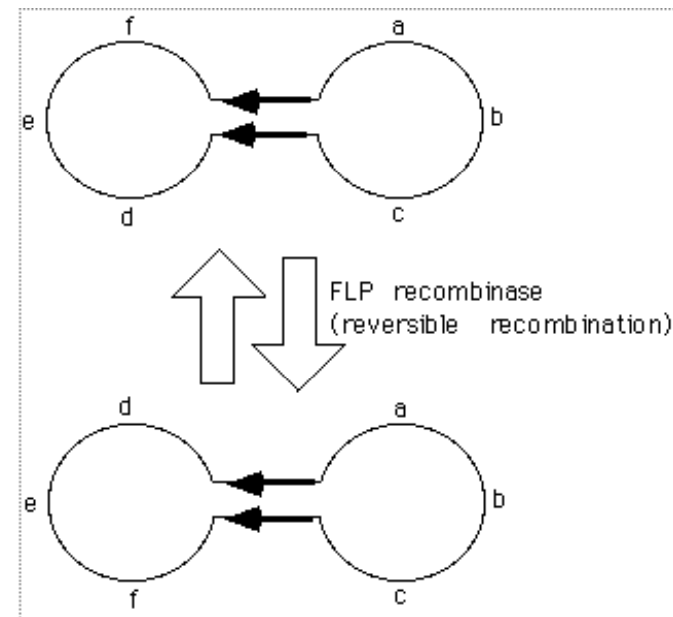
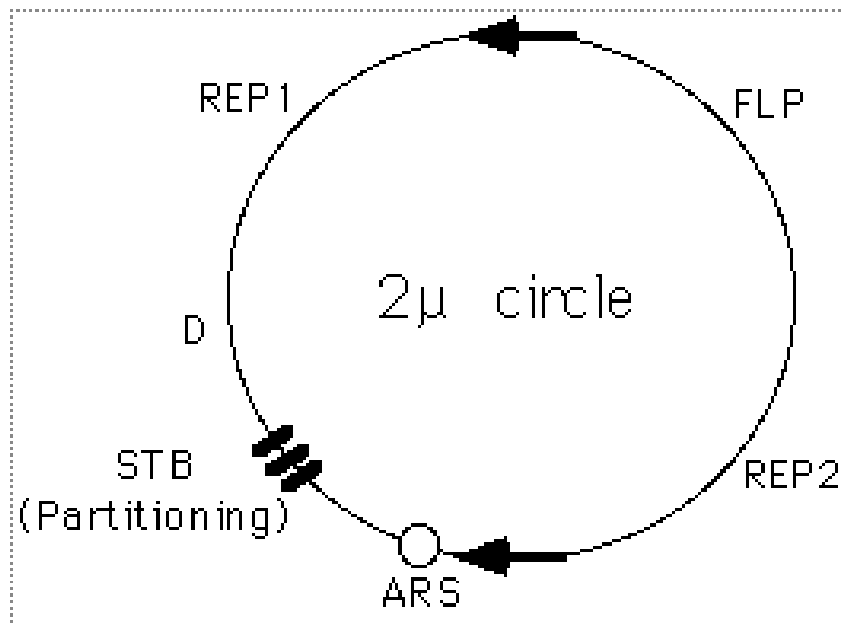


- Poseen un origen de replicación derivado del plásmido de levaduras denominado **2 μ** .
- Este origen permite generar entre **25 y 200 copias** de plásmido **por célula**.
- Posee algún **gen marcador** para su **selección** en levaduras; generalmente es un gen que codifica una **enzima de biosíntesis** para algún **aminoácido** o **nucleótido** (*his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, etc.)
- Poseen **ORI ColE1*** y **gen de resistencia** a antibióticos para su selección y mantenimiento en ***Escherichia coli***.

Expresión de proteínas recombinantes

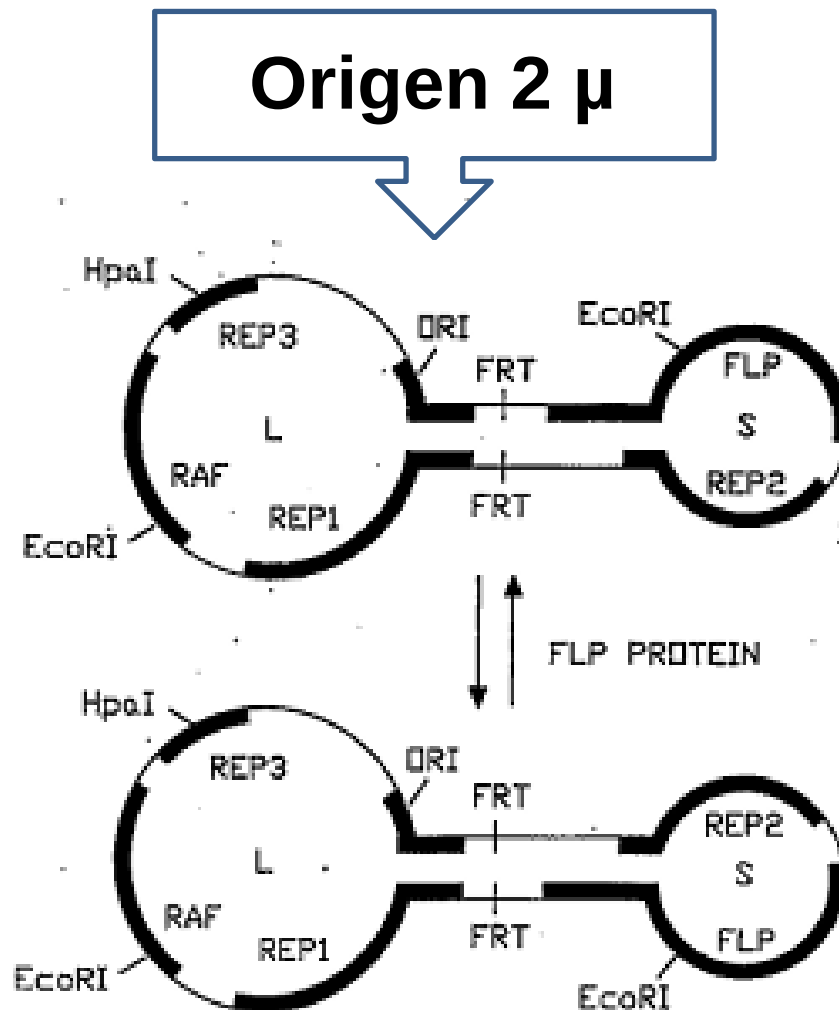
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

Origen 2 μ



Expresión de proteínas recombinantes

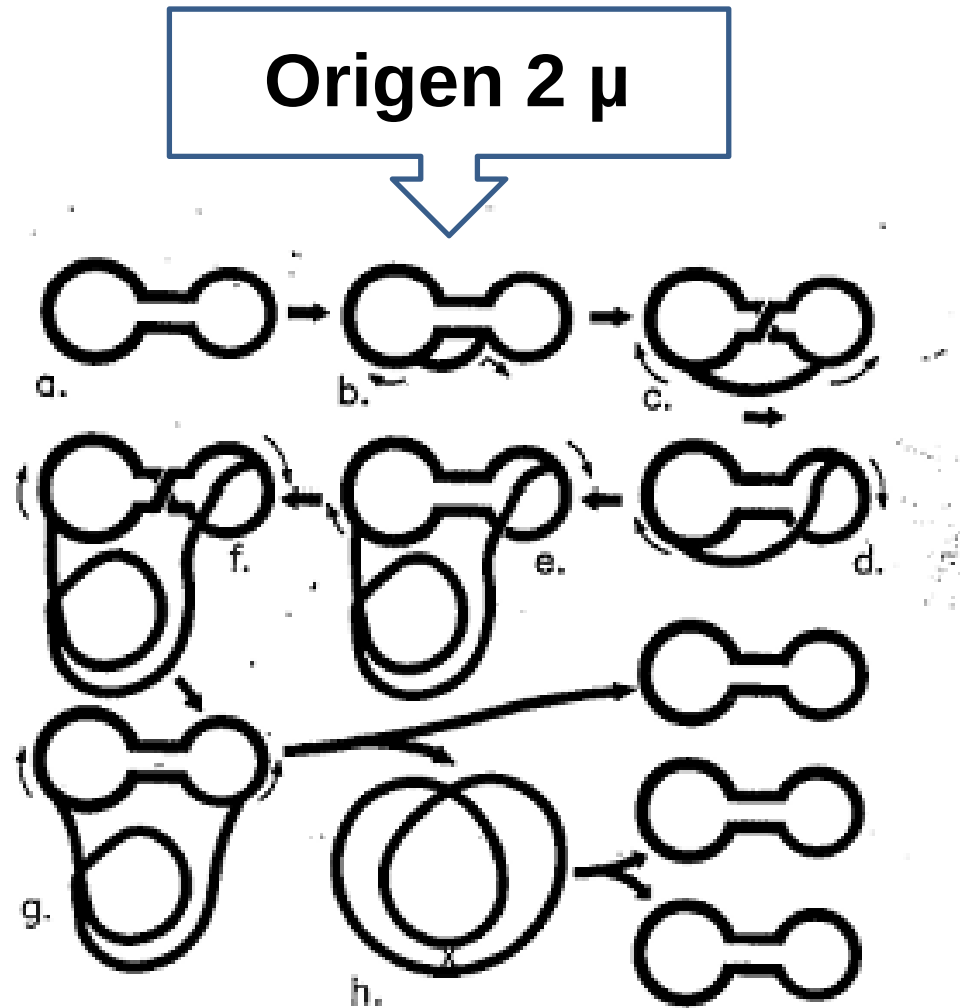
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



- Este sistema comienza con una estrategia de replicación **bidireccional**.
- Luego, pasa a un sistema de **círculo rodante** valiéndose de las secuencias *flip* y de la recombinasa FLP.
- De esta manera, **aprovecha** la **replicación celular** para generar numerosas copias.

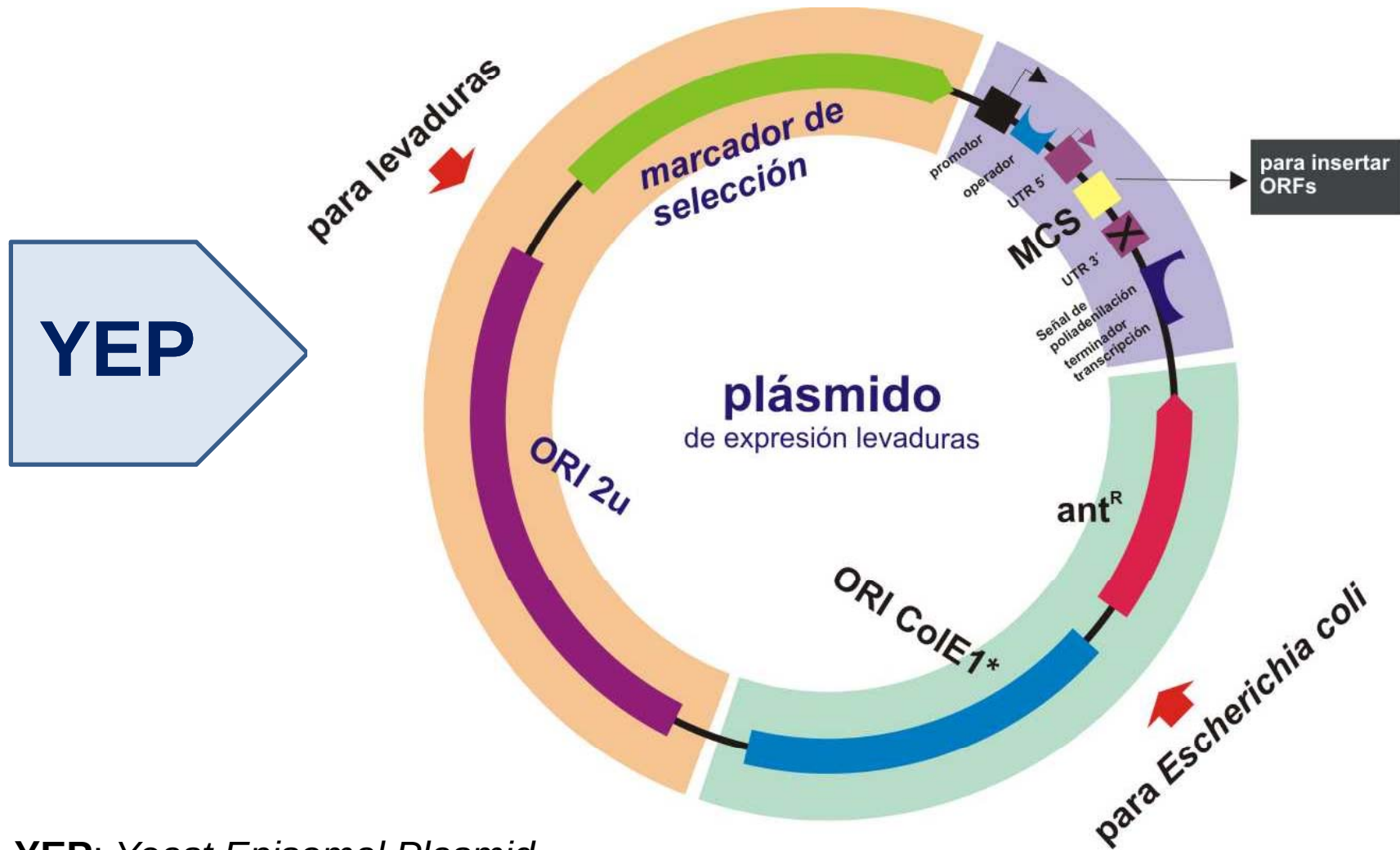
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YEP: *Yeast Episomal Plasmid*

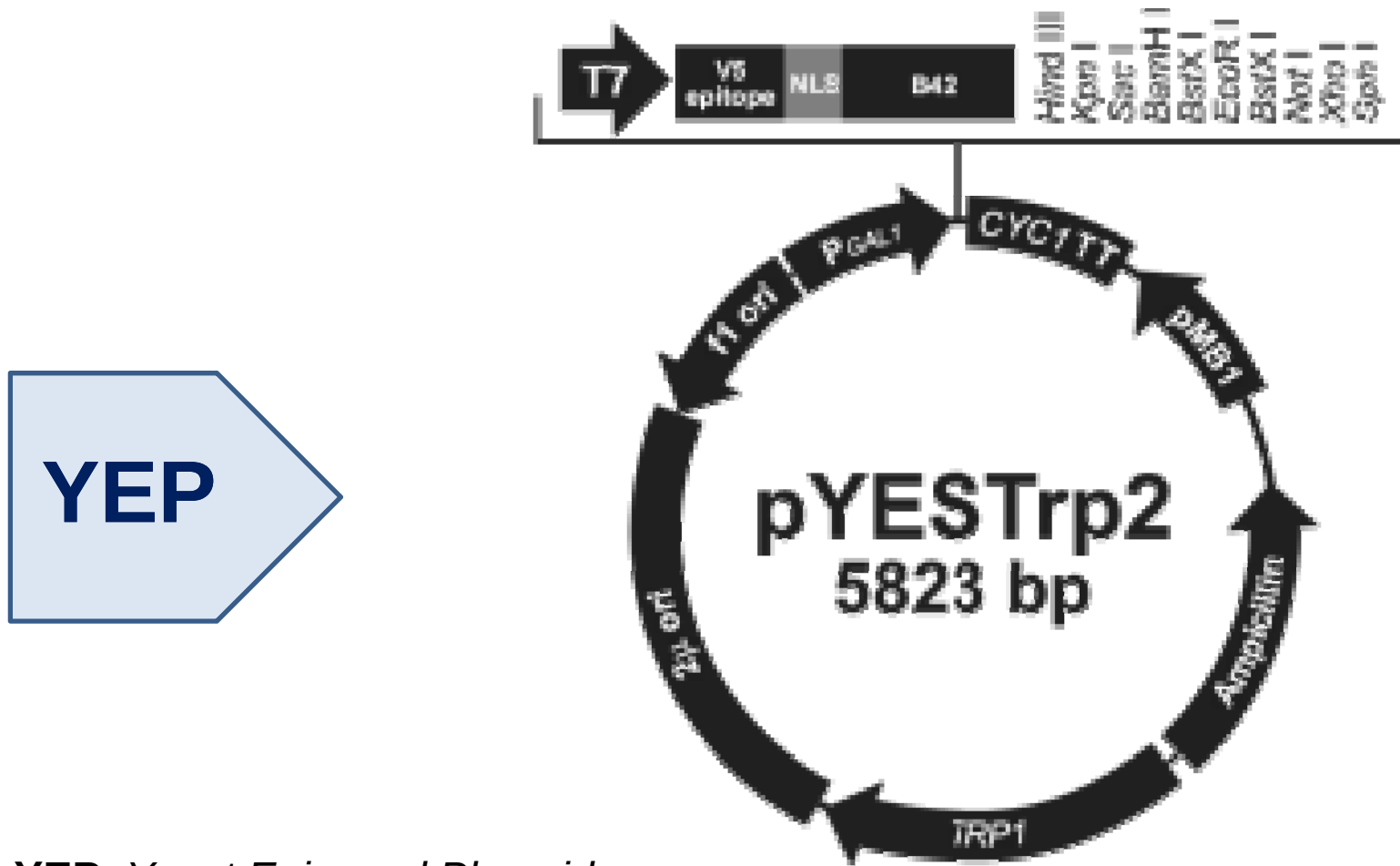
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YEP: *Yeast Episomal Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YEP: *Yeast Episomal Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

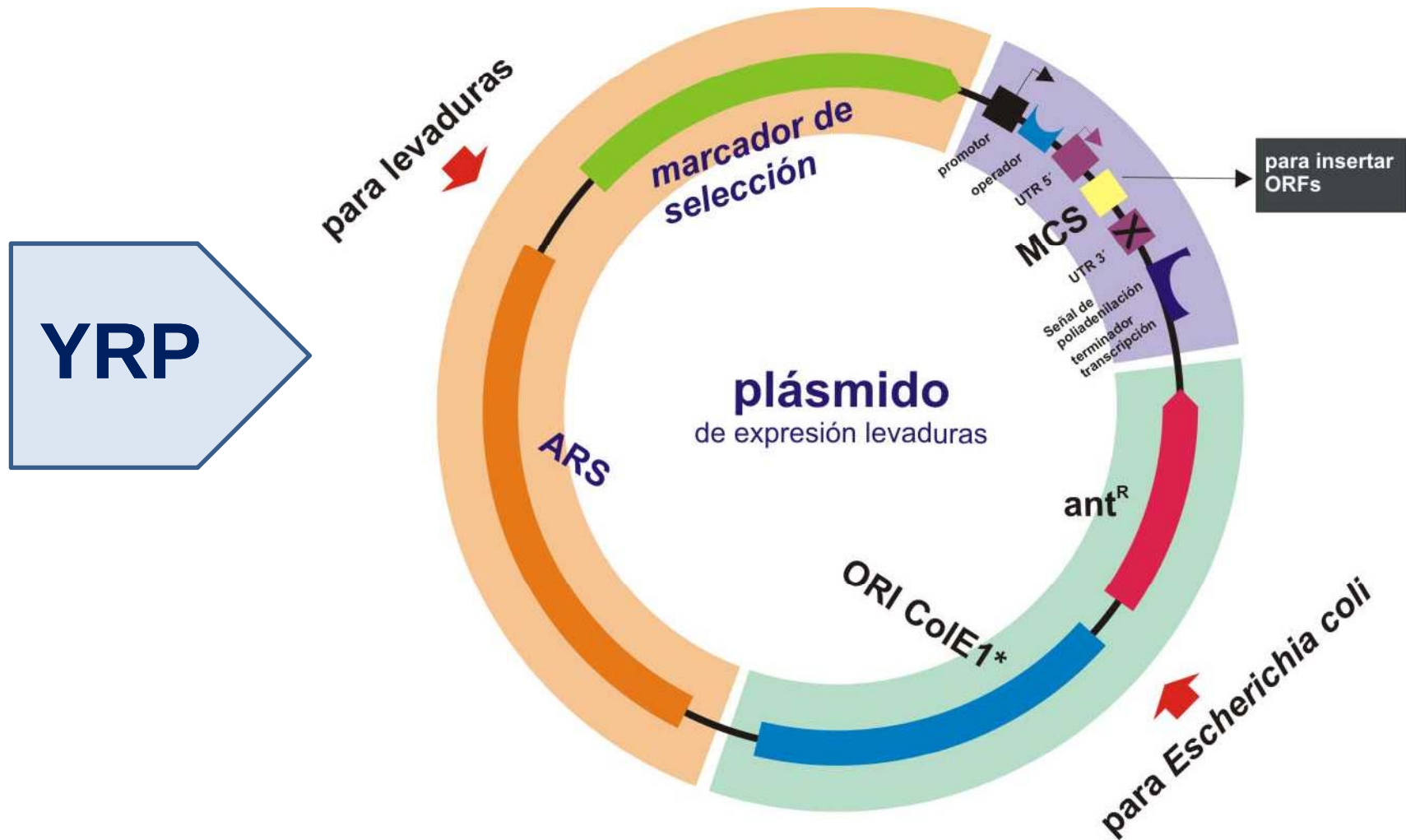
Plásmidos *shuttle* con **secuencia ARS**



- Poseen un **origen de replicación autónomo** (ARS; *autonomous replication sequence*) derivado de cromosomas de levaduras.
- Este origen permite generar entre **1 y 20 copias** de plásmido **por célula**. Es relativamente inestable entre generaciones.
- Posee algún **gen marcador** para su **selección en levaduras**; generalmente es un gen que codifica una **enzima de biosíntesis** para algún aminoácido o nucleótido (*his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, etc.)
- Poseen **ORI ColE1*** y **gen de resistencia a antibióticos** para su selección y mantenimiento en *Escherichia coli*.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YRP: *Yeast Replicating Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

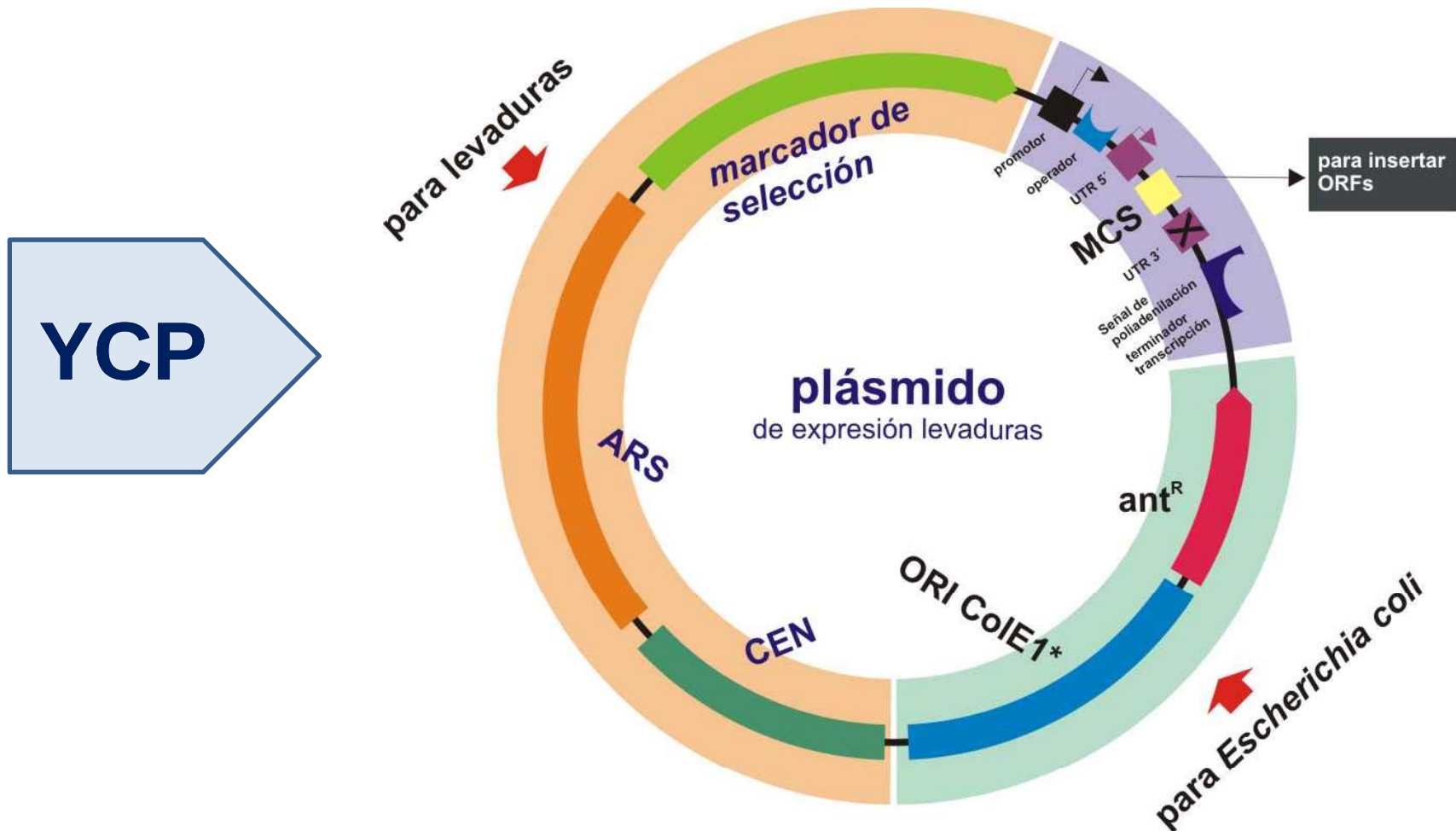
Plásmidos *shuttle* con **secuencia ARS y CEN**



- Poseen un **origen de replicación autónomo** (ARS; *autonomous replication sequence*) derivado de cromosomas de levaduras.
- Poseen la **región centromérica** (CEN) de algún cromosoma de levaduras
- Este origen permite generar entre **1 y 2 copias** de plásmido **por célula**.
- Posee algún **gen marcador** para su selección en levaduras; generalmente es un gen que codifica una **enzima de biosíntesis** para algún aminoácido o nucleótido (*his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, etc.)
- Poseen **ORI ColE1*** y **gen de resistencia a antibióticos** para su selección y mantenimiento en *Escherichia coli*.

