

Ingeniería Genética II

Unidad XII

Sistemas de expresión de proteínas

Biotecnología es...

Biotecnología es...

El uso de organismos, sus productos o partes para la generación de bienes y servicios

Biotecnología es...

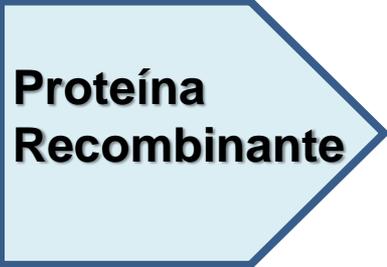
El uso de organismos, sus productos o partes para la generación de bienes y servicios

SOLUCIONES BIOLÓGICAS frente a **PROBLEMAS**
biológicos o no biológicos

Biotecnología

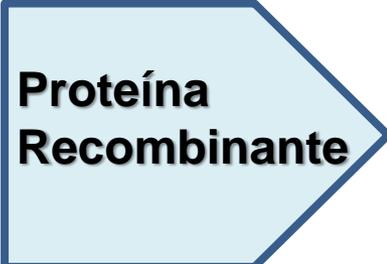


Biotecnología y Proteínas recombinantes



**Proteína
Recombinante**

Biotecnología y Proteínas recombinantes



Proteína
Recombinante

Proteína sintetizada *in vitro* o *in vivo* a partir de un **gen recombinante**

Biotecnología y Proteínas recombinantes

Proteína
Recombinante

Proteína sintetizada *in vitro* o *in vivo* a partir de un gen recombinante



Es una solución biotecnológica (o parte de la solución)

Ejemplos: vacunas, fármacos, kits de diagnóstico, enzimas industriales, bioplaguicidas, etc.

Biotecnología y Proteínas recombinantes

Proteína
Recombinante

Proteína sintetizada *in vitro* o *in vivo* a partir de un gen recombinante



La proteína puede ser producida en sistemas libres de células o en células derivadas de organismos pluricelulares

Ejemplos: Sistemas basados en extractos celulares; células vegetales y animales creciendo en cultivo in vitro.

Biotecnología y Proteínas recombinantes

Proteína
Recombinante

Proteína sintetizada *in vitro* o *in vivo* a partir de un gen recombinante



La proteína puede ser producida en organismos que actúan como fábricas

Ejemplos: Bacterias, levaduras, vegetales y animales biofábricas.

Biotecnología y Proteínas recombinantes

Proteína
Recombinante

Proteína sintetizada *in vitro* o *in vivo* a partir de un gen recombinante



***La proteína deriva de un gen
construido mediante ingeniería
genética***

*Ejemplos: plásmidos recombinantes, virus recombinantes,
genomas recombinantes de organismos*

Sistemas de expresión

- Las **proteínas recombinantes** son **polipéptidos producidos** en general, en **sistemas heterólogos** (organismos diferentes al portador natural del gen). **Involucra la introducción de un nuevo programa genético en una materia viva, contemplando para ello a los programas genéticos endógenos** (sistemas de transcripción, traducción, modificaciones postraduccionales).
- 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

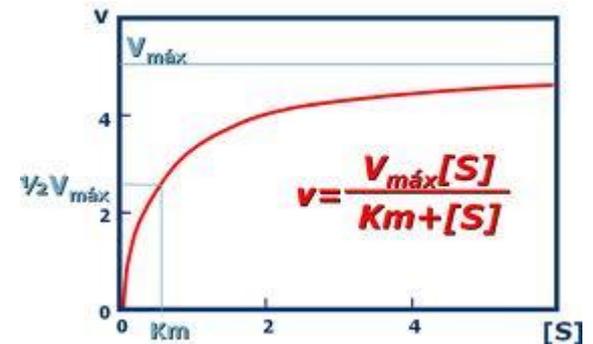
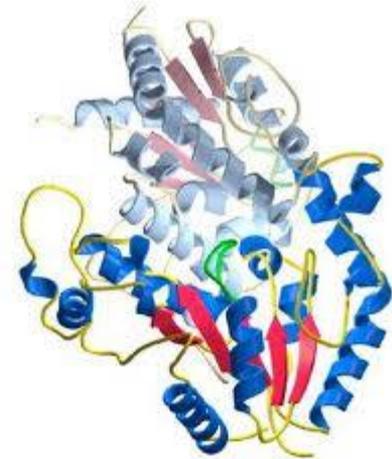
Generar construcción genética

Transferirla al organismo
adecuado

Producir la proteína recombinante

Purificar la proteína recombinante

Realizar ensayos funcionales y estructurales



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

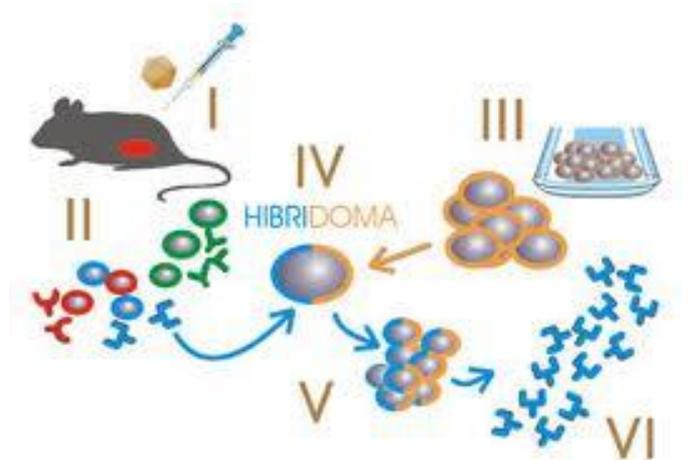
Generar construcción genética

Transferirla al organismo
adecuado

Producir la proteína recombinante

Purificar la proteína recombinante

Inoculación en un mamífero



Clonado molecular

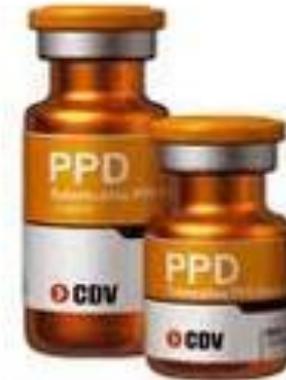
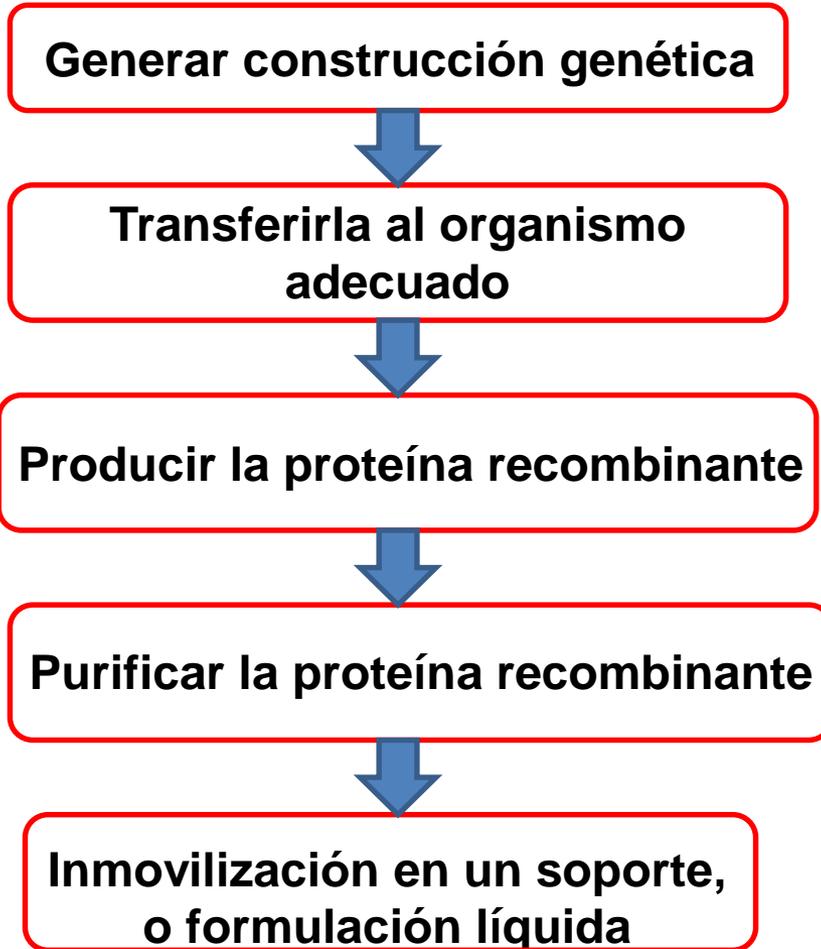
Expresión de proteínas recombinantes



- 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

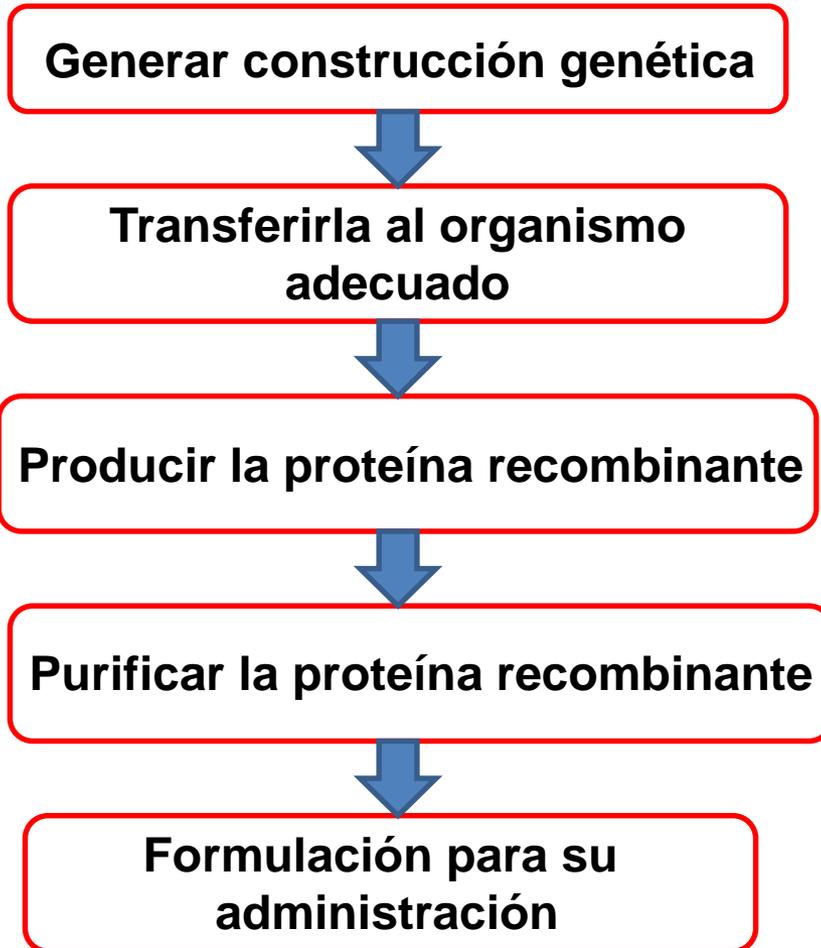
Expresión de proteínas recombinantes



- 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

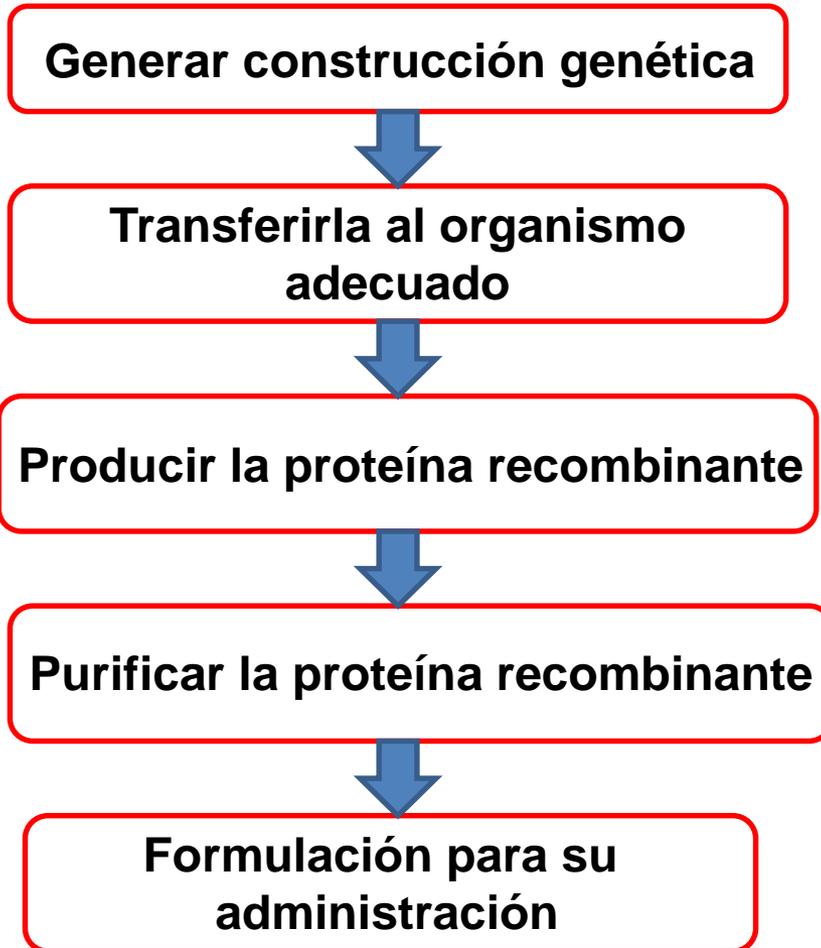
Expresión de proteínas recombinantes



- 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

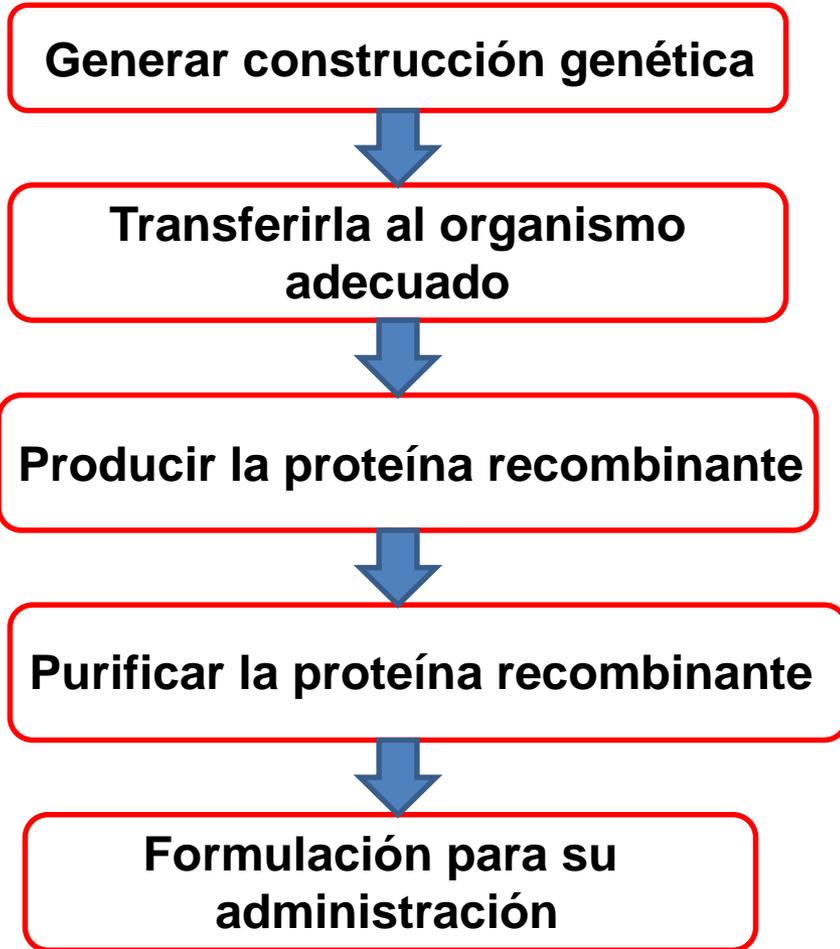
Expresión de proteínas recombinantes



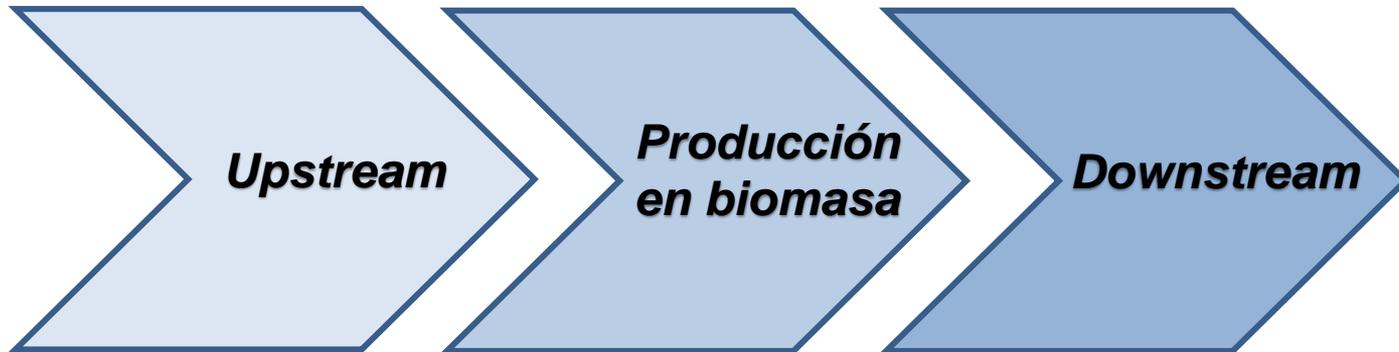
- Para estudiar proteínas (estructura, actividad)
- Para generar anticuerpos poli y monoclonales
- Para generar antígenos de diagnóstico
- Para generar agentes terapéuticos
- Para generar vacunas a subunidad
- Para generar enzimas de aplicación industrial

Expresión de proteínas recombinantes

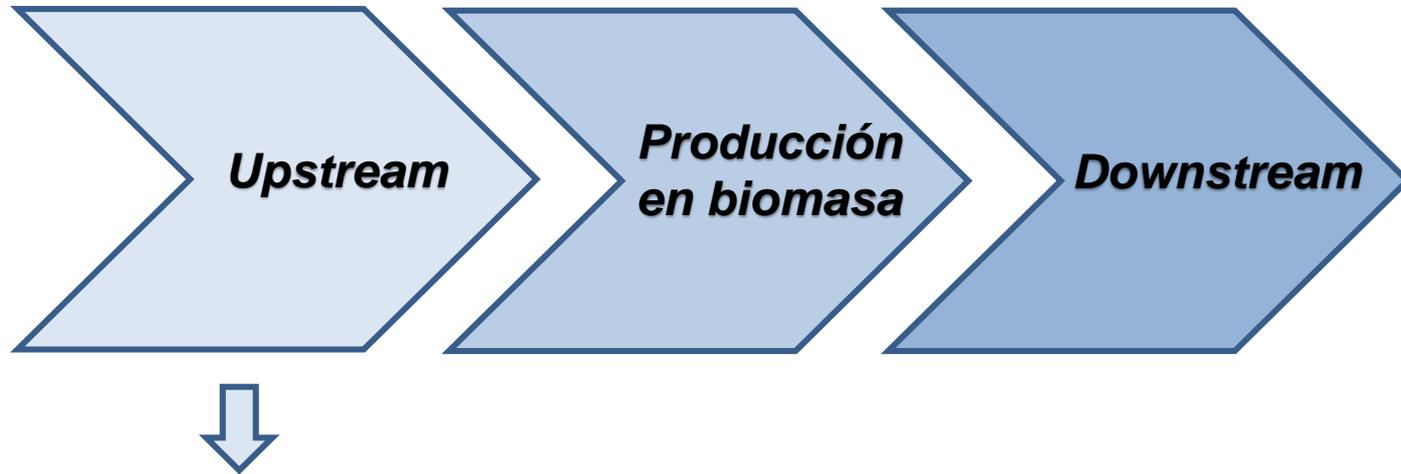
Para generar enzimas de aplicación industrial



Producción de una proteína recombinante

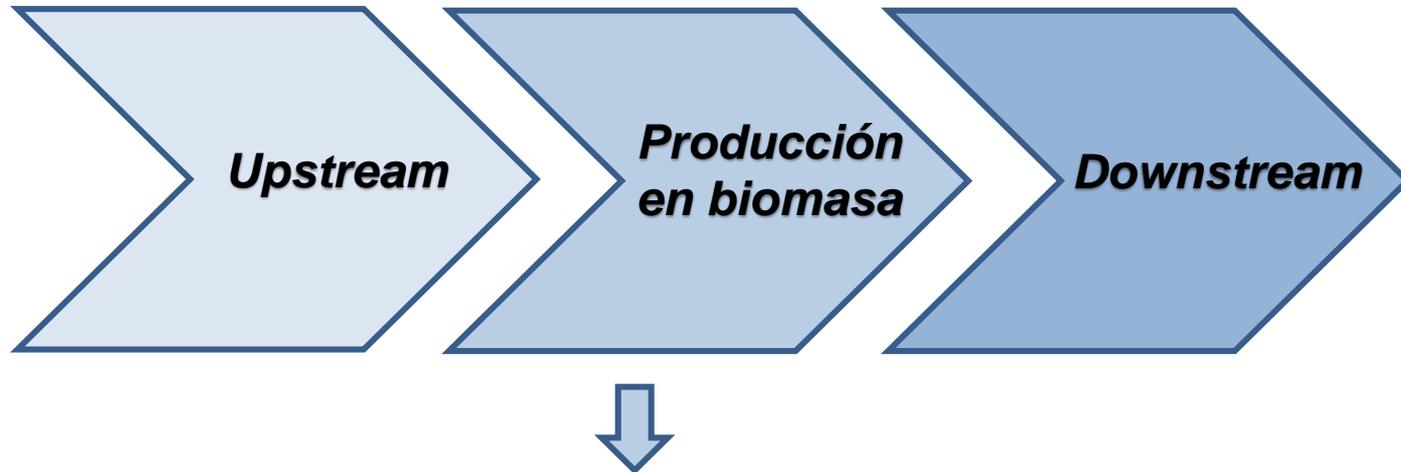


Producción de una proteína recombinante



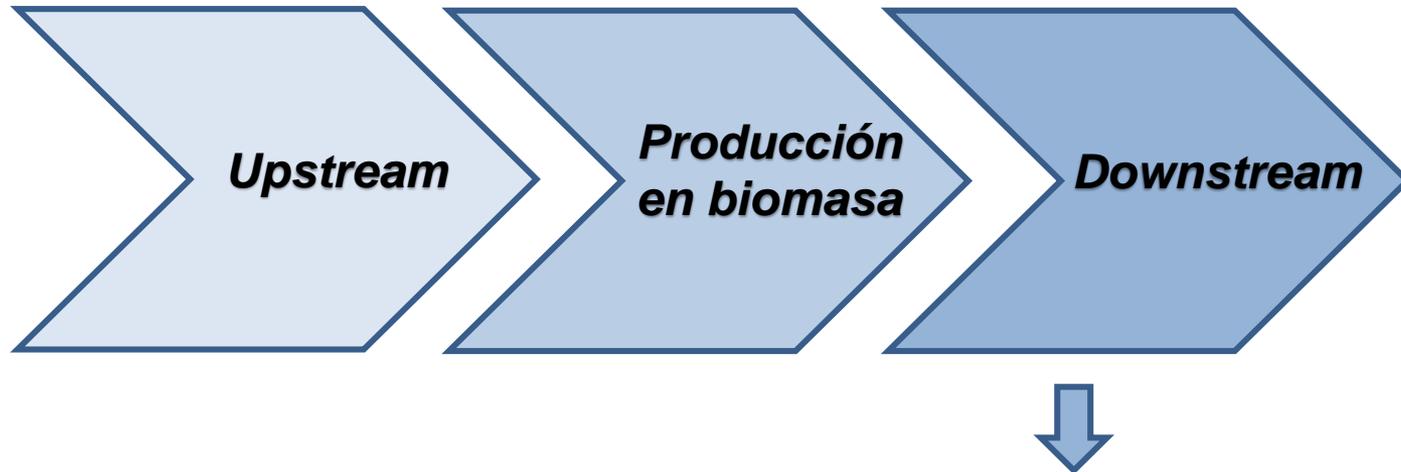
- ✓ Desarrollo del genotipo recombinante
- ✓ Pruebas piloto en biomasa

Producción de una proteína recombinante



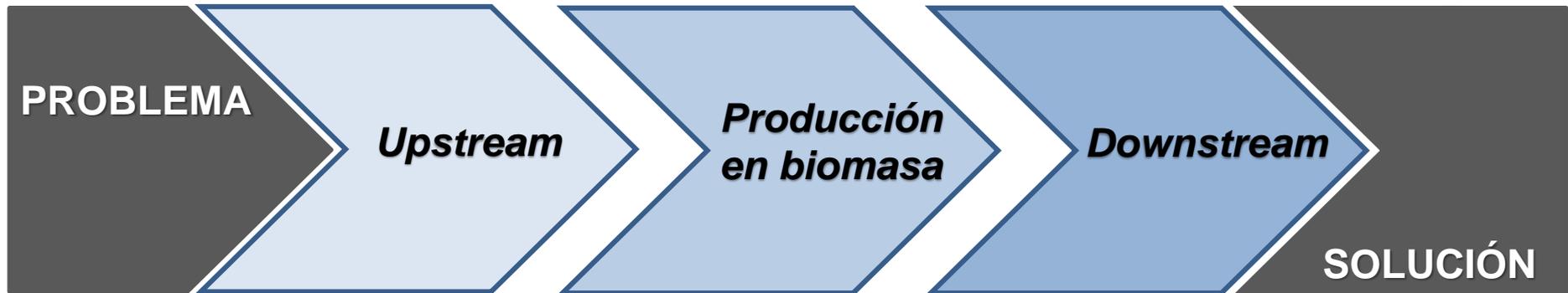
- ✓ **Proceso fermentativo**
- ✓ **Escalado**
- ✓ **Cría y mantenimiento de OGMs biofábricas**

Producción de una proteína recombinante

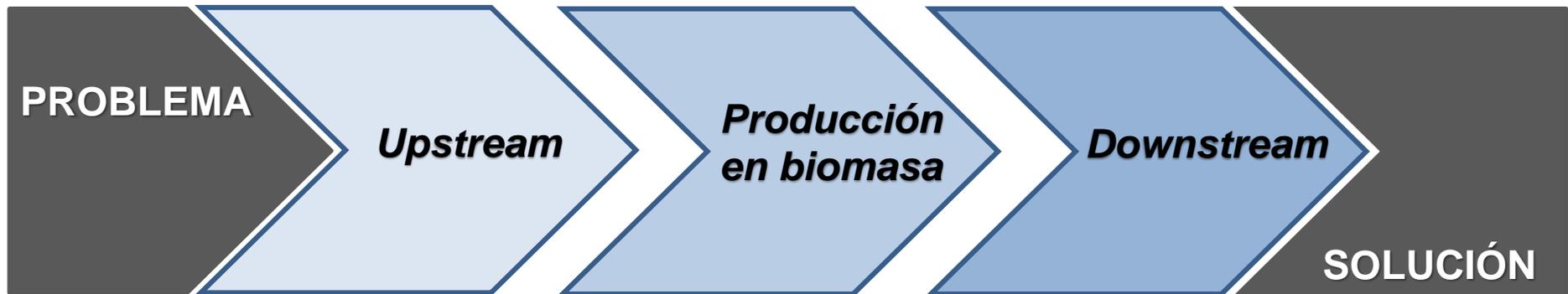


- ✓ **Recuperación de la materia prima**
- ✓ **Purificación de la proteína**
- ✓ **Acondicionamiento de la proteína**
- ✓ **Asuntos regulatorios**

Producción de una proteína recombinante

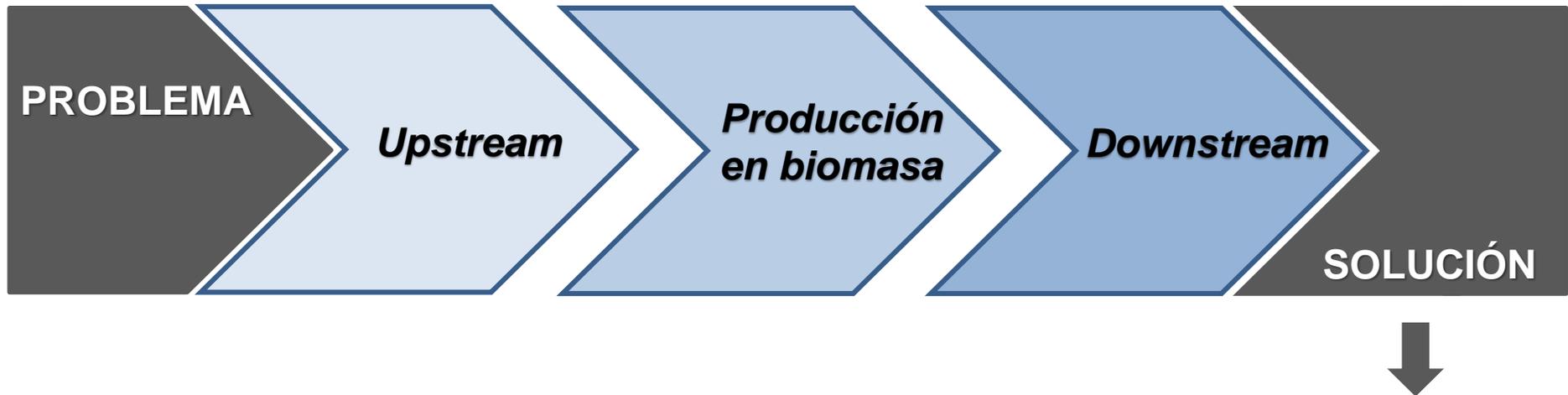


Producción de una proteína recombinante



Necesidad de conocimiento, de una **terapia**, de una **vacuna**, de una **enzima**, de un **sistema de diagnóstico**, etc.

Producción de una proteína recombinante



La **proteína recombinante** es el **producto biotecnológico**, o es parte de un **producto / servicio biotecnológico**

Producción de una proteína recombinante



La **dimensión del problema** y la **necesidad del producto o servicio requeridos** condicionan el **proceso biotecnológico** que debe elegirse y aplicarse

Producción de una proteína recombinante

PROBLEMA

- **CONOCIMIENTO BÁSICO** sobre el **PROBLEMA**
- **CONOCIMIENTO APLICADO** sobre el **PROBLEMA**
- **NATURALEZA** de la **PROTEÍNA DE INTERÉS**
- **EVALUACIÓN ECONÓMICA** para su producción
- **SISTEMA REGULATORIO**
- **MERCADO**

SOLUCIÓN

Producción de una proteína recombinante

PROBLEMA

- **CONOCIMIENTO BASICO** sobre el **PROBLEMA**
- **CONOCIMIENTO APLICADO** sobre el **PROBLEMA**
- **NATURALEZA** de la **PROTEÍNA DE INTERÉS**
- **EVALUACIÓN ECONÓMICA** para su producción
- **SISTEMA REGULATORIO**
- **MERCADO**

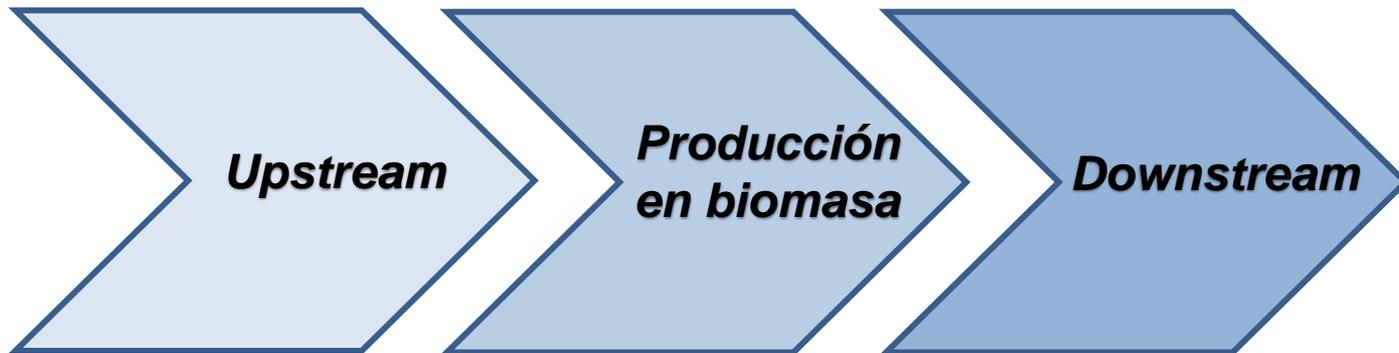
SOLUCIÓN



El análisis define la elección del SISTEMA DE EXPRESIÓN

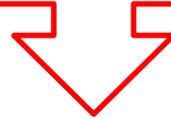
Producción de una proteína recombinante

La elección del SISTEMA DE EXPRESIÓN define...



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

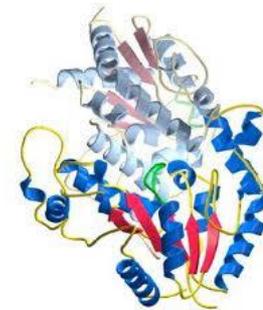
GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



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

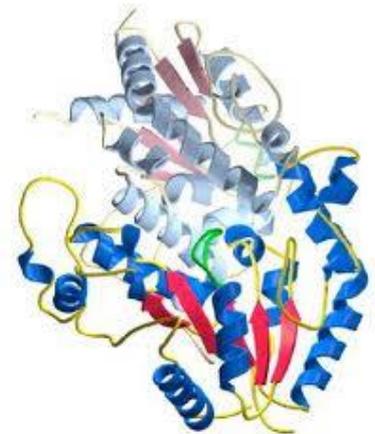
Dirección del proceso de diseño

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

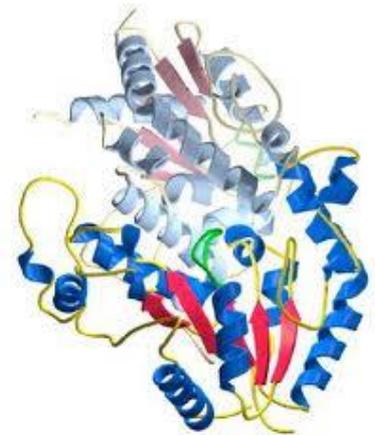


Expresión de proteínas recombinantes

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



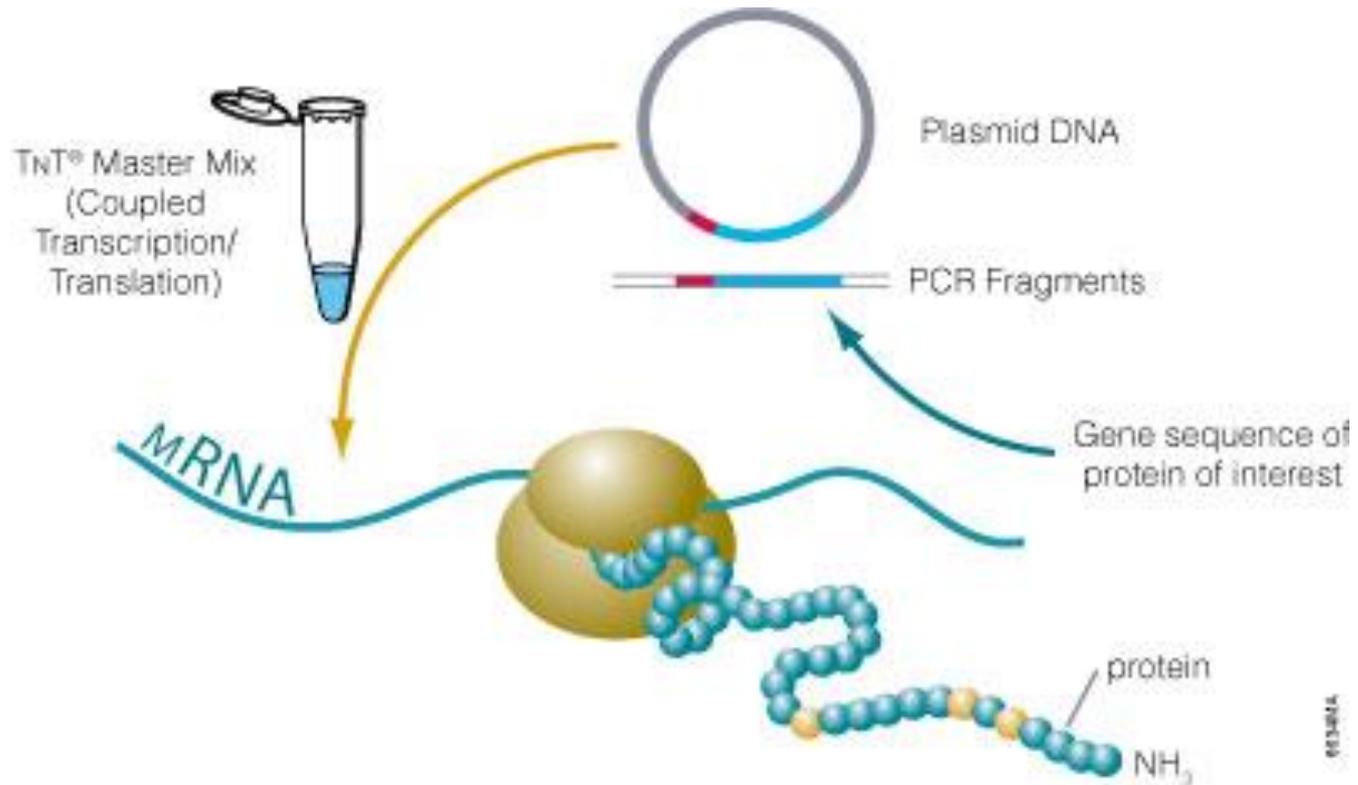
Expresión de proteínas recombinantes

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

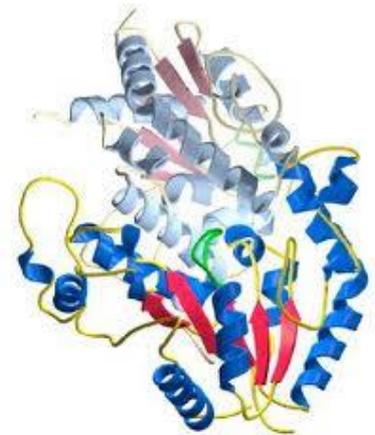
- Estos **sistemas** son **útiles** cuando **no** se necesitan **grandes cantidades** de proteína, **o** de un **suministro constante** de la misma.
- Además, son **empleados** para **generar proteínas marcadas** necesarias para llevar a cabo otros estudios moleculares.
- Los **tiempos de ejecución** 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

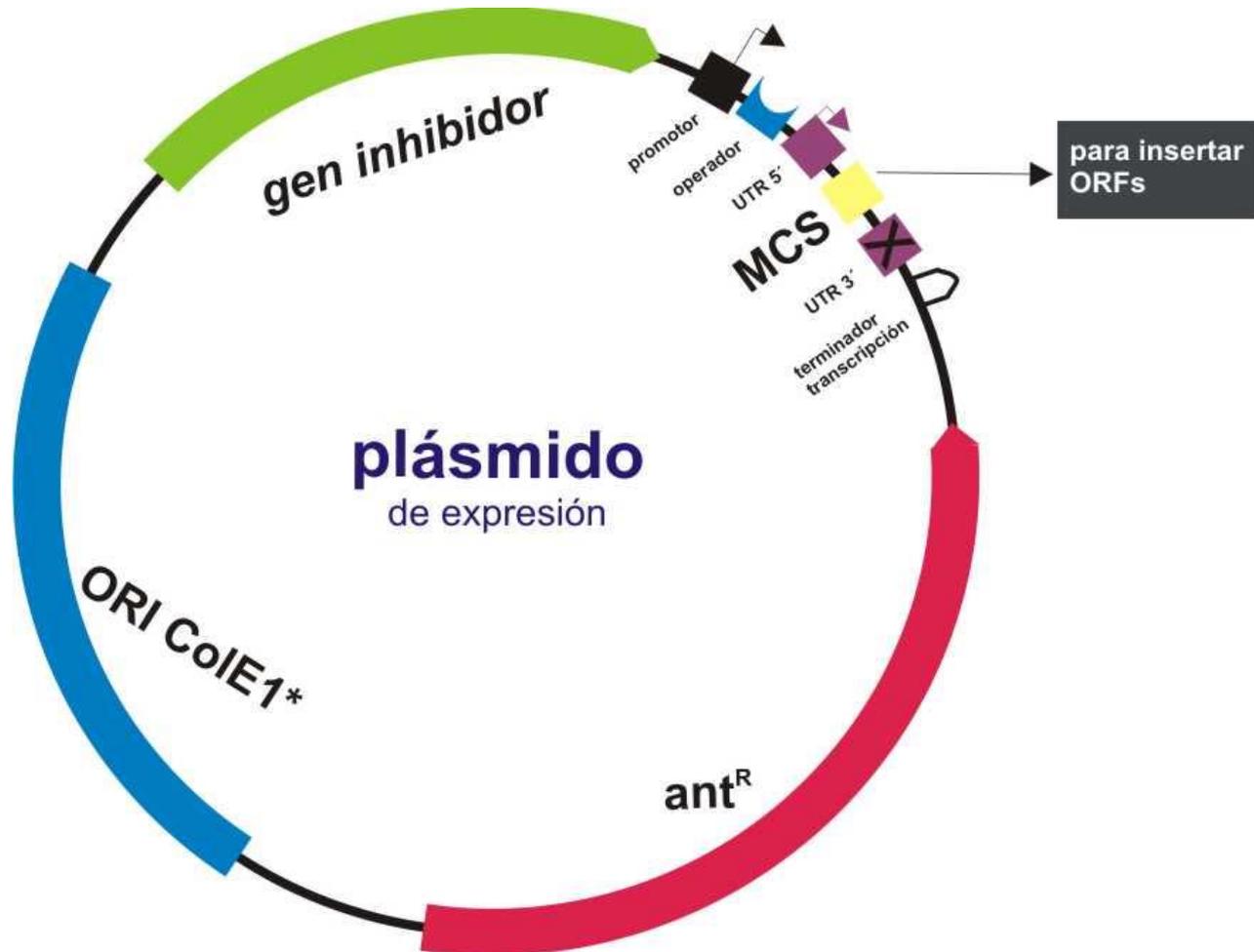


Plásmidos	Bacterias
Plásmidos	Levaduras
Plásmidos	Células animales
Virus	Células de insectos
Virus	Células de mamíferos
Transgenes	Toda clase de organismos



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

AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGT
Promotor T7 *Operador lacI*

TAACHTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCGGGCG
RBS *NdeI* *pel B*

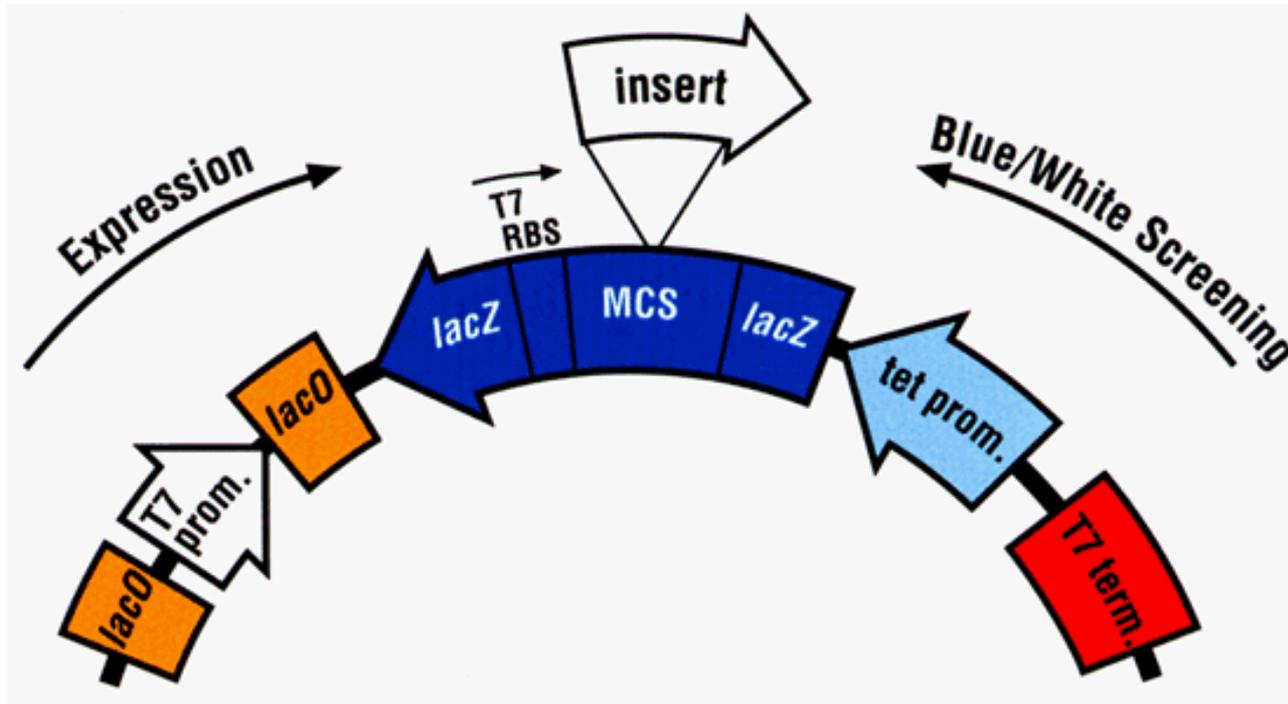
ATGGCCTGGCCATGGATATCGGAATTAATTTCCGGATCCGGATATCCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCCCTCGAGCACCC
pel B *NcoI* *BamHI* *EcoRV* *SacI* *Sall* *HindIII* *XhoI*

ACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAG
His-tag *STOP*

CATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTT
Terminador T7

Expresión de proteínas recombinantes

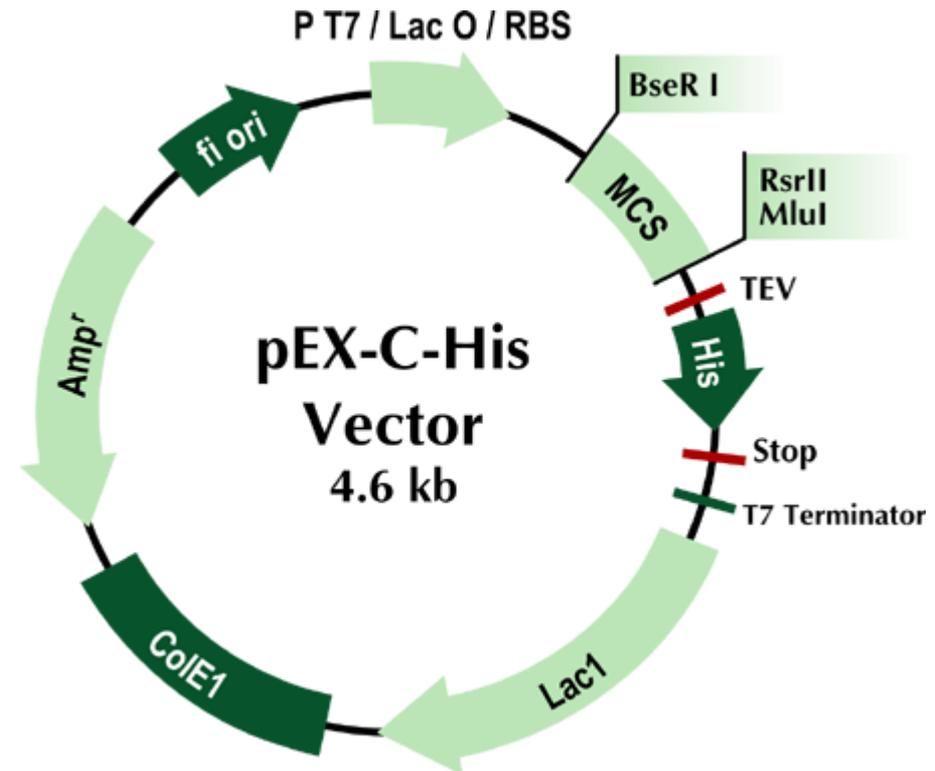
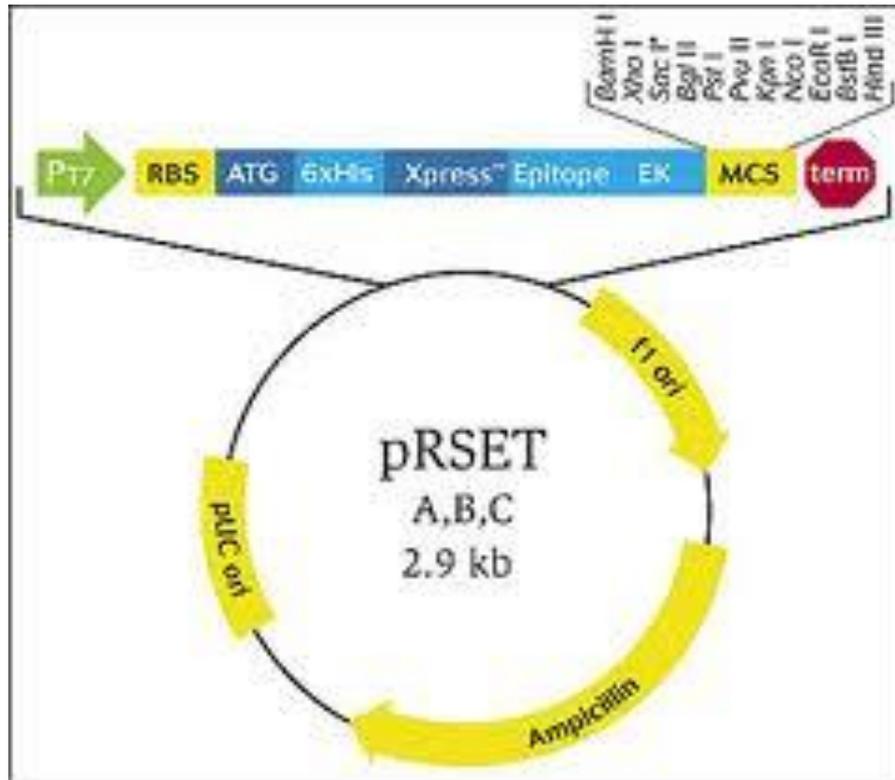
Construcción del gen: selección de vector



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

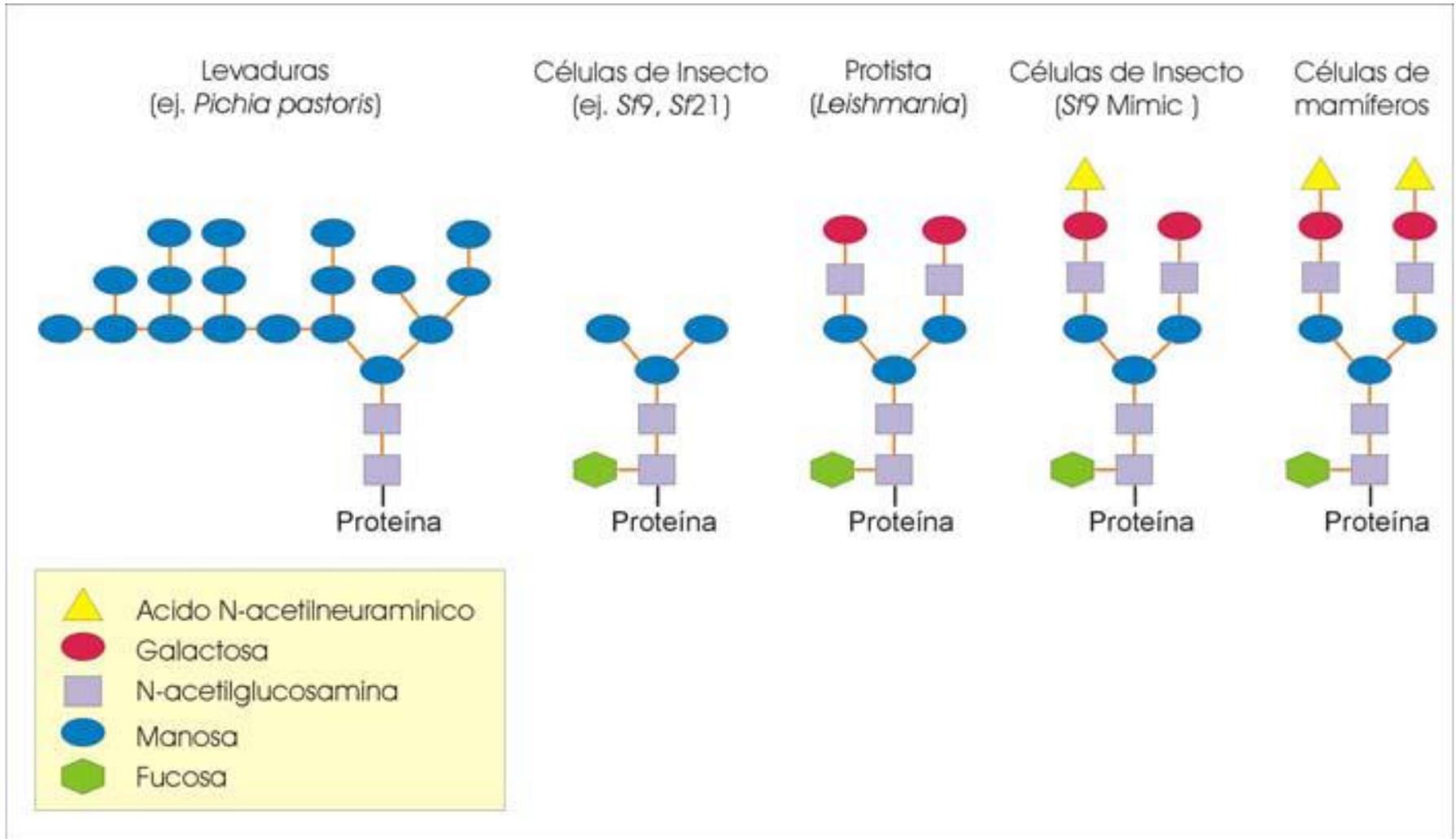
Sistema plásmidos/bacterias

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

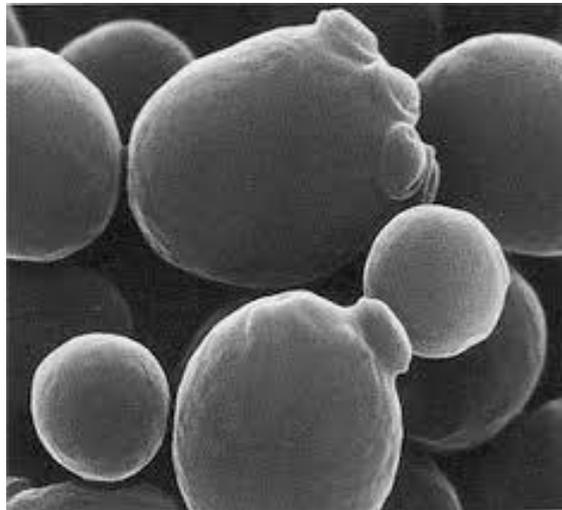
- La **principal desventaja** radica en que ciertas **proteínas de mamíferos no** pueden ser **expresadas correctamente**, ya sea por problemas de **plegamiento**, por sus **efectos tóxicos** en las bacterias, y/o porque estos microorganismos no cuentan con las **rutas de modificación postraduccional**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

Expresión de proteínas recombinantes

Algunas modificaciones: las glicosilaciones



Expresión de proteínas en levaduras

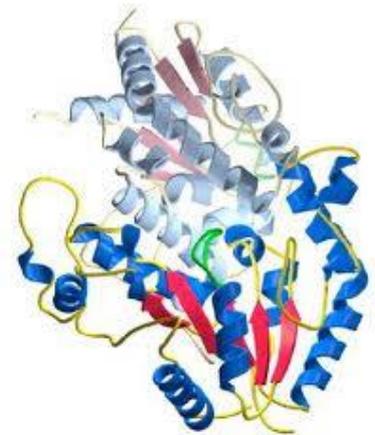


Expresión de proteínas recombinantes

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.

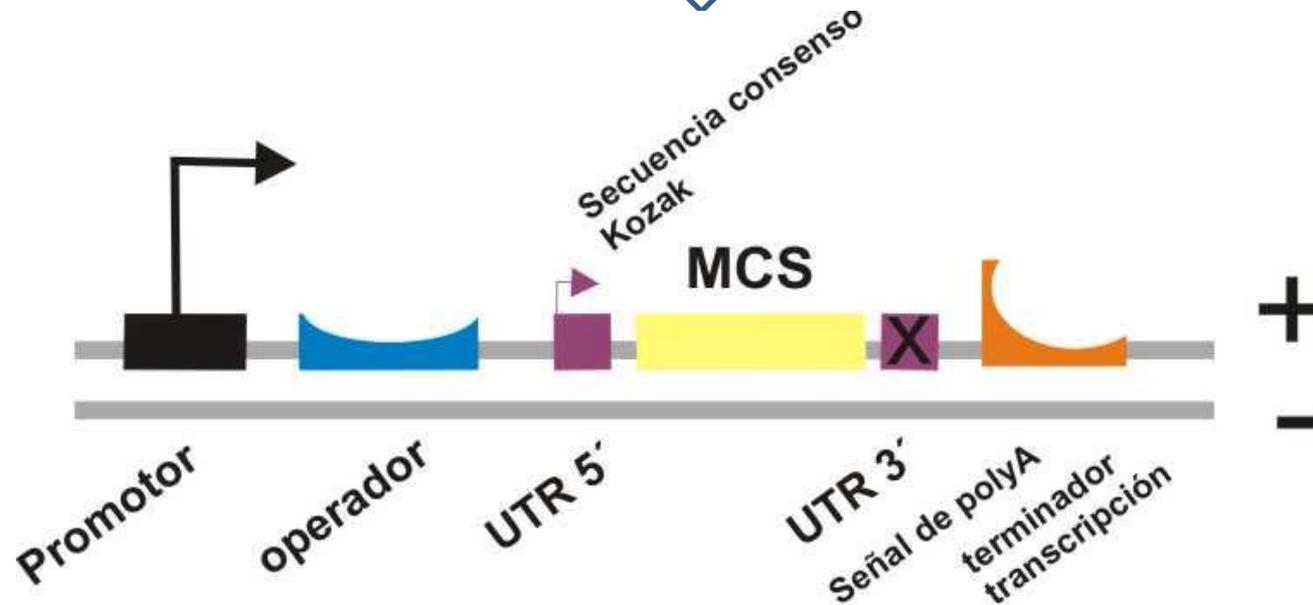
- En vistas de su naturaleza, las levaduras permiten la correcta **formación de puentes disulfuro** en las proteínas que así lo necesiten, y permiten la **adición covalente** de **diferentes compuestos** a las cadenas laterales de algunos aminoácidos (acetilaciones, fosforilaciones, miristilaciones, 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**.