Expresión de proteínas recombinantes

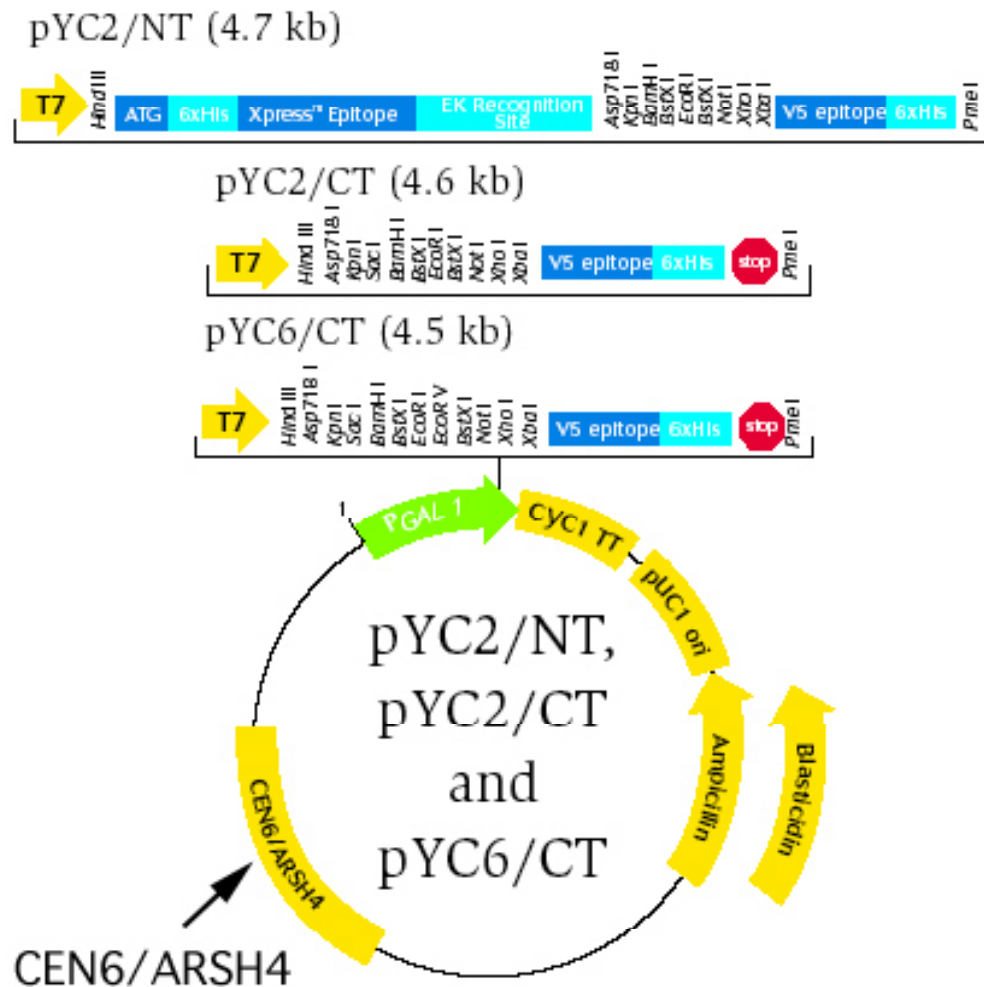
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YCP: *Yeast Centromere Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

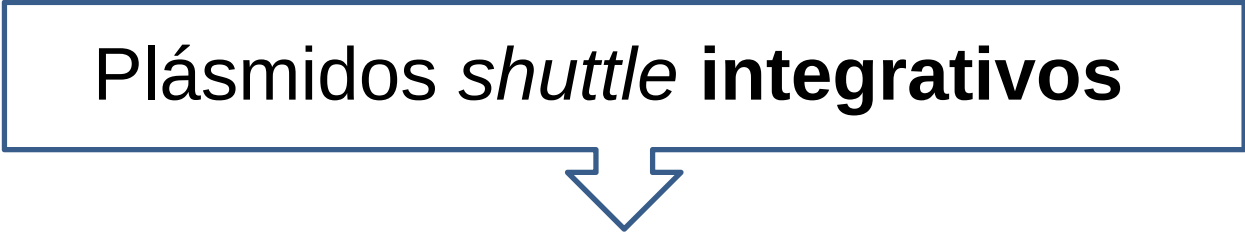


YRP: *Yeast Centromere Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

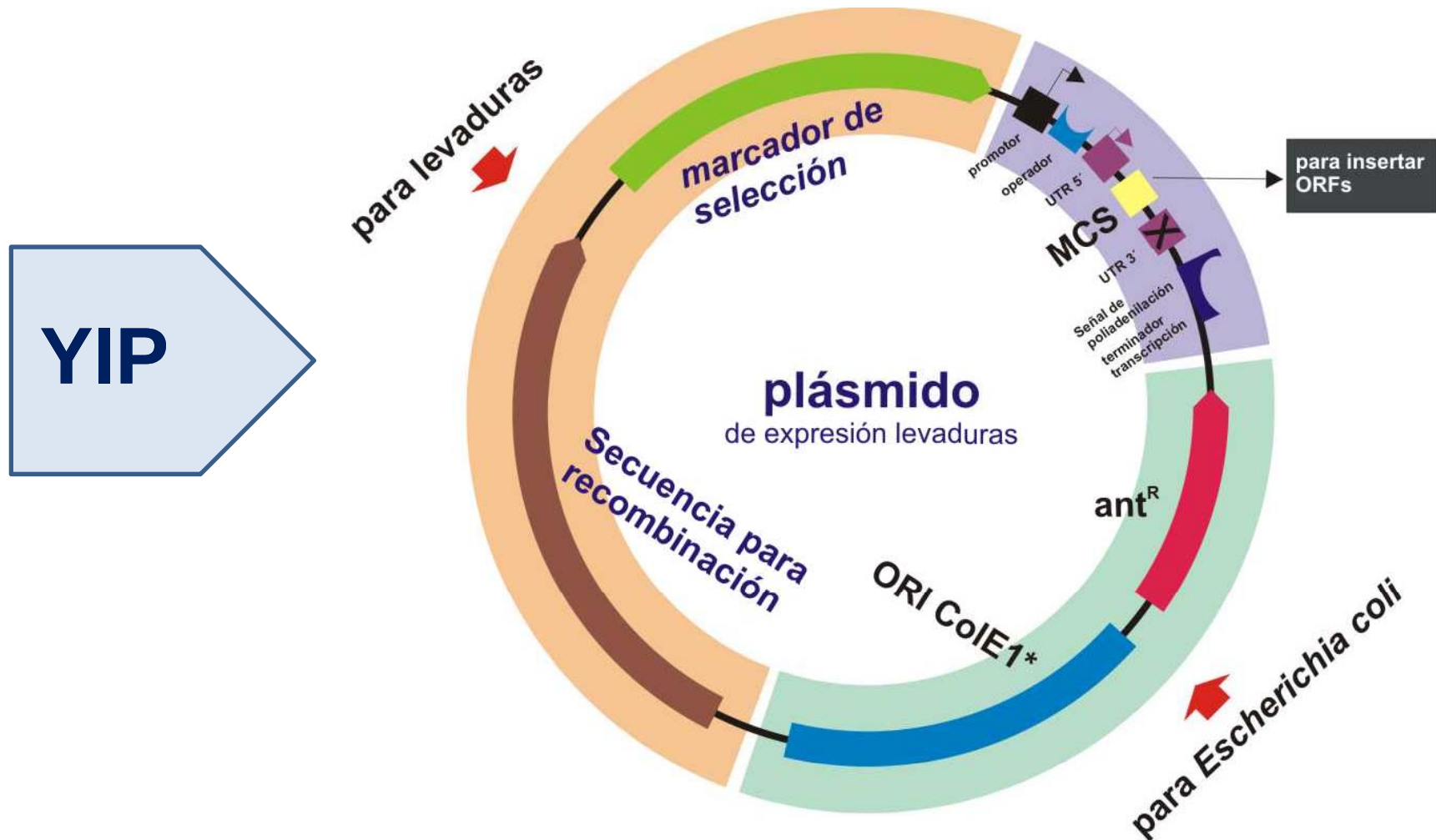
Plásmidos *shuttle* integrativos



- No llevan señales de **replicación** para levaduras.
- Llevan **secuencias** de genes de **levaduras** para **posibilitar** la **integración** mediante eventos de **recombinación homóloga**.
- Queda **1 copia por célula** luego de la integración en el genoma.
- Posee algún **gen marcador** para su selección en levaduras; generalmente es un gen que codifica una **enzima de biosíntesis** para algún aminoácido o nucleótido (*his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, etc.)
- Poseen **ORI ColE1*** y **gen de resistencia a antibióticos** para su selección y mantenimiento en *Escherichia coli*.

Expresión de proteínas recombinantes

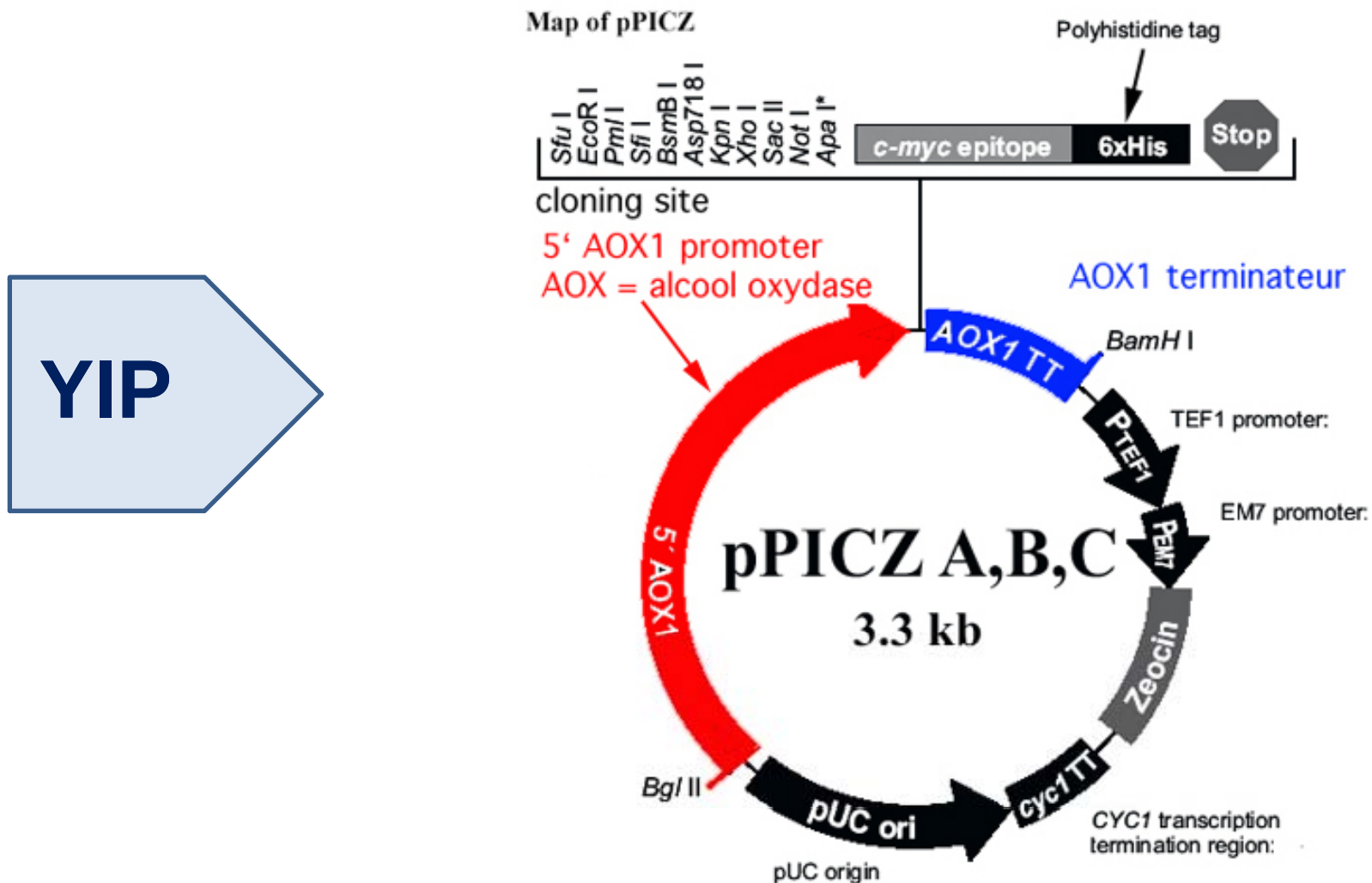
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YIP: *Yeast Integrating Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



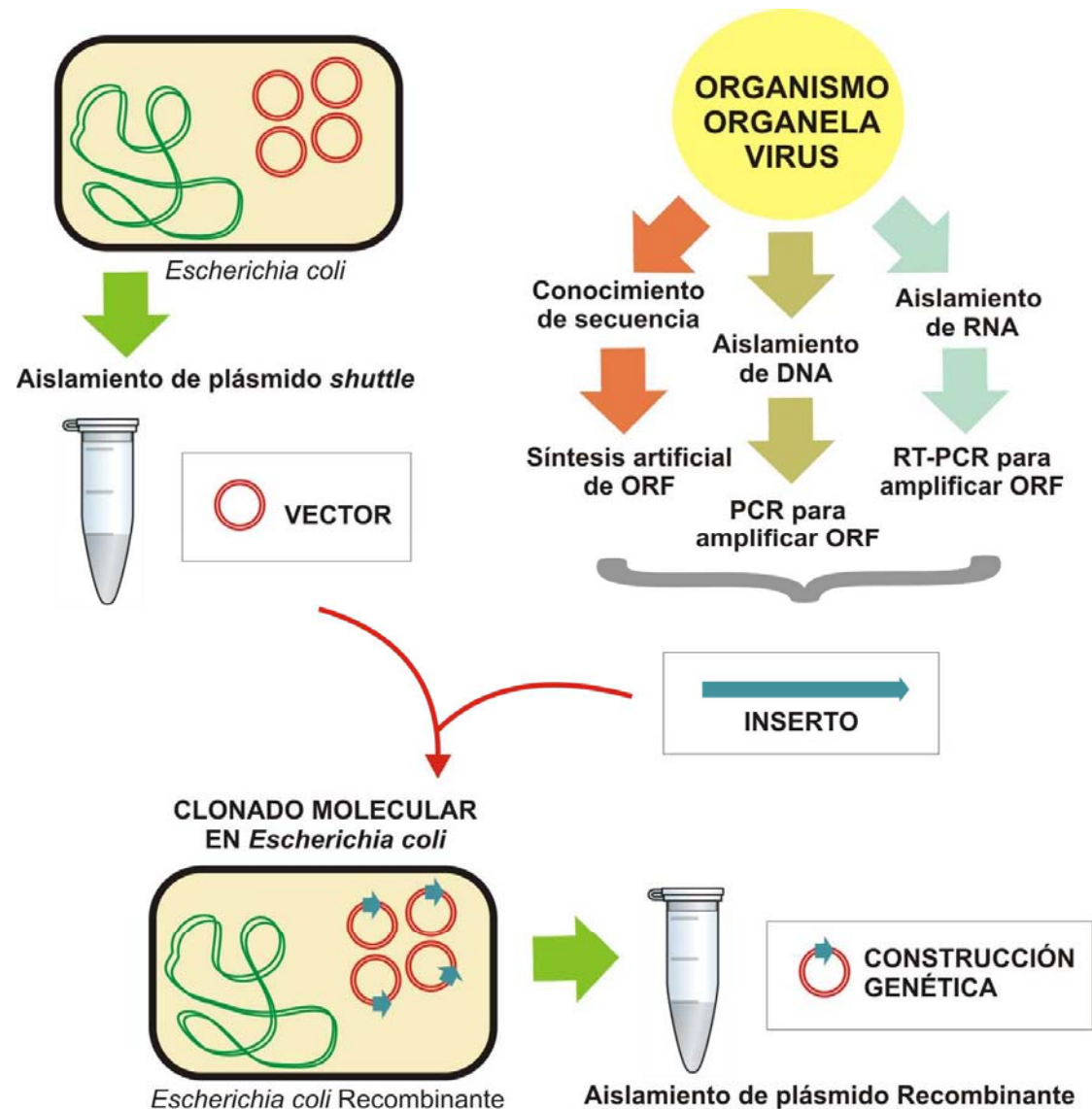
YIP: *Yeast Integrating Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

1^{ra} Etapa

Clonado molecular
en bacterias



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de la levadura

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



organismo

Construir un gen que
exprese la proteína de
interés

Seleccionar el
organismo adecuado
para la expresión del
gen

Seleccionar
especies de
levaduras

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de la levadura

Las levaduras más utilizadas son:

- ***Saccharomyces cerevisiae*** (genoma secuenciado, fisiología muy estudiada, capaz de exportar proteínas, capaz de modificar postraduccionalmente proteínas, organismo aceptado como GRAS—*Generally Recognised as Safe*-).
- ***Pichia pastoris*** (genoma secuenciado, levadura metilotrófica, simple y económica de cultivar, capaz de exportar proteínas, capaz de modificar postraduccionalmente proteínas).
- ***Kluyveromyces lactis*** (utilizada en la industria láctea, productora de proteínas recombinantes en altas concentraciones).

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de la levadura

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, May 2004, p. 2639–2646
0099-2240/04/\$08.00+0 DOI: 10.1128/AEM.70.5.2639–2646.2004
Copyright © 2004, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 70, No. 5

In Vivo Synthesis of Mammalian-Like, Hybrid-Type N-Glycans in *Pichia pastoris*

Wouter Vervecken,[†] Vladimir Kaigorodov,[†] Nico Callewaert,^{†‡} Steven Geysens,
Kristof De Vusser, and Roland Contreras*

*Fundamental and Applied Molecular Biology, Department of Molecular Biomedical Research, Ghent
University and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Ghent, Belgium*

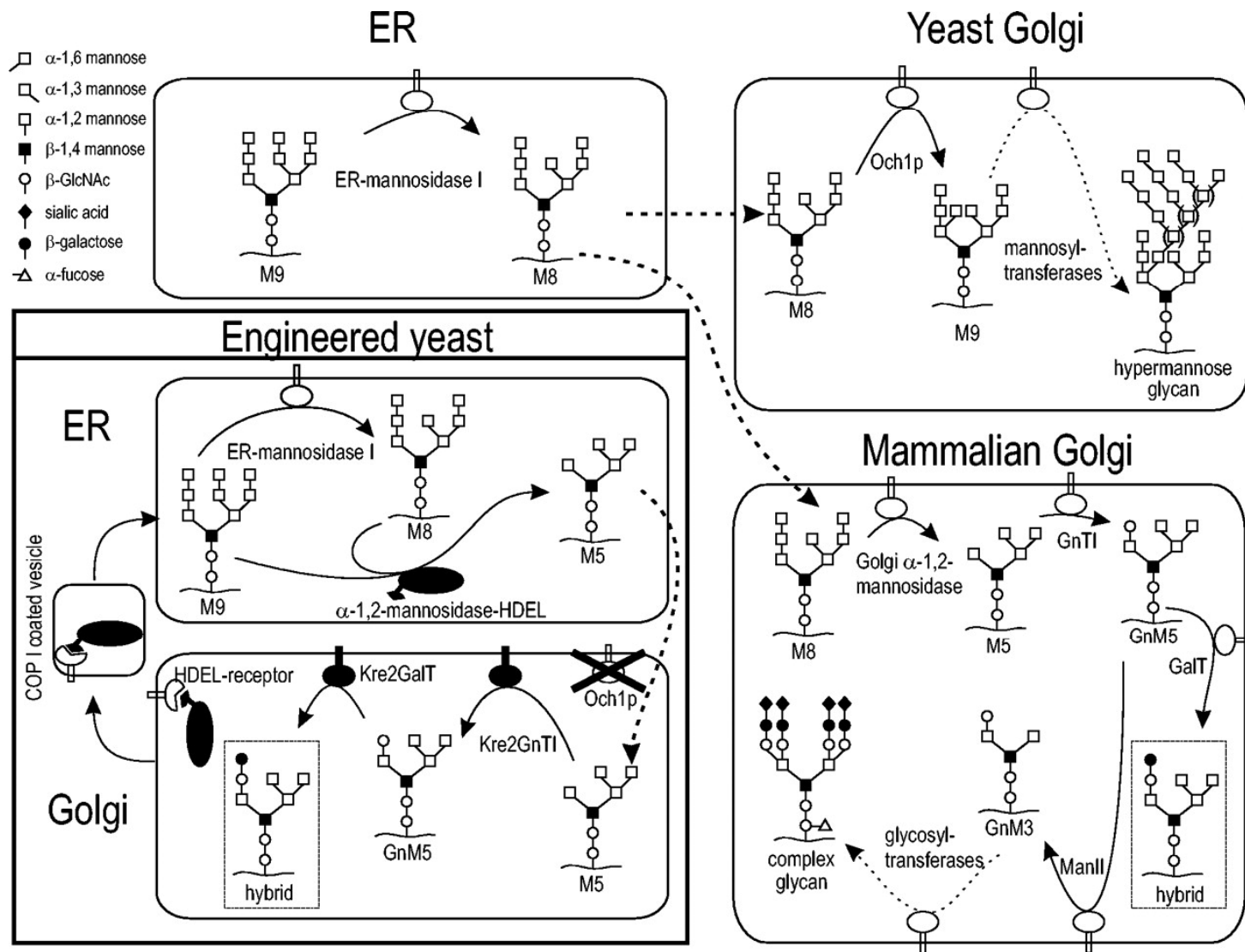
Received 18 November 2003/Accepted 29 January 2004

The *Pichia pastoris* N-glycosylation pathway is only partially homologous to the pathway in human cells. In the Golgi apparatus, human cells synthesize complex oligosaccharides, whereas *Pichia* cells form mannose structures that can contain up to 40 mannose residues. This hypermannosylation of secreted glycoproteins hampers the downstream processing of heterologously expressed glycoproteins and leads to the production of protein-based therapeutic agents that are rapidly cleared from the blood because of the presence of terminal mannose residues. Here, we describe engineering of the *P. pastoris* N-glycosylation pathway to produce nonhyperglycosylated hybrid glycans. This was accomplished by inactivation of *OCH1* and overexpression of an α -1,2-mannosidase retained in the endoplasmic reticulum and *N*-acetylglucosaminyltransferase I and β -1,4-galactosyltransferase retained in the Golgi apparatus. The engineered strain synthesized a nonsialylated hybrid-type N-linked oligosaccharide structure on its glycoproteins. The procedures which we developed allow glycan engineering of any *P. pastoris* expression strain and can yield up to 90% homogeneous protein-linked oligosaccharides.