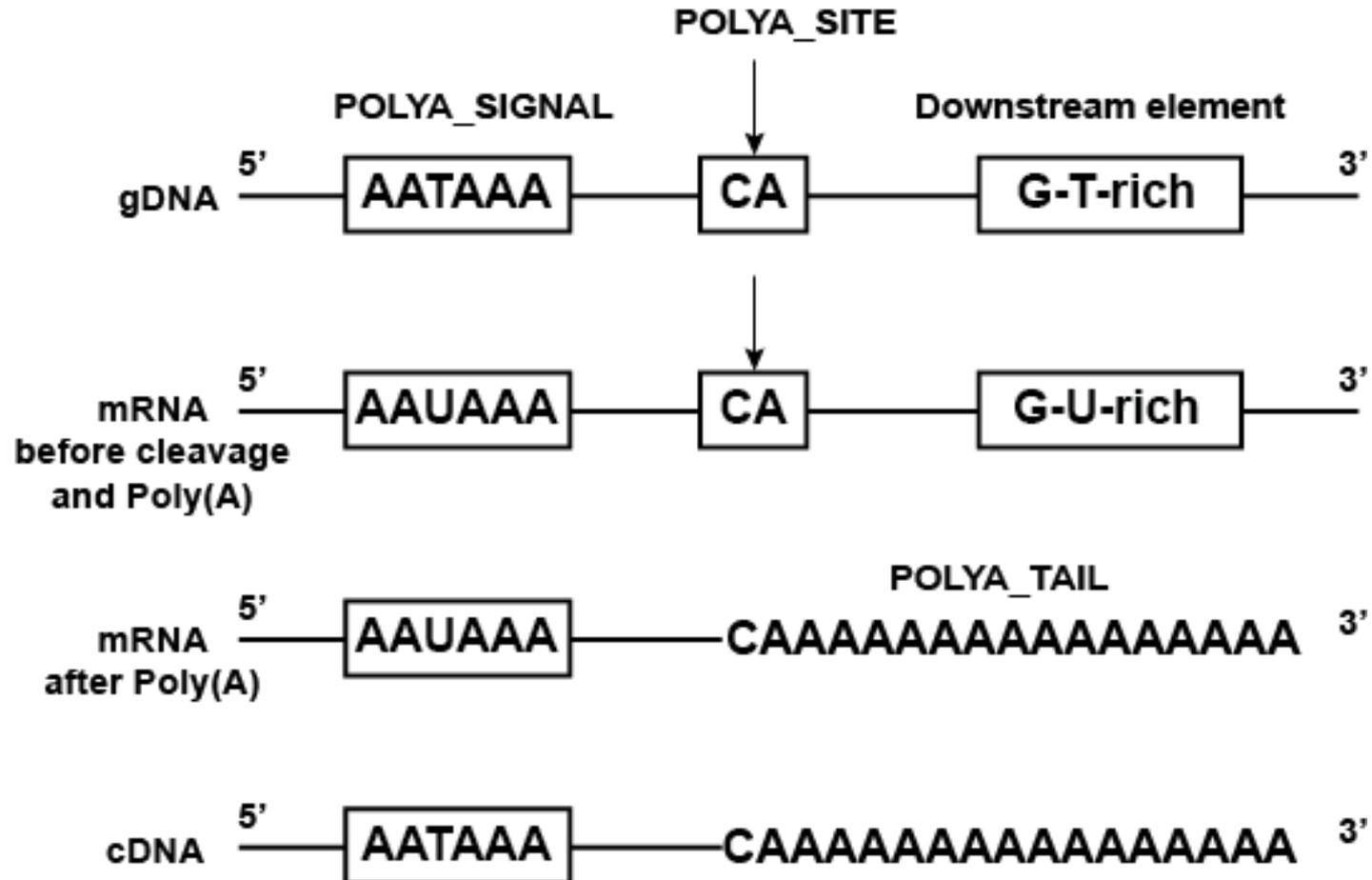
GCCGCC(A/G)⁻³CCA¹UGG⁺⁴

└─> +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

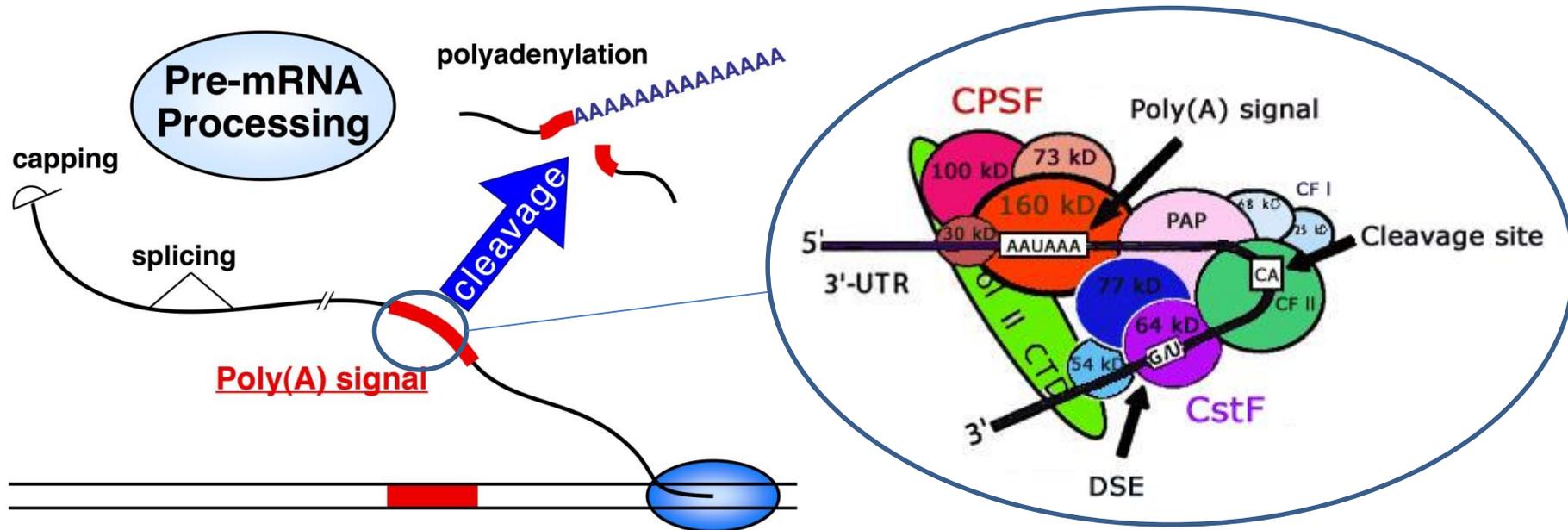
Señal de poliadenilación



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

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



Construir un gen que exprese la proteína de interés

Generar una construcción genética



Plásmido de expresión para levaduras



Inserto: ORF

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

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

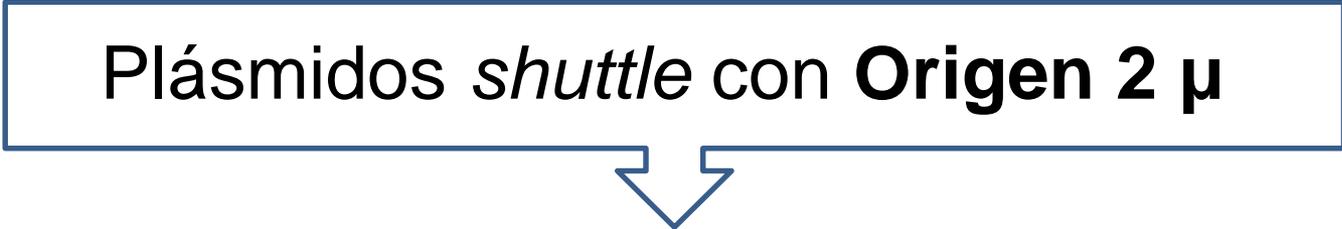
- *Secuencias que permiten la replicación y partición en levaduras.*
- *Genes marcadores que aportan ventajas para su selección en levaduras.*
- *Sitios de clonado múltiple rodeados de elementos genéticos adecuados para construir un gen eucariota.*
- *Secuencias que permiten la replicación y partición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

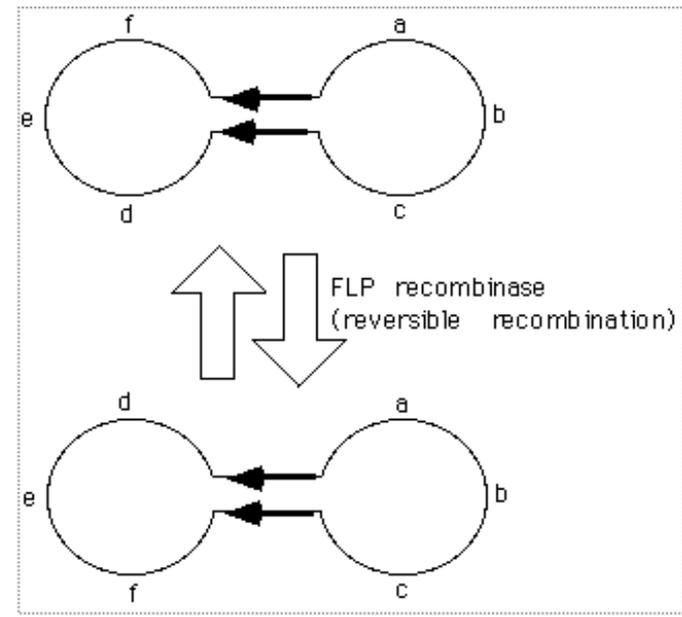
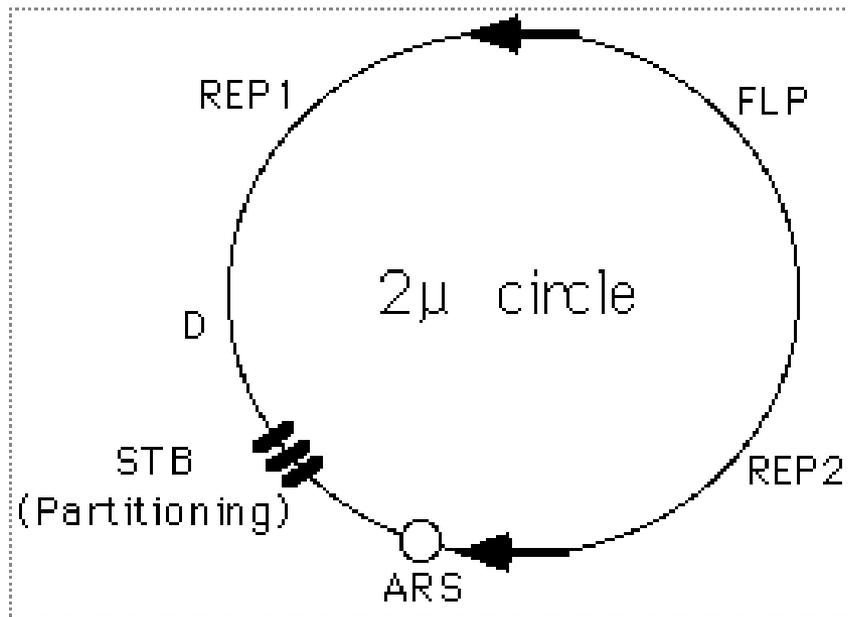


- Poseen un origen de replicación derivado del plásmido de levaduras denominado **2 μ** .
- Este origen permite generar entre **25 y 200 copias** de plásmido **por célula**.
- Posee algún **gen marcador** para su **selección** en levaduras; generalmente es un gen que codifica una **enzima de biosíntesis** 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

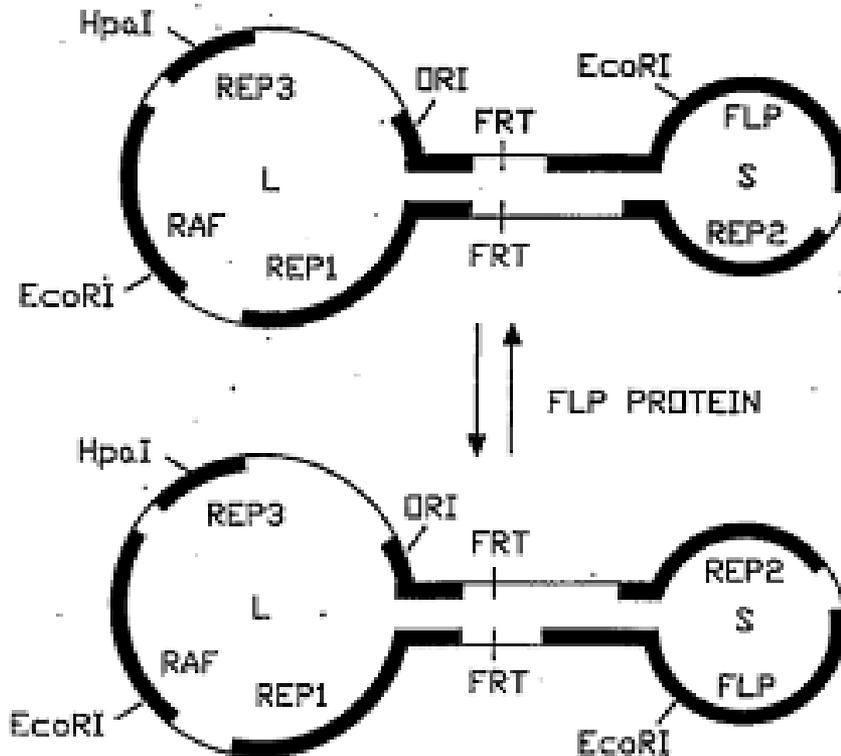
Origen 2 μ



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

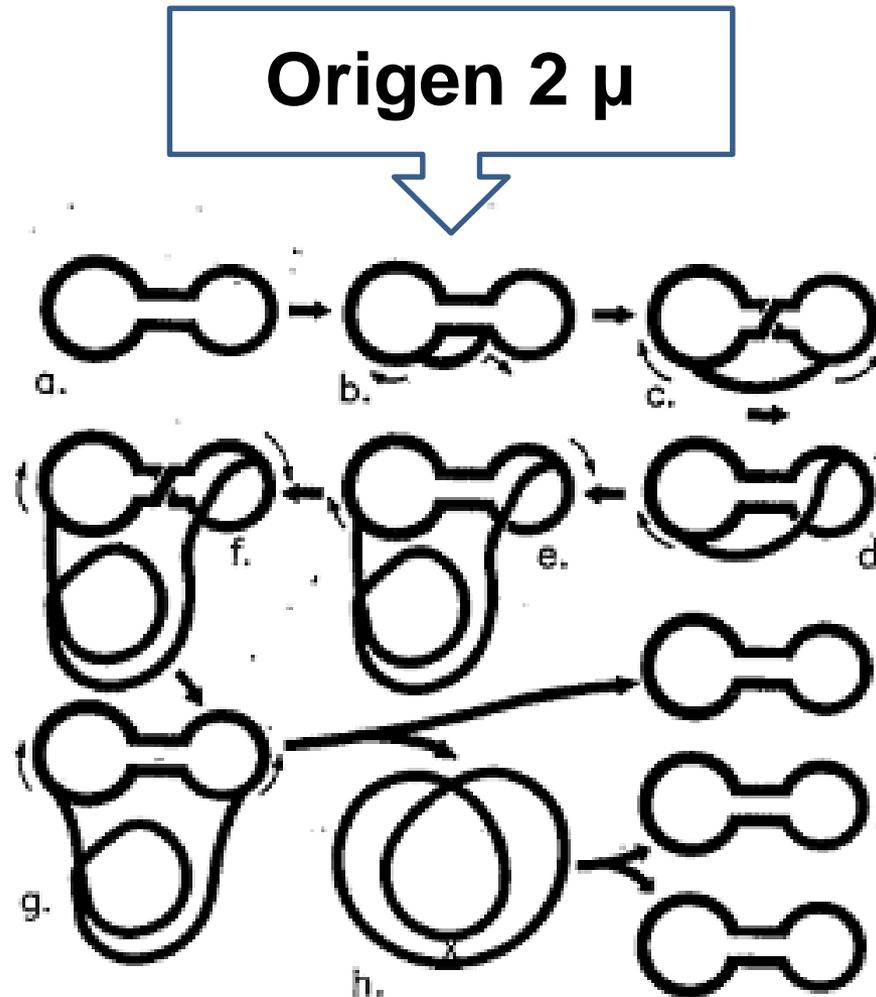
Origen 2 μ



- 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.

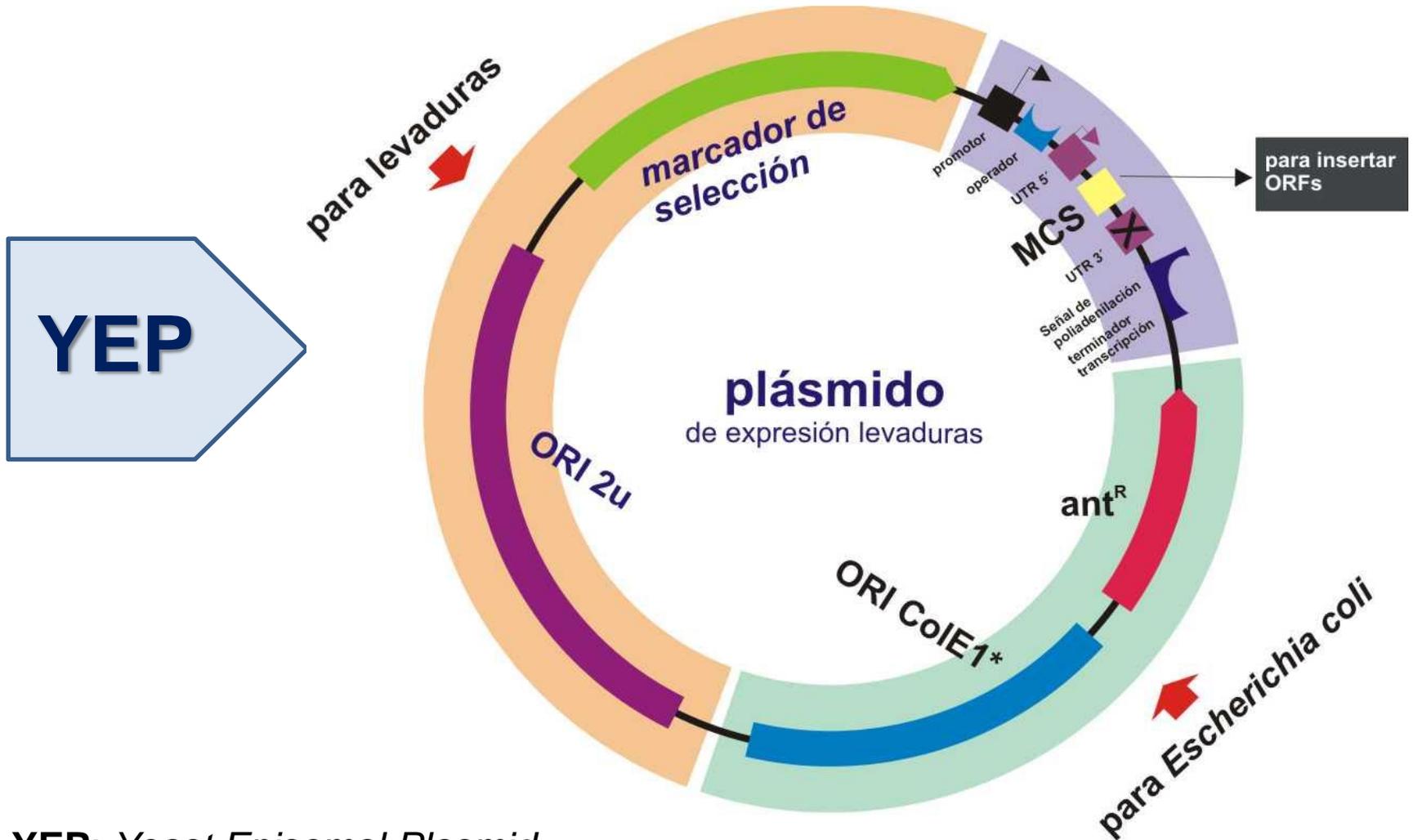
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



Expresión de proteínas recombinantes

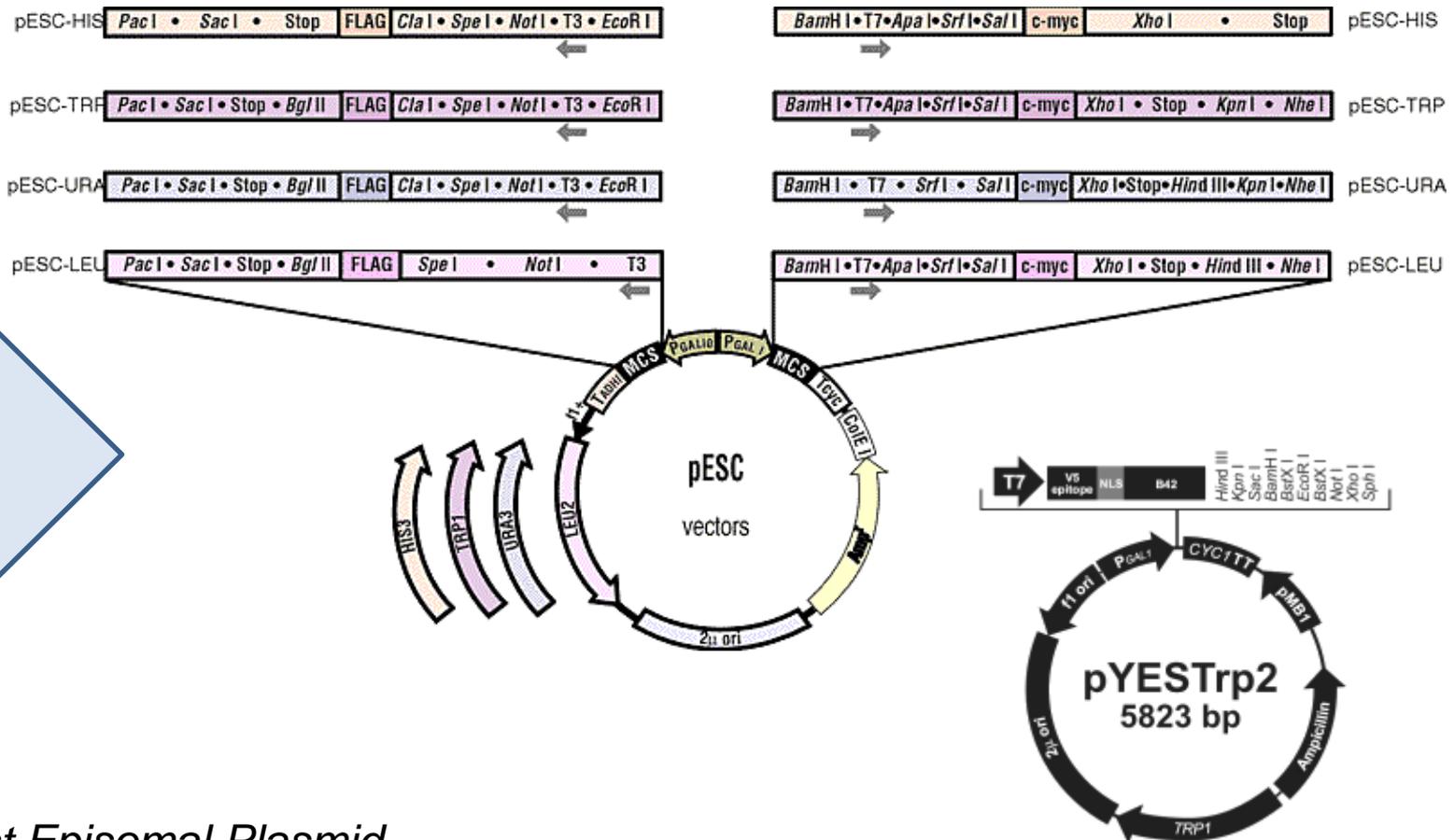
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YEP: *Yeast Episomal Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

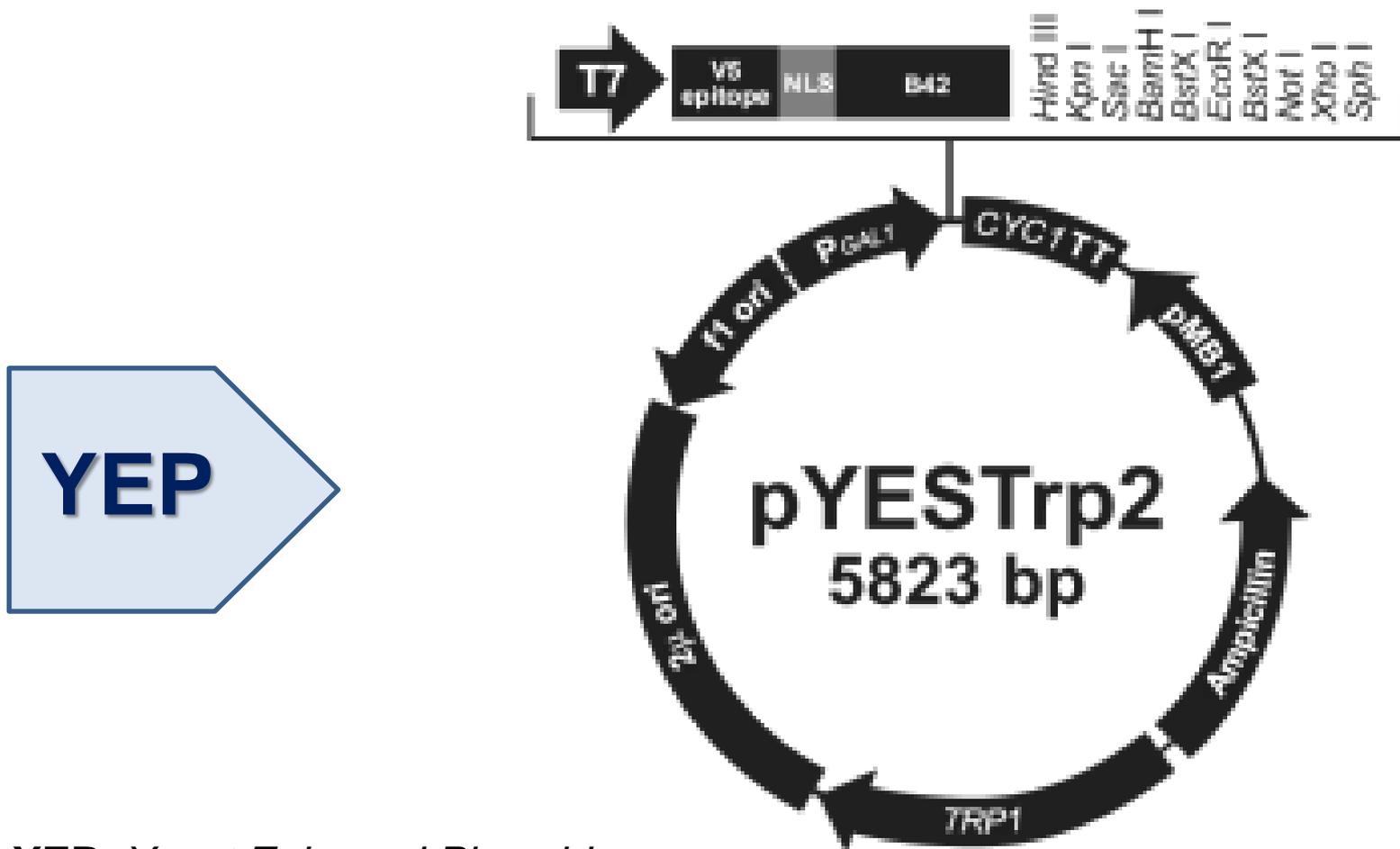
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YEP: *Yeast Episomal Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YEP

YEP: *Yeast Episomal Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen

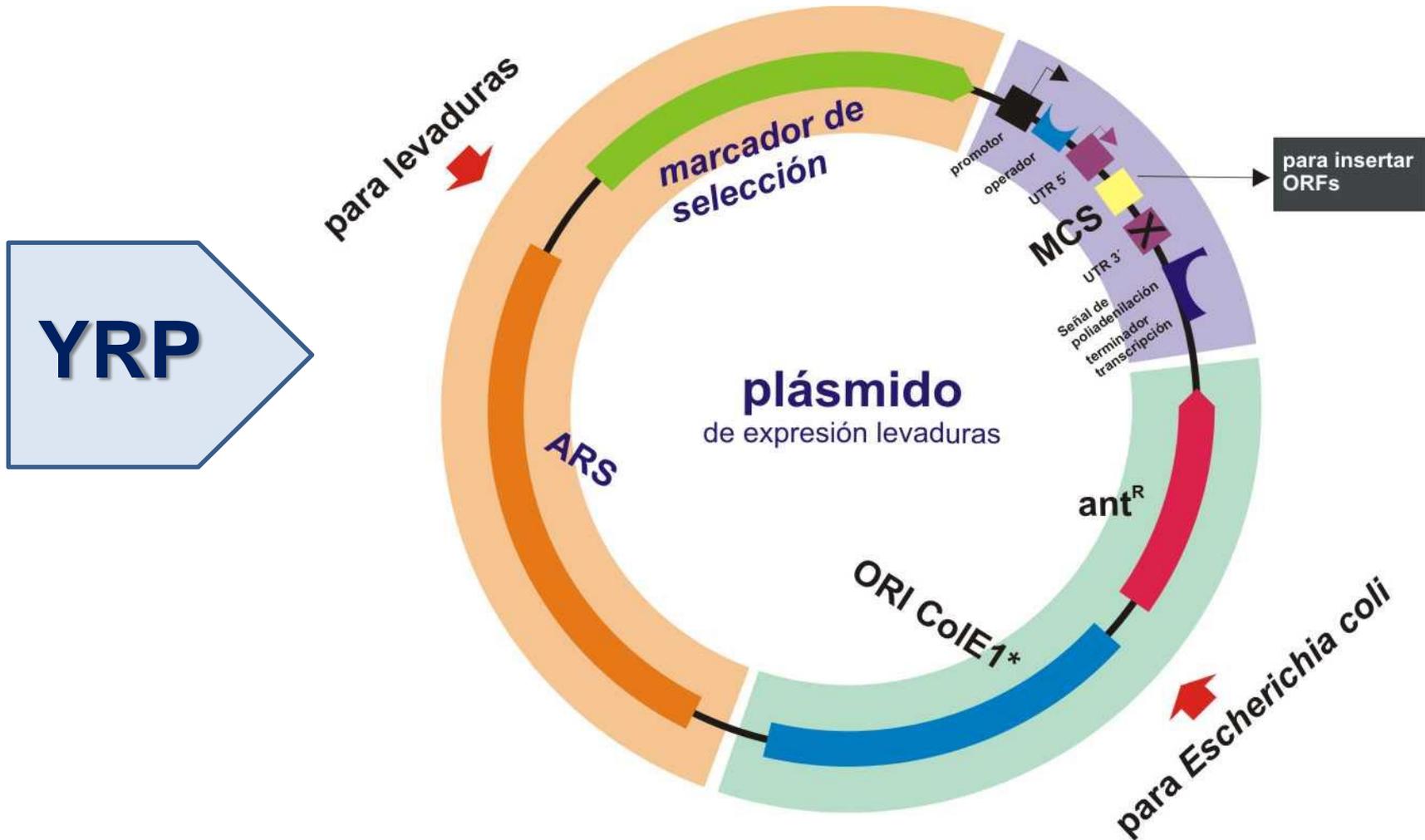
Plásmidos *shuttle* con **secuencia ARS**



- 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

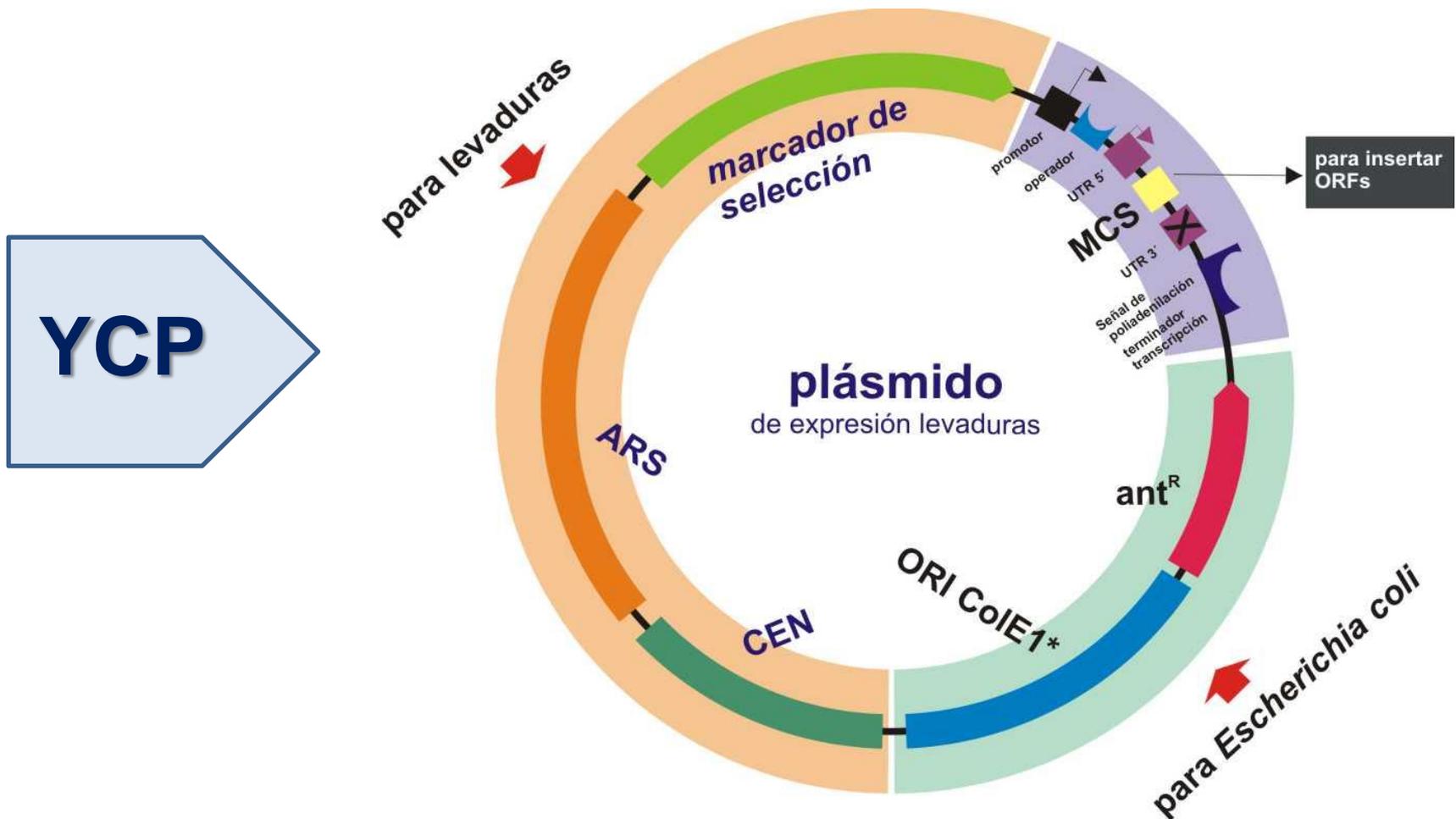
Plásmidos *shuttle* con **secuencia ARS y CEN**



- 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

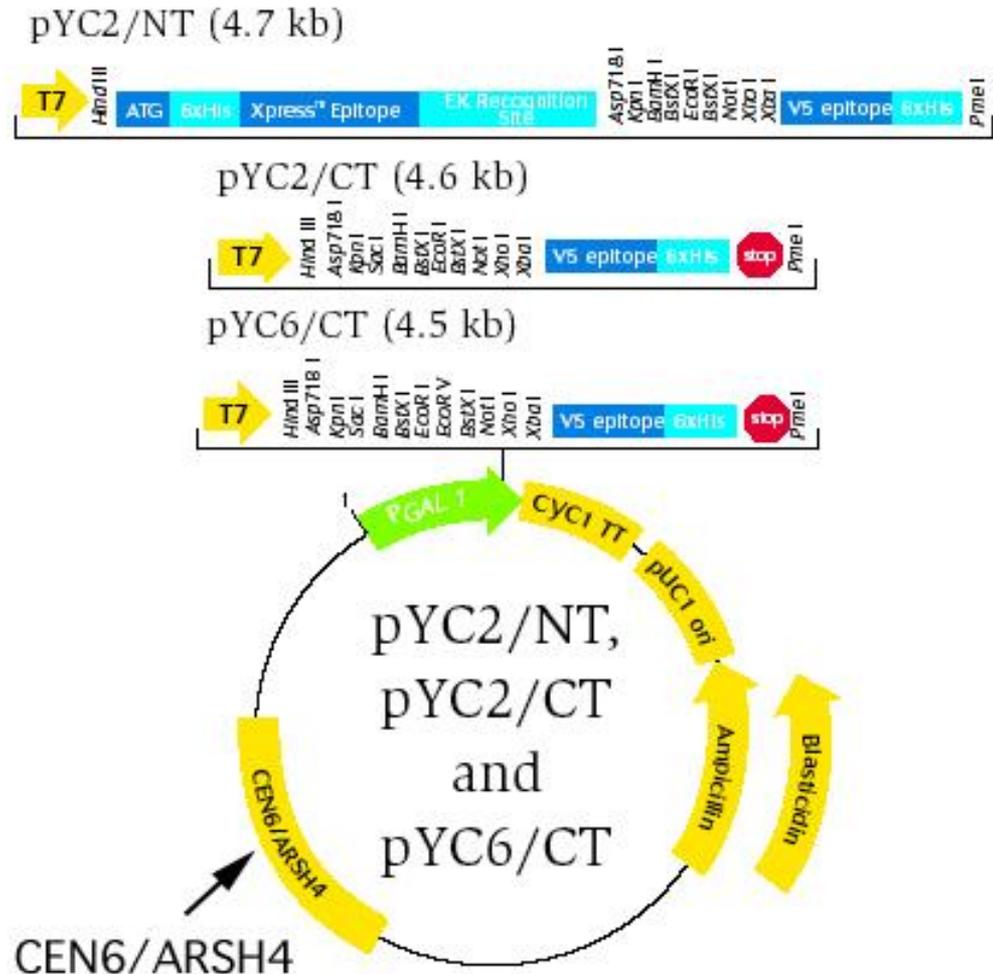
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



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

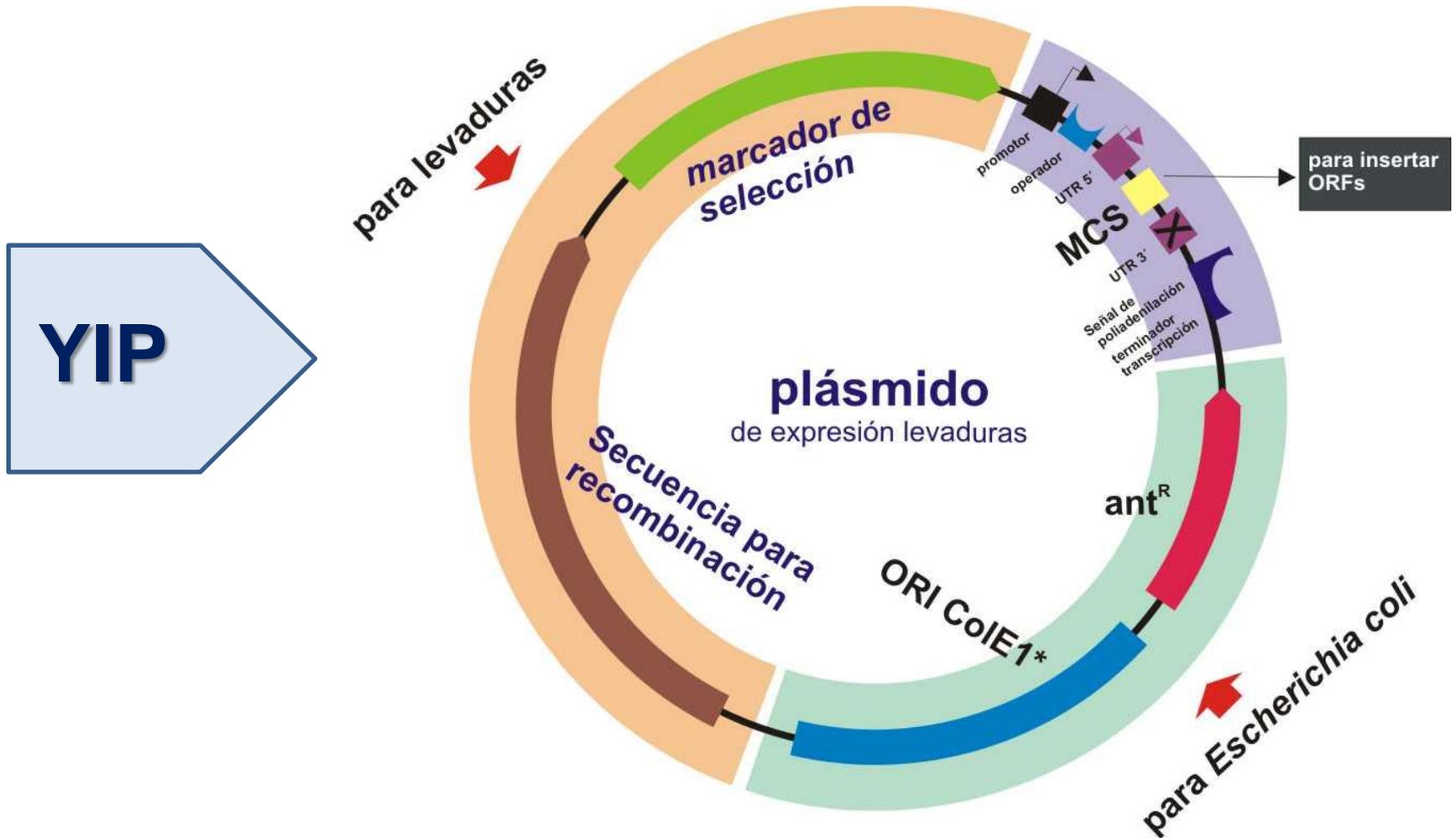
Plásmidos *shuttle* integrativos



- 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

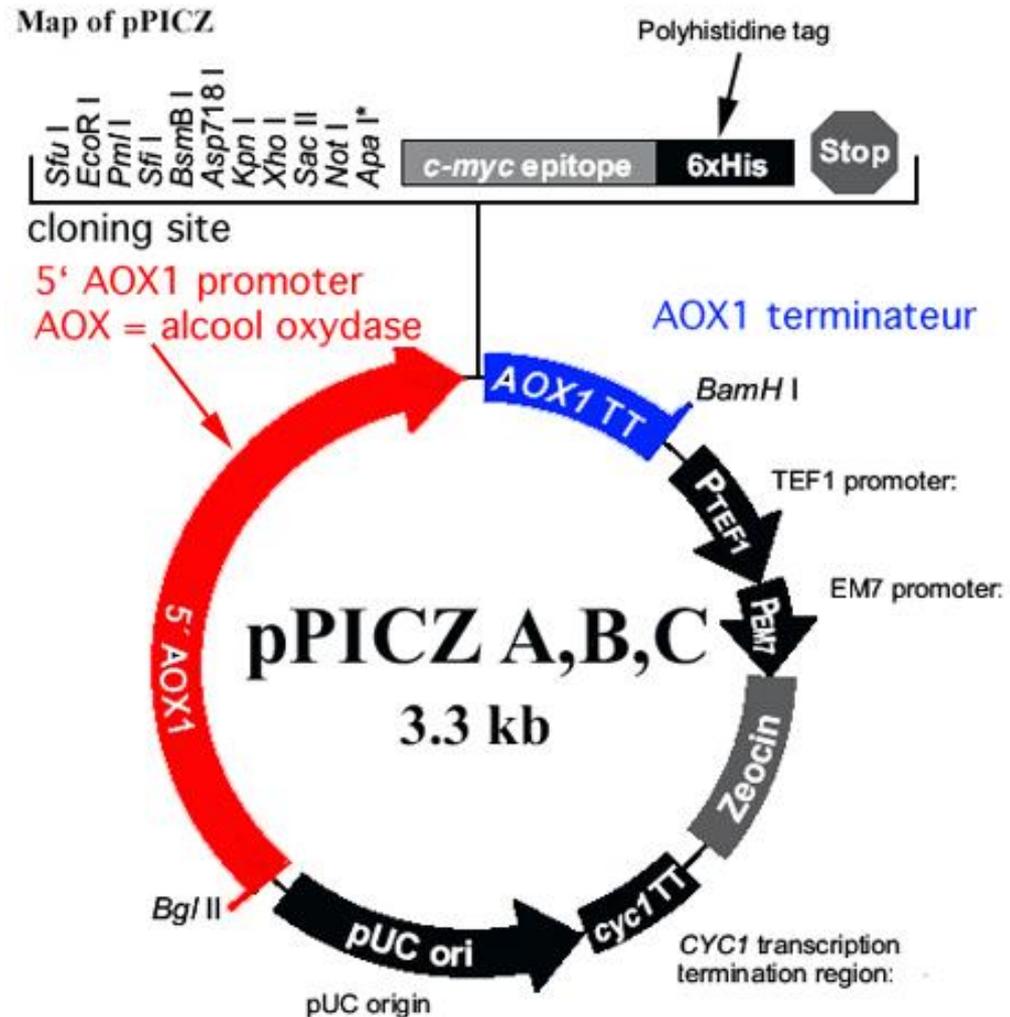
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YIP: *Yeast Integrating Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

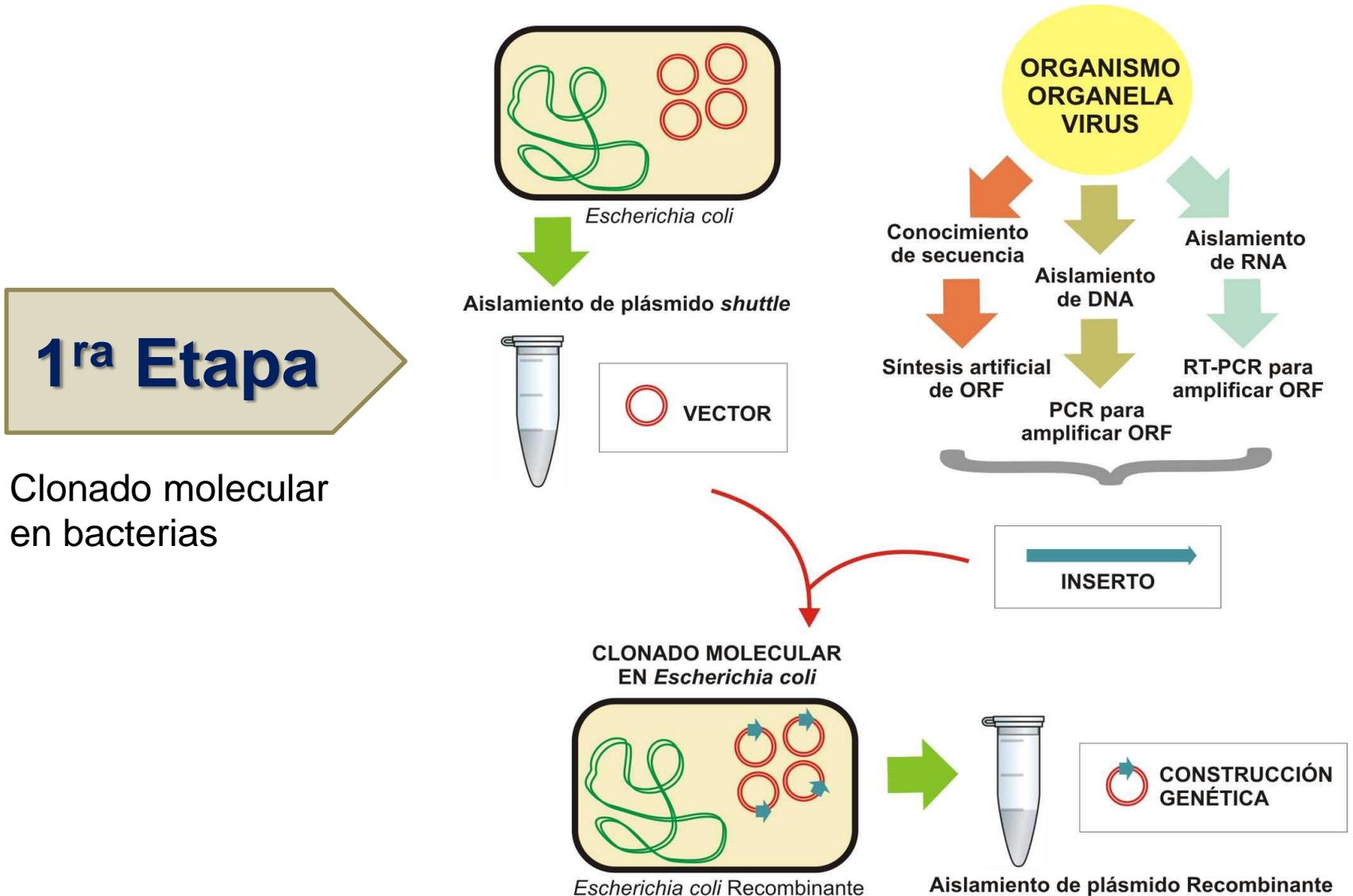
Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



YIP: *Yeast Integrating Plasmid*

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Construcción del gen



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de la levadura

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



organismo

**Seleccionar
especies de
*levaduras***

Construir un gen que
expresé la proteína de
interés

Seleccionar el
organismo adecuado
para la expresión del
gen

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*

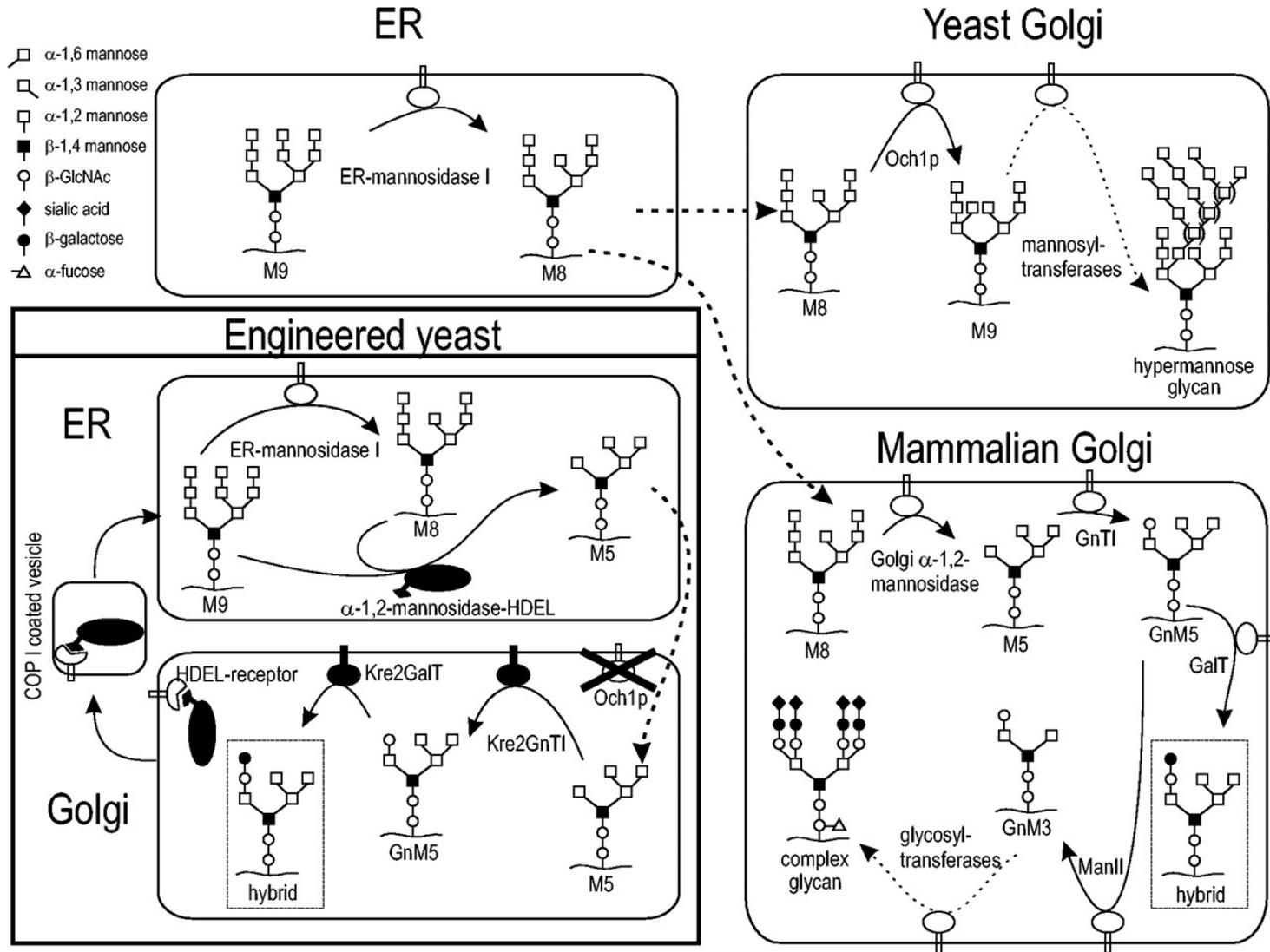
Received 18 November 2003/Accepted 29 January 2004

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.

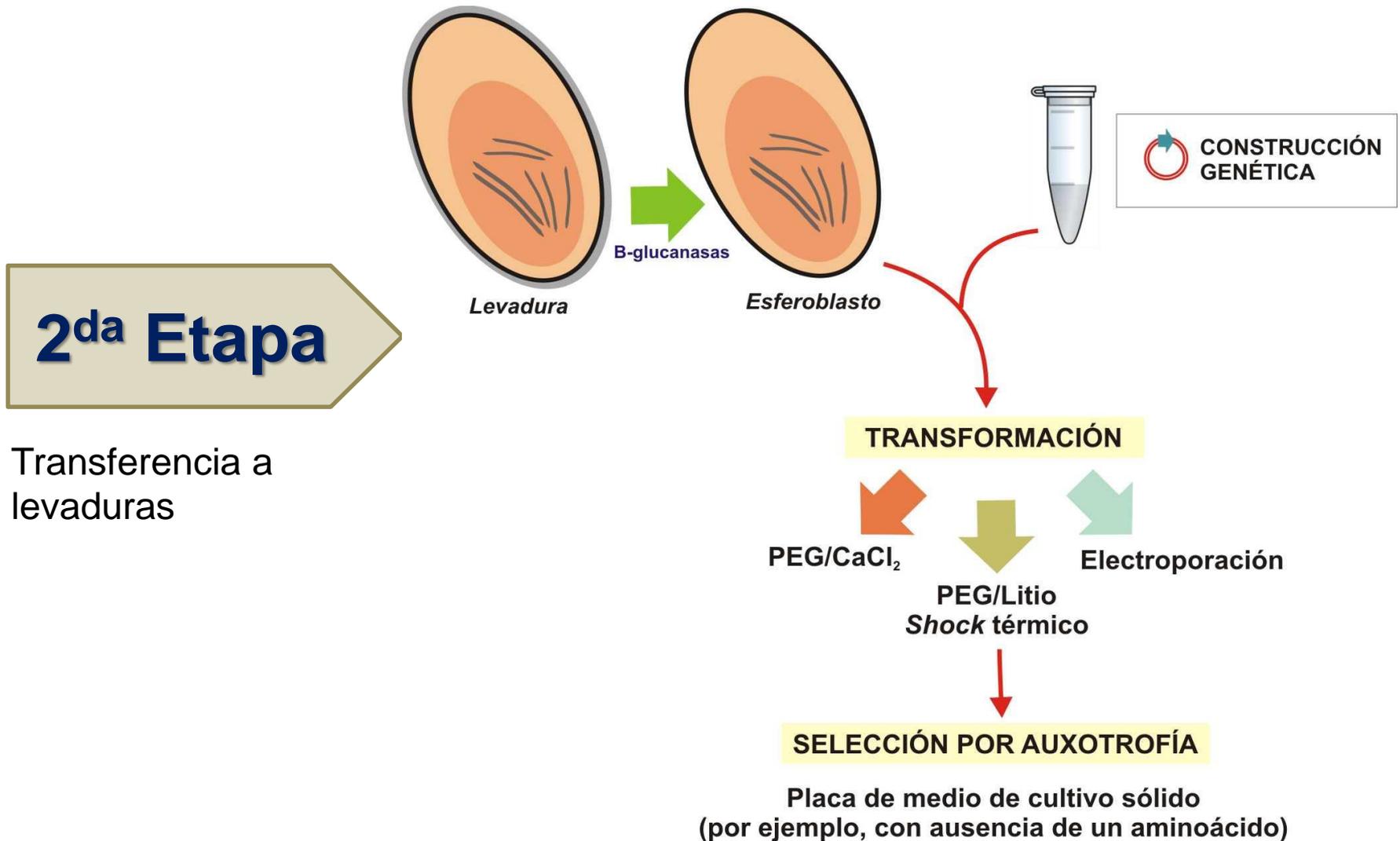
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de la levadura



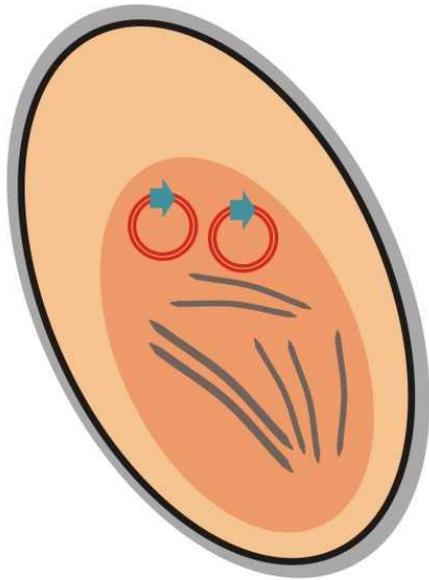
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras

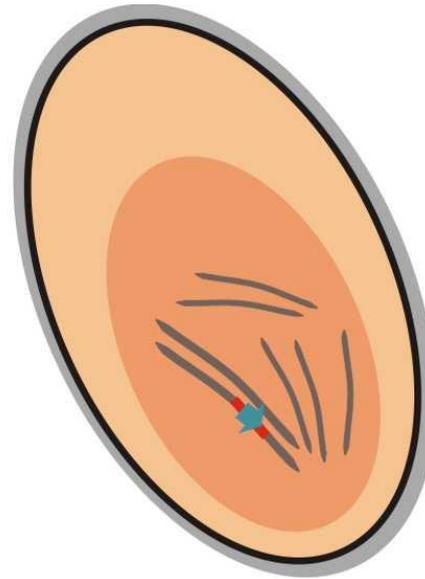


Expresión de proteínas recombinantes

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% bacto-peptone, 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 OD_{600} 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 $CaCl_2$] and pellet again for 3–4 min. Resuspend this pellet in 2 ml of STC.
5. Mix aliquots (100 μ l) with plasmid DNA and carrier DNA (calf thymus or *E. coli*) added to a total of 5 μ g of DNA in <10 μ l.
6. After 10 min at room temperature, add 1 ml of PEG [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $CaCl_2$ 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 μ l of SOS (1 M sorbitol, 6.5 mM $CaCl_2$, 0.25% yeast extract and 0.5% bacto-peptone; 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 μ l of a plasmid DNA solution (670 μ g/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.

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.

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). ^{2,15}	No effect on the transformation efficiency. ⁷⁴
	Increases the permeability of intact cells. ³⁷	
PEG	Indispensable for transformation efficiency. ^{2,15}	Not indispensable for transformation frequency but enhances the frequency. ³⁸
	Pre-incubation enhances the transformation efficiency and frequency. ³⁵	
	Increases the permeability of intact cells. ³⁷	
	Indispensable for DNA attachment. ³⁸	Indispensable for DNA attachment. ³⁸

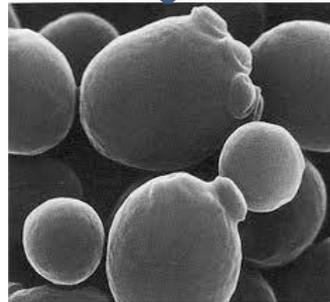
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Ensayos de inducción

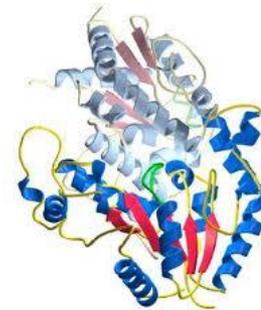
GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



levadura



proteína

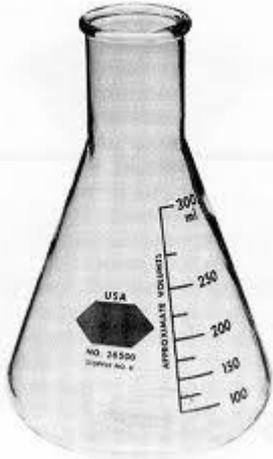
Construir un gen que exprese la proteína de interés

Seleccionar la levadura adecuada para la expresión del gen

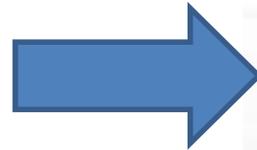
Evaluar la producción de la proteína de interés

Expresión de proteínas recombinantes

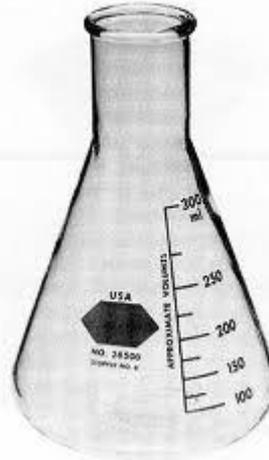
Ensayos de inducción



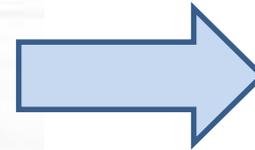
Cultivo
(en medio adecuado para el mantenimiento de la levadura recombinante)



2-3 hs



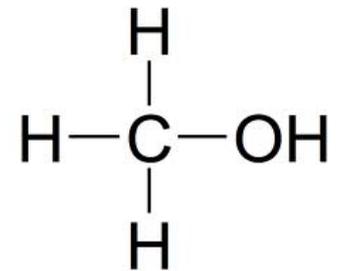
Cultivo crecido
(en medio adecuado, a 200 rpm y 25-30°C)



DO₆₀₀
(Determinación de fase de cultivo)



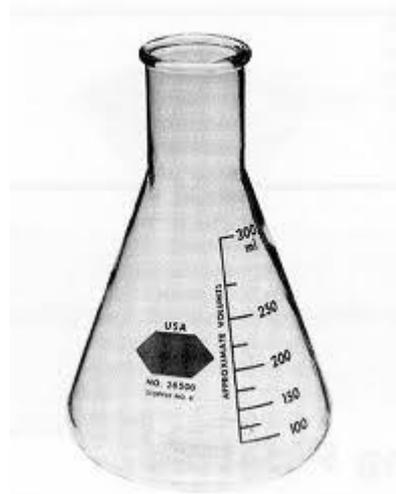
Inducción
(introducción del agente inductor a concentración deseada)



(por ejemplo metanol, para las metilotróficas)