Pichia pastoris humanizada en rutas de glicosilación.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de la levadura

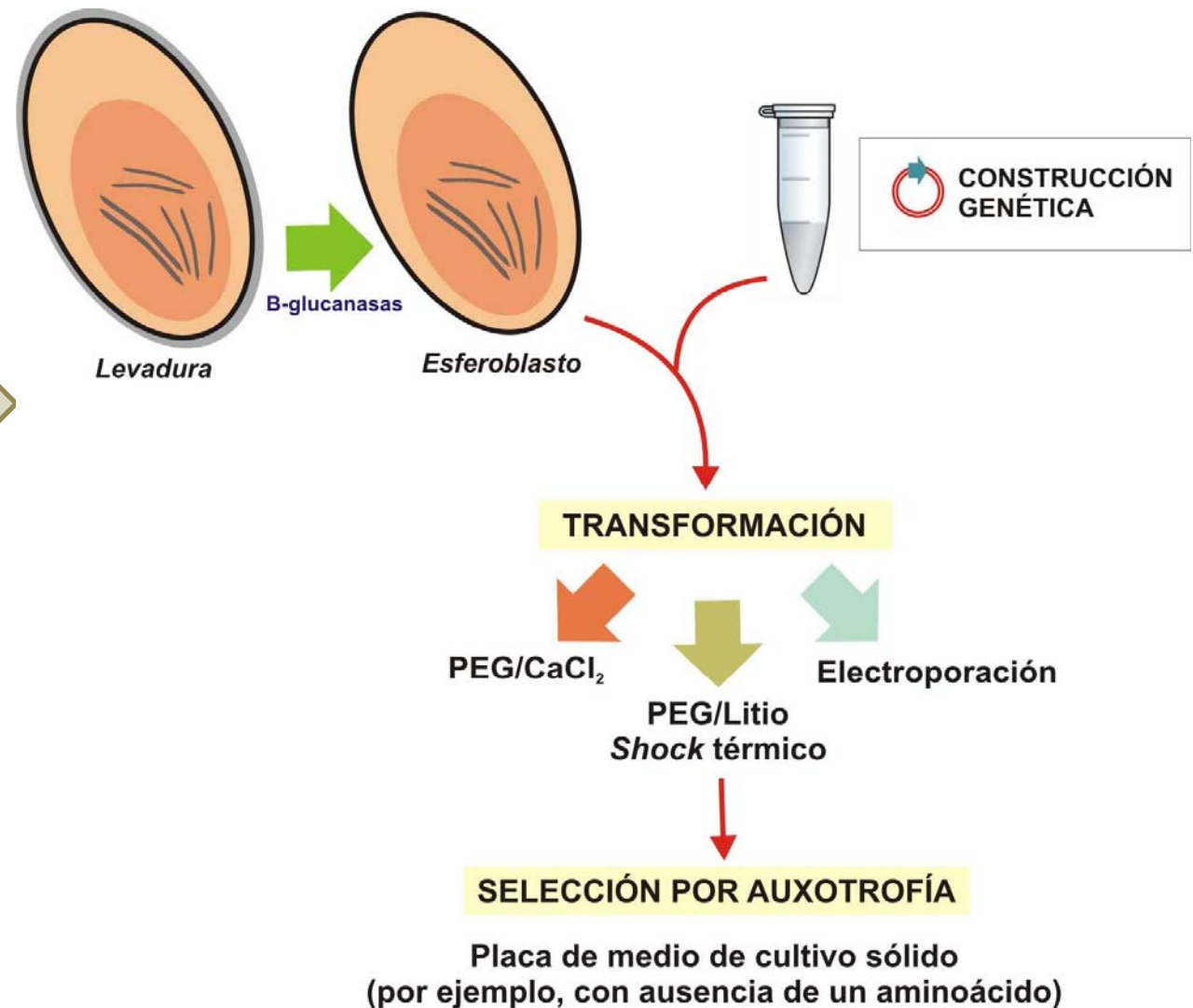


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras

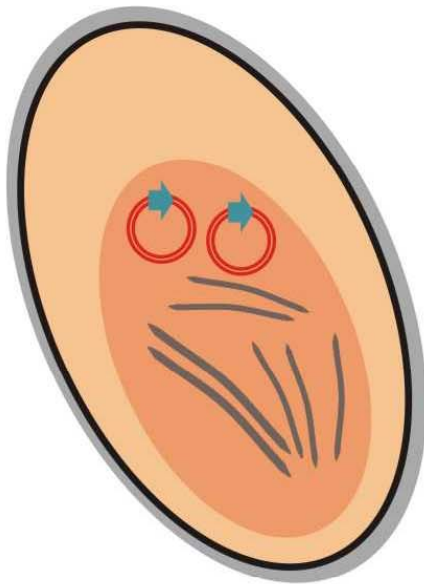
2^{da} Etapa

Transferencia a levaduras

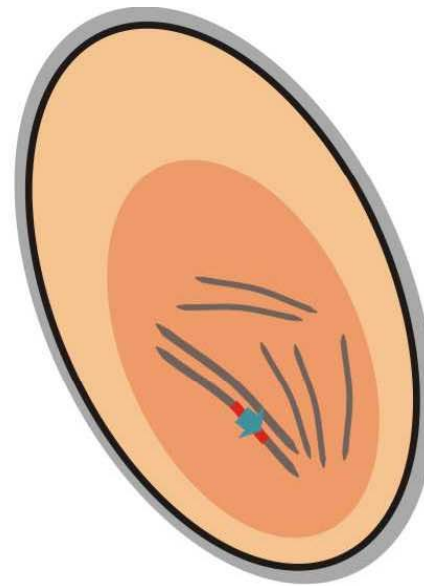


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras



Levadura Recombinante
(con plásmidos YEP, YRP, YCP)



Levadura Recombinante
(con integración de plásmidos YIP)

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras

Table 1. Protocol for the spheroplast method developed by Burgers and Percival⁷

Centrifuge cells and spheroplasts at 400–600 g and 200–300 g, respectively.

1. Grow the cells overnight with vigorous aeration in 50 ml of YPD (1% yeast extract, 2% bactopectone, and 2% dextrose) to a concentration of about 3×10^7 cells/ml and harvest.
2. Wash the cells successively with 20 ml of sterile water and 20 ml of 1 M sorbitol by resuspension, followed by 5-min spins. Resuspend them in 20 ml of SCEM [1 M sorbitol, 0.1 M sodium citrate (pH 5.8), 10 mM EDTA and 30 mM 2-mercaptoethanol], add 1,000 U of lyticase, and incubate at 30°C with occasional inversion.
3. After spheroplasting, measure the decrease in the OD₆₀₀ of a 10-fold dilution of spheroplasts in water. Harvest the spheroplasts for 3–4 min when the spheroplasting proceeds to 90% (~15–20 min).
4. Gently resuspend the spheroplasts in 20 ml of 1 M sorbitol by using a 1-ml pipette and pellet for 3–4 min. Then, gently resuspend them in 20 ml of STC [1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 10 mM CaCl₂] and pellet again for 3–4 min. Resuspend this pellet in 2 ml of STC.
5. Mix aliquots (100 µl) with plasmid DNA and carrier DNA (calf thymus or *E. coli*) added to a total of 5 µg of DNA in <10 µl.
6. After 10 min at room temperature, add 1 ml of PEG [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂ and 20% PEG 8000; filter-sterilized], gently resuspend the spheroplasts, and harvest them for 4 min after another 10 min.
7. Resuspend the pellet in 150 µl of SOS (1 M sorbitol, 6.5 mM CaCl₂, 0.25% yeast extract and 0.5% bactopectone; filter-sterilized) and leave at 30°C for 20–40 min. Dilutions of the spheroplasts are made in the same medium.
8. Add 8 ml of TOP [1 M sorbitol and 2.5% agar in selective SD medium (0.67% yeast nitrogen base and 2% glucose)] kept at 45–46°C. Invert the tube quickly several times to mix and plate the suspension immediately on selective SORB plates (SD plates containing 0.9 M sorbitol and 3% glucose).

Table 2. Original protocol for the lithium method developed by Ito et al.²

1. Grow the yeast cells aerobically on 100 ml of YPD medium at 30°C with reciprocation. At the mid-log phase, harvest the cells by centrifugation, wash once with TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1.0 mM EDTA] and suspend in TE to a final concentration of 2×10^8 cells/ml.
2. To a 0.5-ml portion of this cell suspension, add an equal volume of 0.2 M metal ions (LiAc). After 1 h at 30°C with shaking (140 rpm; stroke, 7.0 cm), incubate 0.1 ml of the cell suspension statically with 15 µl of a plasmid DNA solution (0.70 µg/ml) at 30°C for 30 min.
3. Add an equal volume of 70% PEG 4000 dissolved in water and sterilized at 120°C for 15 min and mix thoroughly on a vortex mixer. After standing for 1 h at 30°C, incubate the suspension at 42°C for 5 min.
4. Immediately cool the cells to room temperature, wash twice with water, and suspend in 1.0 ml of water.
5. For selecting the yeast transformants, directly spread 0.1 ml of the cell suspension on selective solid medium.

Kawai et al, 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi Methods and possible underlying mechanism.. Bioengineered Bugs 1:6, 395-403.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras

Table 3. Protocol for the LiAc/single-stranded carrier DNA/PEG method developed by Gietz and Woods¹⁷

1. Inoculate the yeast strain into 5 ml of liquid medium (2x YPAD or synthetic complete [SC] selection medium) and incubate overnight at 30°C. Place a bottle of double-strength YPAD broth (2x YPAD) and 250 ml culture flask in the incubator as well.
2. Determine the titer of the yeast culture by measuring the OD₆₀₀ of a solution of 10 µl of the cells added to 1.0 ml of water in a spectrophotometer cuvette. For many yeast strains, a suspension containing 1 x 10⁸ cells/ml will give an OD₆₀₀ of 0.1.
3. Transfer 50 ml of the pre-warmed 2x YPAD to the pre-warmed culture flask and add 2.5 x 10⁸ cells to give a density of 5 x 10⁸ cells/ml. Incubate the flask on a rotary or reciprocating shaker at 30°C and 200 rpm. (Note: It is important to allow the cells to complete at least 2 divisions. Transformation efficiency remains constant for 3 to 4 cell divisions).
4. When the cell titer is at least 2 x 10⁷ cells/ml, which should take about 4 h, harvest the cells by centrifugation, wash the cells in 25 ml of sterile water, and wash again in 1 ml of sterile water.
5. Add water to a final volume of 1.0 ml and vigorous vortex-mixing to resuspend the cells. Pipette 100 µl samples (~10⁸ cells) into 1.5-ml microcentrifuge tubes, one for each transformation, centrifuge at top speed for 30 s, and discard the supernatant.
6. Add 360 µl of transformation mix, consisting of 240 µl PEG 3350 [50% (w/v)], 36 µl LiAc (1.0 M), 50 µl boiled single-stranded DNA (2.0 mg/ml), and 34 µl plasmid DNA plus water, to each transformation tube and resuspend the cells by vigorous vortex-mixing.
7. Incubate the tubes in a 42°C water bath for 40 min. [Note: The optimum time can vary for different yeast strains].
8. Microcentrifuge at top speed for 30 s and remove the transformation mix with a micropipette. Pipette 1.0 ml of sterile water into each tube, stir the pellet with a micropipette tip, and vortex.
9. Plate appropriate dilutions of the cell suspension onto SC selection medium.

Table 4. Protocol for electroporation of frozen competent cells developed by Suga and Hatakeyama¹⁸

1. Grow *S. pombe* cells in SD medium supplemented with appropriate nutrients to a density of approximately 1 x 10⁷ cells/ml at 30°C. Grow *S. cerevisiae* cells in YPD medium to a density of approximately 1 x 10⁷ cells/ml at 30°C.
2. Place the cultures on ice for 15 min just before harvesting. Collect the cells by centrifugation and wash the resulting pellet thrice with ice-cold sterilized water. Suspend this pellet in ice-cold freezing buffer containing 0.6–2.5 M sorbitol, 5–10 mM CaCl₂ and 10 mM 2-(4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazinyl)ethanesulphonic acid (HEPES; pH 7.5) to give a density of approximately 5 x 10⁸ cells/ml.
3. Dispense aliquots (0.1 ml) of the cell suspension in 1.5-ml microcentrifuge tubes, slowly freeze them, and store by placing them directly in a -80°C freezer (cooling rate = ~10°C/min).
4. For each electroporation, quickly thaw the frozen competent cells in a water bath at 30°C (warming rate = ~200°C/min) and wash once with 1 ml of ice-cold 1.0 M sorbitol by centrifugation. Resuspend the final pellet in 1.0 M sorbitol to give a density of 1–2 x 10⁹ cells/ml.
5. Mix the cell suspension with 0.5–10.0 ng of purified plasmid DNA and then transfer to a chilled cuvette with a 0.2-cm electrode gap. Apply a high electric pulse to the cell suspension, by using the Bio-Rad Gene Pulser II with Pulse Controller Plus.
6. Immediately dilute the electroporated cells in 1 ml of ice-cold 1.0 M sorbitol and spread an aliquot (0.1–0.2 ml) on minimal selection plates. For *S. cerevisiae*, the minimal selection plates contain 1.0 M sorbitol as an osmotic stabilizer.
7. The transformant colonies appear within 4–6 days at 30°C.

Kawai et al, 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi Methods and possible underlying mechanism.. Bioengineered Bugs 1:6, 395-403.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras

Table 5. Effects of LiAc, heat shock and PEG on the transformation of intact cells and spheroplasts

	Intact cells	Spheroplasts
LiAc	Enhances the transformation efficiency and frequency (although not indispensable). ^{2,38}	No effect on the transformation frequency. ³⁸
	Increases the permeability of intact cells. ³⁷	
Heat shock	Enhances the transformation efficiency (although not indispensable). ^{2,13}	No effect on the transformation efficiency. ⁷⁴
	Increases the permeability of intact cells. ³⁷	
PEG	Indispensable for transformation efficiency. ^{2,13}	Not indispensable for transformation frequency but enhances the frequency. ³⁸
	Pre-incubation enhances the transformation efficiency and frequency. ³⁶	
	Increases the permeability of intact cells. ³⁷	Indispensable for DNA attachment. ³⁸
	Indispensable for DNA attachment. ³⁸	

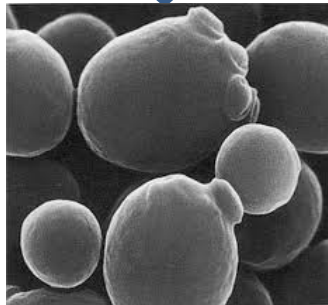
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Ensayos de inducción

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



levadura



proteína

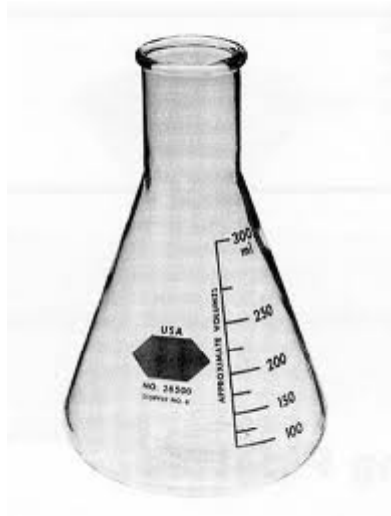
Construir un gen que exprese la proteína de interés

Seleccionar la levadura adecuada para la expresión del gen

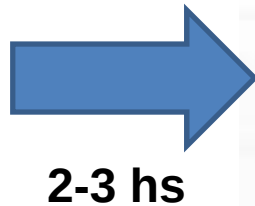
Evaluar la producción de la proteína de interés

Expresión de proteínas recombinantes

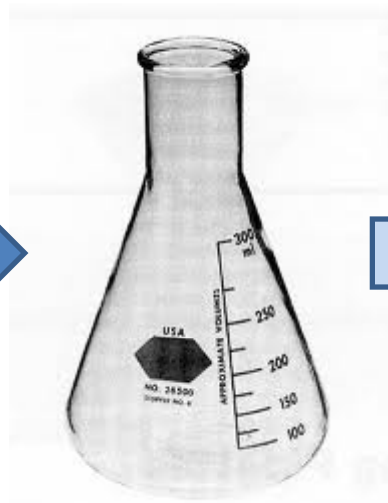
Ensayos de inducción



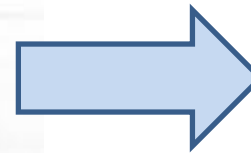
Cultivo
(en medio adecuado
para el mantenimiento
de la levadura
recombinante)



2-3 hs

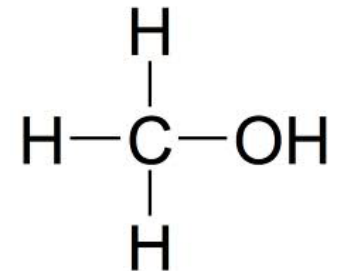


Cultivo crecido
(en medio adecuado, a
200 rpm y 25-30°C)



DO₆₀₀
(Determinación de fase
de cultivo)

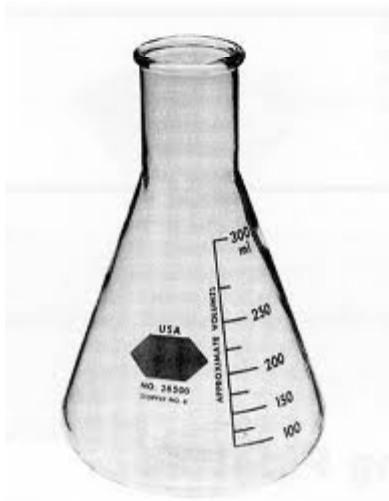
Inducción
(introducción del agente
inductor a
concentración deseada)



(por ejemplo metanol,
para las metilotróficas)

Expresión de proteínas recombinantes

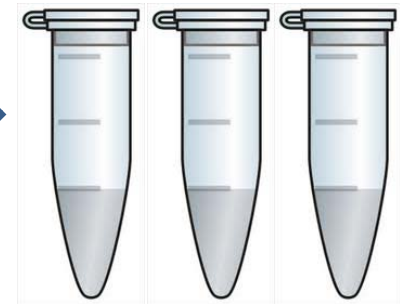
Ensayos de inducción



Cultivo Inducido
(en medio adecuado, a
200 rpm y 25-30°C)



**Incubar a temperatura deseada
y tiempo deseado**

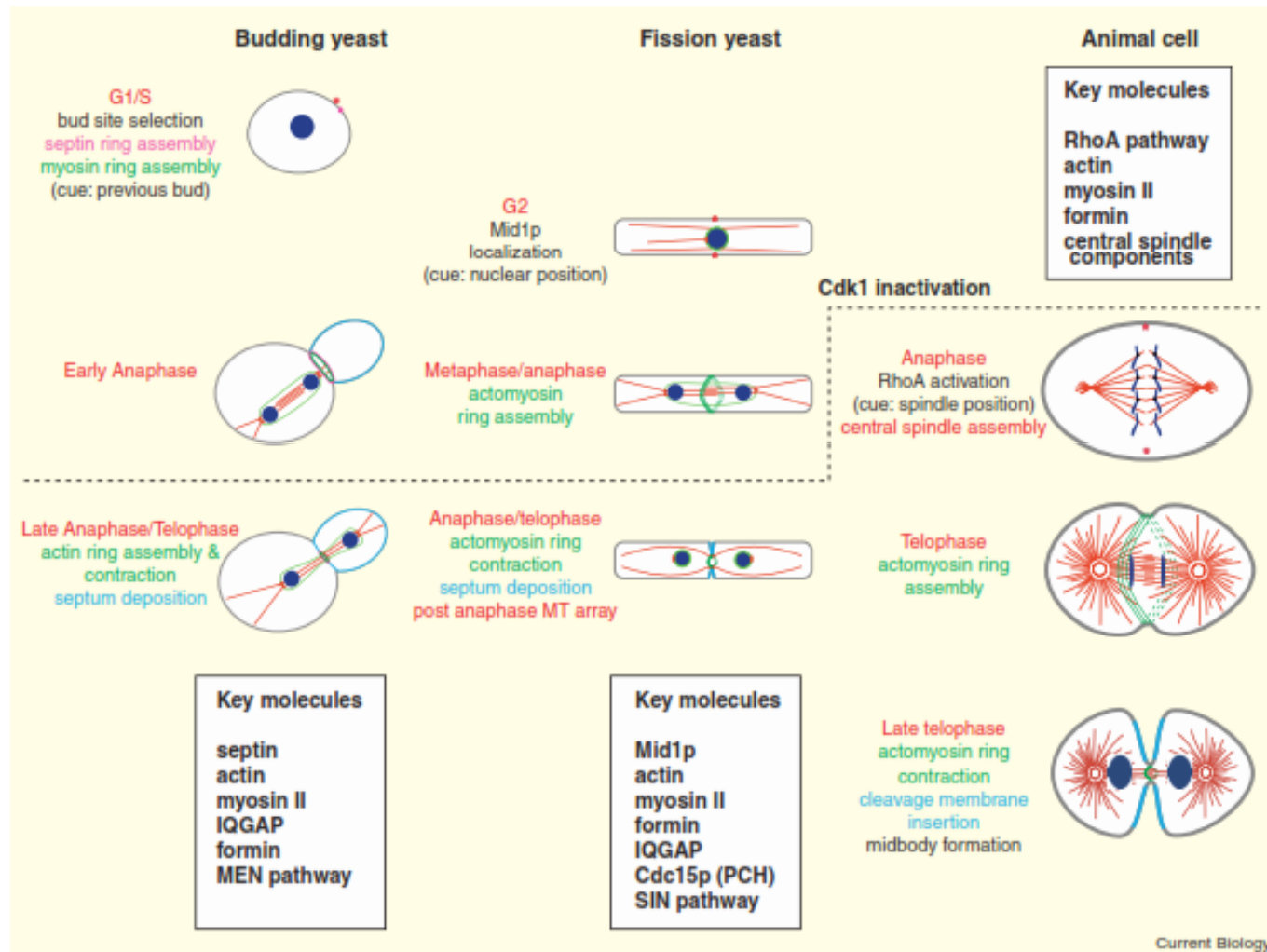


**Colecta de
muestras**
(colecta de levaduras y/o
sobrenadante para su
posterior análisis)

Expresión de proteínas recombinantes

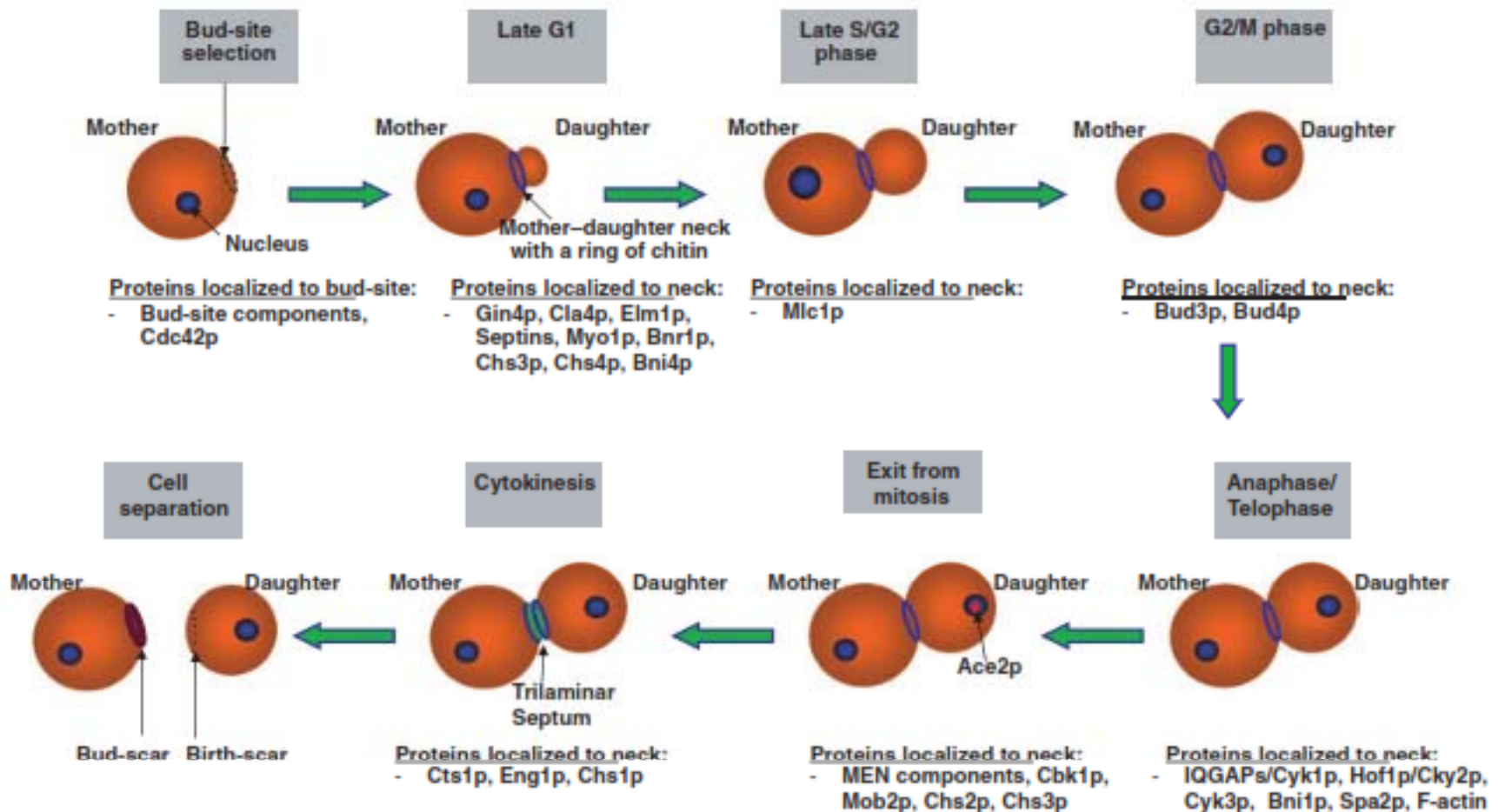
Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras

Formas de multiplicación celular



Expresión de proteínas recombinantes

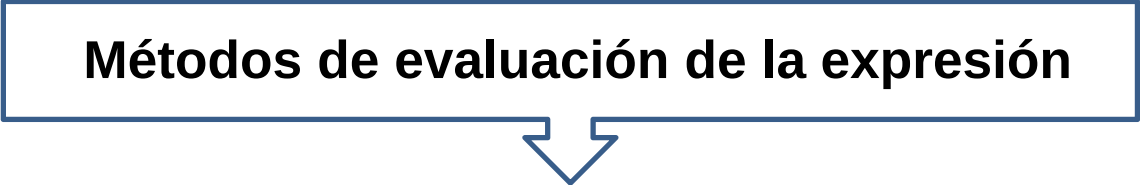
Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras



Expresión de proteínas recombinantes

Ensayos de inducción

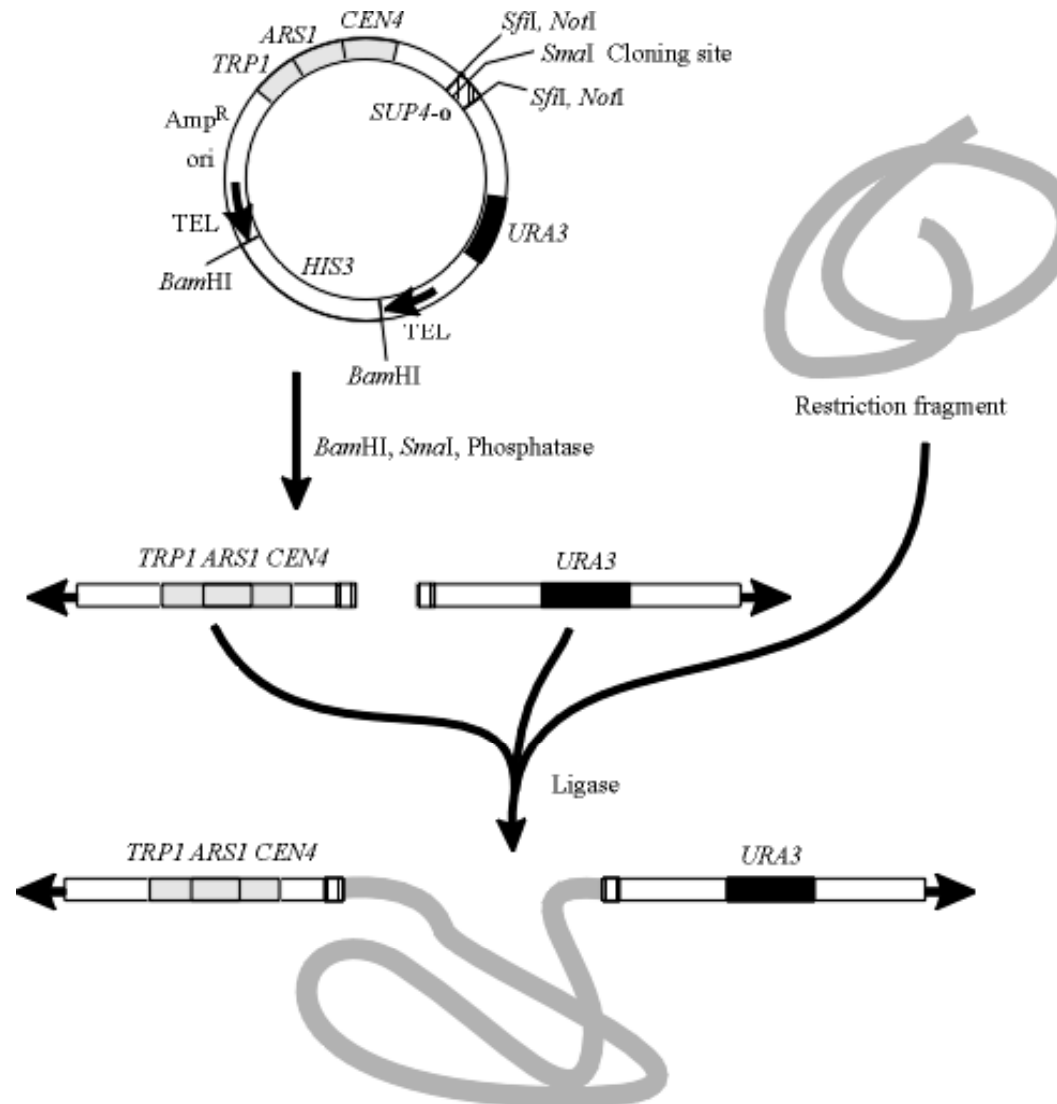
Métodos de evaluación de la expresión



- SDS-PAGE
- *Western Blot*
- Ensayos de Actividad

Expresión de proteínas recombinantes

Cromosomas artificiales de levaduras



Expresión de proteínas en células animales



Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insectos
Virus	Células de mamífero
Transgenes	Toda clase de organismos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales

- A partir de **tejidos animales** es posible obtener **células libres** que pueden ser **cultivadas** en condiciones de **laboratorio**.
- Estas células, a las que debe suministrársele **medios complejos** con aminoácidos, antibióticos, vitaminas, fuentes de carbono, sales y factores de crecimiento, entre otros componentes, pueden ser sostenidas (repiques o pasajes) **entre 50 y 100 generaciones**.
- En tanto, algunos **cultivos de células animales** logran **inmortalizarse** debido a cambios genéticos, constituyendo así **líneas celulares establecidas**.
- Las **células** derivadas de **tumores**, llamadas “**transformadas**”, suelen constituir líneas inmortales.
- Las **células animales** en cultivo **pueden ser transfectadas** (ingresarles DNA exógeno). En esos DNAs pueden encontrarse genes, pudiéndose entonces expresar proteínas recombinantes.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales



ANIMAL



Muestra de tejido



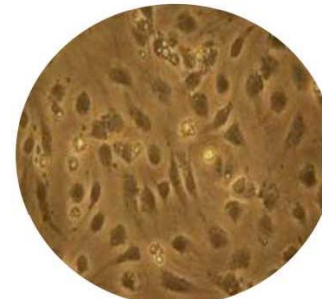
**Tratamiento
con proteasas**



Cultivo *in vitro*



Campana de flujo laminar



células en cultivo



Estufa de cultivo celular

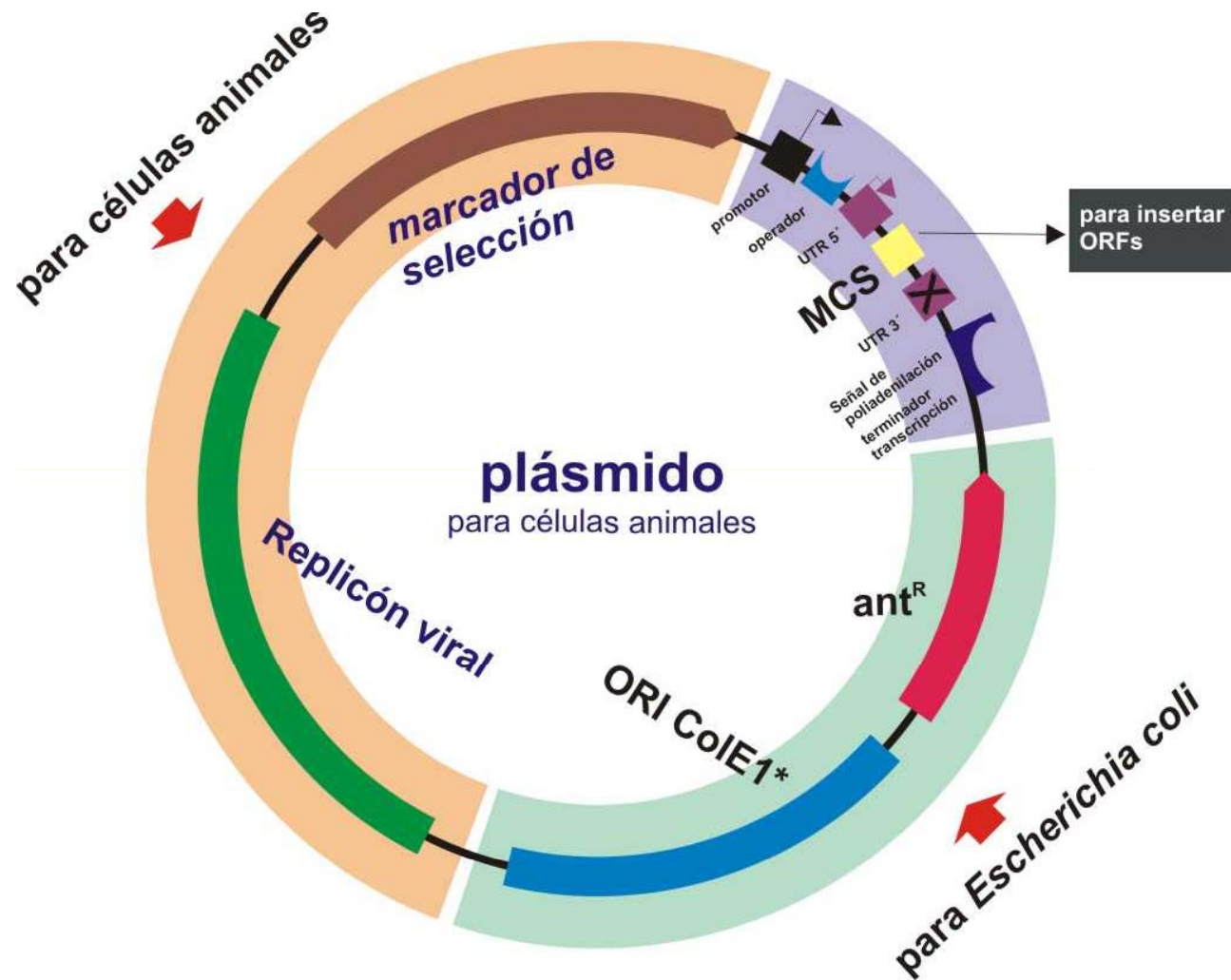
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen

Promotores:

La mayoría de los vectores posee **secuencias promotoras de origen viral**, las cuales son constitutivas (leídas por la RNA polimerasa celular) y permiten una alta tasa de transcripción (Ejemplos: promotores tempranos de los virus CMV, SV40, Epstein Barr, Papiloma).

Replicón viral:

Un **replicón viral** permite a los vectores **replicar** como un **episoma** con un número dado de copias (orígenes de SV40, poliomavirus, papilomavirus o Epstein Barr).

Marcadores de selección:

Para la generación de líneas celulares establemente modificadas algunos plásmidos cuentan con **genes de selección**. Entre ellos se cuentan **genes de resistencia a antibióticos eucariotas** y genes que expresan **enzimas** implicadas en **rutas biosintéticas**.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen

- Los **replicones virales** son **orígenes de replicación** de **virus animales** más el **gen** que codifica la **proteína viral trans-activadora** (PVTa) de unión al ORI.

Replicones virales

SV40	BPV	EBV
Simian Virus 40 ORI: 64 pb. PVTa: antígeno T mayor Copias: 100-1000 Segregación: sin mecanismo	Bovine Papillomavirus ORI: 60 pb PVTa: E1 Copias: 50-150 Segregación: E2 (proteína de unión a cromosomas en metafase)	Epstein Barr Virus ORI: ori P (1700 pb) PVTa: EBV nuclear Antigen 1 (EBNA1) Copias: 5-20 Segregación: EBNA1 (proteína de unión a cromosomas en metafase)

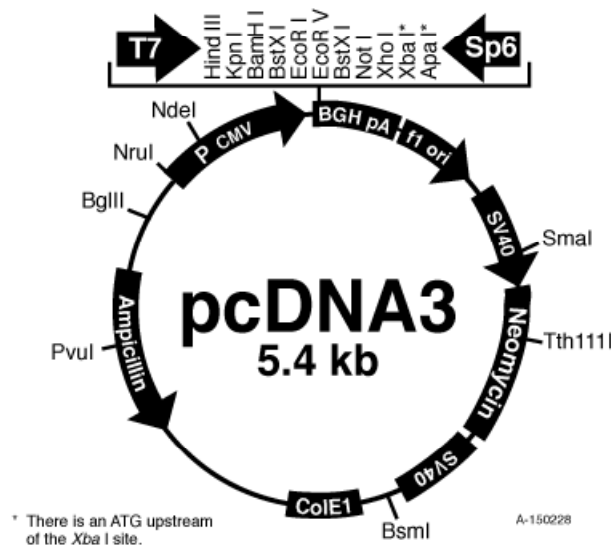
Se comercializan líneas celulares modificadas que expresan una PVTa. De ese modo, sólo es necesario en el plásmido la presencia de la secuencia ORI.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen

Comments for pcDNA3:
5446 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
T7 promoter: bases 864-882
Polylinker: bases 889-994
Sp6 promoter: bases 999-1016
BGH poly A: bases 1018-1249
SV40 promoter: bases 1790-2115
SV40 origin of replication: bases 1984-2069
Neomycin ORF: bases 2151-2945
SV40 poly A: bases 3000-3372
ColE1 origin: bases 3632-4305
Ampicillin ORF: bases 4450-5310



The sequence of pcDNA3 has been compiled from information in sequence databases, published sequences, and other sources. This vector has not yet been completely sequenced. If you suspect an error in the sequence, please contact Invitrogen's Technical Services Department at 800-955-6288.

U.S. Headquarters

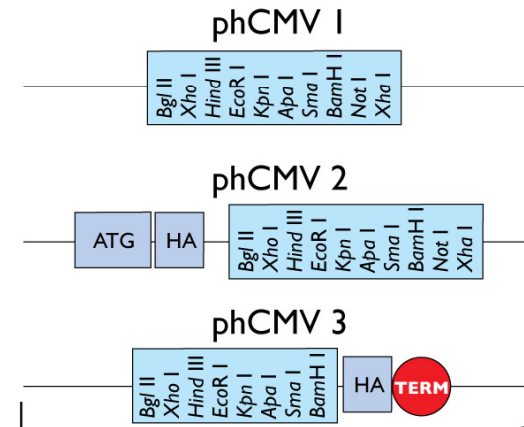
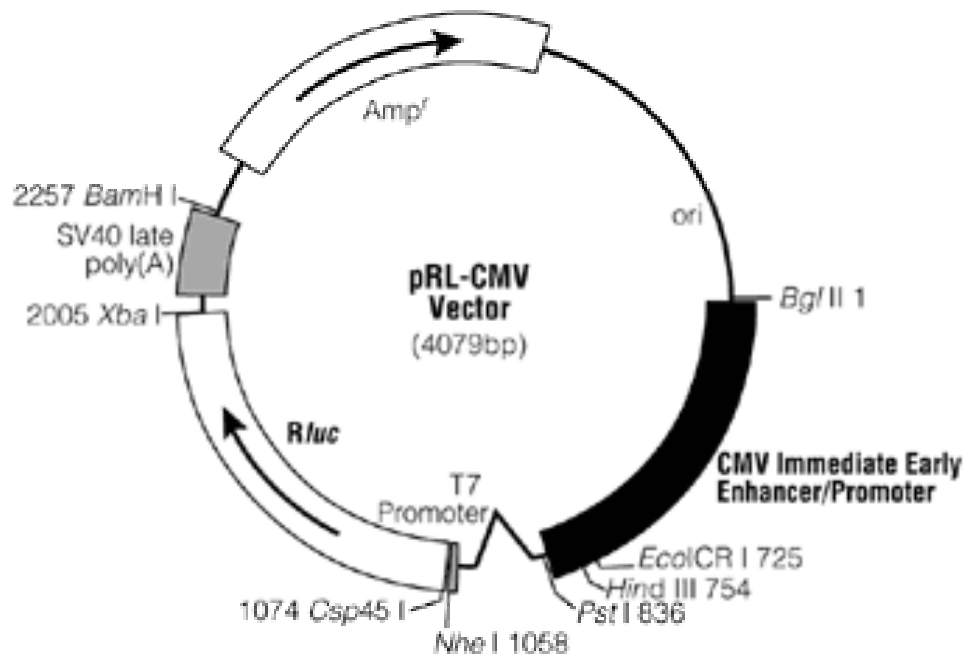
Tel: 1-800-955-6288
Fax: 1-760-603-7201

European Headquarters

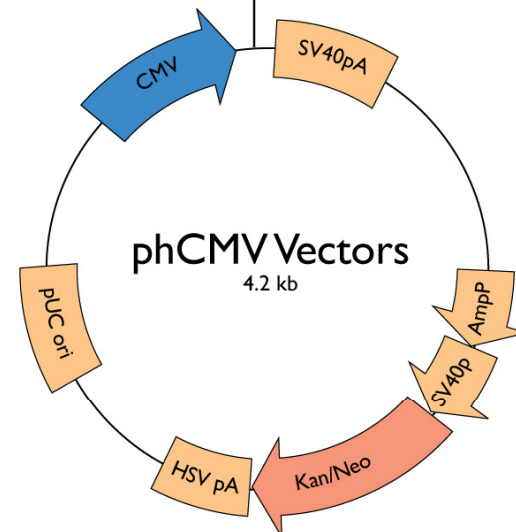
Tel: +31 (0) 594 515 175
Fax: +31 (0) 594 515 312

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen

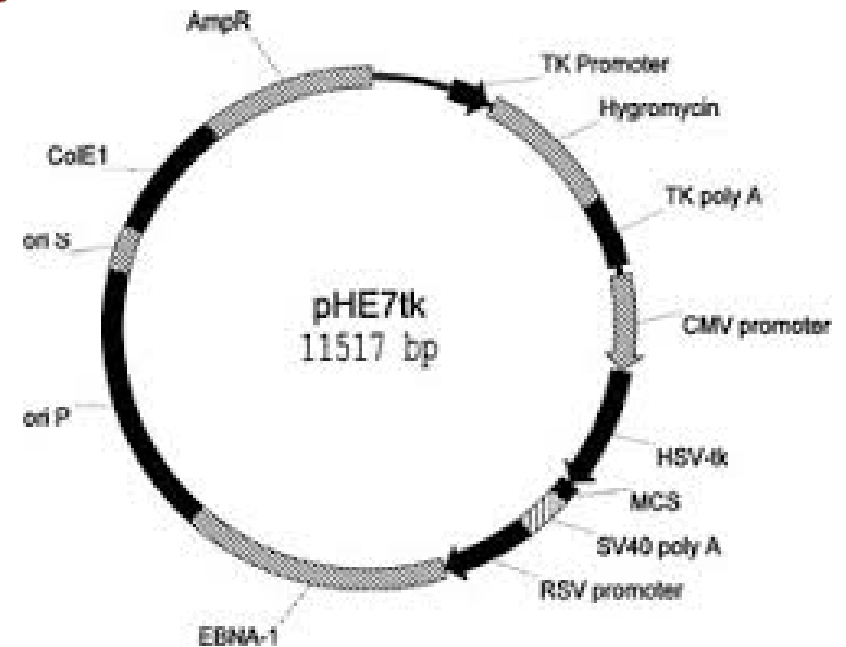
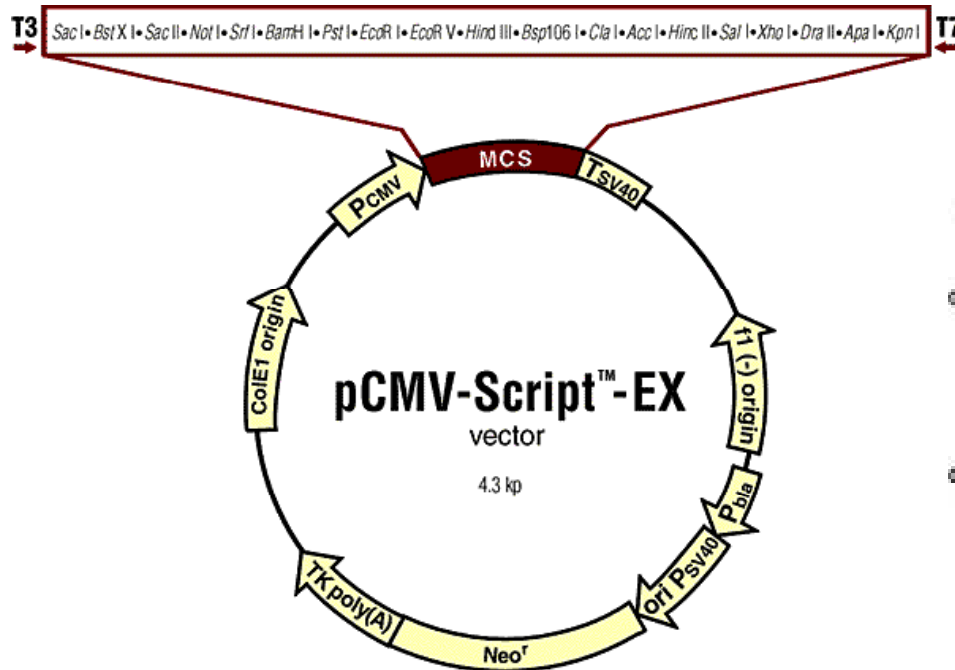


136-47401_GA



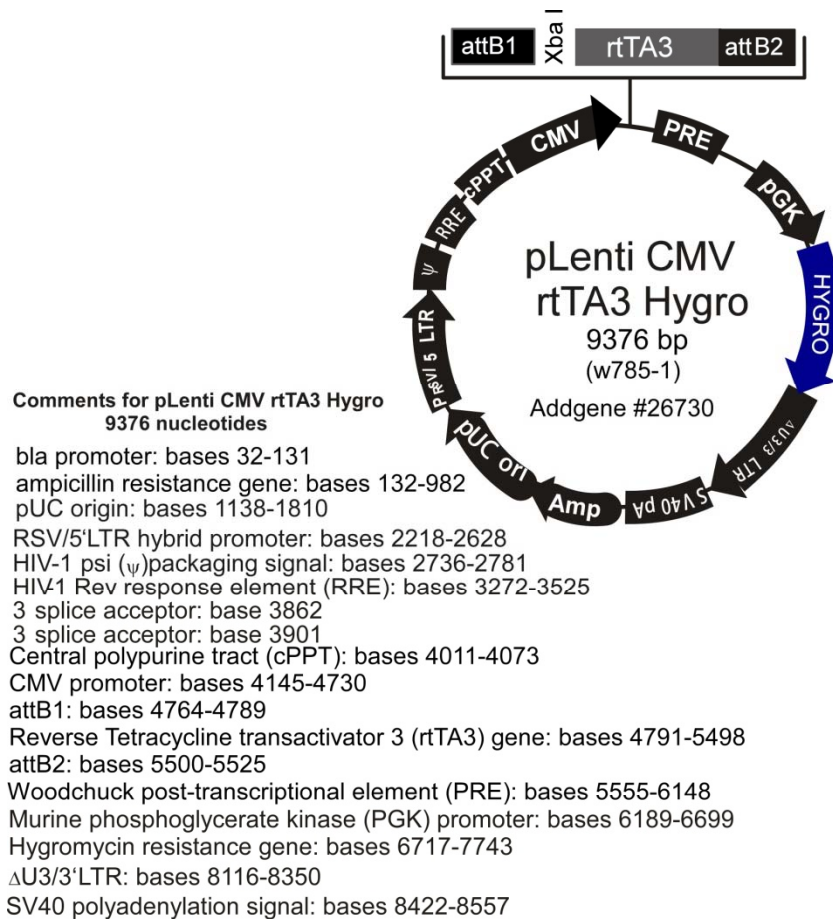
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen



- Los **plásmidos** para **células animales** también pueden **integrarse** mediante el **uso** de **maquinaria viral**.
- El **sistema** más utilizado para esto es el de los **lentivirus**.