Expresión de proteínas recombinantes

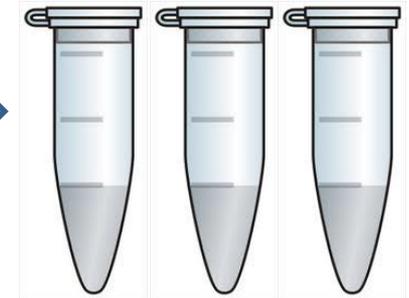
Ensayos de inducción



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



**Incubar a temperatura deseada
y tiempo deseado**

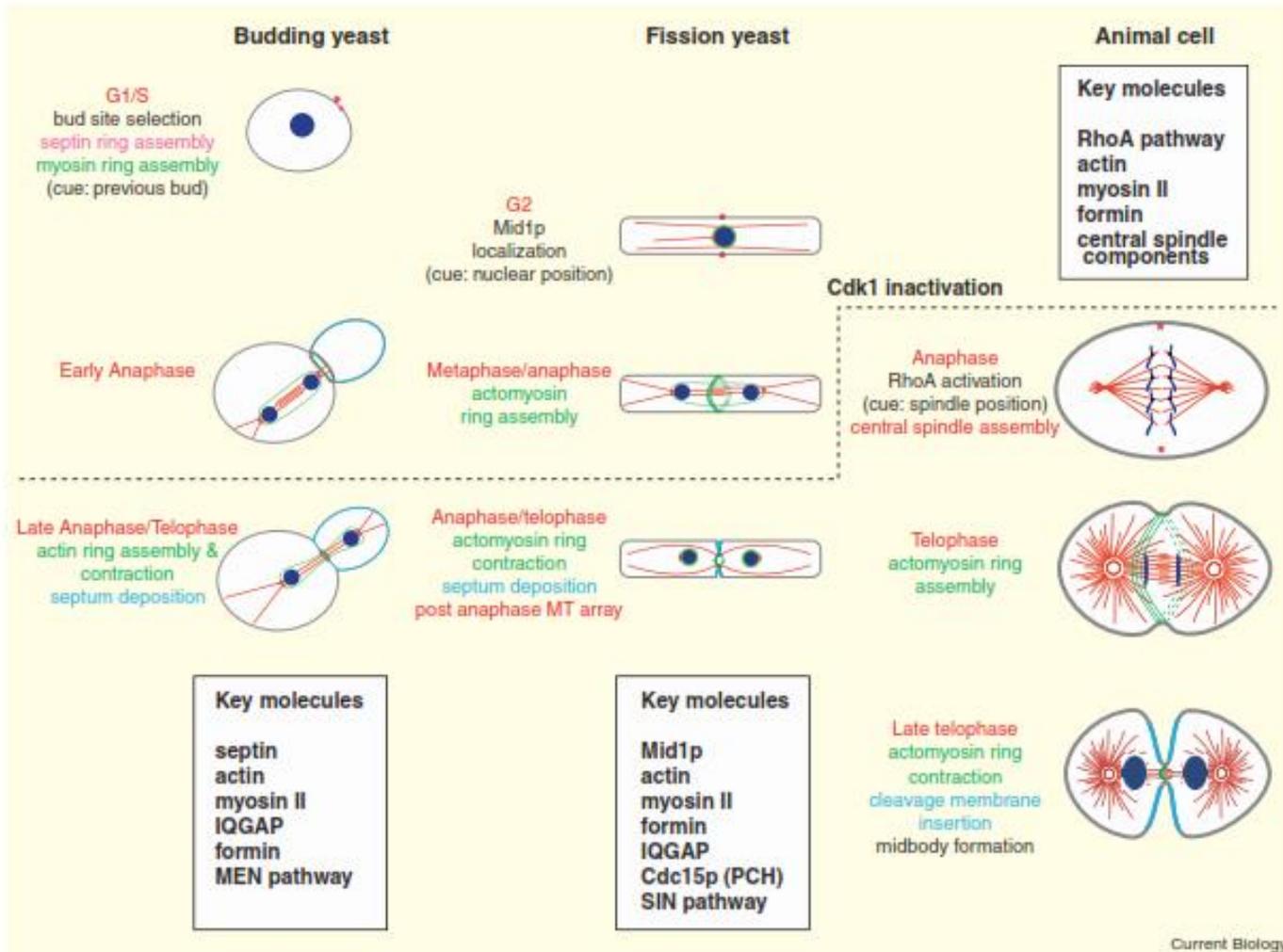


**Colecta de
muestras**
(colecta de levaduras y/o
sobrenadante para su
posterior análisis)

Expresión de proteínas recombinantes

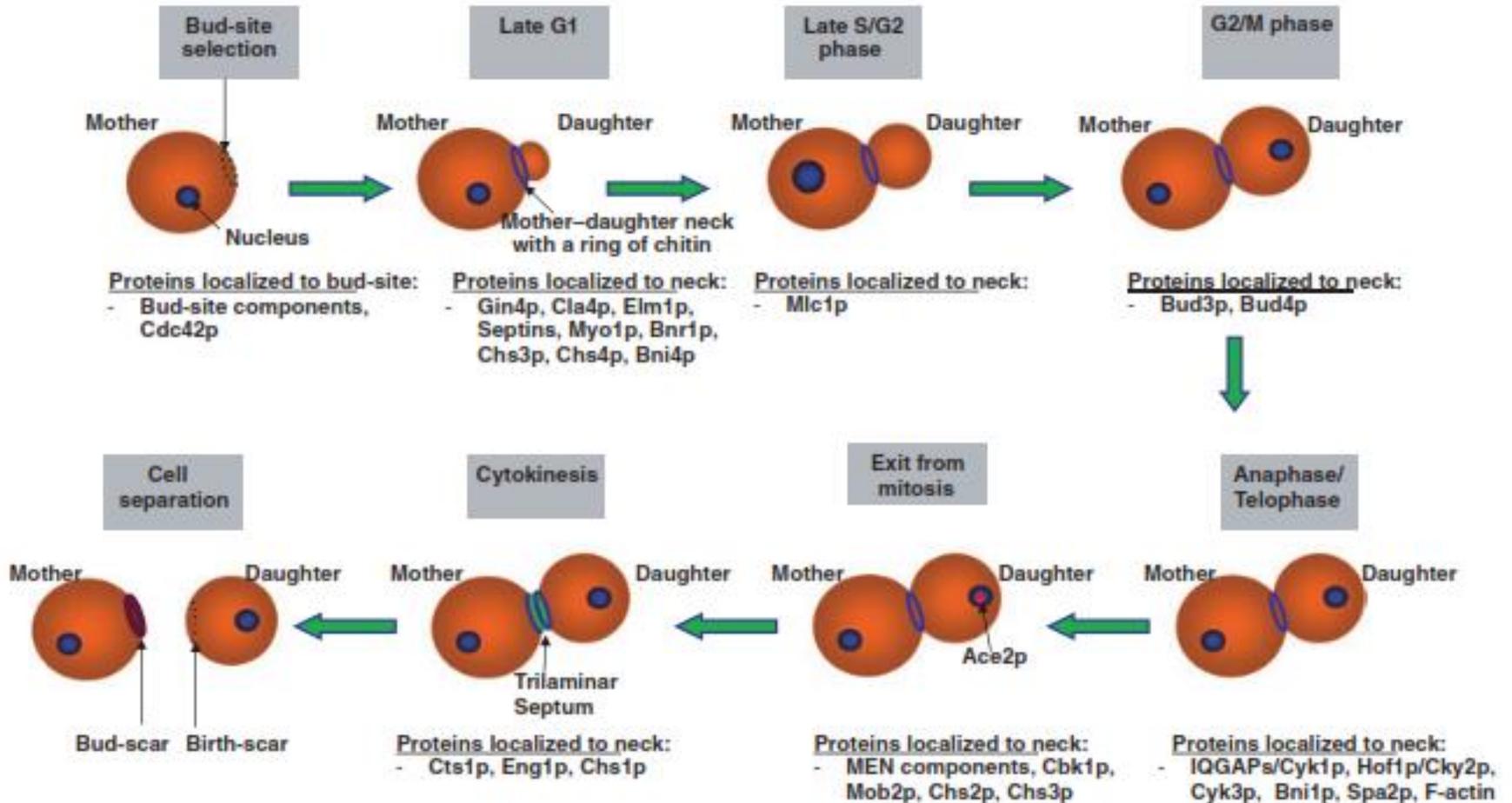
Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras

Formas de multiplicación celular



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de levaduras



Expresión de proteínas recombinantes

Ensayos de inducción

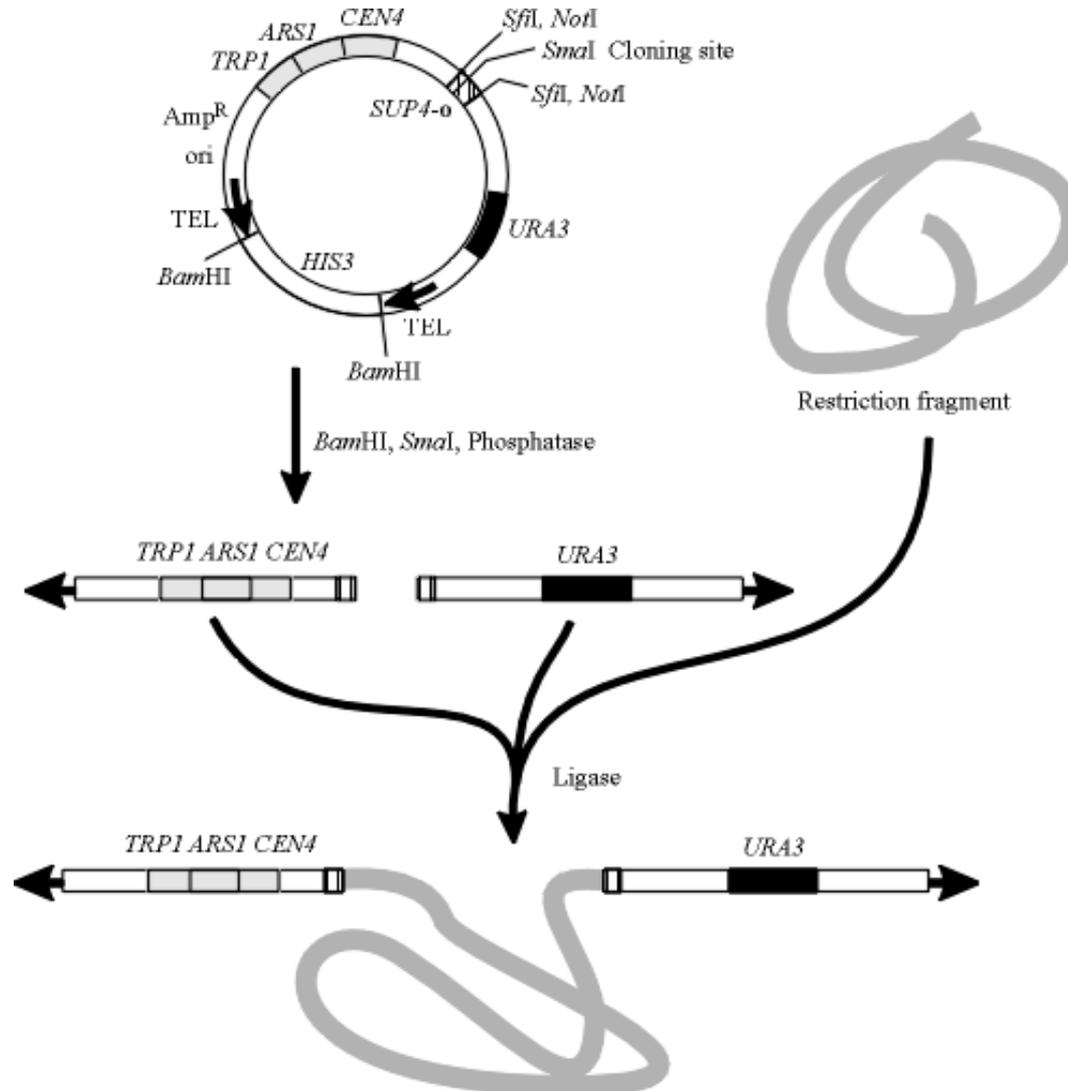
Métodos de evaluación de la expresión



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

Expresión de proteínas recombinantes

Cromosomas artificiales de levaduras



Expresión de proteínas en células animales

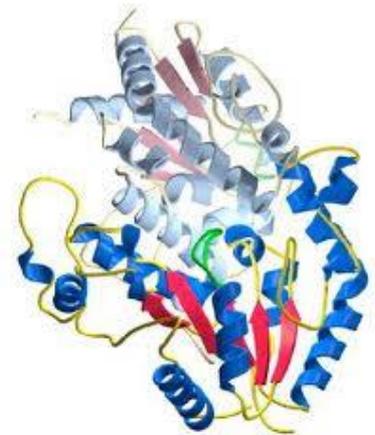


Expresión de proteínas recombinantes

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*



células en cultivo



Campana de flujo laminar



Estufa de cultivo celular

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO

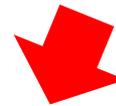


gen



Construir un gen que exprese la proteína de interés

Generar una construcción genética



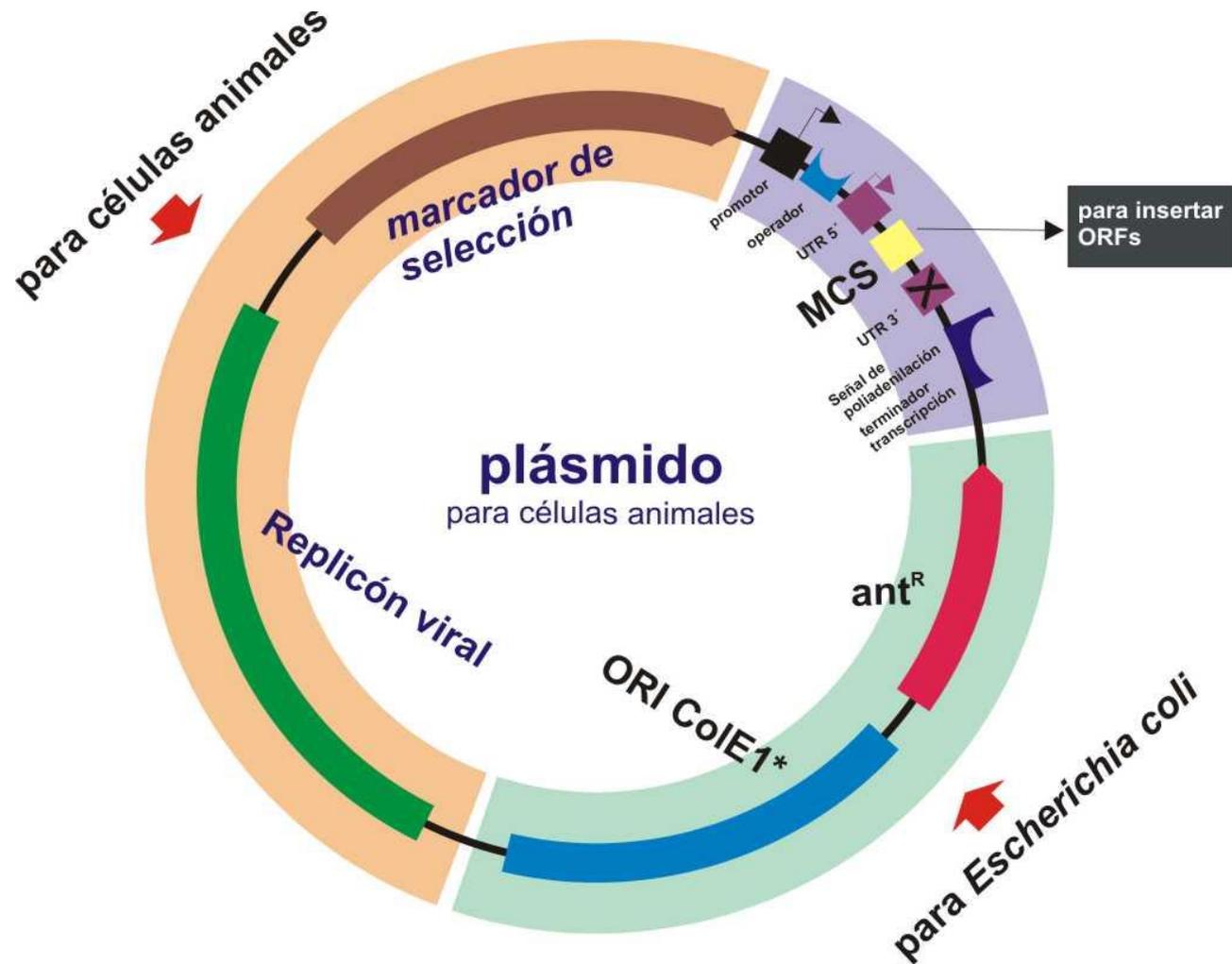
Plásmido de expresión para células animales



Inserto: ORF

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)

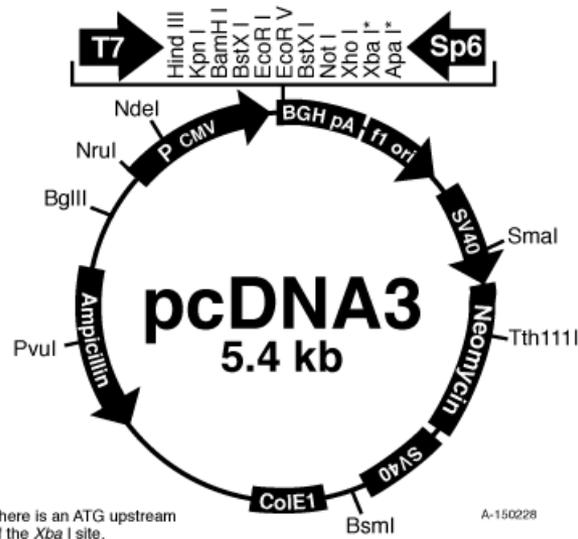
Se comercializan líneas celulares modificadas que expresan una PVTA. De ese modo, sólo es necesario en el plásmido la presencia de la secuencia ORI.

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

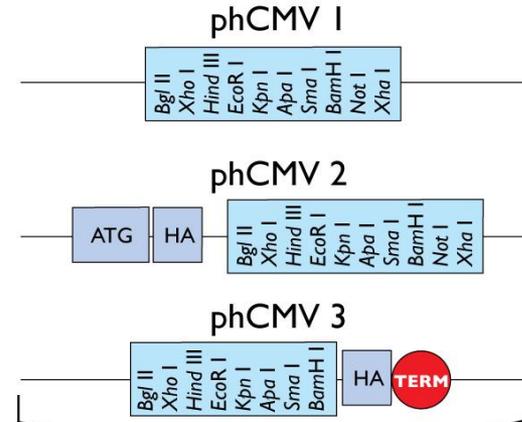
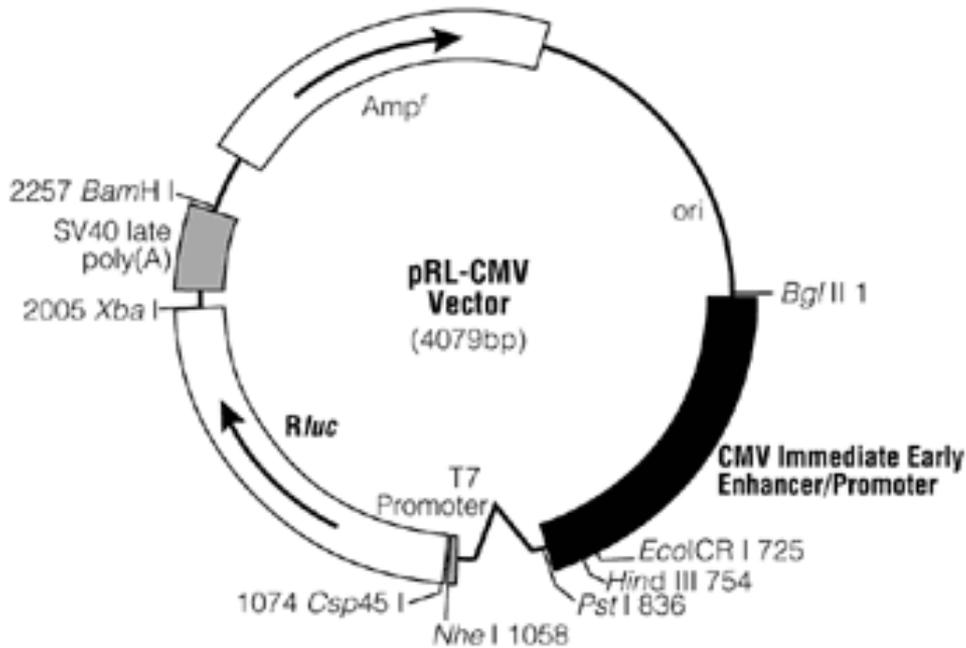
European Headquarters

Tel: +31 (0) 594 515 175

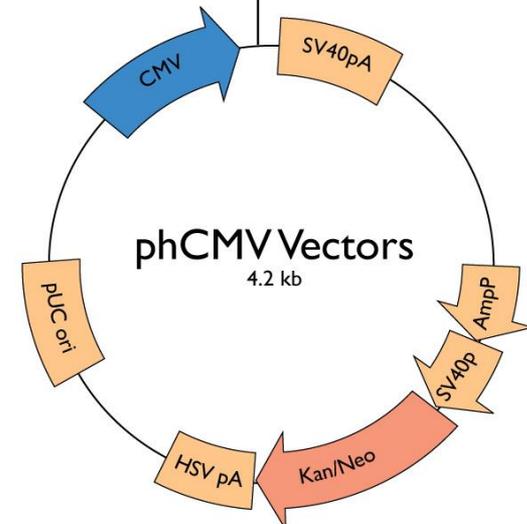
Fax: +31 (0) 594 515 312

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen



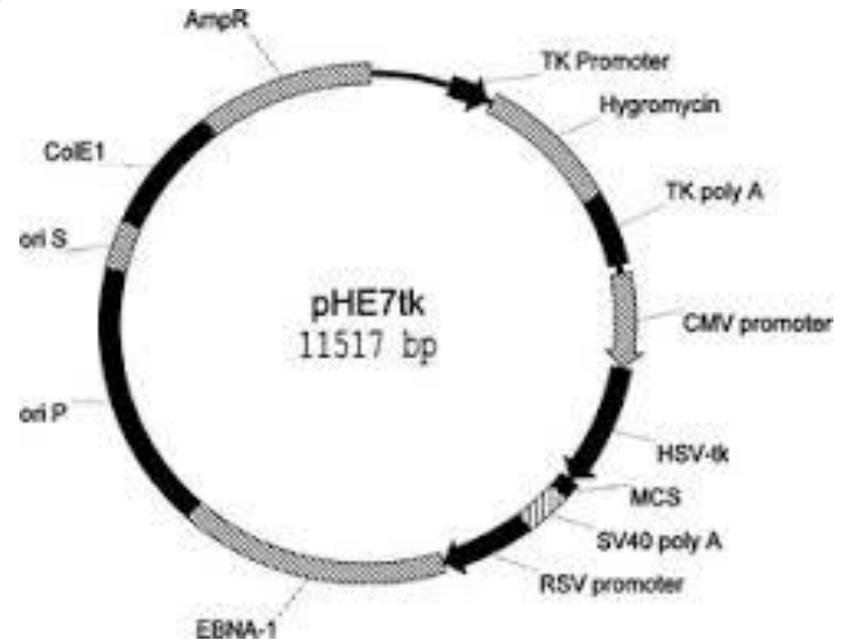
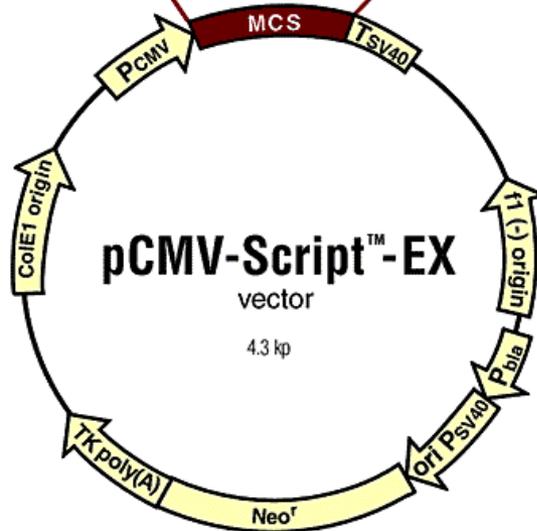
1364VAD1_GA



Expresión de proteínas recombinantes

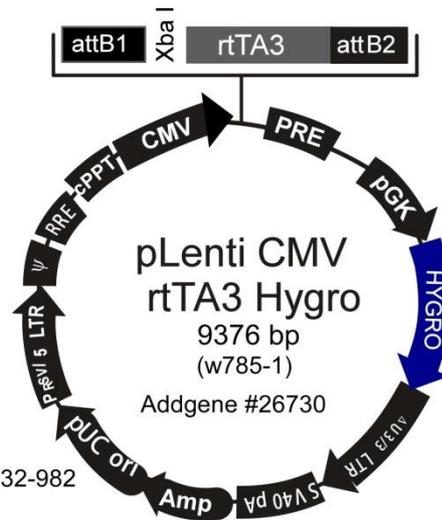
Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen

T3 *Sac I • Bst X I • Sac II • Not I • Srf I • BamH I • Pst I • EcoR I • EcoR V • Hind III • Bsp106 I • Cla I • Acc I • Hinc II • Sal I • Xho I • Dra II • Apa I • Kpn I* T7



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Construcción del gen



Comments for pLenti CMV rtTA3 Hygro 9376 nucleotides

bla promoter: bases 32-131
ampicillin resistance gene: bases 132-982
pUC origin: bases 1138-1810
RSV/5'LTR hybrid promoter: bases 2218-2628
HIV-1 psi (ψ) packaging signal: bases 2736-2781
HIV-1 Rev response element (RRE): bases 3272-3525
3 splice acceptor: base 3862
3 splice acceptor: base 3901
Central polypurine tract (cPPT): bases 4011-4073
CMV promoter: bases 4145-4730
attB1: bases 4764-4789
Reverse Tetracycline transactivator 3 (rtTA3) gene: bases 4791-5498
attB2: bases 5500-5525
Woodchuck post-transcriptional element (PRE): bases 5555-6148
Murine phosphoglycerate kinase (PGK) promoter: bases 6189-6699
Hygromycin resistance gene: bases 6717-7743
 Δ U3/3'LTR: bases 8116-8350
SV40 polyadenylation signal: bases 8422-8557

- 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**.

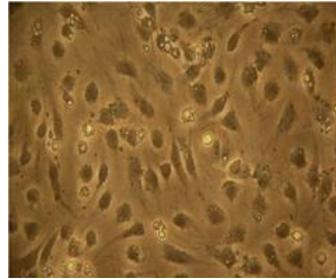
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/levaduras: Selección de células

GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



organismo

**Seleccionar
líneas celulares
animales**

Construir un gen que
exprese la proteína de
interés

Seleccionar las
células adecuadas
para la expresión del
gen

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

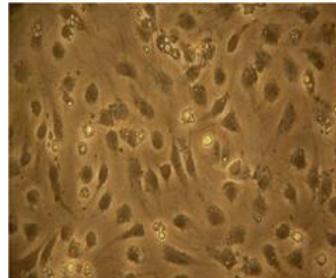
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Expresión

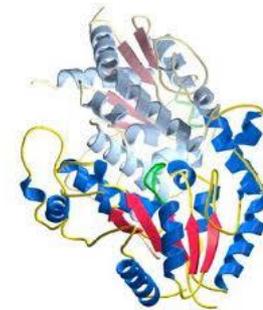
GENOTIPO + AMBIENTE = FENOTIPO



gen



levadura



proteína

Construir un gen que exprese la proteína de interés

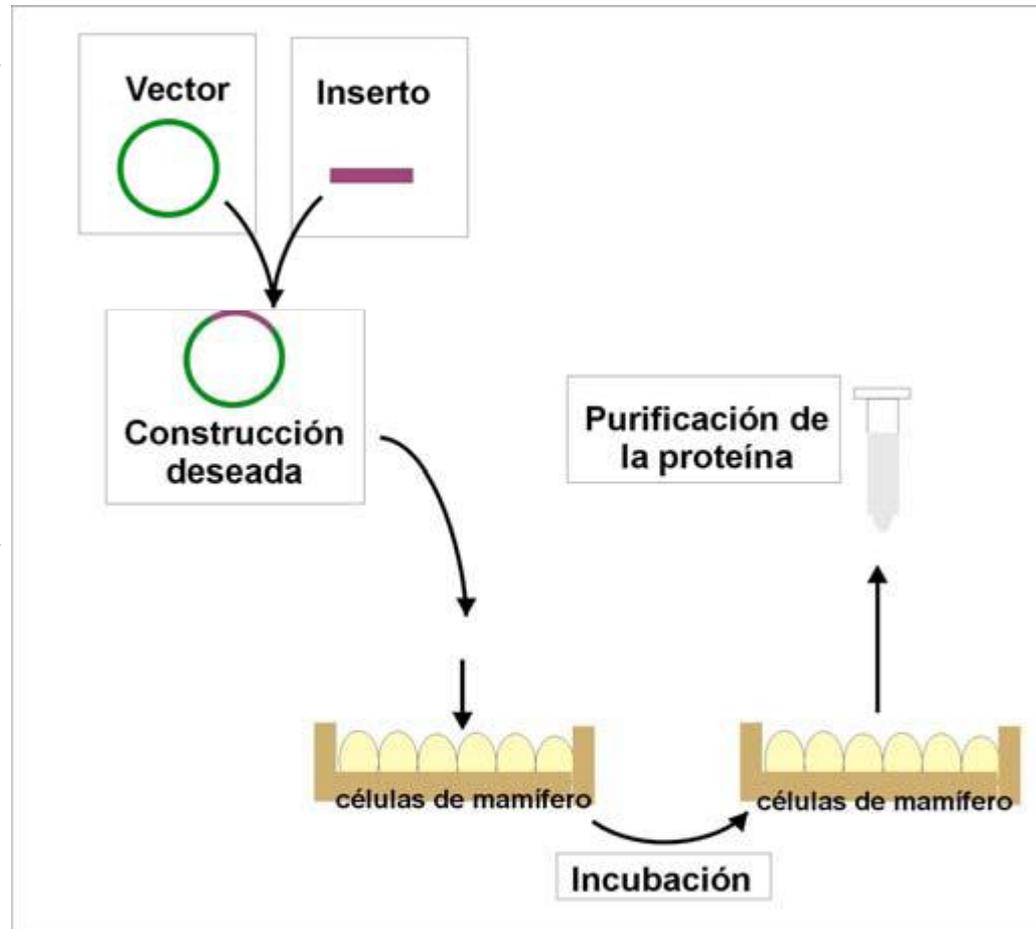
Seleccionar la línea celular para la expresión del gen

Evaluar la producción de la proteína de interés

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Expresión

Clonado en
Escherichia coli



Transiente
o estable

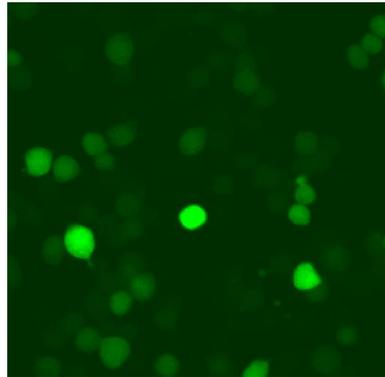
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema plásmidos/células animales: Expresión

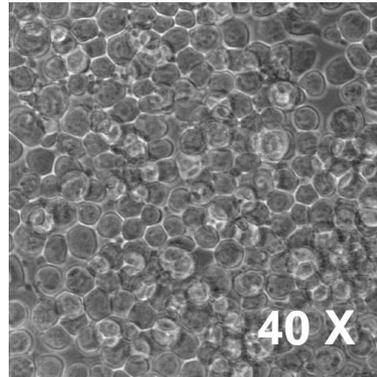
Ejemplo de **células transfectadas** con un **plásmido** que expresa **GFP**