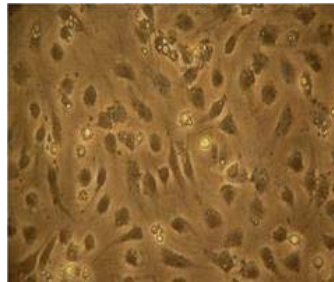
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de células

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



organismo

Construir un gen que
exprese la proteína de
interés

Seleccionar las
células adecuadas
para la expresión del
gen

Seleccionar
líneas celulares
animales

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales

Línea celular	Procedencia	Tipo celular de origen
MDCK	Perro	Riñón
VERO	Mono	Riñón
CHO	Hámster	Epitelio del ovario
CV-1	Mono	Riñón
NIH-3T3	Ratón	Fibroblastos de embrión
Rat-1	Rata	Fibroblastos de embrión
Hela	Humana	Carcinoma cervical
HEK-293	Humana	Riñón de embrión
LNCaP	Humana	Tumor de próstata
MCF7	Humana	Tumor de mama
Sf21	Lepidóptero	Ovario
Hi-5	Lepidóptero	Ovario
S2	<i>Drosophila melanogaster</i>	Embriones

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales

- Una vez generada la **construcción** recombinante en *Escherichia coli*, y seleccionada la **línea celular animal**, se procede a la **transfección**.
- La **transfección** es el proceso por el cual un **DNA exógeno** es **ingresado** dentro de una célula eucariota (evento similar a la transformación bacteriana).
- Existen **diferentes procedimientos** y cada tipo celular evidencia **diversas respuestas** (mayor o menor susceptibilidad) al proceso de transfección.
- En ciertos casos, las **transfecciones** son **transientes**. En otros casos, mediante **procesos de selección**, pueden **establecerse líneas celulares** genéticamente **modificadas**.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales

PROCEDIMIENTOS DE TRANSFECCIÓN

Con fosfato de Calcio

Con lípidos

Con polímeros
catiónicos

Por electroporación

- El DNA disuelto en un *buffer* fosfato genera un precipitado en contacto con iones de calcio.
- La célula incorpora el precipitado mediante endocitosis.

- Los lípidos catiónicos forman complejos estables con el DNA.
- Estos complejos se asocian a las membranas celulares e ingresan por endocitosis.

- El DEAE-Dextrano es un polication que se asocia al DNA.
- El complejo se asocia a las membranas celulares e ingresa por endocitosis.

- El DNA ingresa por los microporos de las células al someterlas con un pulso eléctrico.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales

- En función de los vectores utilizados, y de la permanencia de los mismos en el cultivo celular, los plásmidos para células animales se clasifican en:

Transitorios



Su permanencia en las células es **momentánea** por pérdida en los sucesivos ciclos de división celular o por muerte celular

Estables



- **Episomales:** replicón de origen viral y son de bajo número de copias
- **Insercionales:** El plásmido se inserta en algún cromosoma por recombinación ilegítima, o mediado por sistemas virales

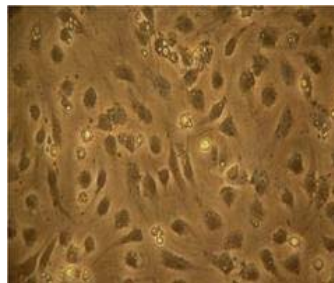
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Expresión

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



levadura



proteína

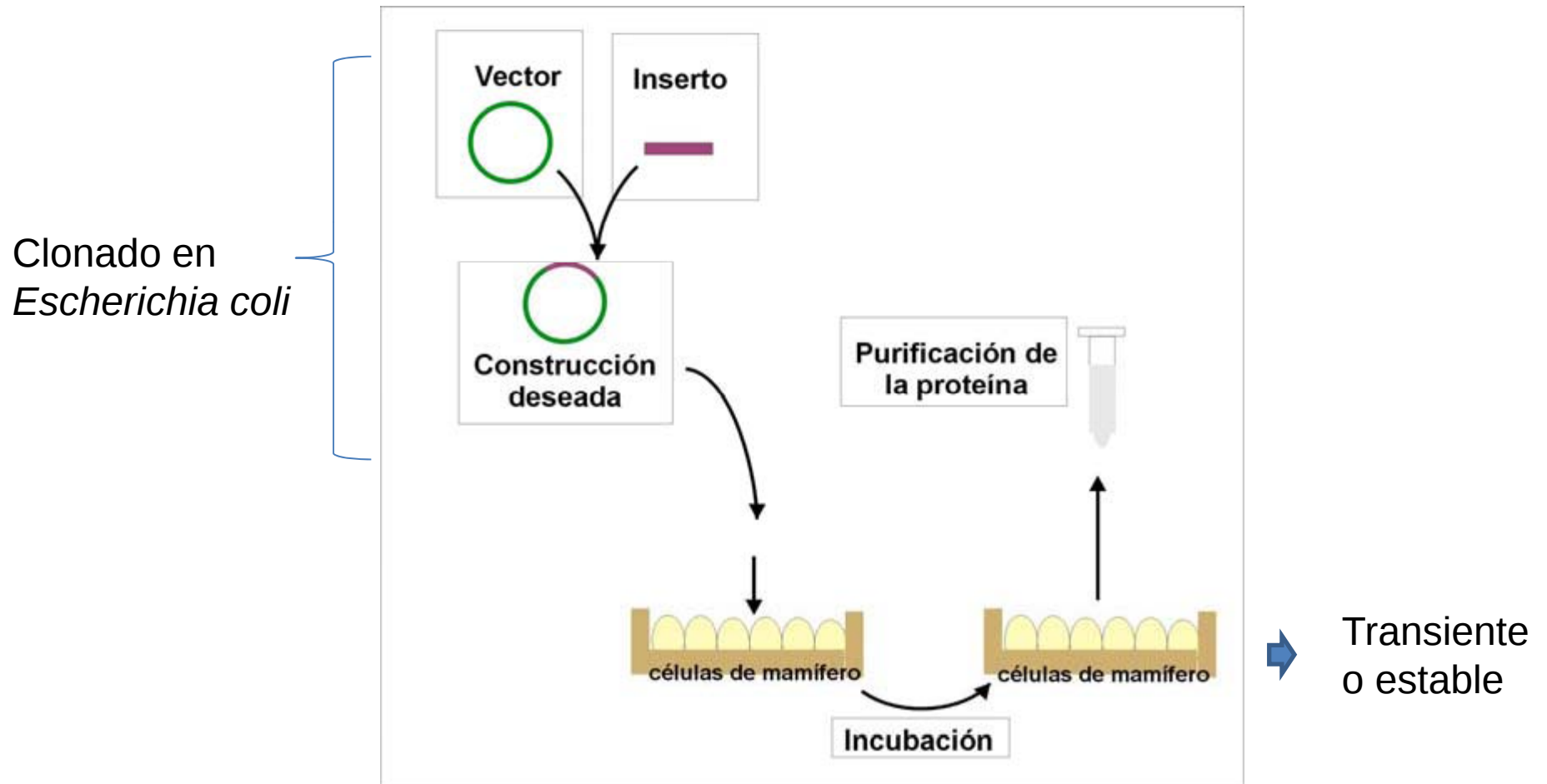
Construir un gen que exprese la proteína de interés

Seleccionar la línea celular para la expresión del gen

Evaluar la producción de la proteína de interés

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Expresión



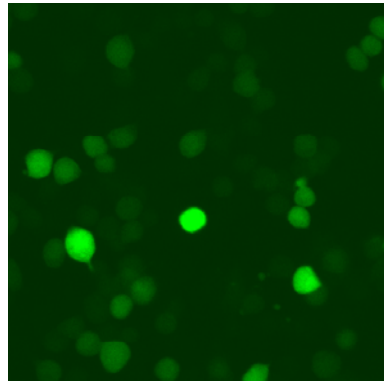
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Expresión

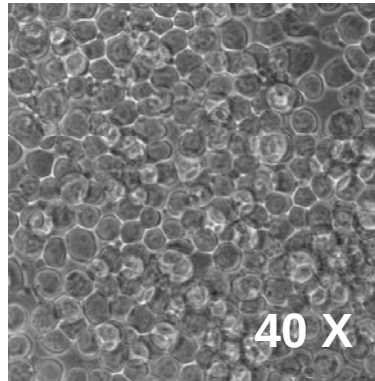
Ejemplo de **células transfectadas** con un **plásmido** que expresa **GFP**



Células Sf21

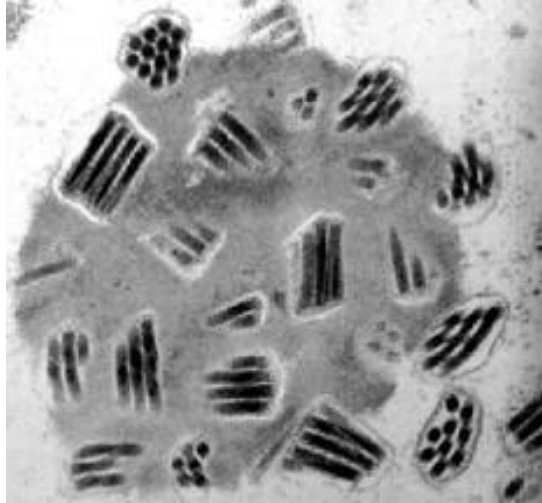


Microscopio de fluorescencia



Luz Blanca

Expresión de proteínas utilizando virus de insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus/hospedador

- Los **virus** son **entidades biológicas** con la capacidad de **parasitar** a los **organismos** para la **generación** de su **descendencia**.
- Esta característica transforma a sus **genomas** en excelentes **plataformas** para el **clonado molecular**.
- Dado que existen virus conocidos para todos los organismos, es **posible proponer sistemas virales** modificados para **diferentes aplicaciones**.
- Entre ellas, la **producción de proteínas recombinantes** es un objetivo ampliamente abordado para el diseño de sistemas de expresión del tipo *virus/hospedador*.

Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insecto
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



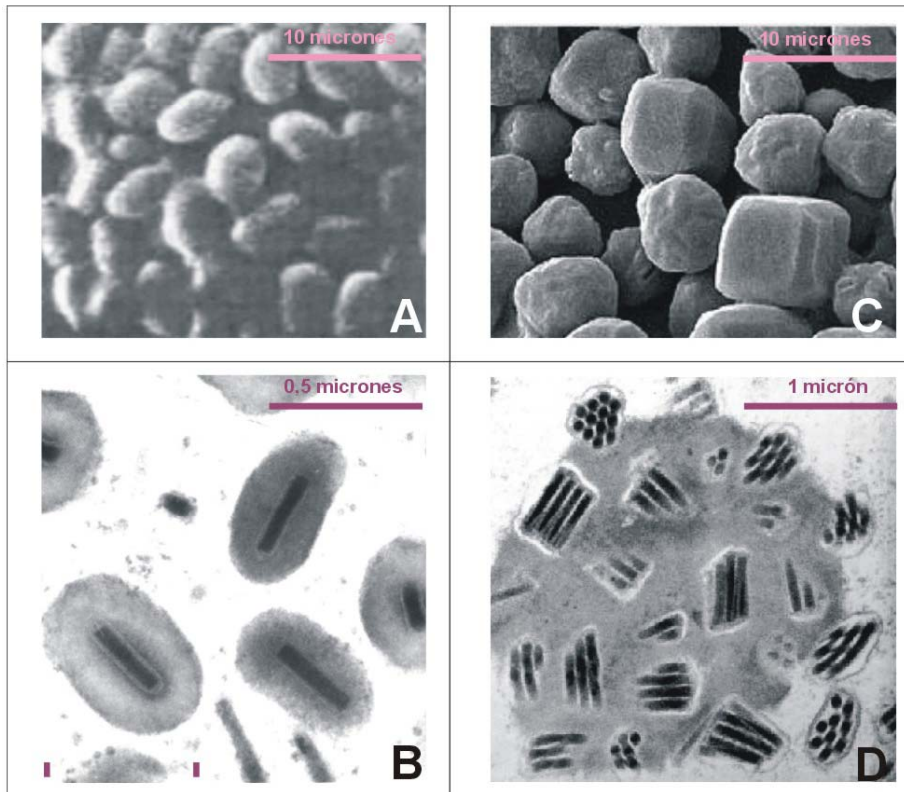
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

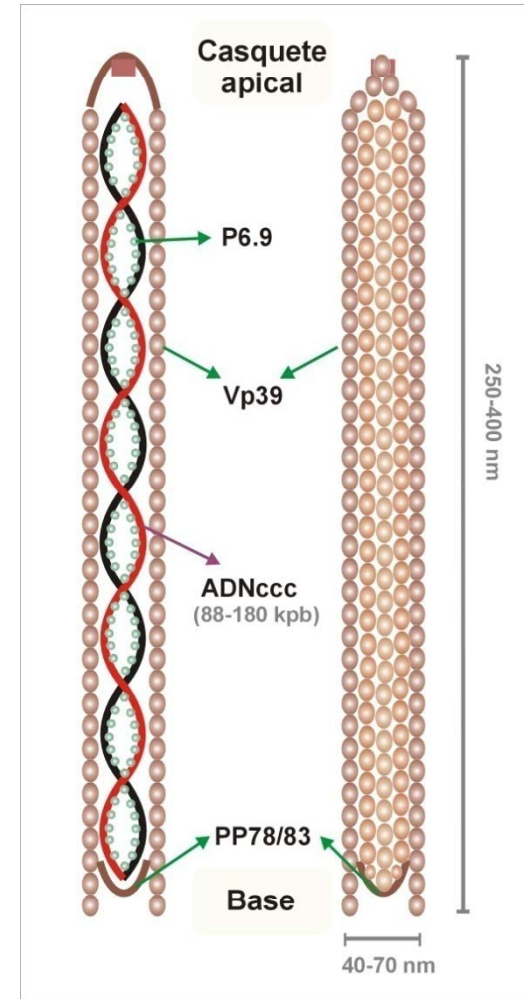
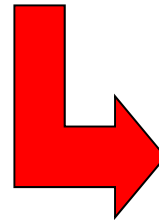
- Los **baculovirus** son virus que **infectan** principalmente **lepidópteros, himenópteros y dípteros** en su estadio larval.
- El **rango de hospedador** es muy **estrecho**.
- Estos virus poseen **genomas** de **cccdsDNA** de entre **80-180 kpb**, conteniendo entre 80-200 genes.
- El virus presenta dos fenotipos a lo largo de su ciclo de multiplicación: **Viriones Brotantes** y **Viriones Ocluidos**.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



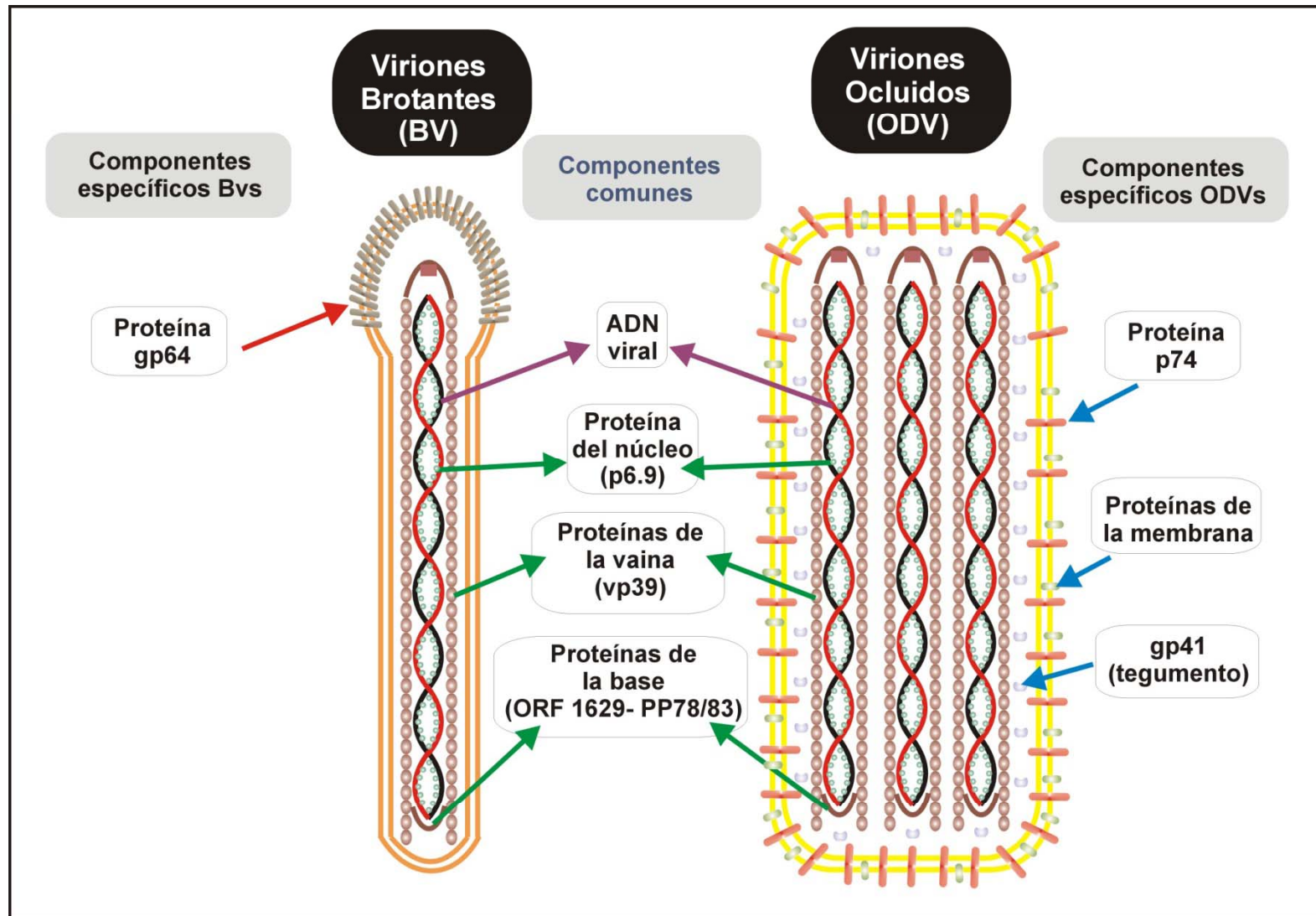
Micrografías electrónicas fenotipo ocluido
(OB: *Occlusion Body*)
A y B. Granulovirus.
C y D. Poliedrovirus



Nucleocápside

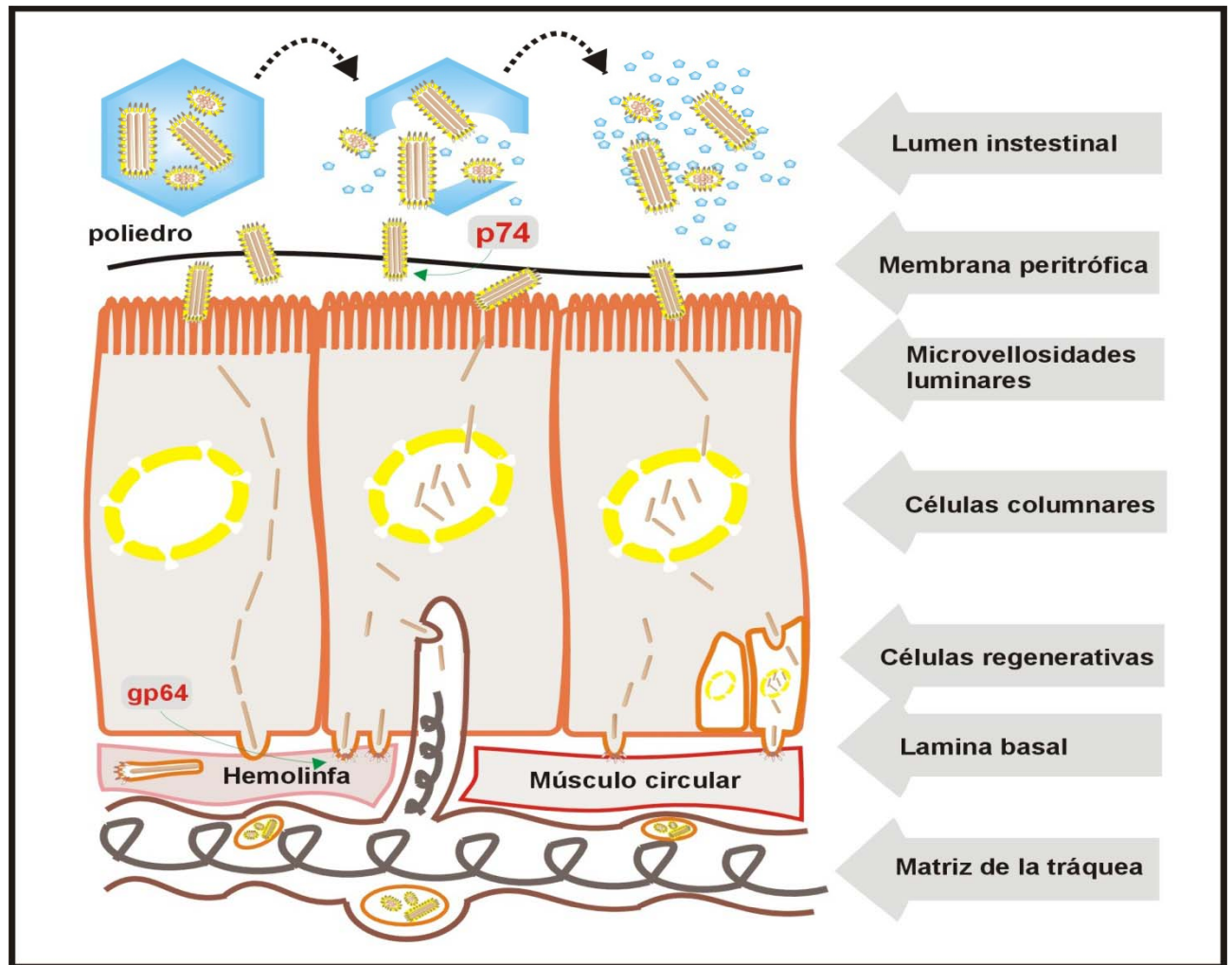
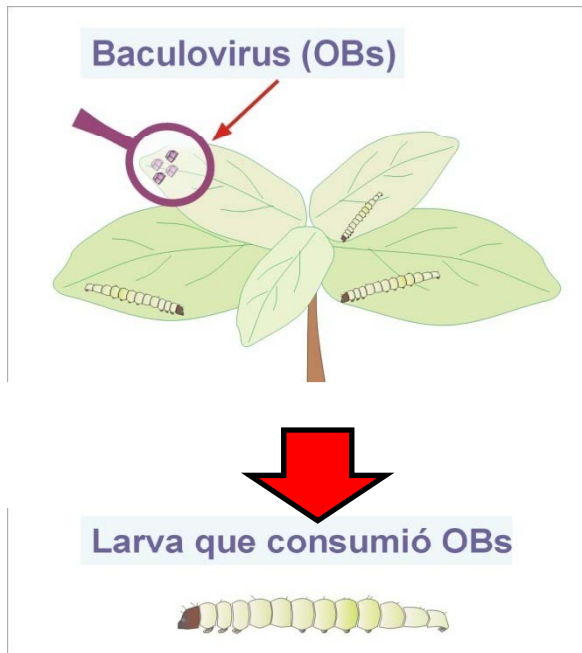
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos: ciclo en la naturaleza

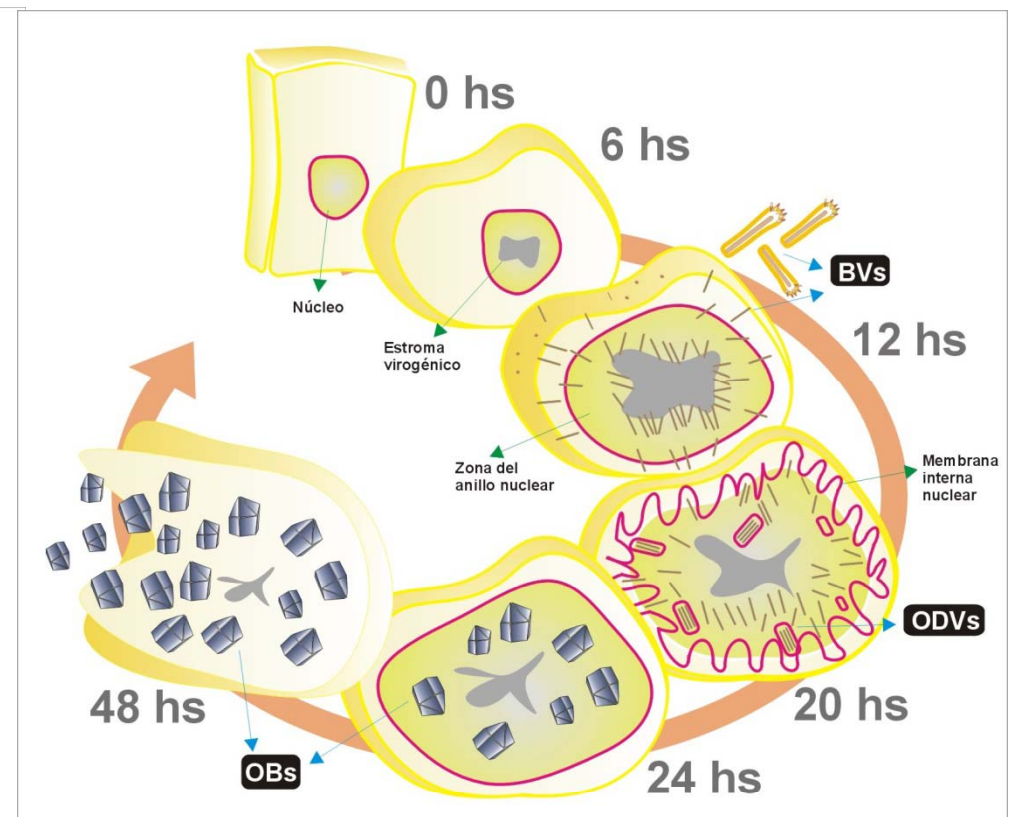
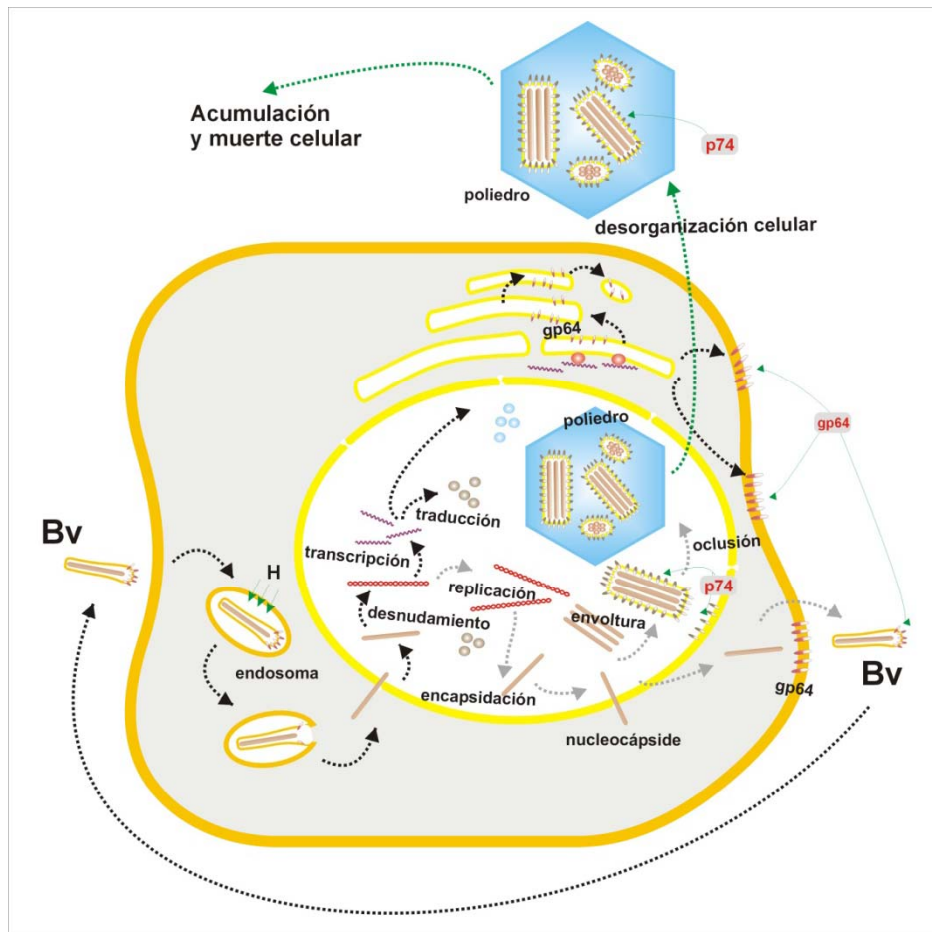


Intestino medio del insecto (Infección primaria)

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

Infección secundaria



Muerte celular

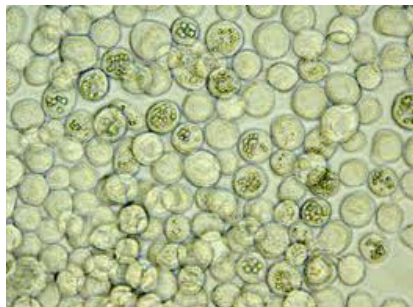
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

- Los **Viriones Ocluidos** se utilizan para la infección de **larvas**.

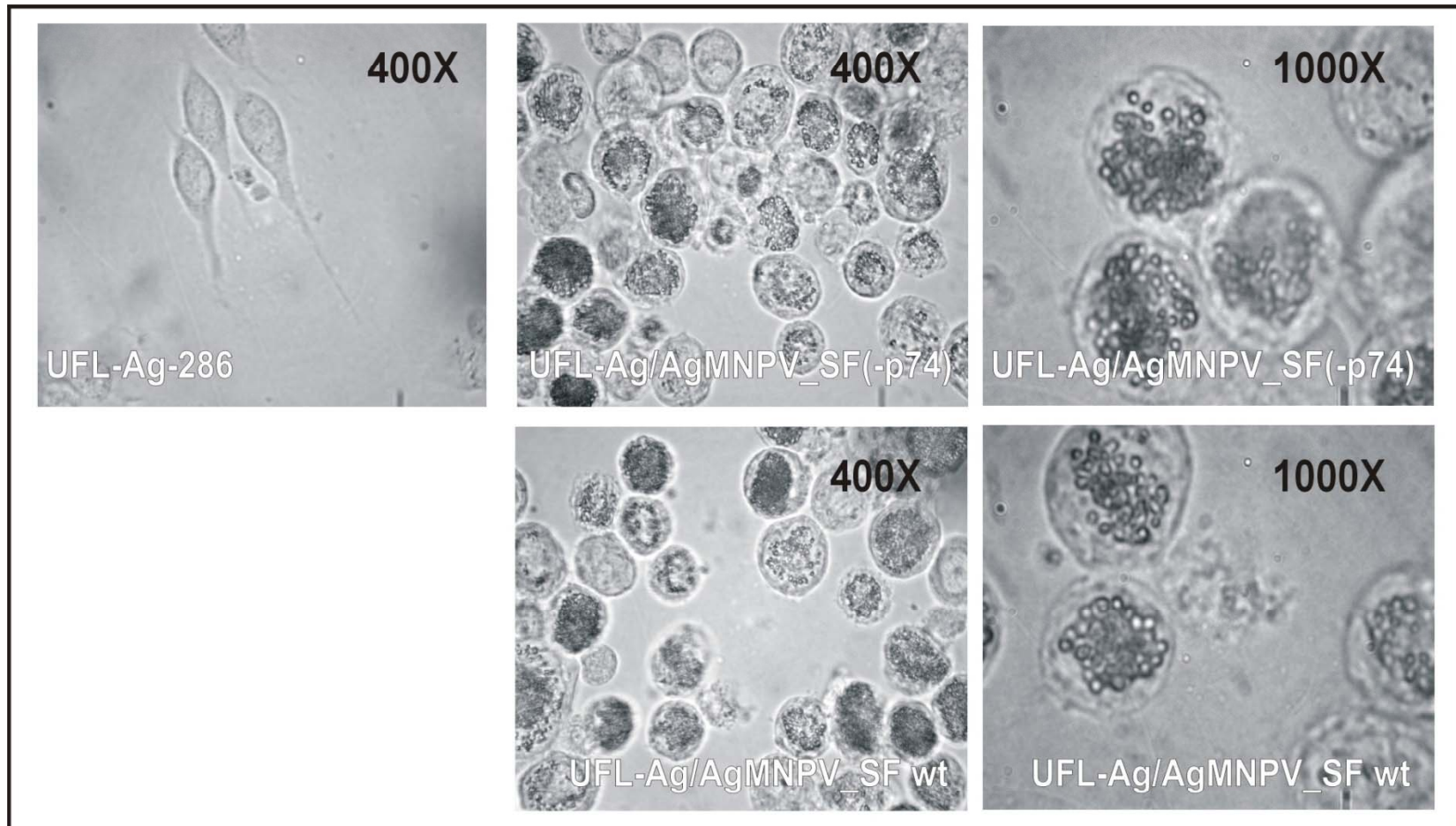


- Los **Viriones Brotantes** se utilizan para la infección en **células** creciendo en condiciones de laboratorio.



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Células de insecto cultivadas *in vitro* infectadas con un baculovirus

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



Construir un gen que
exprese la proteína de
interés

Generar una construcción genética



Genoma de baculovirus
recombinante



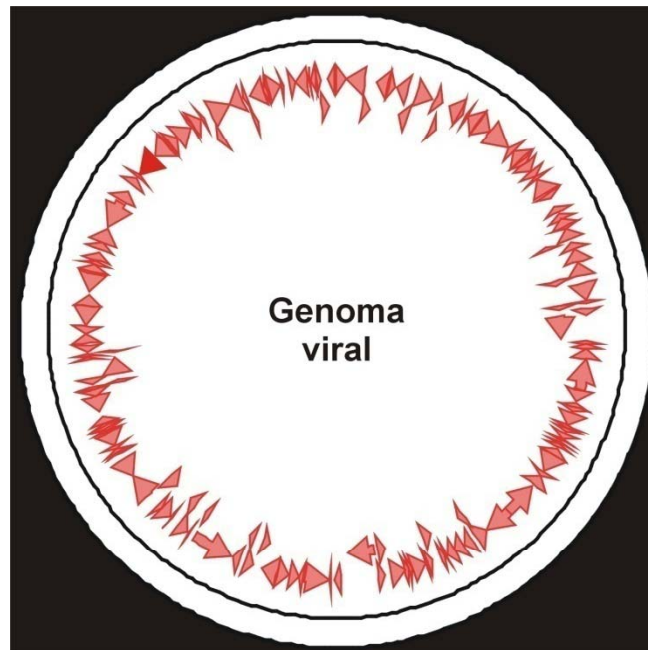
Inserto: ORF
En casete de
expresión

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

El genoma de los baculovirus es infectivo *per se*

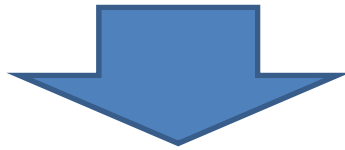
Al ser transfectado como DNA desnudo en una línea celular susceptible es capaz de iniciar la cascada de transcripción, traducción y replicación necesarias para la generación de progenie (viriones brotantes y viriones ocluidas)



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

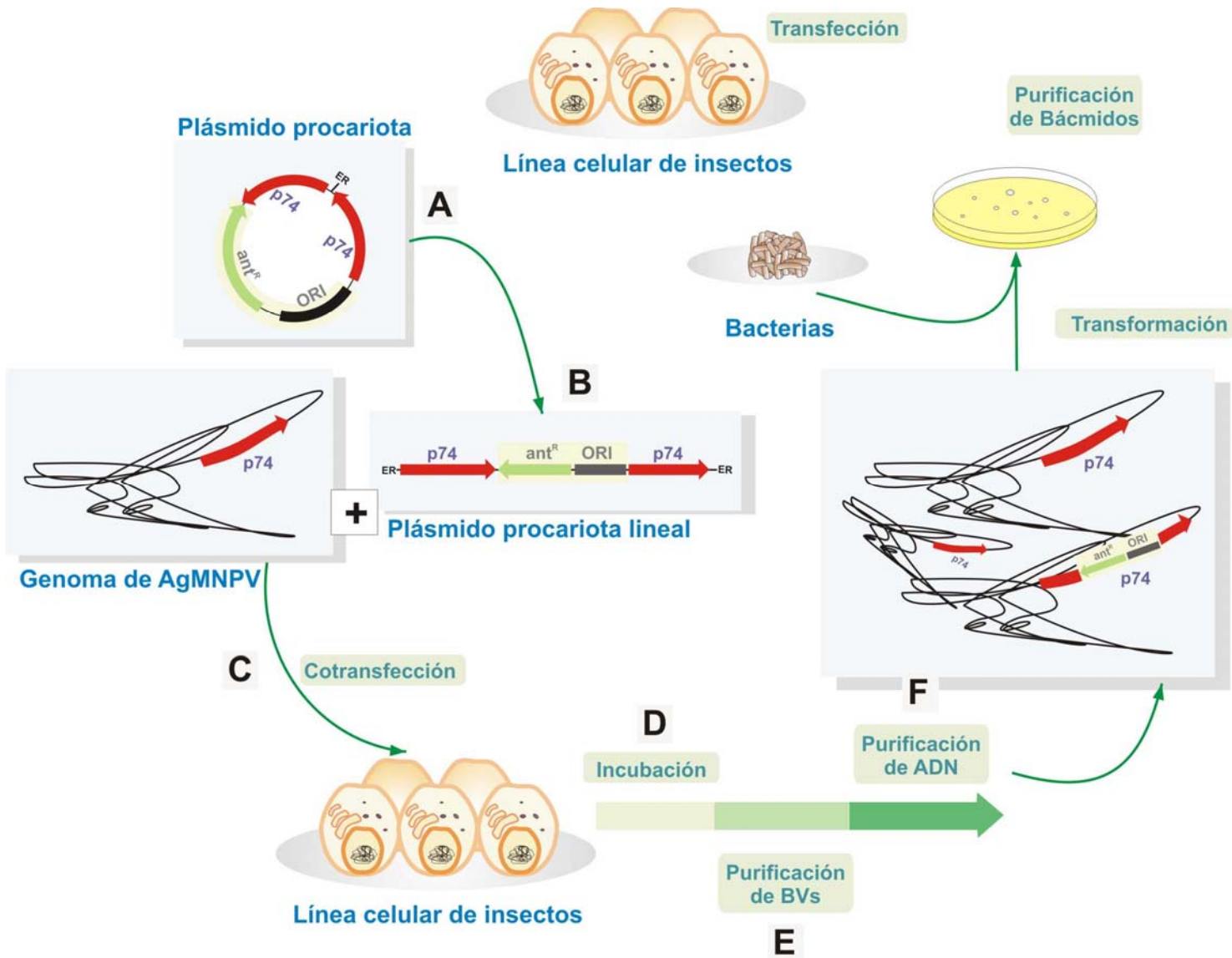
Al genoma de los baculovirus puede insertársele un replicón procariota, transformándose en un mega-plásmido



Este mega-plásmido permite la realización de construcciones genéticas en *Escherichia coli*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Ejemplo de la generación de un bácmido

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

El gen que codifica la proteína mayoritaria del cuerpo de inclusión (Viriones Ocluidos; gen *poliedrina*) posee un promotor de altísima tasa de transcripción



En función de ello, las regiones de este gen implicadas en la transcripción y traducción (promotor, UTRs, terminadores) son ideales para el diseño de un casete de expresión.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

- En función de todas las consideraciones anteriores:

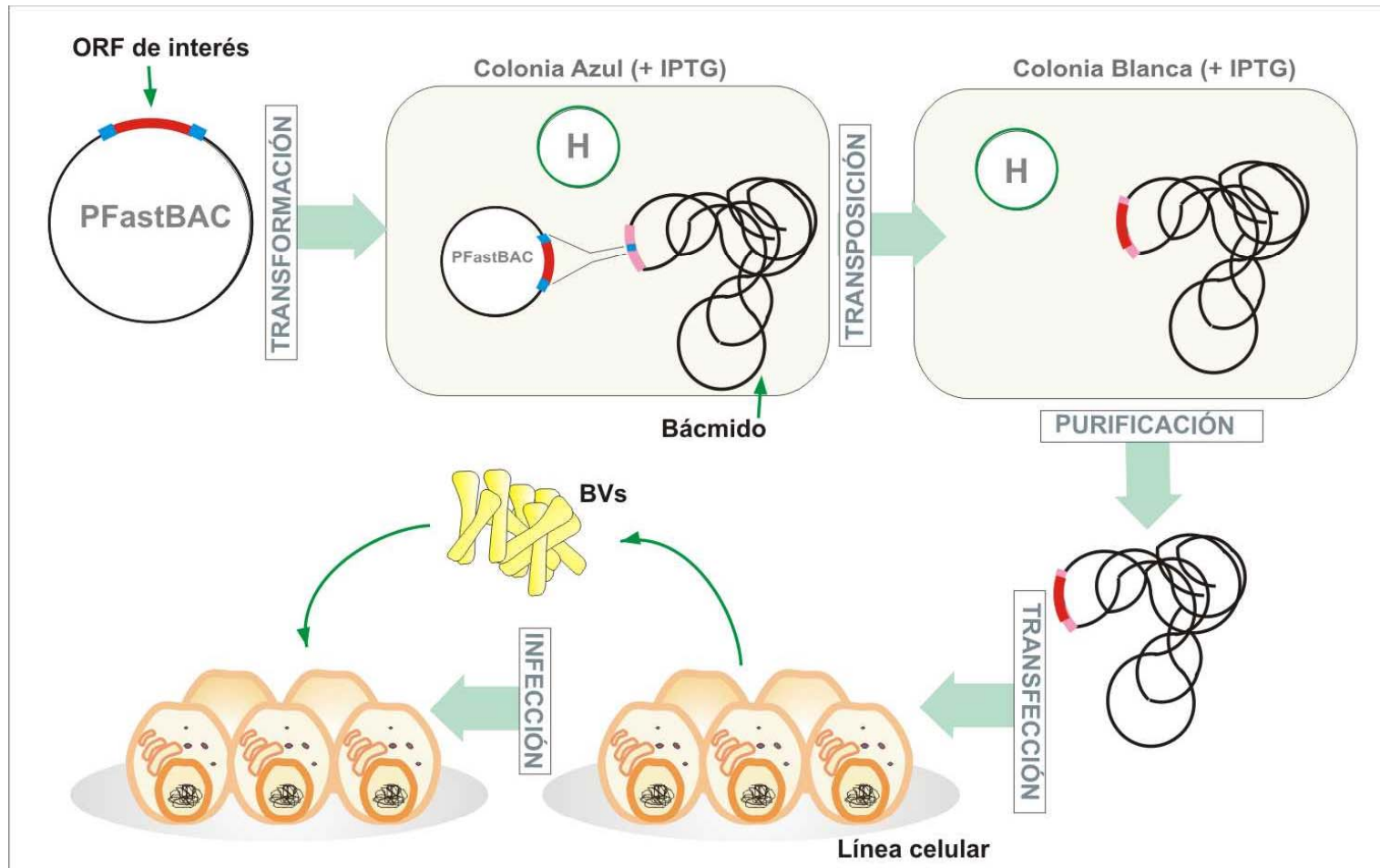
- *Genomas baculovirales transformables en plásmidos bacterianos*
- *Regiones del gen poliedrina adecuadas para la generación de genes recombinantes.*
- *Capacidad infectiva de los genomas baculovirales sobre cultivos de células de insecto.*

...es posible desarrollar sistemas de expresión para proteínas recombinantes.

- De hecho, existen numerosos ejemplos en el mercado biotecnológico de sistemas basados en baculovirus y células de insecto.

Expresión de proteínas recombinantes

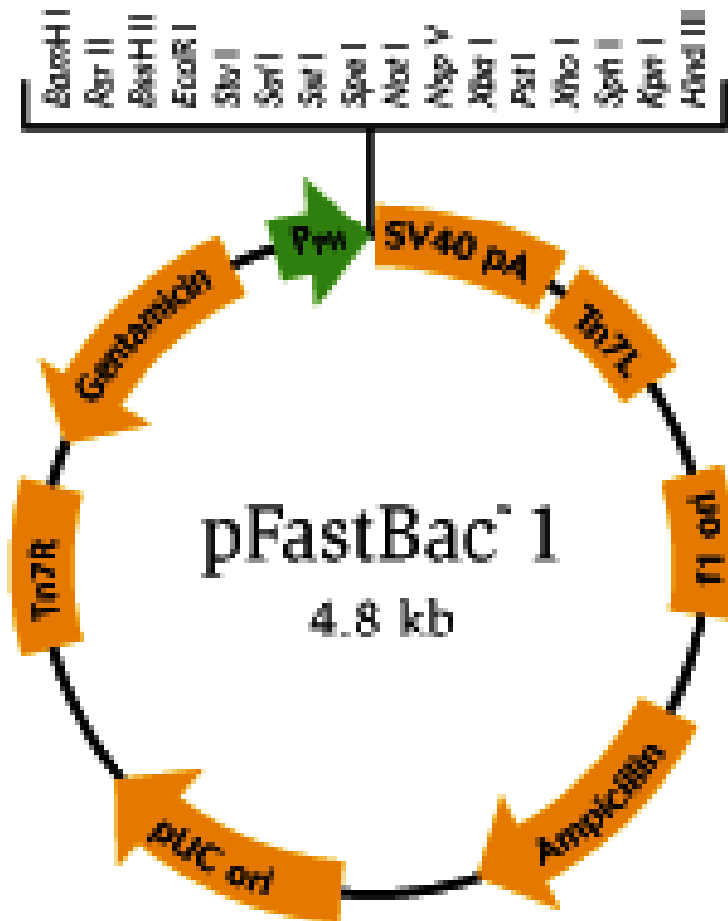
Sistema baculovirus/insectos



Sistema Bac to Bac (Invitrogen)

Expresión de proteínas recombinantes

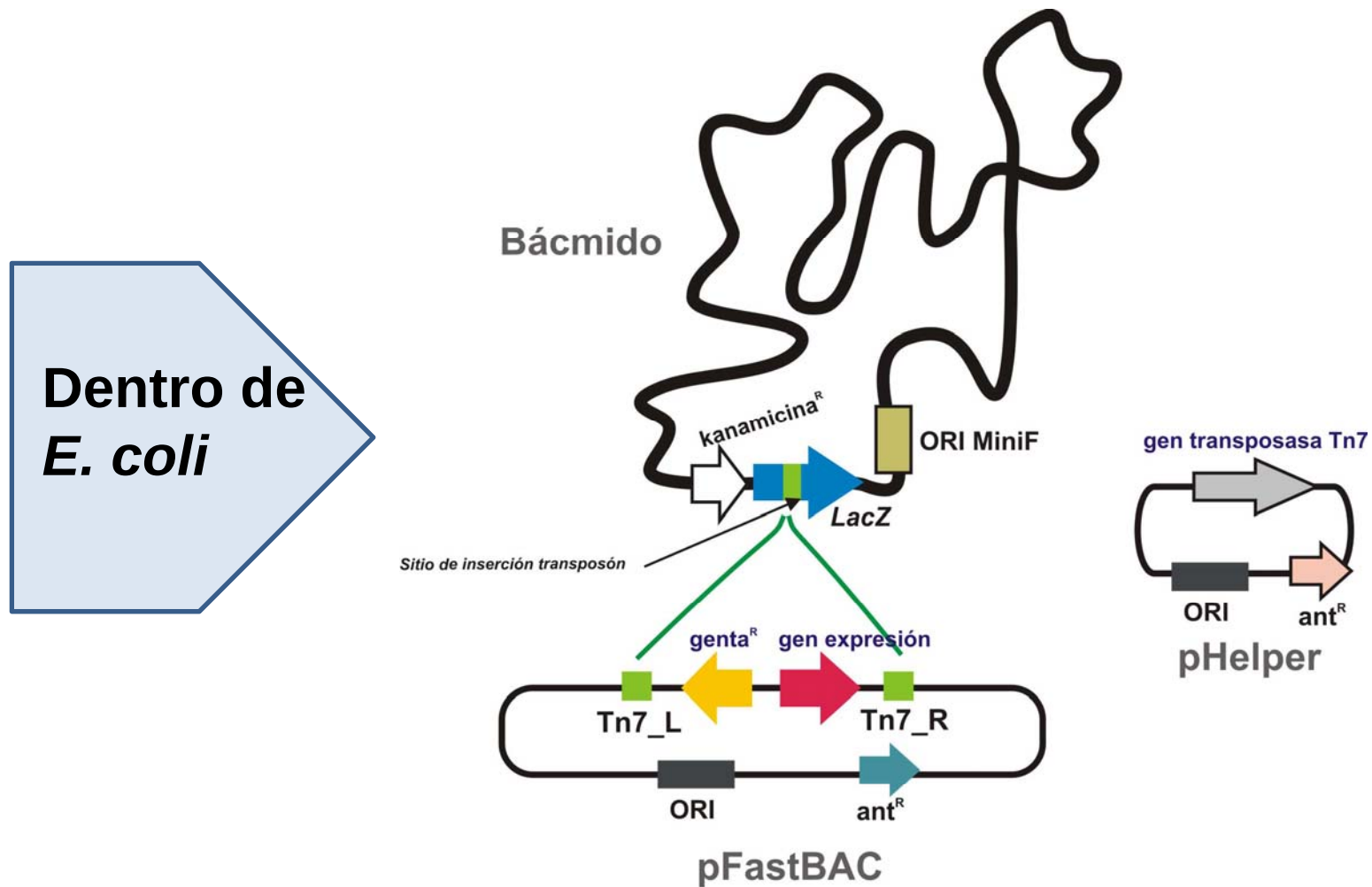
Sistema baculovirus/insectos



- Plásmido de *Escherichia coli*.
- Permite el clonado de ORFs bajo el promotor del gen poliedrina, permitiendo la generación de un gen quimérico.
- Posee los brazos del transposón bacteriano Tn7.
- Los brazos están flanqueando al gen quimérico y a un gen de resistencia bacteriano al antibiótico gentamicina