Células Sf21

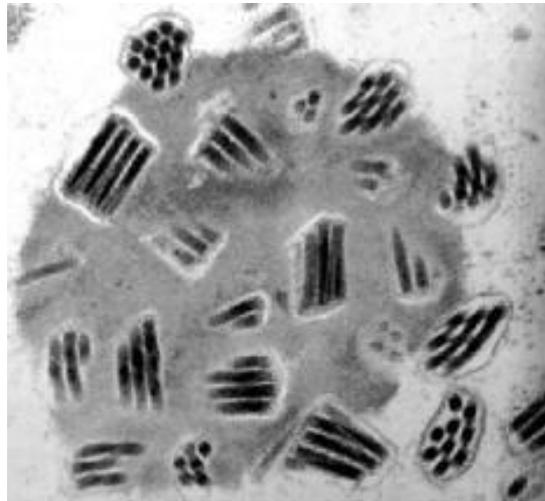


Microscopio de fluorescencia



Luz Blanca

Expresión de proteínas utilizando virus de insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus/hospedador

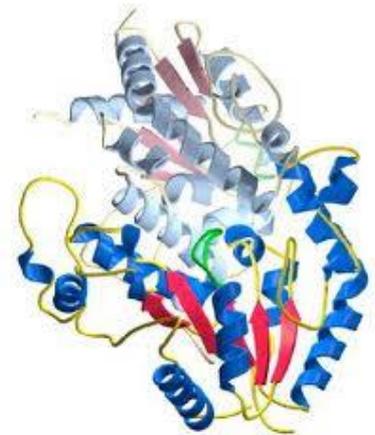
- Los **virus** son **entidades biológicas** con la capacidad de **parasitar** a los **organismos** para la **generación** de su **descendencia**.
- Esta característica transforma a sus **genomas** en excelentes **plataformas** para el **clonado molecular**.
- Dado que existen virus conocidos para todos 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



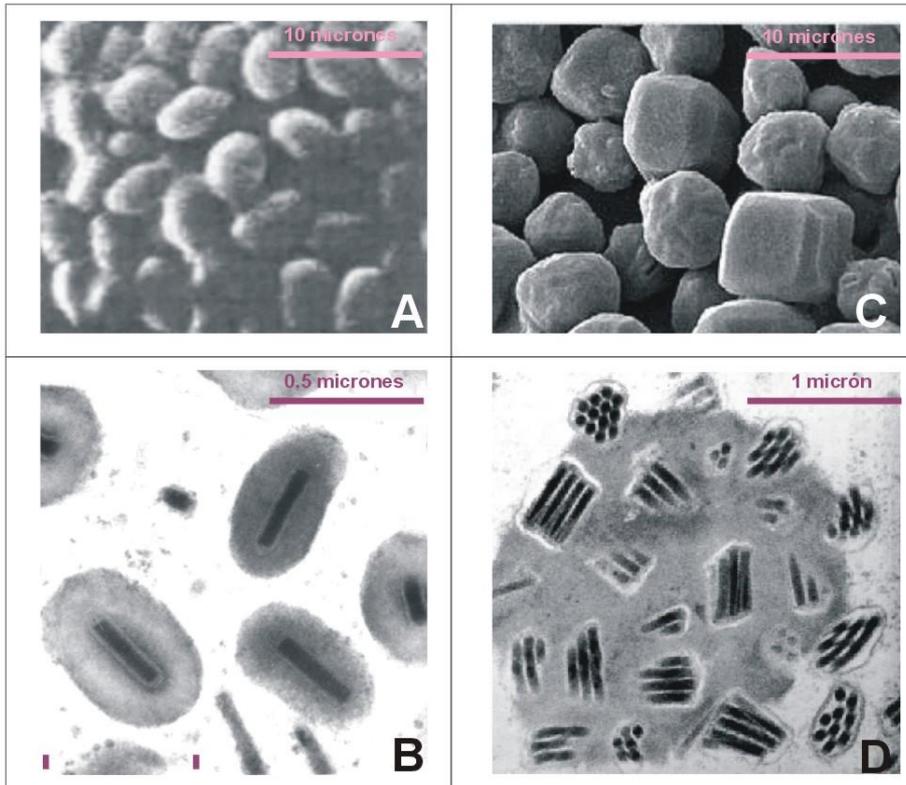
Expresión de proteínas recombinantes

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

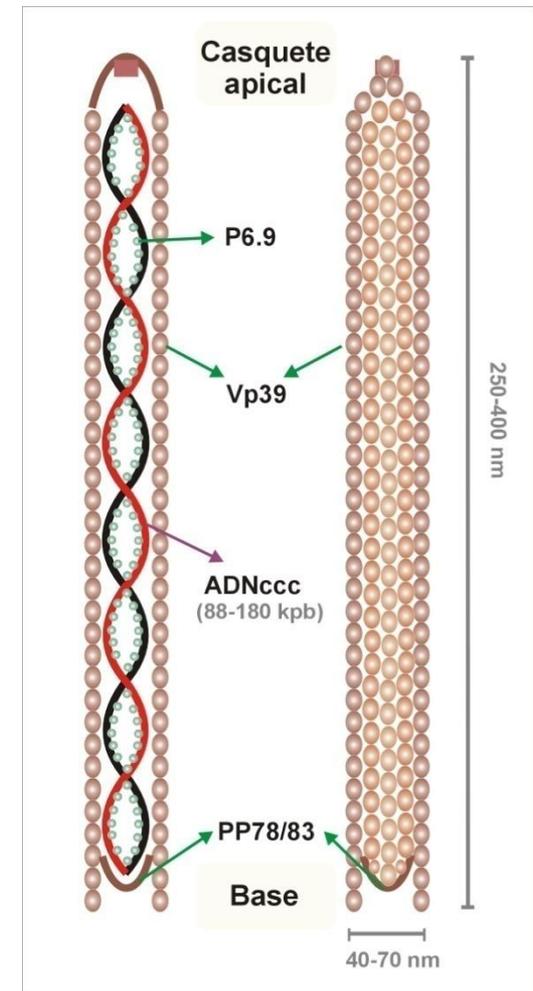
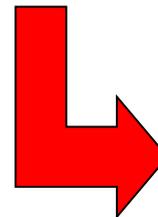


Micrografías electrónicas fenotipo ocluido

(OB: *Occlusion Body*)

A y B. Granulovirus.

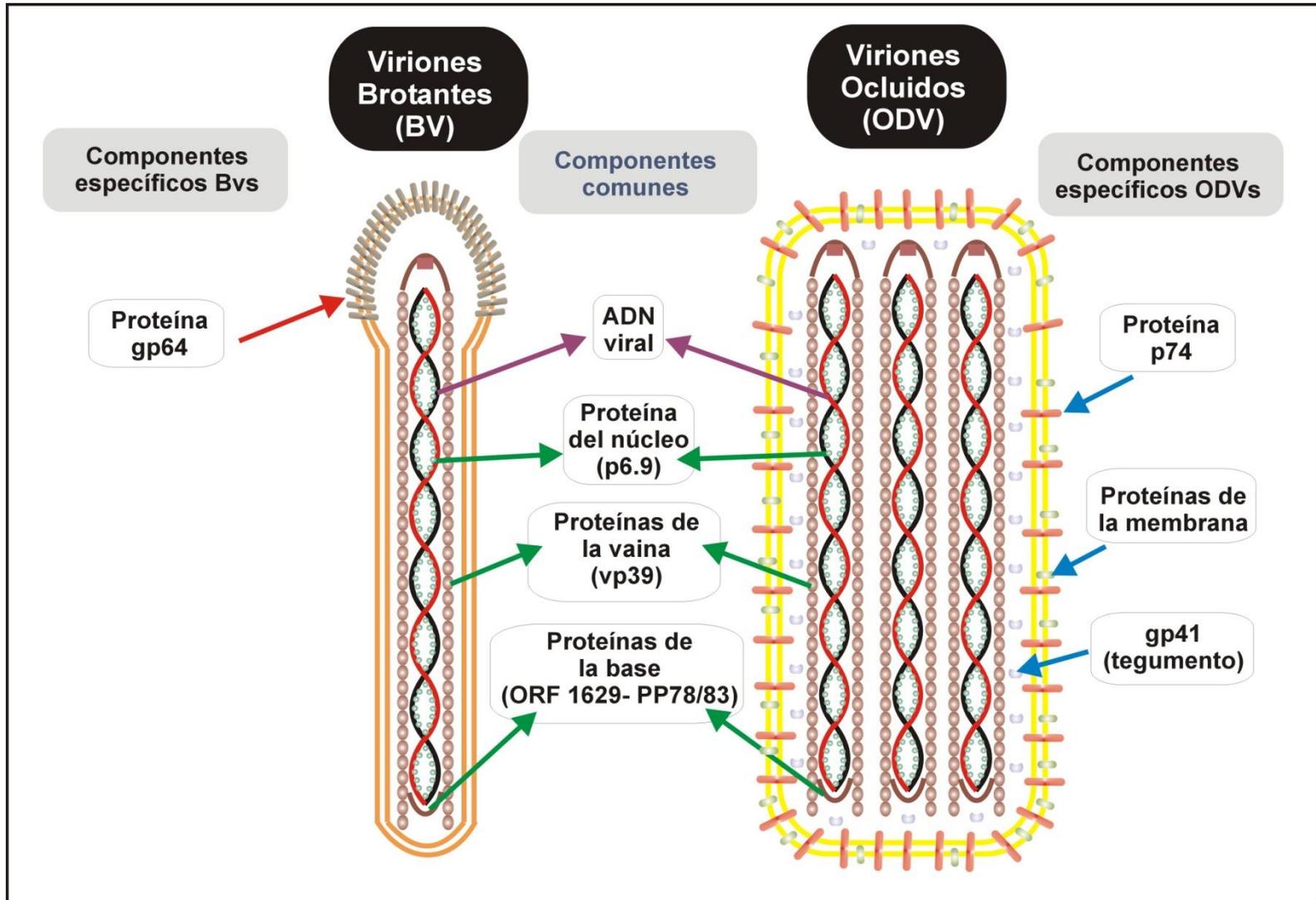
C y D. Poliedrovirus



Nucleocápside

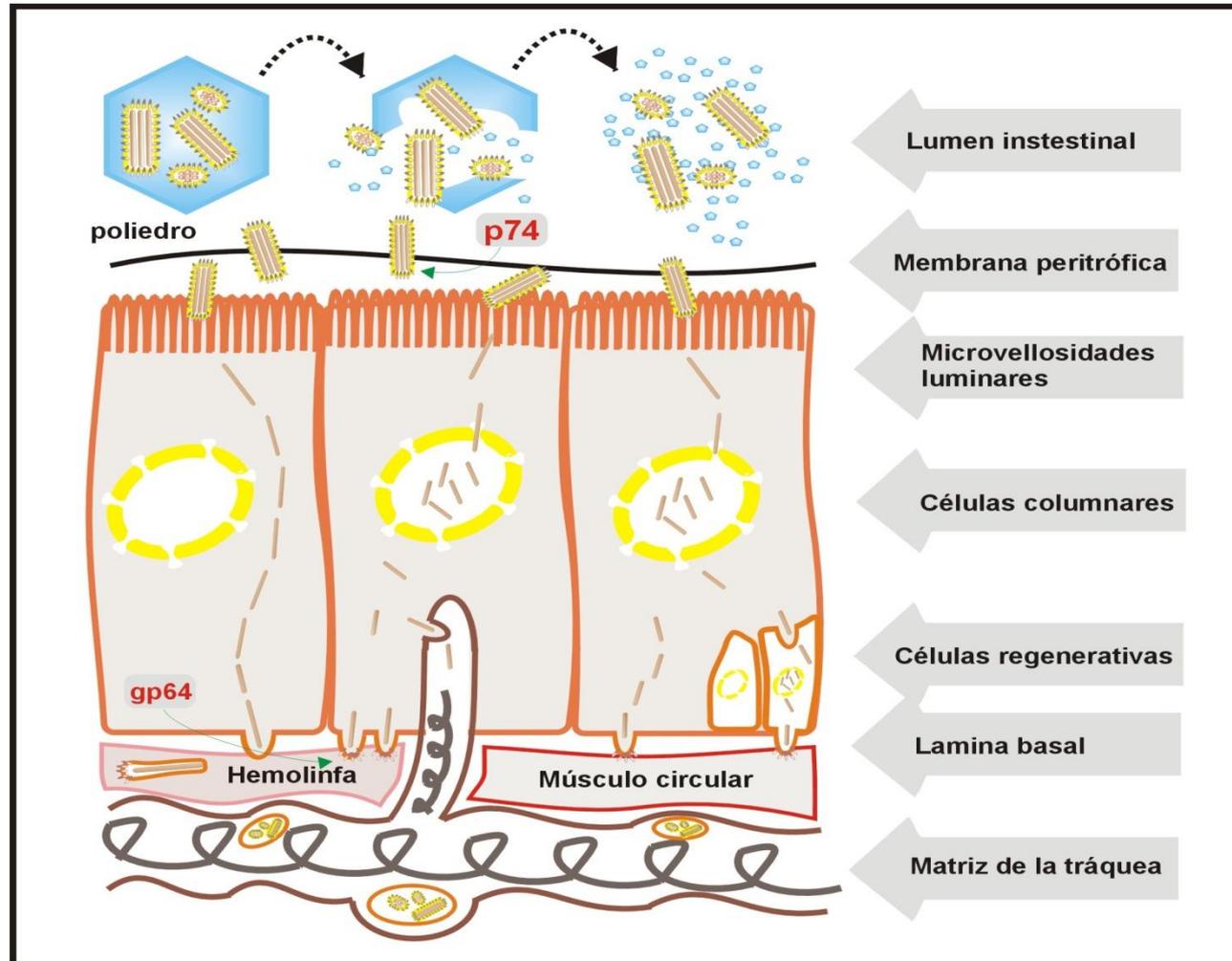
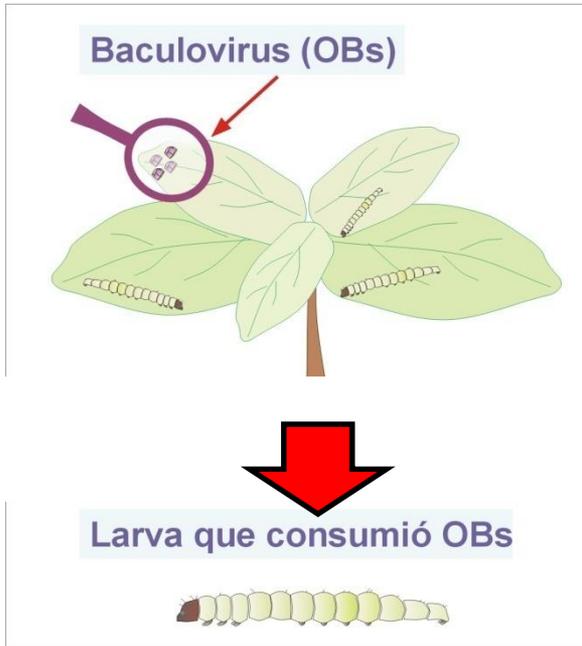
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos: ciclo en la naturaleza

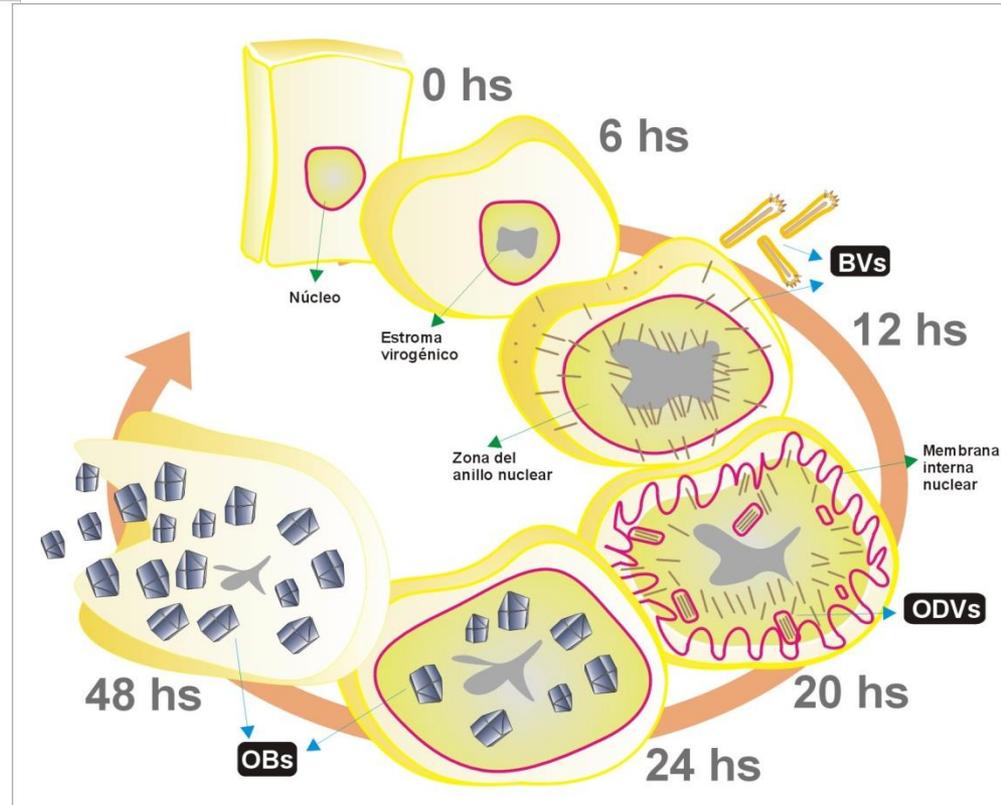
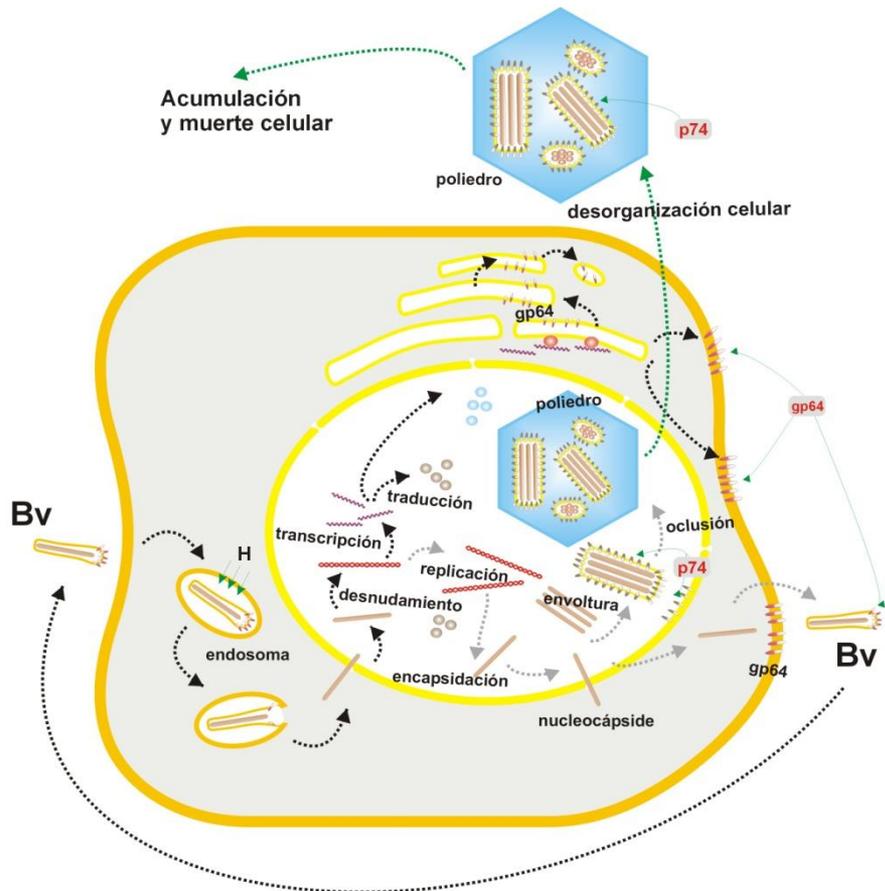


Intestino medio del insecto (Infección primaria)

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

Infección secundaria



Muerte celular

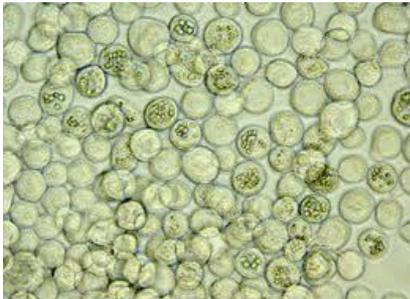
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

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

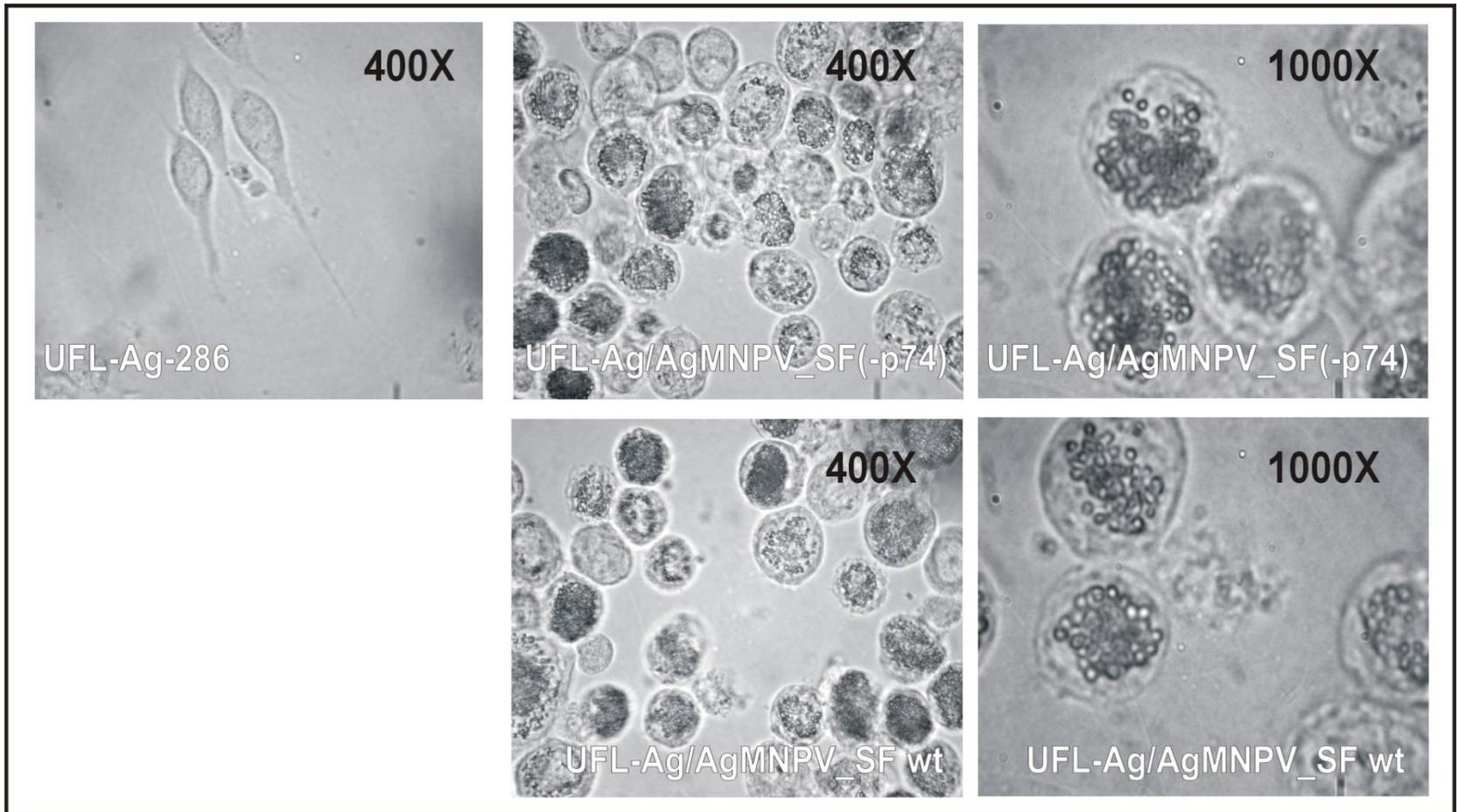


- Los **Viriones Brotantes** se utilizan para la infección en **células** creciendo en condiciones de laboratorio.



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



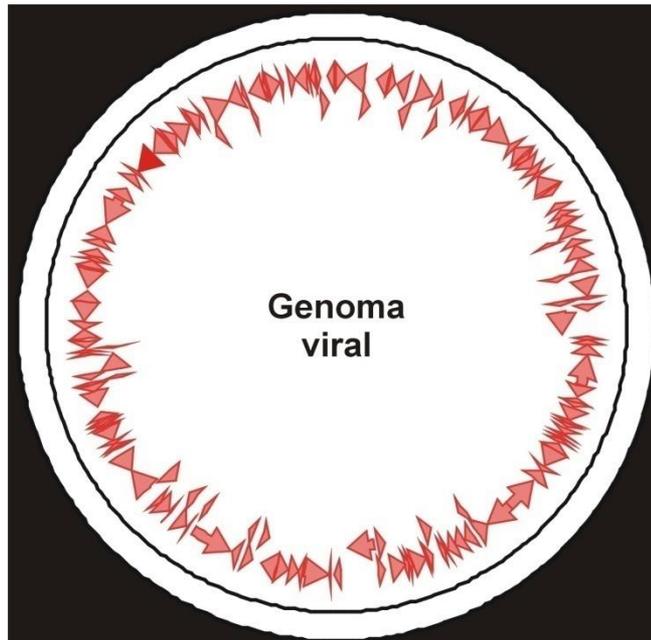
Inserto: ORF
En casete de expresión

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

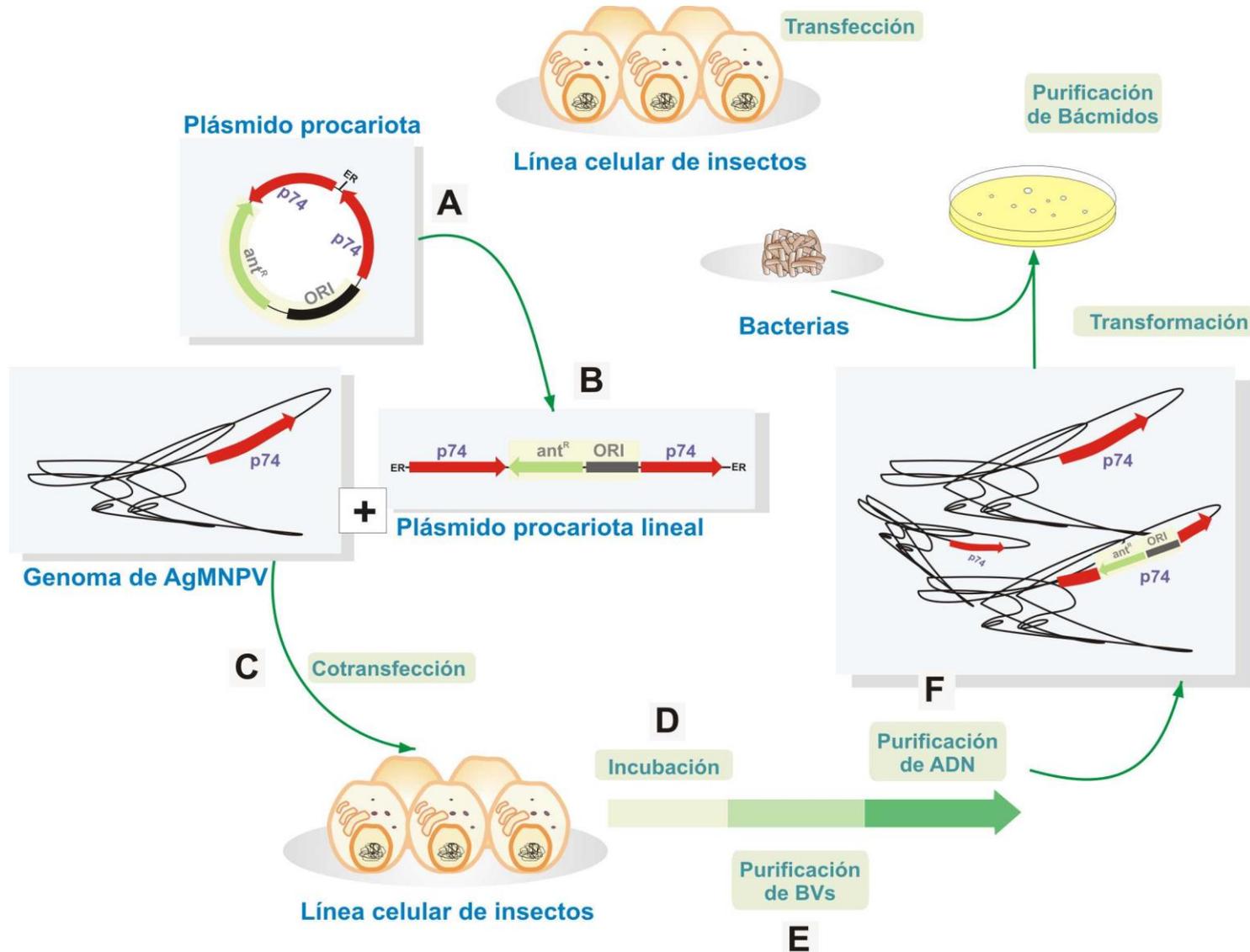
Al genoma de los baculovirus puede insertársele un replicón procariota, transformándose en un mega-plásmido



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.

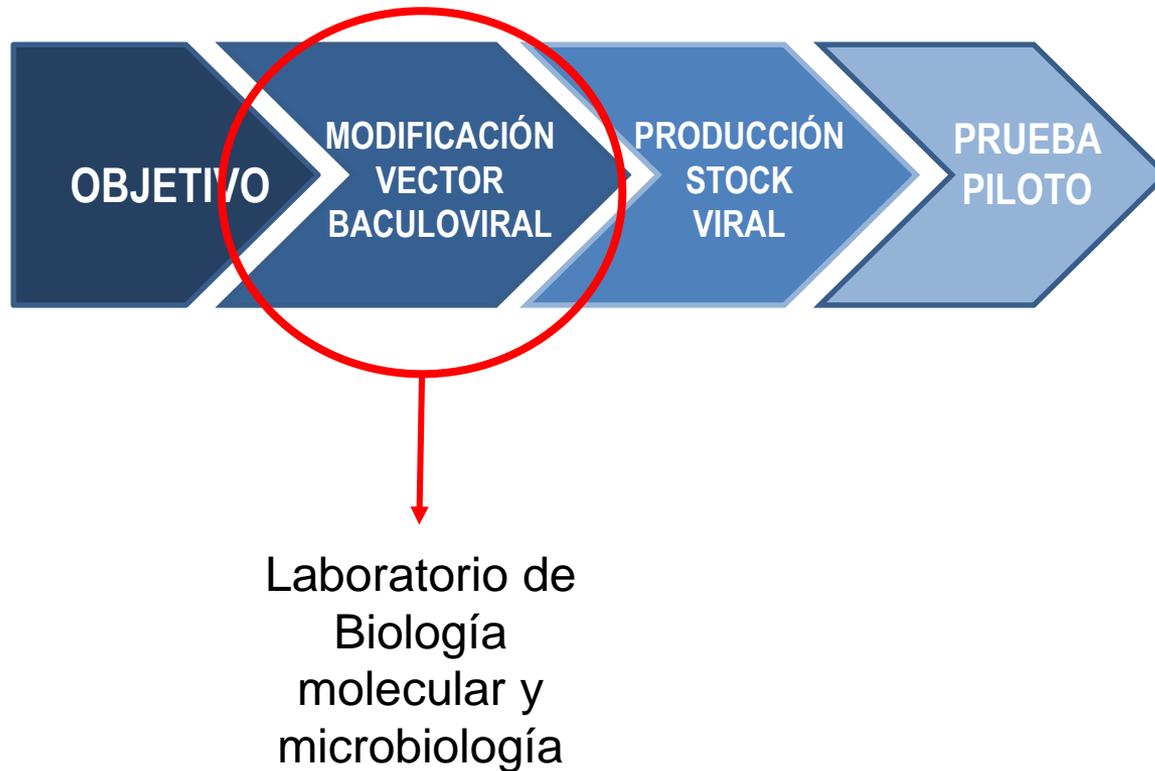
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

MODIFICACIÓN
VECTOR
BACULOVIRAL

Existen **diferentes vectores de clonado molecular** basados en *baculovirus*, siendo uno de los más versátiles el sistema **Bac-to-**

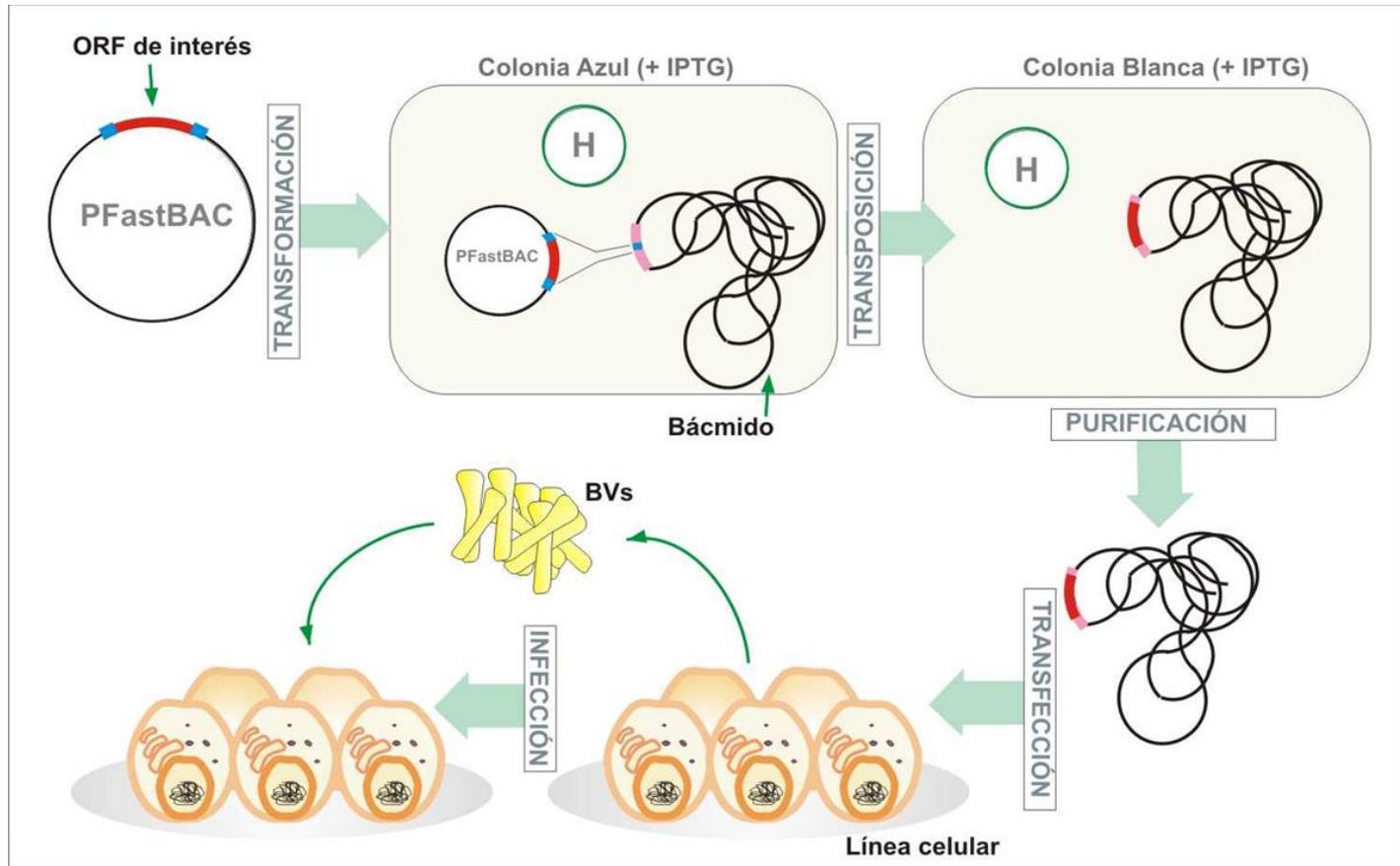


**Invitrogen
Bac-to-Bac
Expression**

Expresión de proteínas recombinantes

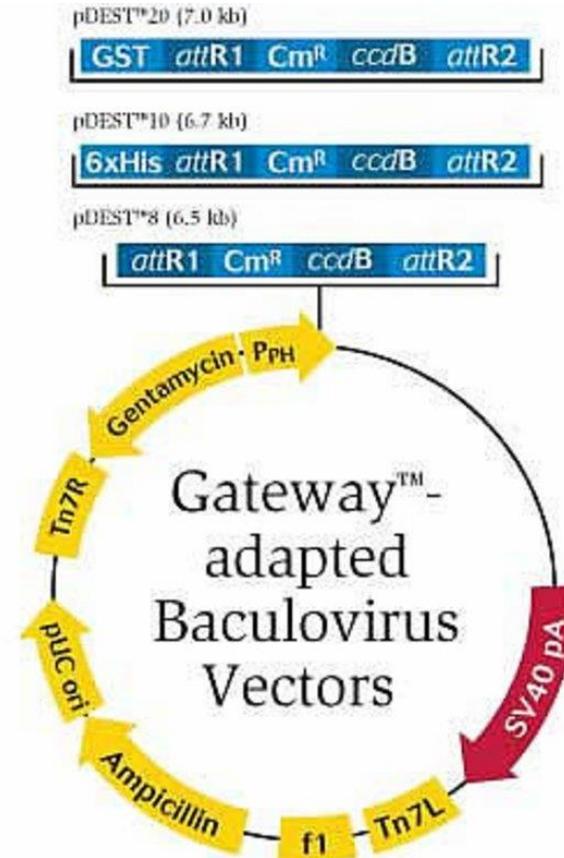
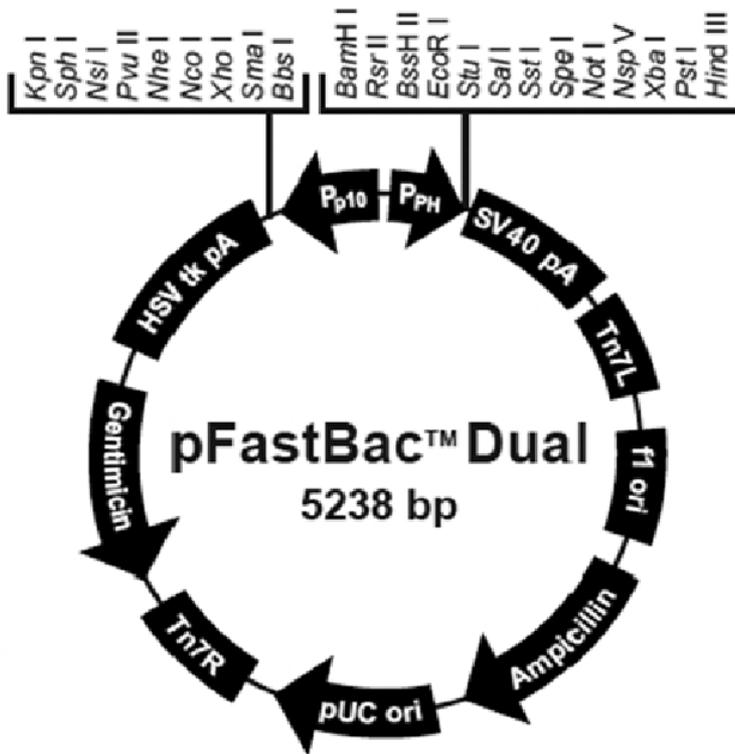
Sistema baculovirus/insectos

Invitrogen
Bac-to-Bac
Expression



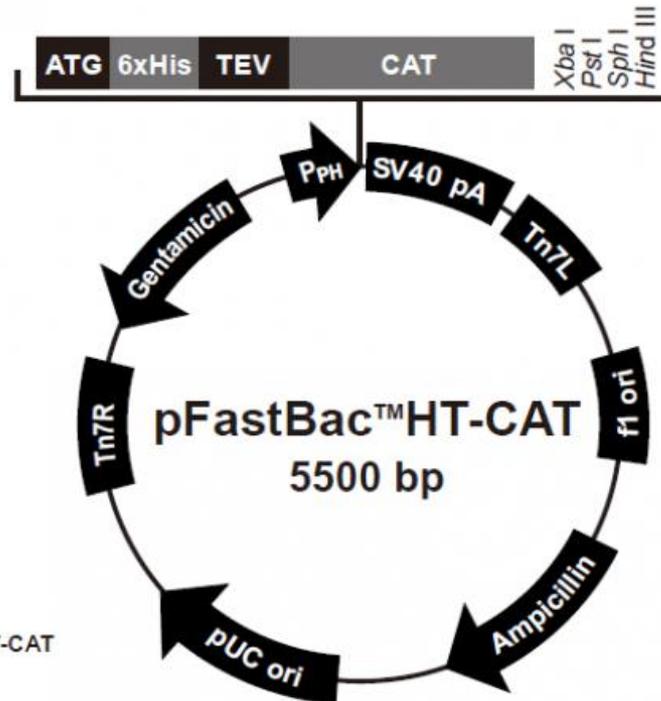
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Comments for pFastBac™HT-CAT
5500 nucleotides

f1 origin: bases 2-457

Ampicillin resistance gene: bases 589-1449

pUC origin: bases 1594-2267

Tn7R: bases 2511-2735

Gentamicin resistance gene: bases 2802-3335 (complementary strand)

Polyhedrin promoter (P_{PH}): bases 3904-4032

Initiation ATG: bases 4050-4052

6xHis tag: bases 4062-4079

TEV recognition site: bases 4101-4121

CAT ORF: bases 4131-4790

SV40 polyadenylation signal: bases 4884-5124

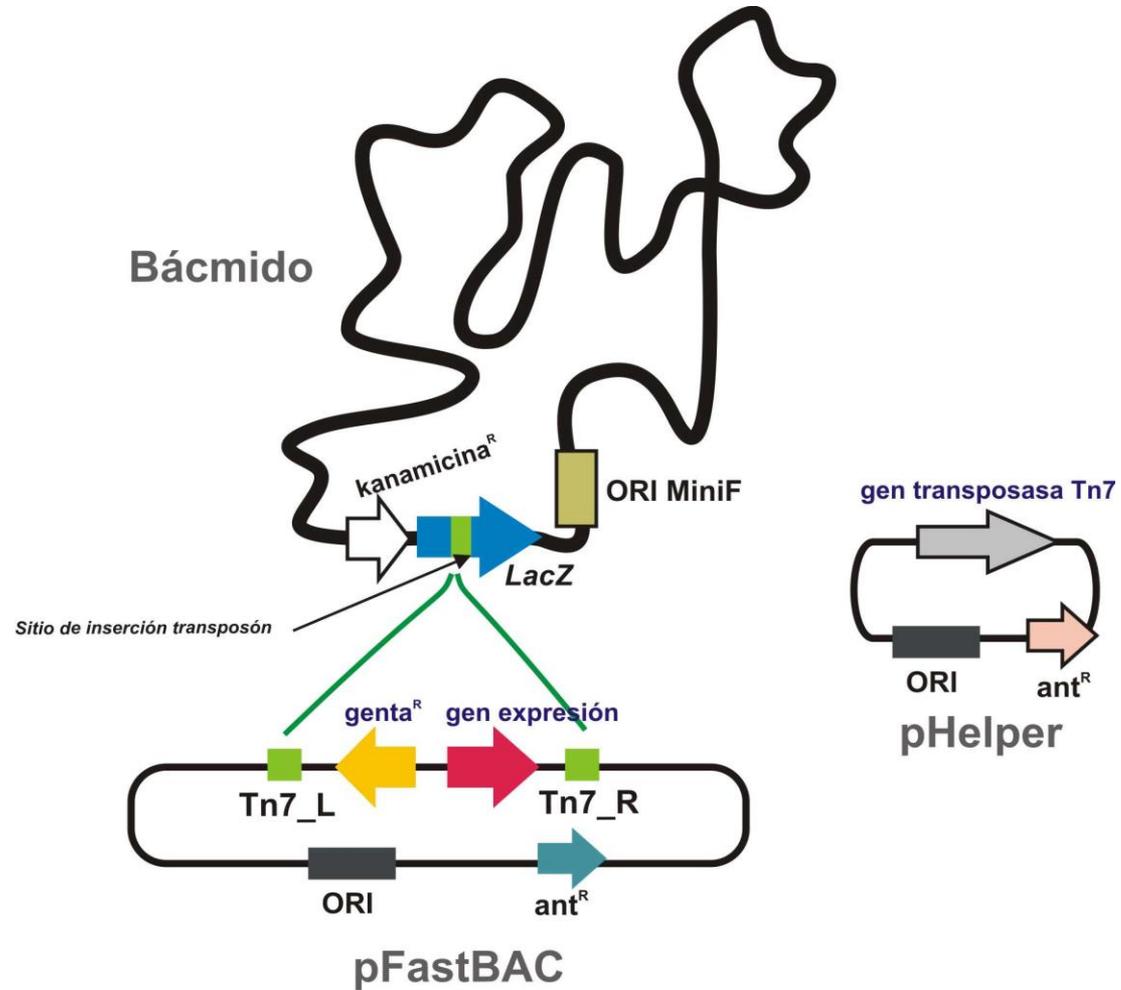
Tn7L: bases 5153-5318

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

Invitrogen
Bac-to-Bac
Expression

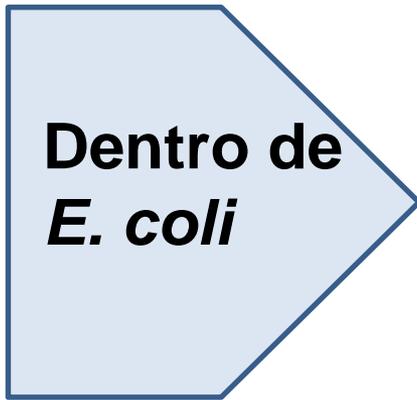
Dentro de
E. coli



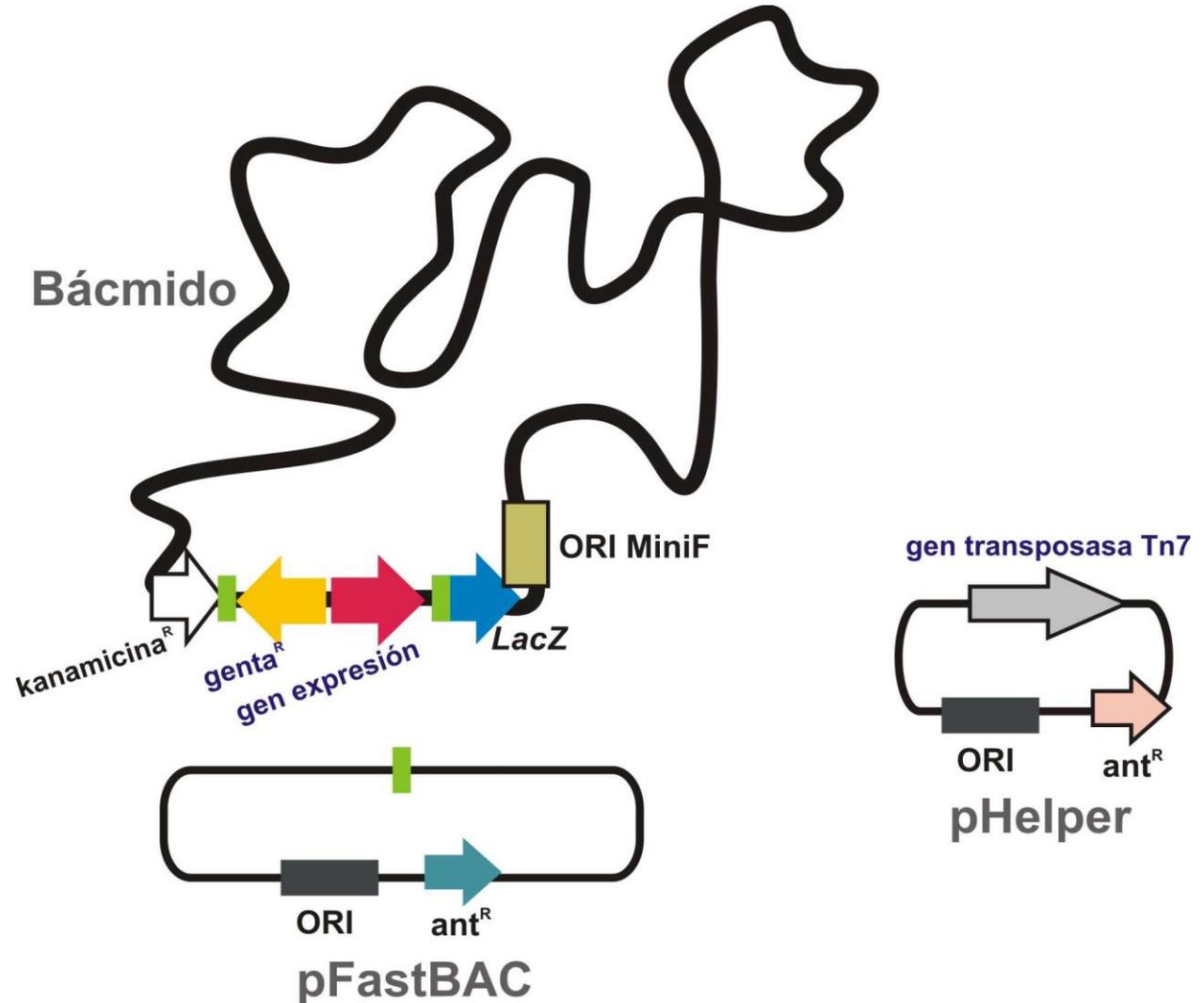
Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

Invitrogen
Bac-to-Bac
Expression

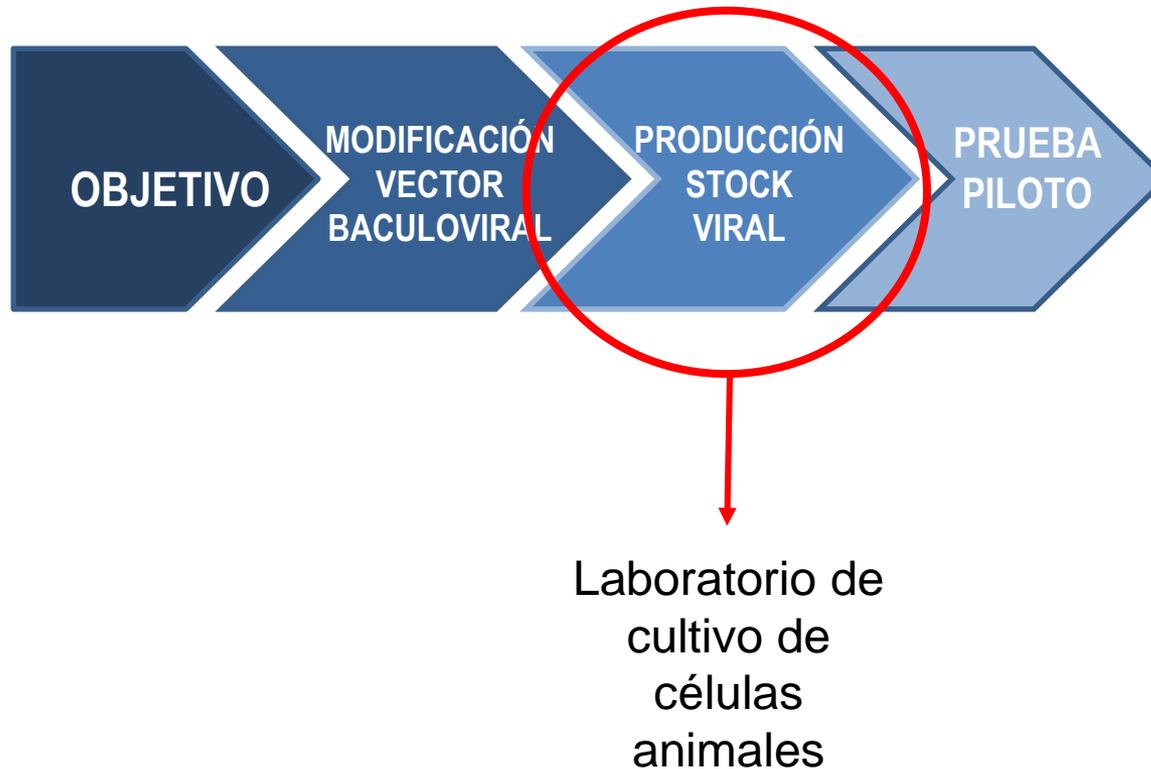


Luego de transponer



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

a) Cultivos celulares *in vitro*: líneas **Sf9** (ATCC CRL-1711™), **Hi-5** (ATCC CRL-10859); medio GRACE's (Gibco).



→
Crecimiento en monocapa



Crecimiento en suspensión

Condiciones: 21-27 °C, atmósfera común

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

b) Transfección del b́acmido recombinante: Emplear para ello, por ejemplo reactivo *Cellfectin* (Invitrogen). Incubar aprox. 5 d́as.



Ćelulas Sf9



DNA B́acmido
recombinante

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

PRODUCCIÓN
STOCK
VIRAL

c) **Expansión Pasaje viral 0 (P0):** Infectar cultivo celular nuevo para producir **lote P1**. Incubar aprox. 5 días.



Células Sf9
transfectadas (P0)



Células Sf9
infectadas (P1)



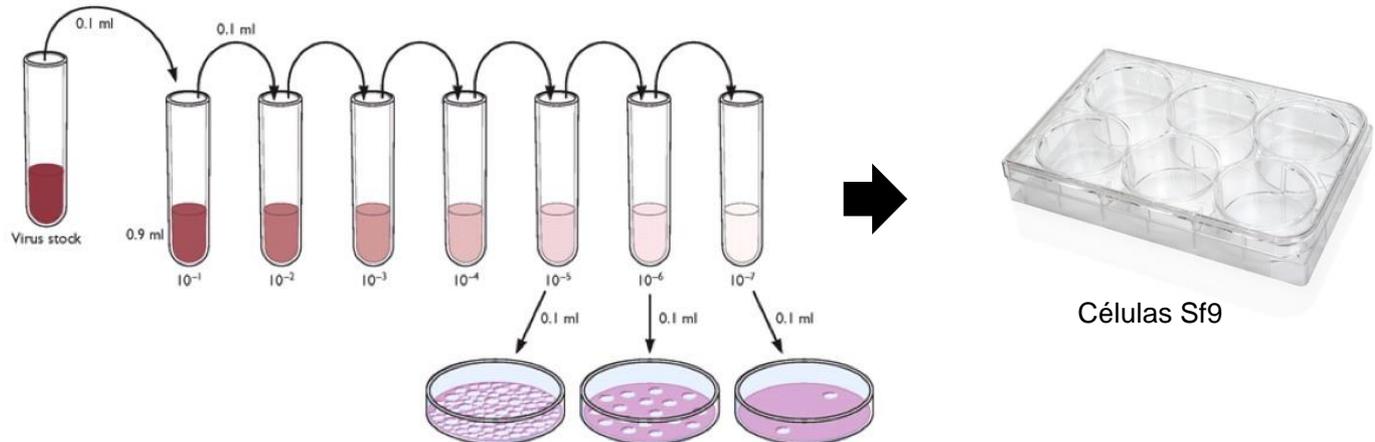
Medio de cultivo clarificado
Lote P1 (almacenado a 4
°C)

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

PRODUCCIÓN
STOCK
VIRAL

d1) Titulación Lote Viral: Realizar un ensayo de infección por dilución en placa. Expresar título como **PFU/mL**

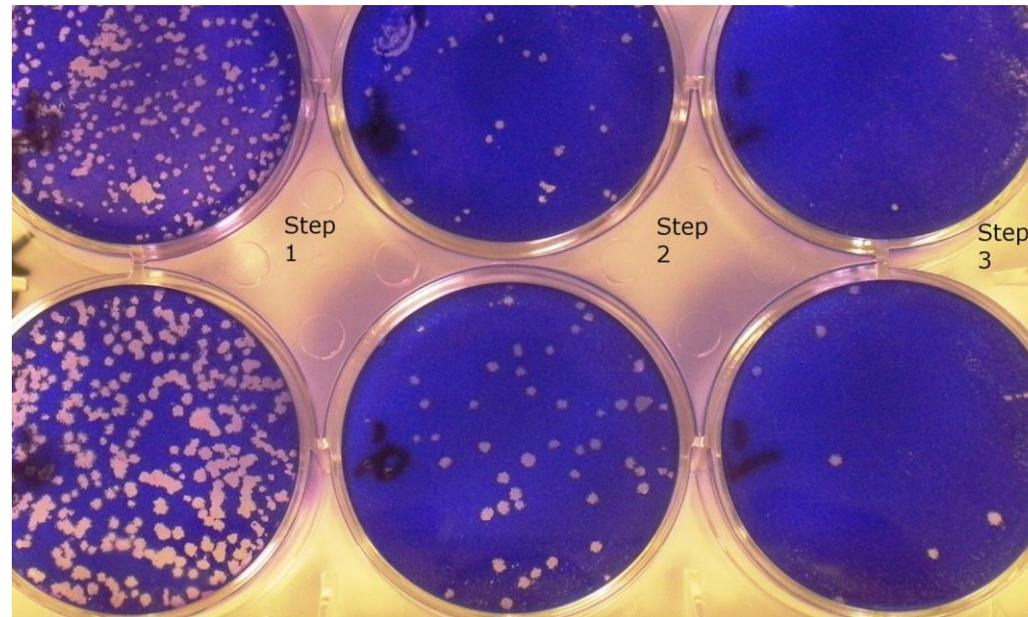


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



d1) Titulación Lote Viral: Realizar un ensayo de infección por dilución en placa. Expresar título como PFU/mL.



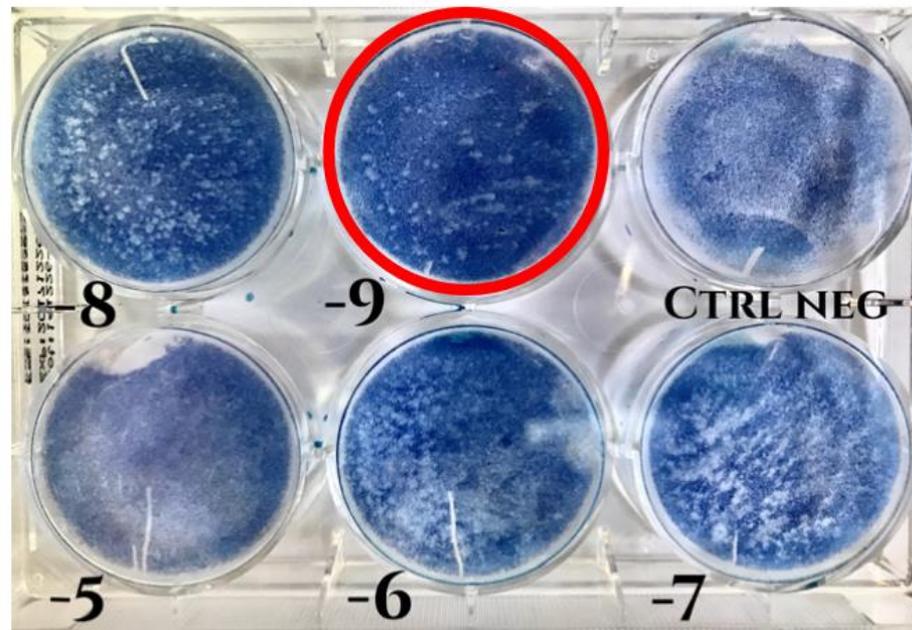
Nota: Este lote se puede escalar, para producir lotes P2, y así, cumplir objetivos

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



d1) Titulación Lote Viral: Realizar un ensayo de infección por dilución en placa. Expresar título como PFU/mL.



Nota: Este lote se puede escalar, para producir lotes P2, y así, cumplir objetivos

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



d2) Titulación Lote Viral: Realizar un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR). Expresar título como **Copias genoma virus/mL** o **Copias gen/mL**.