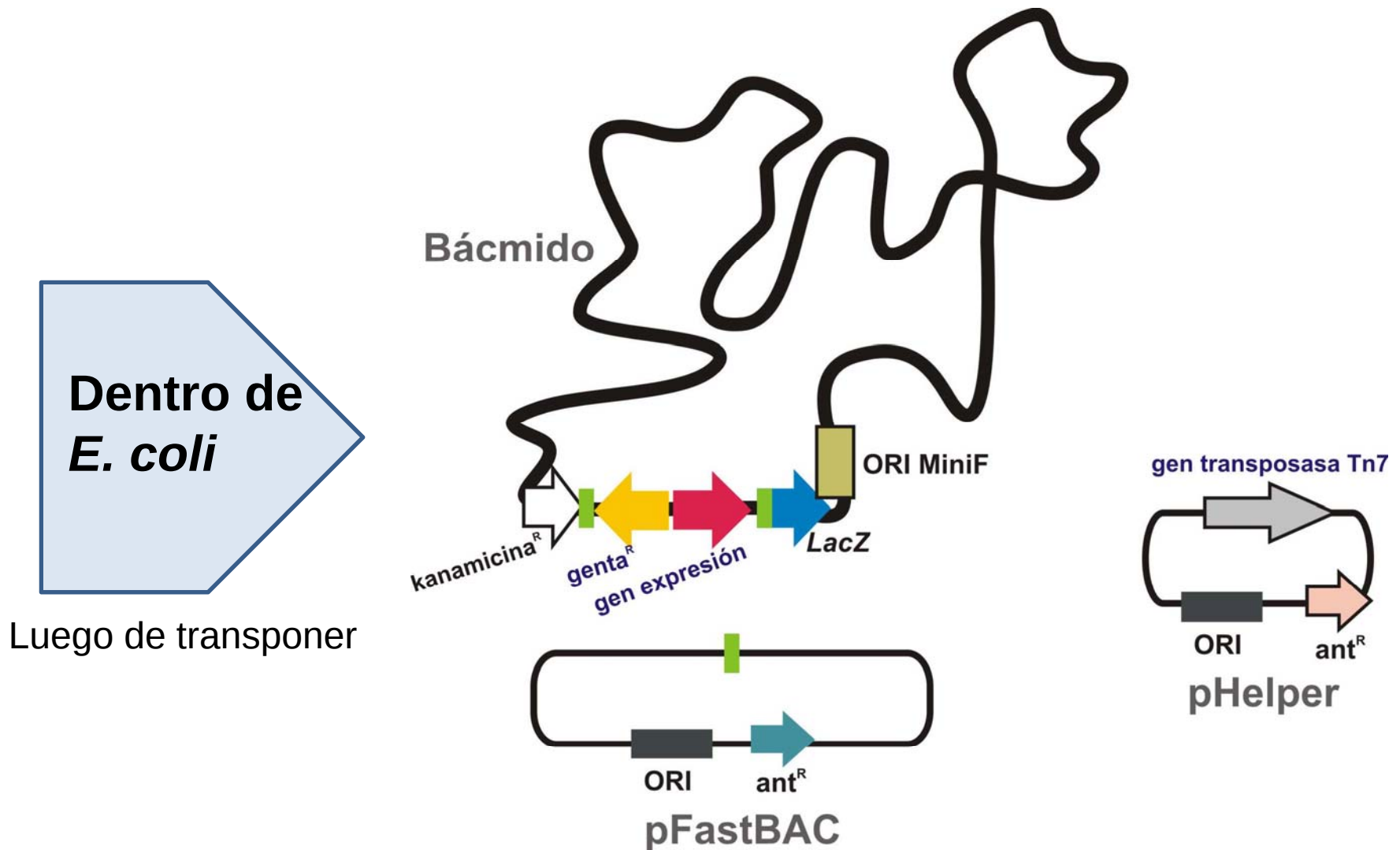
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



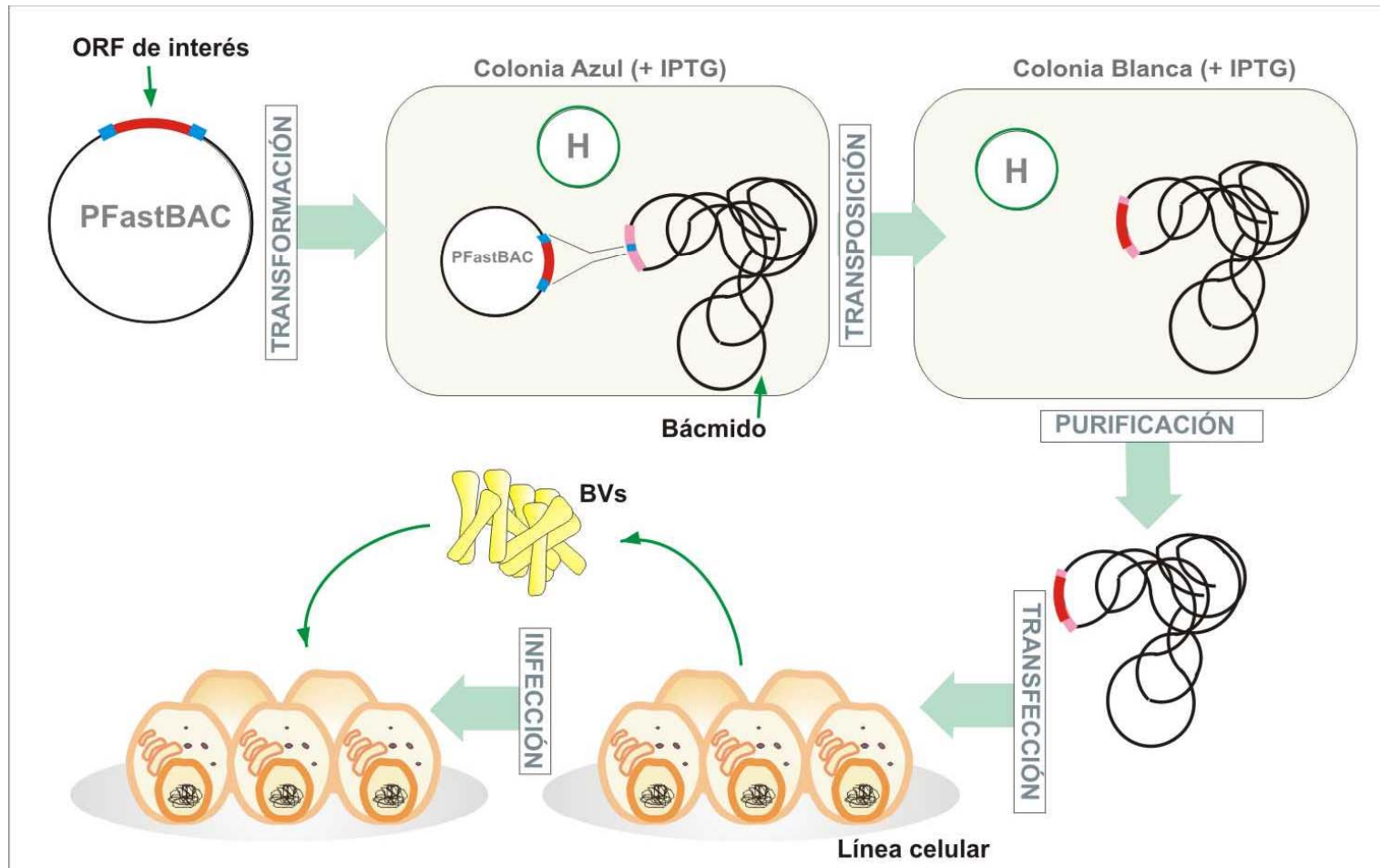
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

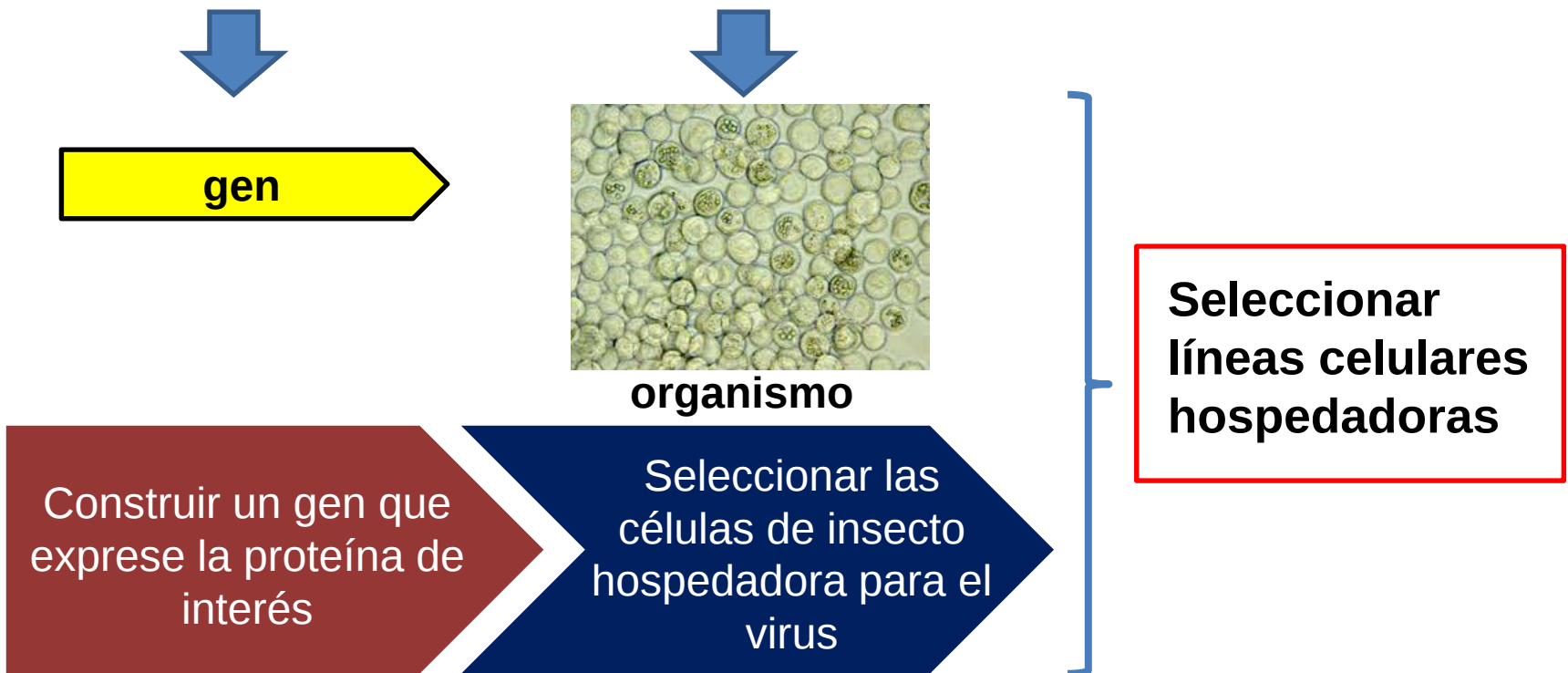


Sistema Bac to Bac (Invitrogen)

Expresión de proteínas recombinantes

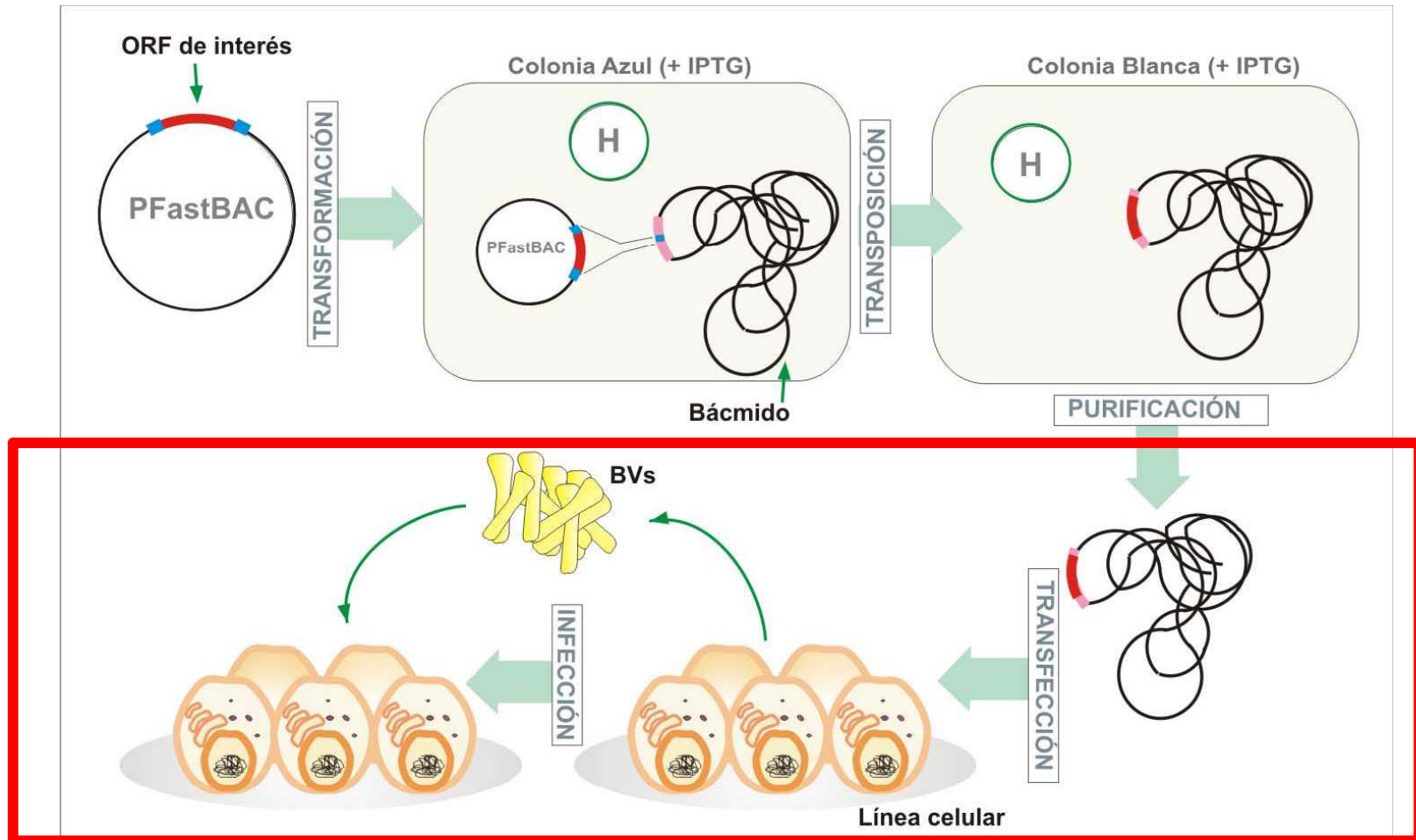
Sistema plásmidos/levaduras: Selección de células

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Sistema Bac to Bac (Invitrogen)

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

- Una vez obtenidos los **bácmidos recombinantes** (genomas baculovirales replicables en *Escherichia coli*, conteniendo el gen para la expresión de la proteína de interés), se **purifican** mediante **miniprep** por lisis alcalina, y luego se **transfectan** (procedimientos antes descritos) en **células** de insecto (hospedadores naturales del baculovirus utilizado).

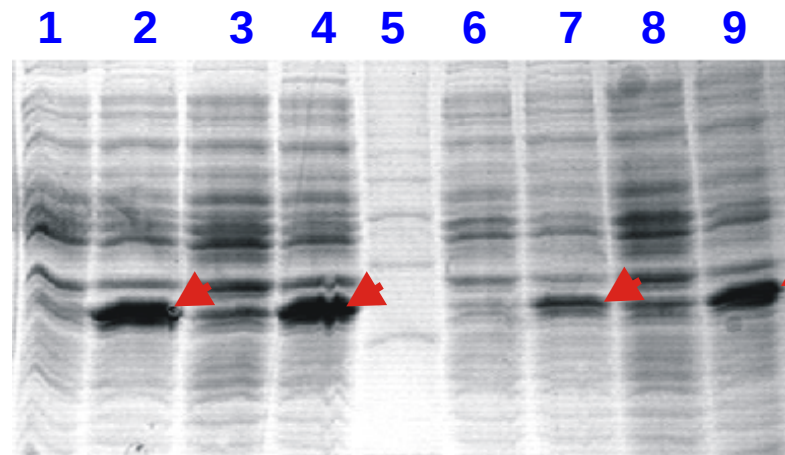
- El **genoma viral recombinante** al ingresar al núcleo celular, será molde para la **transcripción y traducción** de los primeros factores virales (capturando la maquinaria celular), los cuales luego permitirán la **replicación** genómica (a través de una compleja cascada regulatoria), la expresión de los factores tardíos y la **encapsidación** de la progenie viral.

- Dado que el **gen recombinante** está bajo el **promotor del gen poliedrina** (responsable de codificar la proteína mayoritaria del cristal de los viriones ocluidos), se generará una **gran cantidad de la proteína de interés**.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

Ejemplo de la expresión de una proteína en el sistema Bac to Bac en células de insecto

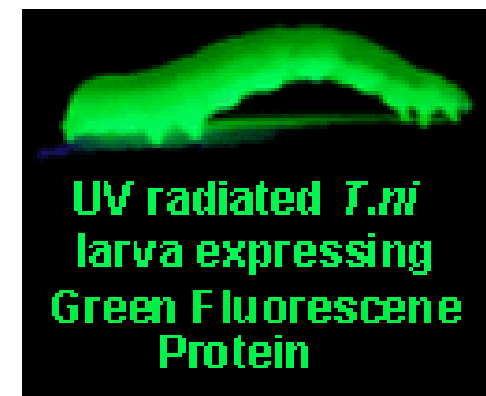


SDS-PAGE 10%

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

- La expresión de proteínas también puede realizarse en larvas.
- Cada larva infectada puede expresar entre 1 y 3 mg de proteínas
- Alrededor de 100 larvas brindan una producción equivalente a 1 litro de cultivo de células de insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

Baculovirus recombinantes que expresan la DsRed (proteína roja).

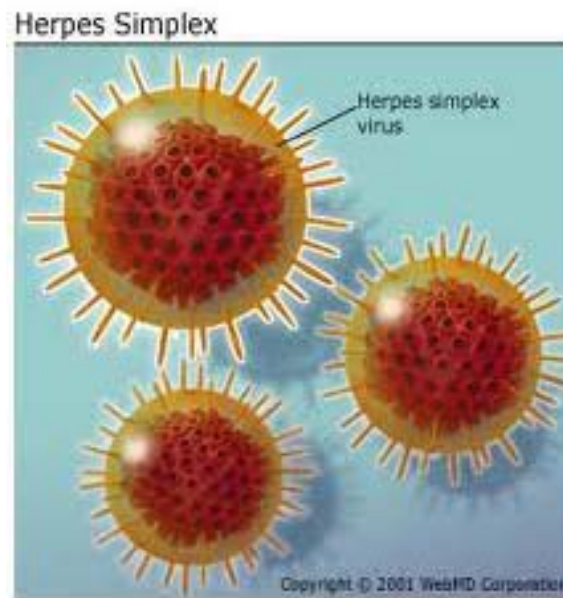


Rachiplusia nu
infectada
con AcMNPV
(ph-, DsRed+)



Rachiplusia nu
no infectada

Expresión de proteínas utilizando virus de mamíferos



Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insecto
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus de mamíferos/células de mamíferos

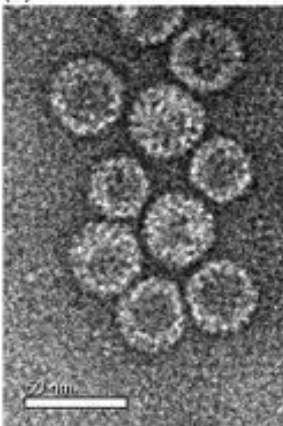
- Existen numerosos ejemplos de **virus de mamíferos** modificados para el desarrollo de **sistemas de expresión de proteínas**.
- Entre ellos se pueden mencionar a **Vaccinia** y al **Herpes virus**.
- Estos **patógenos** han sido **modificados** para que **no afecten** la **salud humana**.
- Al poseer **genomas grandes de dsDNA**, los **sistemas** comerciales basados en ellos presentan **similitudes** con aquellos comentados para los **baculovirus**.
- Por otro lado, **pueden usarse adenovirus, adeno-asociados, retrovirus y lentivirus** tal cual se usan para aplicaciones de terapia génica.

Expresión de proteínas recombinantes

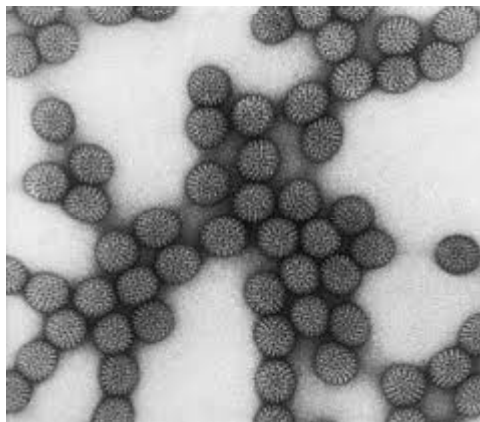
Sistema virus herpes/células de mamíferos

- La Familia *Herpesviridae* contiene numerosos virus con **genomas de DNA** que infectan mamíferos.
- Entre ellos, se encuentran: **HSV-1** (*Herpes Simplex Virus Type 1*), **HSV-2** (*Herpes Simplex Virus Type 2*), **HCMV** (*Human Cytomegalovirus*), **EBV** (*Epstein Barr Virus*), **HHV3** (*Varicella Zoster*), **KSHV** (*Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*).
- De todos los mencionados, **HSV-1, HCMV y EBV** son los **más utilizados** en diversas **aplicaciones biotecnológicas**.

HSV



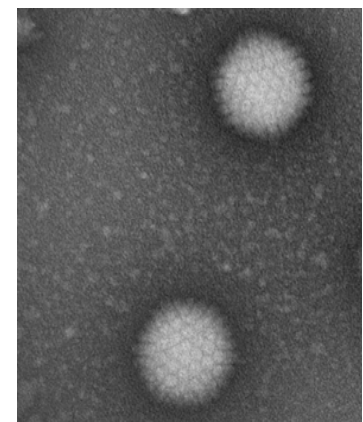
HCMV



EBV



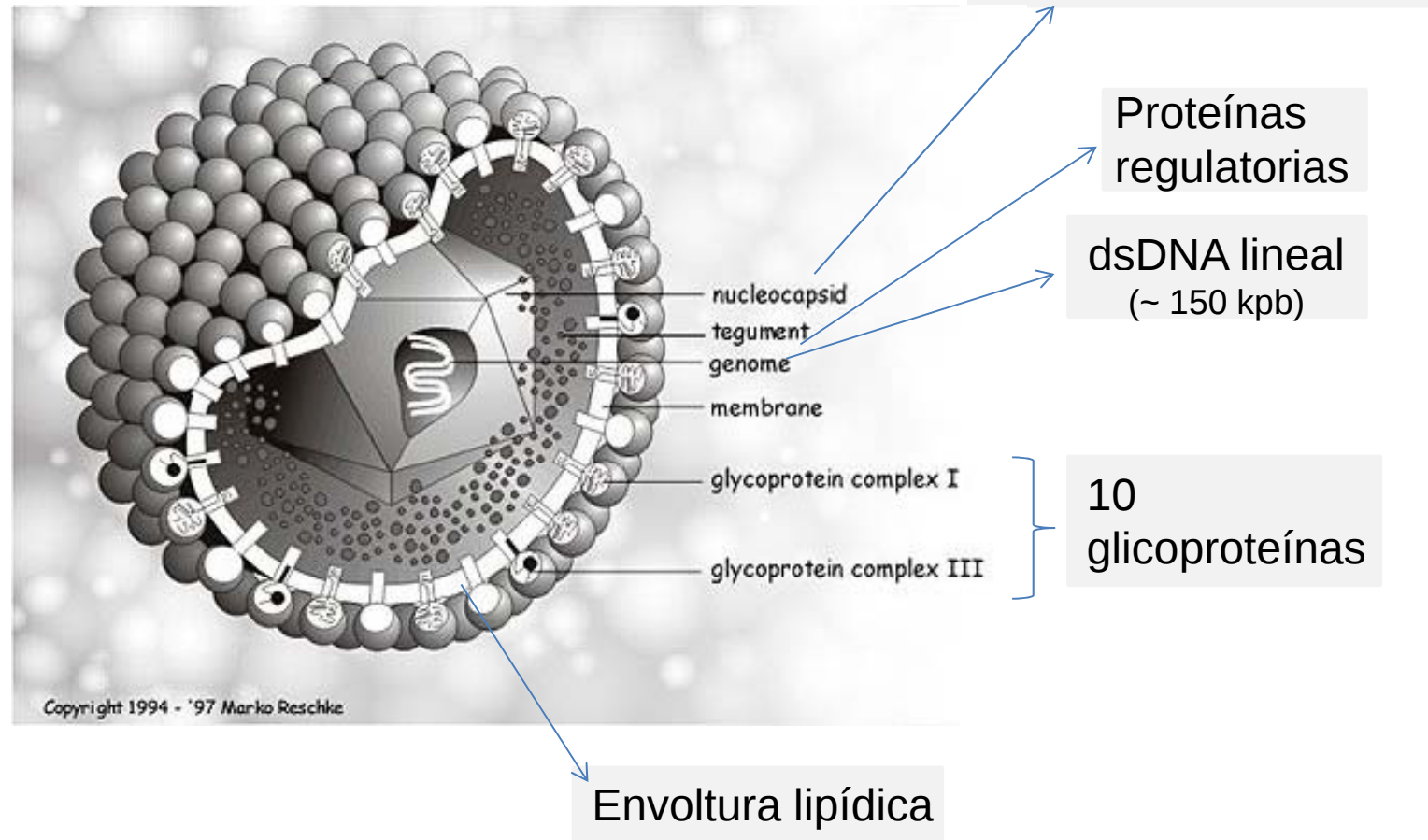
HHV3



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

Estructura típica de un herpes

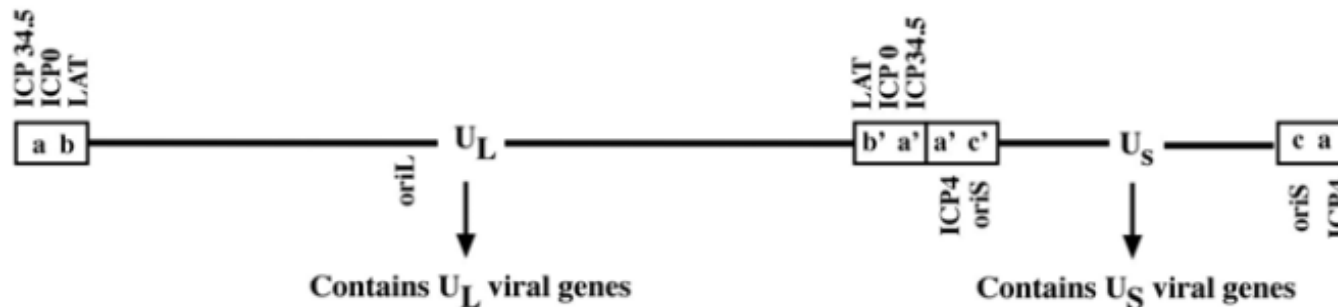


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

Genoma del herpes

B. HSV-1 Genome Organization

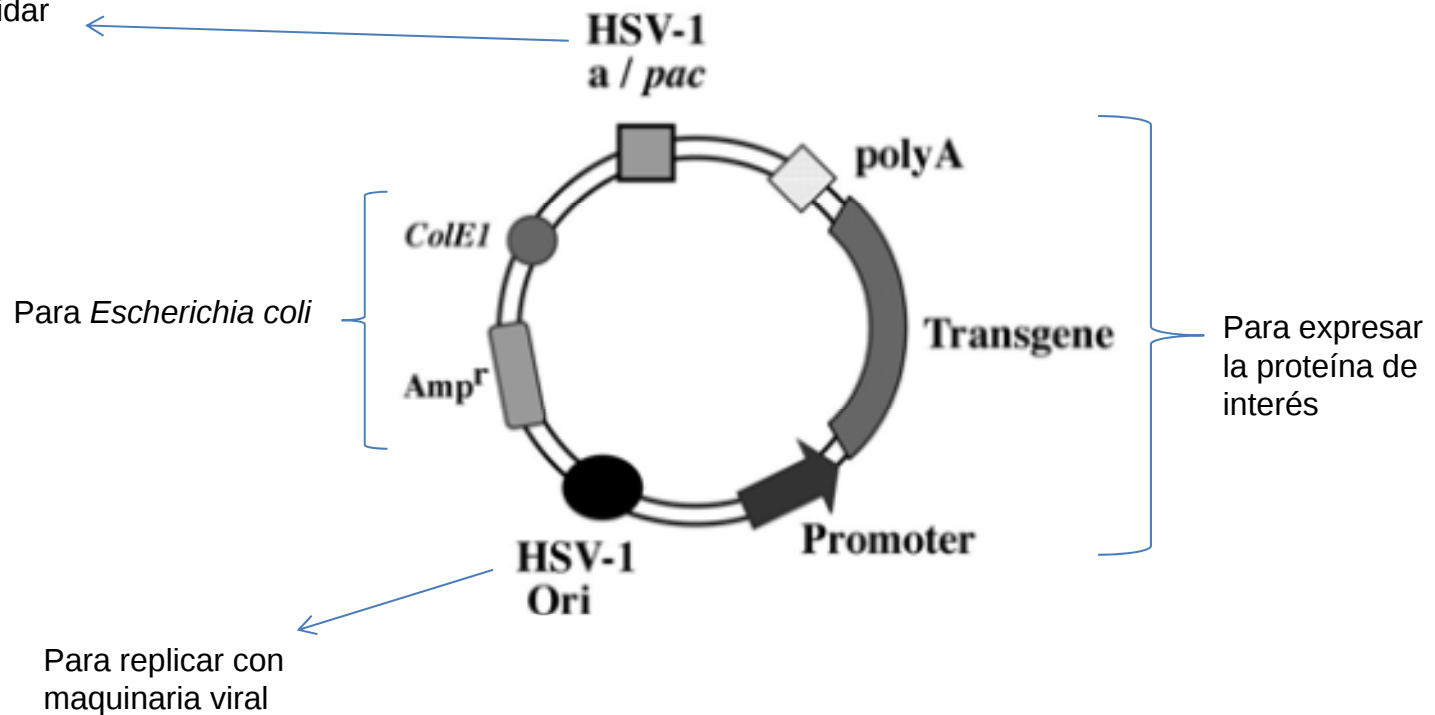


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

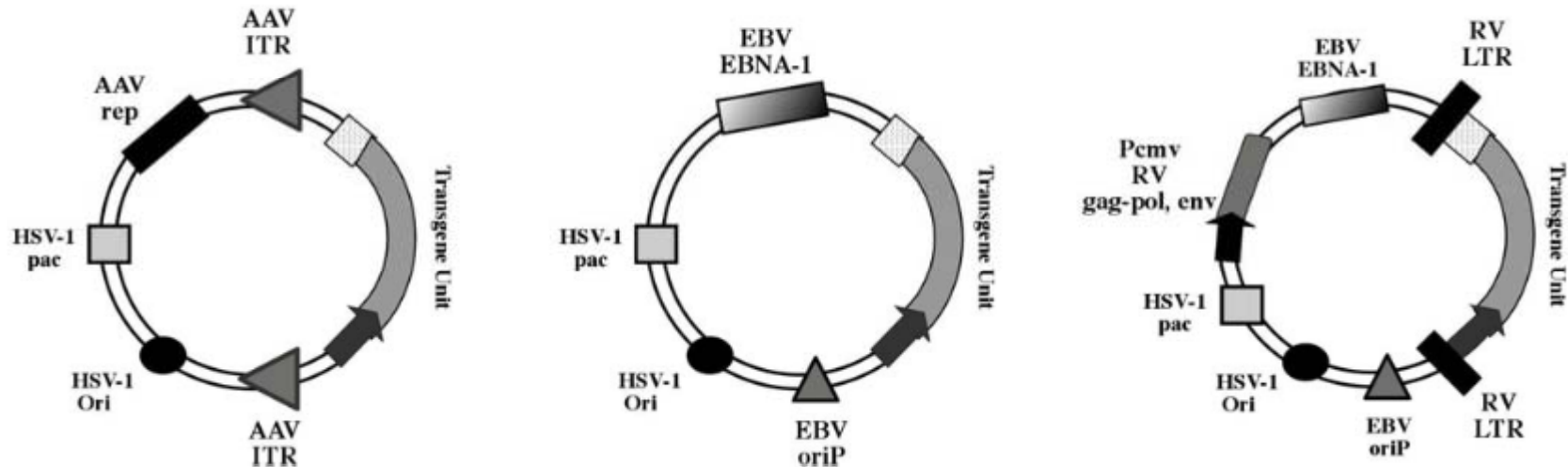
Los **vectores basados** en el genoma del **virus herpes** se denominan **amplicones** (*herpes amplicon vectors*).

Para encapsidar
y resolver
multímeros

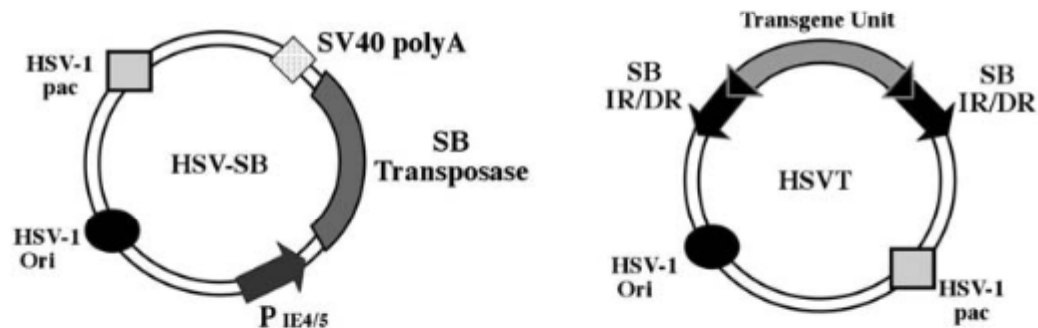


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

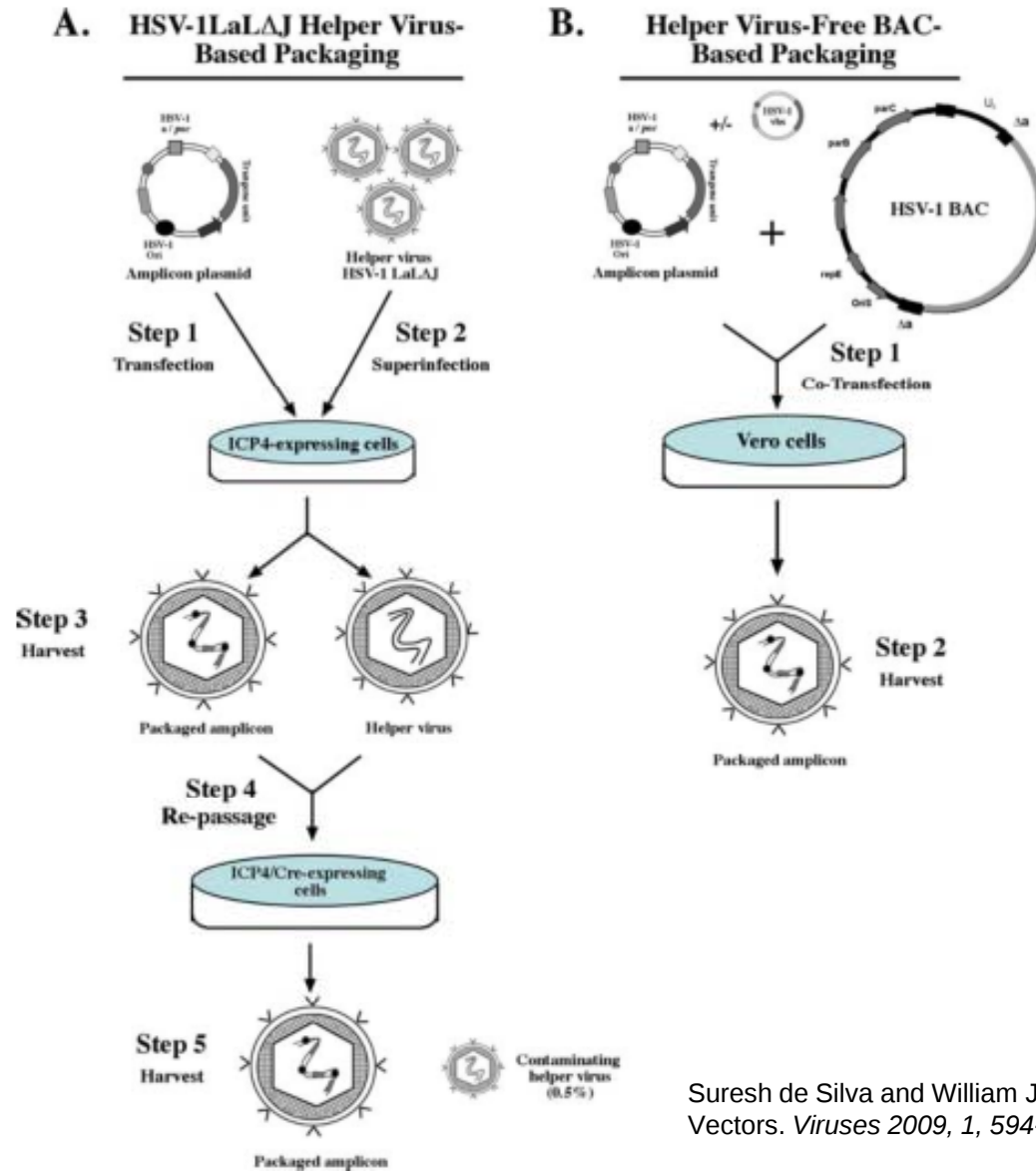


D. HSV/Sleeping Beauty



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos



Suresh de Silva and William J. Bowers. Herpes Virus Amplicon Vectors. *Viruses* 2009, 1, 594-629; doi:10.3390/v1030594

Expresión de proteínas recombinantes

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insecto
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



Expresión de proteínas recombinantes

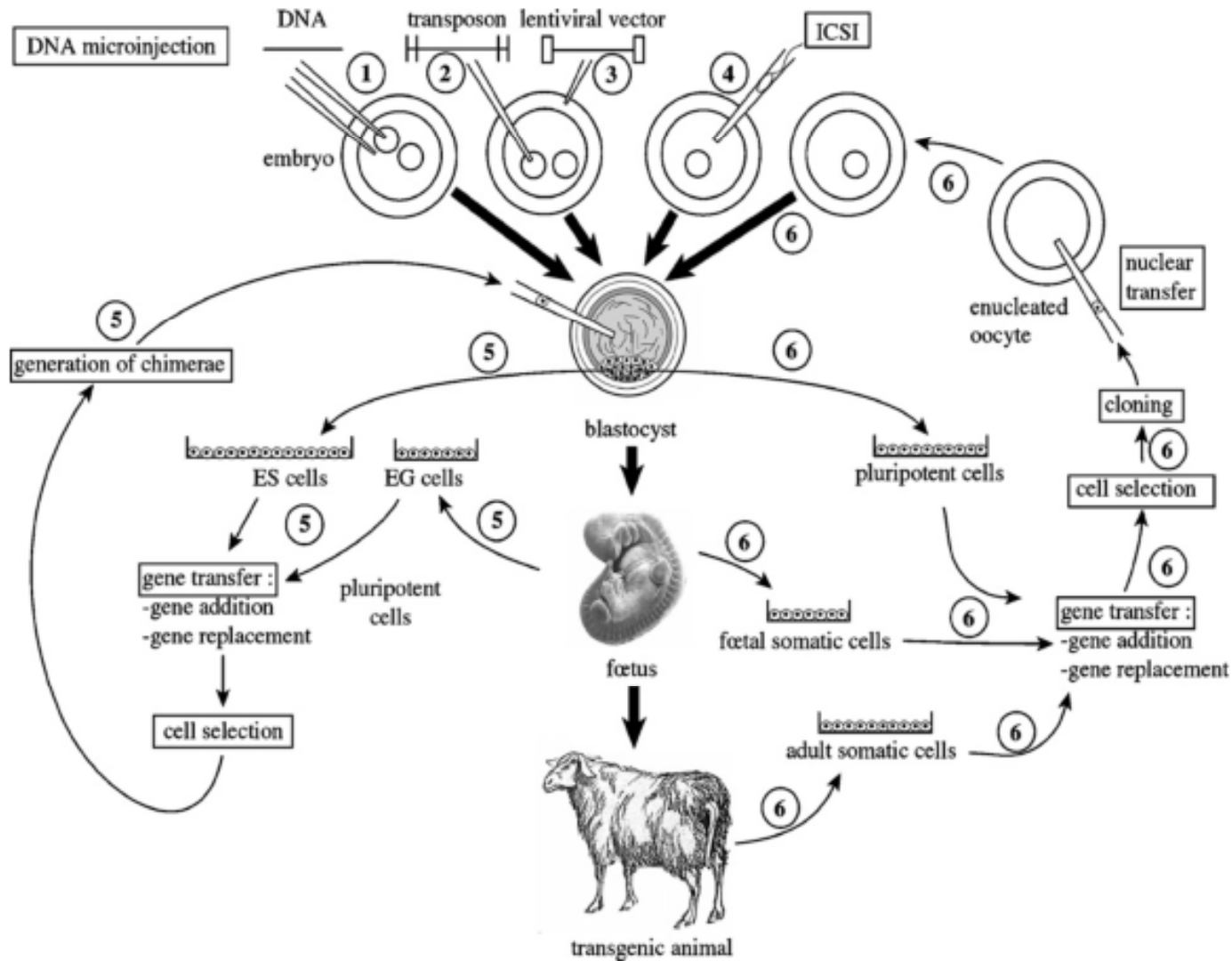
Sistema OGM

- La **modificación genómica** de **mamíferos** para la **producción de proteínas** es un área de la biotecnología en pleno auge.

Esta **estrategia** denominada “**molecular pharming**”, consiste en disponer
- de un **ganado productor** de alguna **biomolécula**, la cual se aísla a partir de la leche, por ejemplo.
- **Metodológicamente** involucra aplicar un procedimiento de **mutagénesis genómica** del tipo *knock in*, y luego una serie de **cruzamientos** para sostener la **línea productora**.
- Esta **metodología** también está siendo **explotada** en **vegetales**.

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema OGM



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema OGM

Table 1

Comparison of the different systems to produce recombinant pharmaceutical proteins

Points to consider	Production systems					
	Bacteria	Yeast	Insect cells + baculovirus	Animal cells (CHO cells)	Transgenic plants	Transgenic animals
Theoretical production level	+++++	+++++	+++	+	+++++	+++++
Practical production level	++ (+)	++ (+)	+	+	++	++++
Investment cost	+++++	+++++	++	+	++++	+++
Production cost	+++++	+++++	++	++	+++++	++++
Flexibility	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Line conservation	+++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Line stability	+++++	+++++	++++	+++	+++++	+++++
Delay for the first production	+++++	+++++	+++	+++++	++++	+++ (+)
Scaling up	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Collection	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++++
Effect on organism	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++
Post-translational modifications	+	++	+++	++++	+++	++++
Glycosylation	+	++	+++	++++	++	++++
Stability of product	+++++	+++++	+++	+++	++++	++++
Purification	+++	+++	+++	++++	+++	+++
Contaminant pathogens	+++++	+++++	+++++	++++	+++++	++++
Intellectual property	++++	+++	+++	++	+++	+++
Products on the market	++++	+++	+++	+++++	+	+++

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema OGM

Comparison of the different transgenic animal species to produce recombinant pharmaceutical proteins

Points to consider	Production systems						
	Blood	Milk	Egg white	Seminal Plasma	Urine	Silk gland	Drosophila larvae
Theoretical production level	+++++	+++++	+++++	+++	++	++	++
Practical production level	++	++++	+++ (+)	+	+	++	+
Investment cost	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
Production cost	++++	++++	++++	++	+	+++++	++++
Flexibility	+++++	+++++	+++++	++	+	+++++	++++
Line conservation	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Line stability	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Delay for the first production	+++	+++	+++	++	+	++++	++++
Scaling up	++++	++++	++++	++	+	++++	+++
Collection	+++++	++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Effect on organism	++	+++	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	++++	++++
Post-translational modifications	+++++	++++	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	++ (+)	++ (+)
Glycosylation	++++ (+)	++++	+++	+++ (+)	+++ (+)	++	++
Stability of product	+++	++++	++++	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)	+++ (+)
Purification	++	+++	+++	++ (+)	++ (+)	+++	++ (+)
Contaminant pathogens	++	+++	+++	+++	++	++++	++++
Intellectual property	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Products on the market	+	++++	++	+	+	++	+

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema OGM

Comparison of the time required to obtain recombinant proteins in different transgenic animal species

	Rabbit	Pig	Sheep	Goat	Cow
Gestation time (months)	1	4	5	5	9
Age at sexual maturity (months)	5	6	8	8	15
Time between gene transfer and first lactation (months)	7	16	18	18	33
Number of offspring	8	10	1–2	1–2	1
Annual milk yield (liters)	15	300	500	800	8000
Recombinant protein per female per year (kg)	0.02	1.5	2.5	4	40

Possible level of recombinant protein production in milk of different transgenic animal species

Protein	Estimated need (kg year ⁻¹)	Species	Herd size
Human serum albumin	100,000	Cow	5,400
α -1-Antitrypsin	5,000	Sheep	4,300
Monoclonal antibody	100	Goat	58
Anti-thrombin-III	75	Goat	43
Factor IX	2	Pig	4
Protein C1 inhibitor	1	Rabbit	50

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema OGM

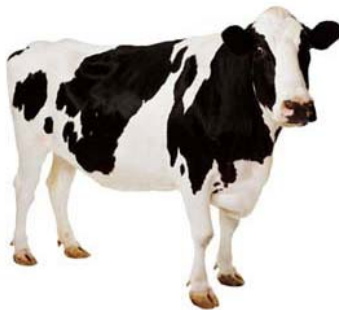
Some of the pharmaceutical proteins under study produced in milk

Proteins	Company	Animal	g/l	Glycosylation	Development
ATryn	GTC	Goat	3	<NANA, >NGNA	EMEA (2006)
InhibitorC1	Pharming	Rabbit	8	<NANA	Phase III
Fibrinogen	Pharming	Rabbit	?		Phase III
Malaria antigen	GTC	Goat	?	No	Clinical
Anti-CD137	GTC	Goat	?	?	Clinical
Albumin	GTC	Goat	?	No	Clinical
α -AT	GTC	Goat	?	?	Clinical
BChE	PhAth	Goat	?	?	Preclinical
Rotavirus VP2/VP6	BPT	Rabbit	0.5	No	Preclinical
Blood factor	BPT	Rabbit	3	<NANA	Preclinical
TNAP	AM Pharma	Rabbit	<0.1	?	Preclinical

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema OGM

Desarrollos de mamíferos transgénicos para producción de biofármacos en Argentina



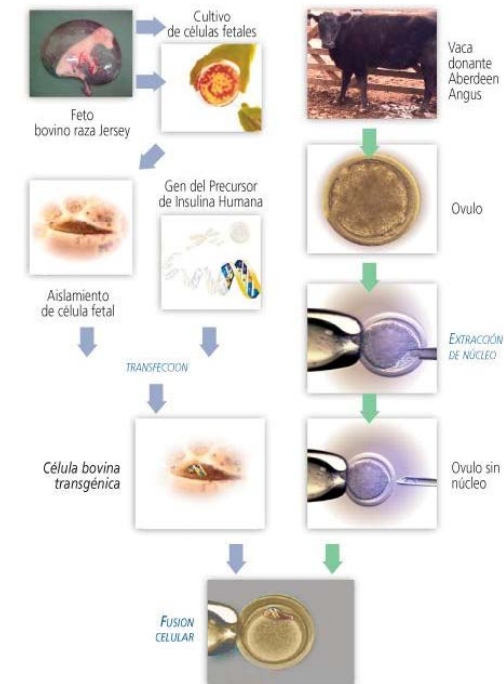
insulina

Hormona de
crecimiento

Lactoferrina y
lisozima

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema OGM



Desarrollo de bovinos transgénicos para obtención de insulina humana a partir de su leche.

Bovinos transgénicos productores de **Insulina** desarrollado por la empresa **BIOSIDUS** en **Argentina**