Lote P1



Aislar **DNA viral**
a partir de
alícuota



qPCR (*primers* genoma
viral y/o transgén)



**Cuantificación
absoluta con
DNA calibrador**

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

PRUEBA
PILOTO



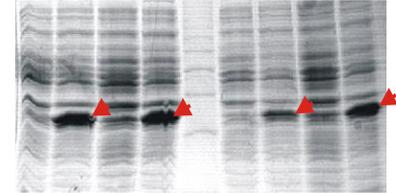
Lote P1, BacX $N \times 10^9$ PFU/mL



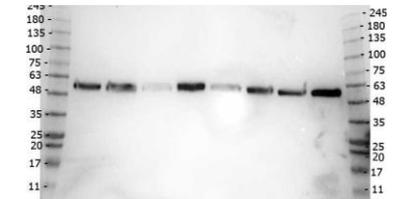
Ensayos a distintas MOI
(multiplicidad de infección)



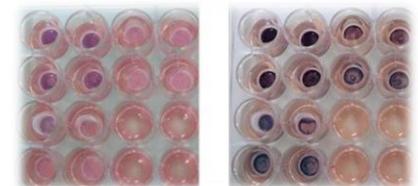
SDS-PAGE



Western blot



Ensayo de
actividad/inmunogenicidad



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos

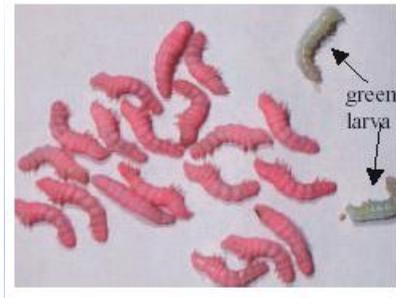
PRUEBA PILOTO



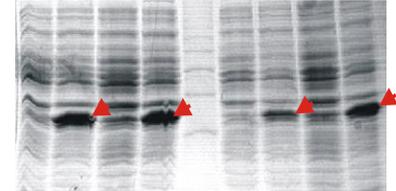
Lote P1, BacX $N \times 10^9$ PFU/mL



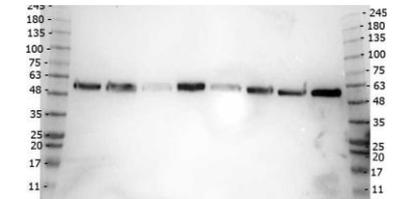
Ensayos a distintas MOI
(por inyección de larvas susceptibles)



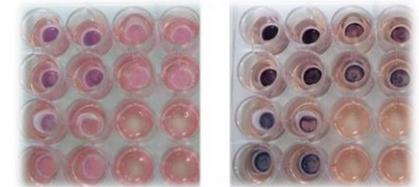
SDS-PAGE



Western blot

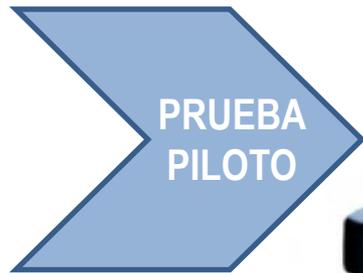


Ensayo de actividad/inmunogenicidad



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



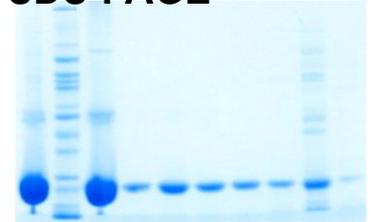
Lote Biomasa con proteína expresada



Proceso de purificación y posterior acondicionamiento



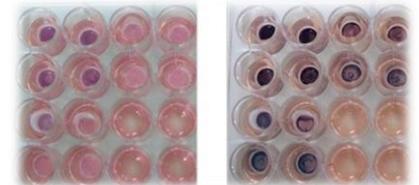
SDS-PAGE



Espectrometría de masa



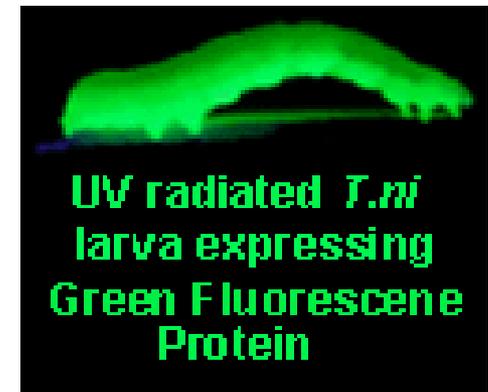
Ensayo de actividad/inmunogenicidad



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).



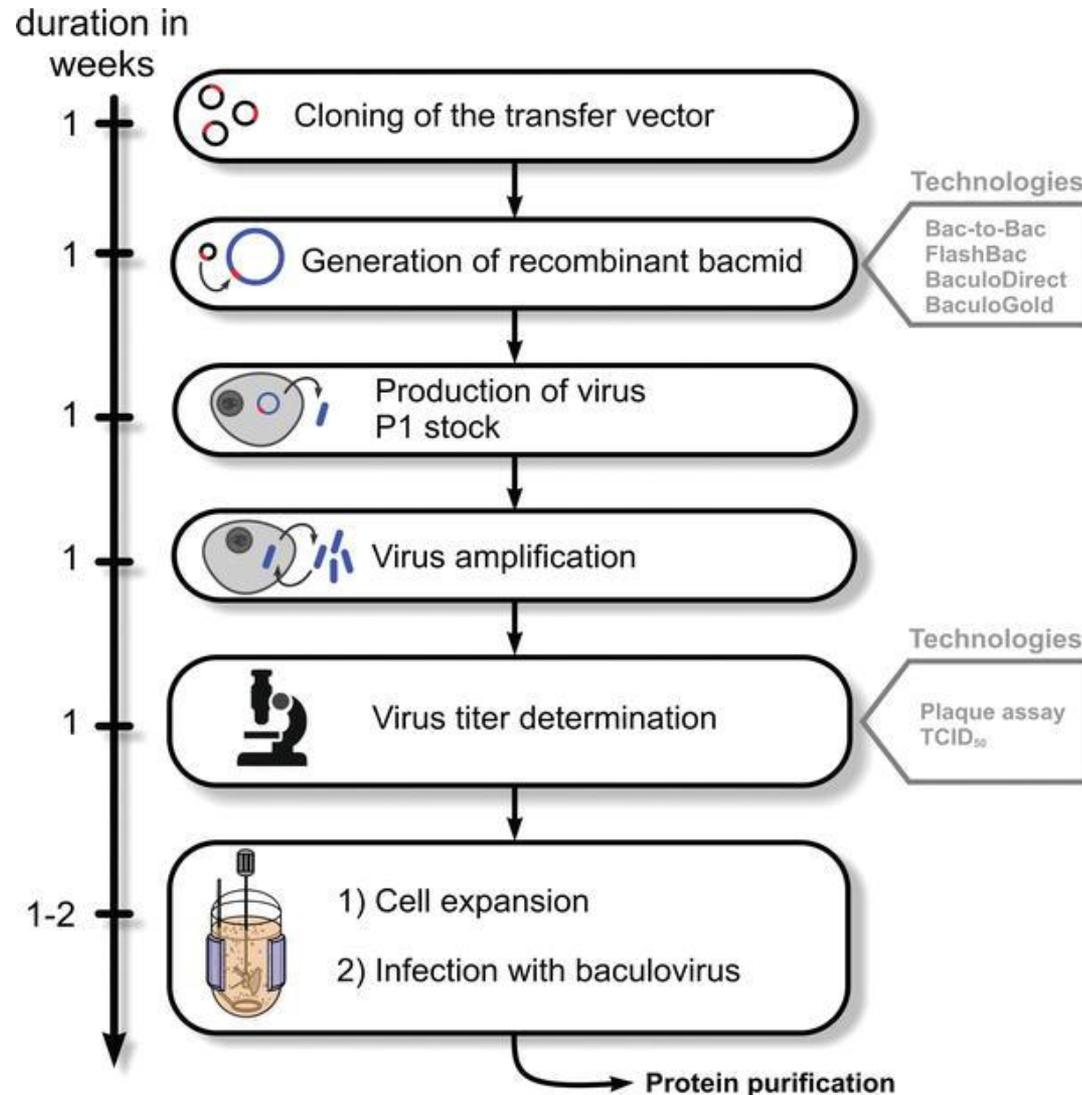
Rachiplusia nu
infectada
con AcMNPV
(ph-, DsRed+)



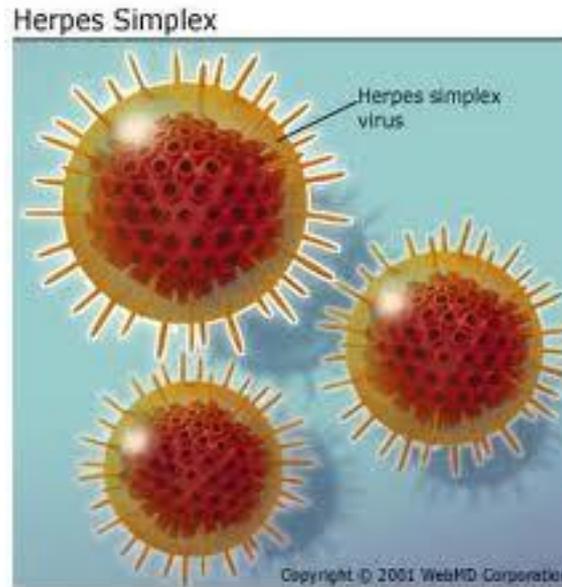
Rachiplusia nu
no infectada

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema baculovirus/insectos



Expresión de proteínas utilizando virus de mamíferos

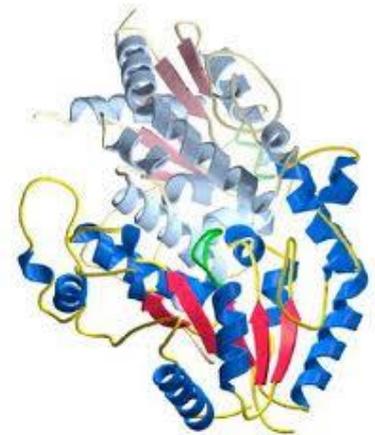


Expresión de proteínas recombinantes

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

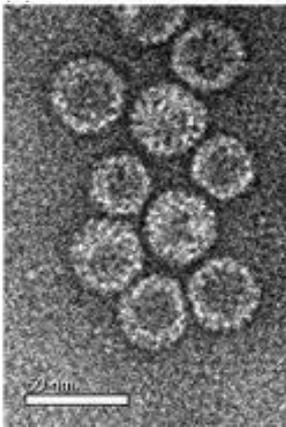
- Existen numerosos ejemplos de **virus de mamíferos** modificados para el desarrollo de **sistemas de expresión de proteínas**.
- Entre ellos se pueden mencionar a **Vaccinia** y al **Herpes virus**.
- Estos **patógenos** han sido **modificados** para que **no afecten** la **salud humana**.
- Al poseer **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

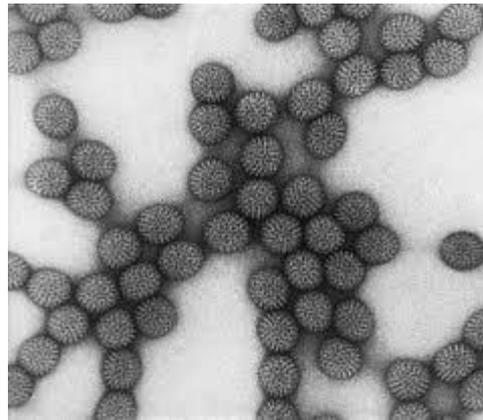
Sistema virus herpes/células de mamíferos

- 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**.

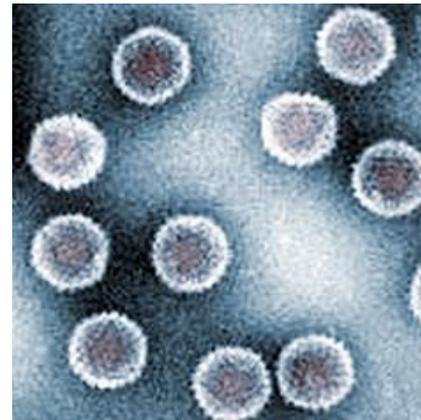
HSV



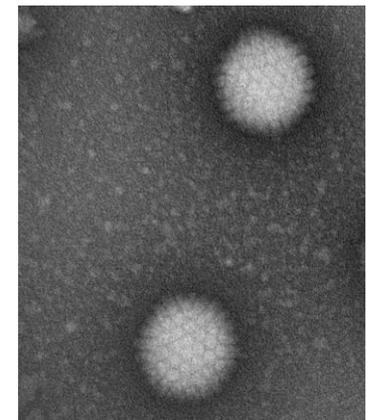
HCMV



EBV



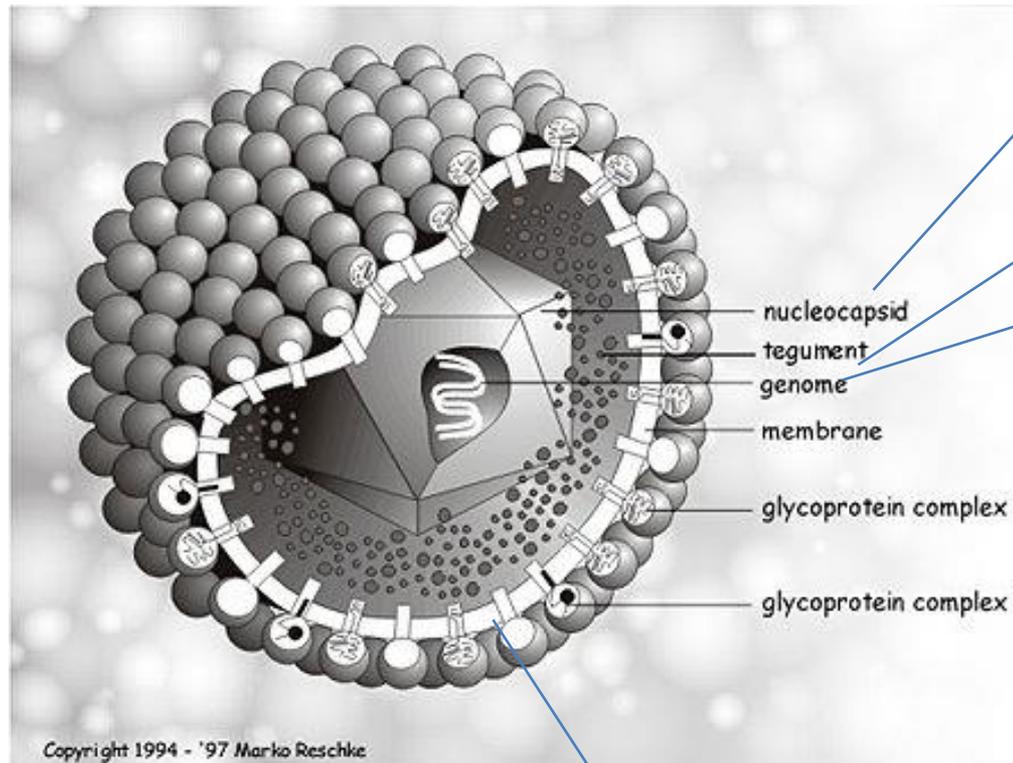
HHV3



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

Estructura típica de un herpes



162 capsómeros
(VP5, VP26, VP23, VP19C)

Proteínas
regulatorias

dsDNA lineal
(~ 150 kpb)

10
glicoproteínas

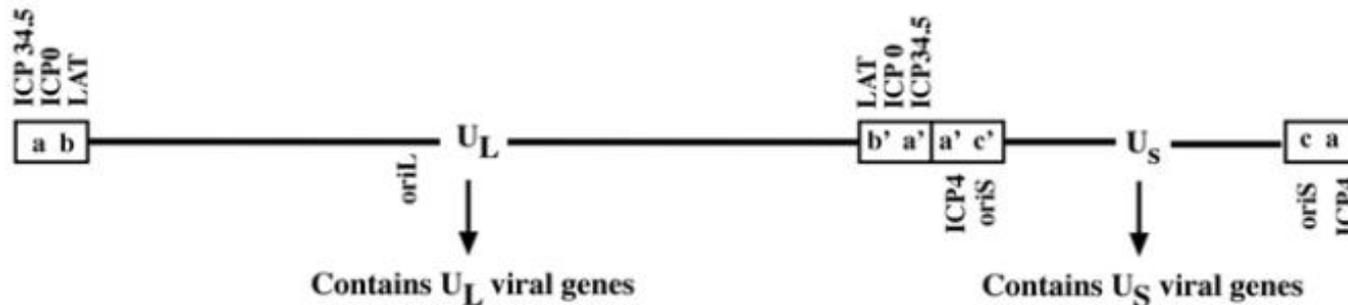
Envoltura lipídica

Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

Genoma del herpes

B. HSV-1 Genome Organization

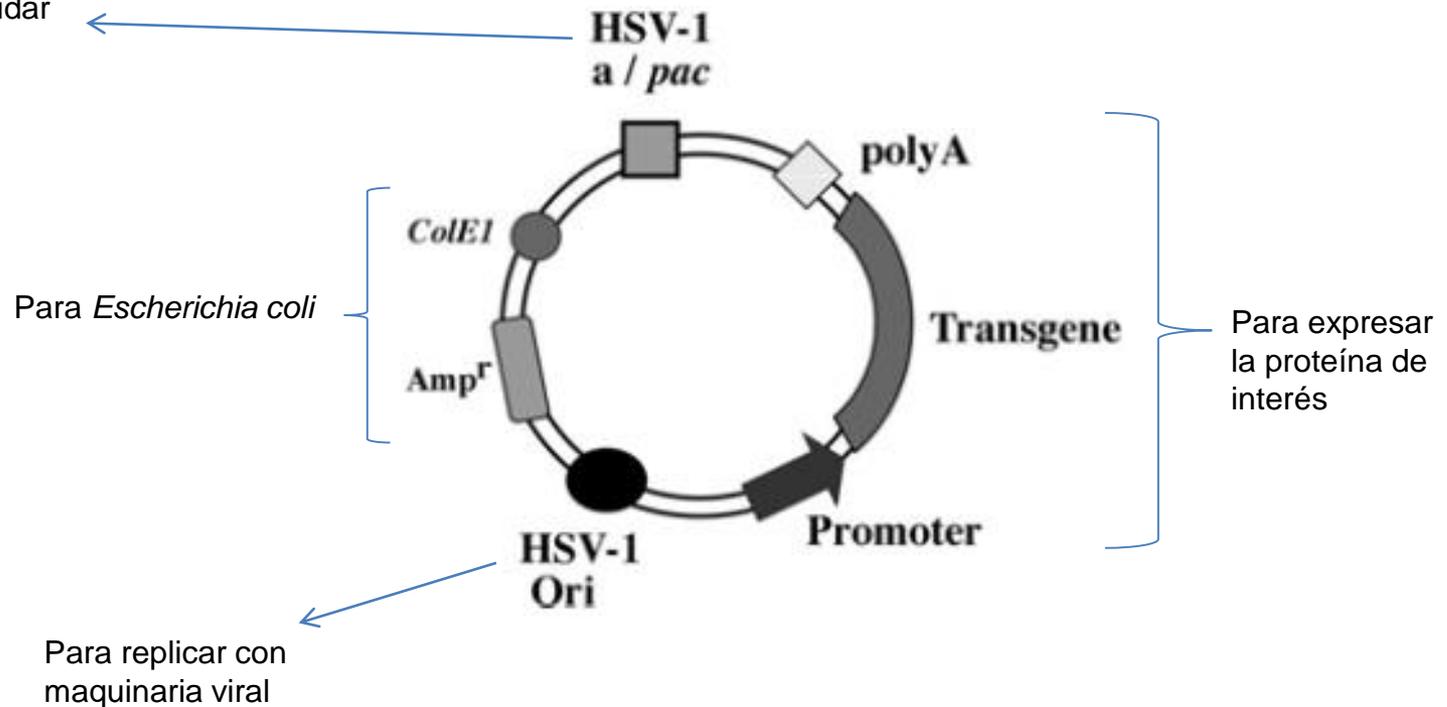


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

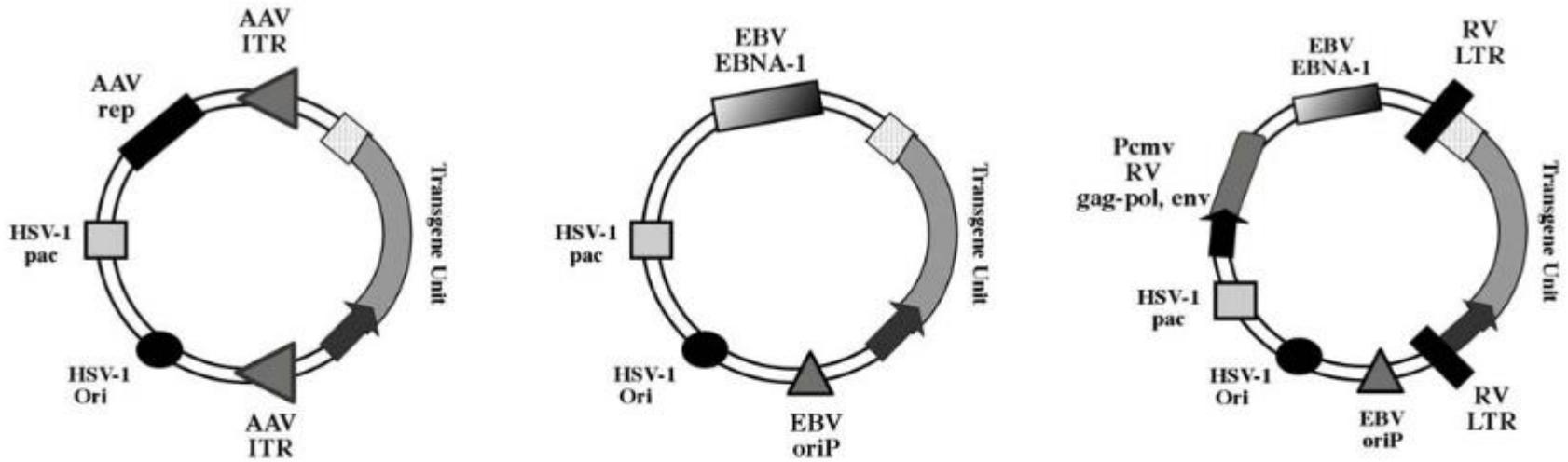
Los **vectores basados** en el genoma del **virus herpes** se denominan **amplicones** (*herpes amplicon vectors*).

Para encapsidar
y resolver
multímeros

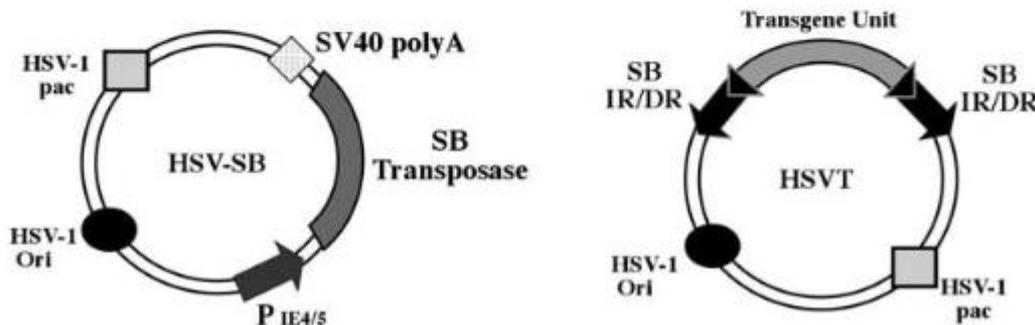


Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

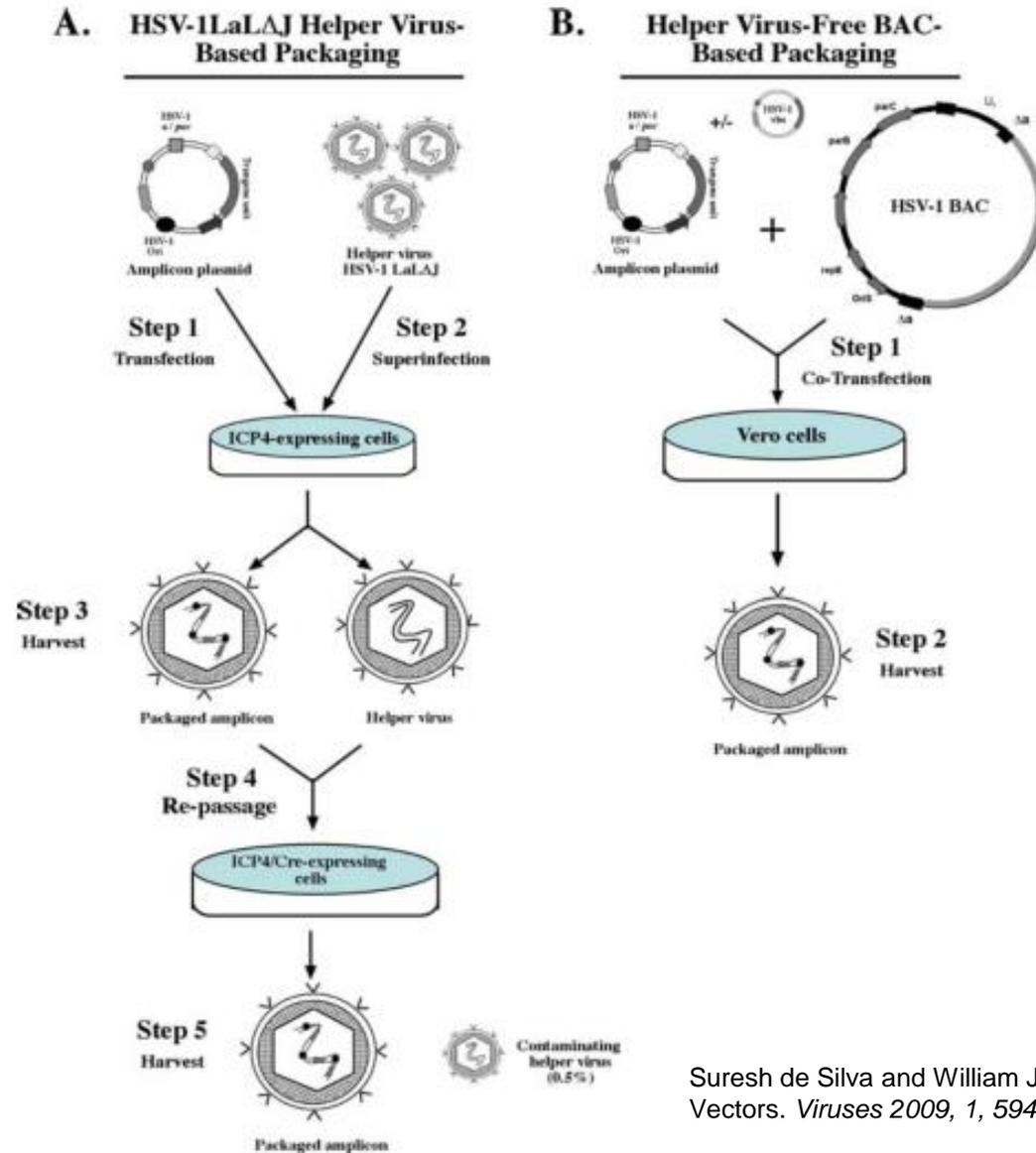


D. HSV/Sleeping Beauty



Expresión de proteínas recombinantes

Sistema virus herpes/células de mamíferos

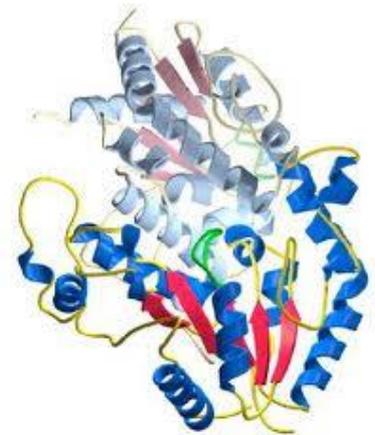


Expresión de proteínas recombinantes

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

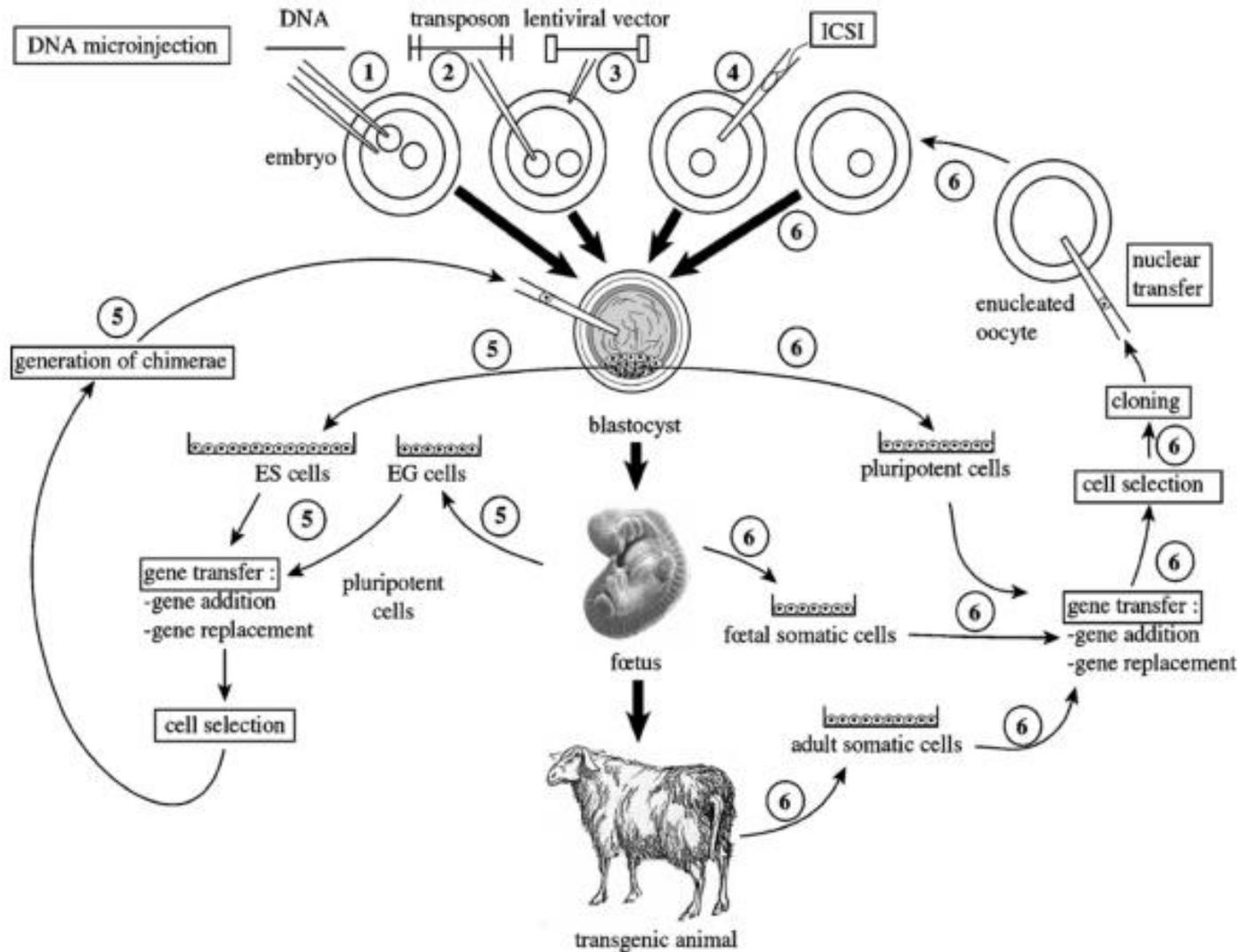
Sistema OGM

- 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

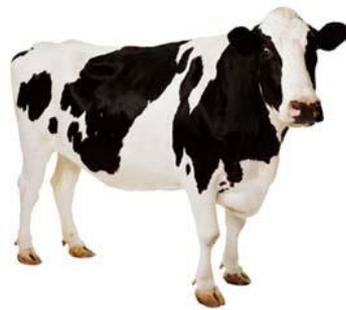
Some of the pharmaceutical proteins under study produced in milk

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

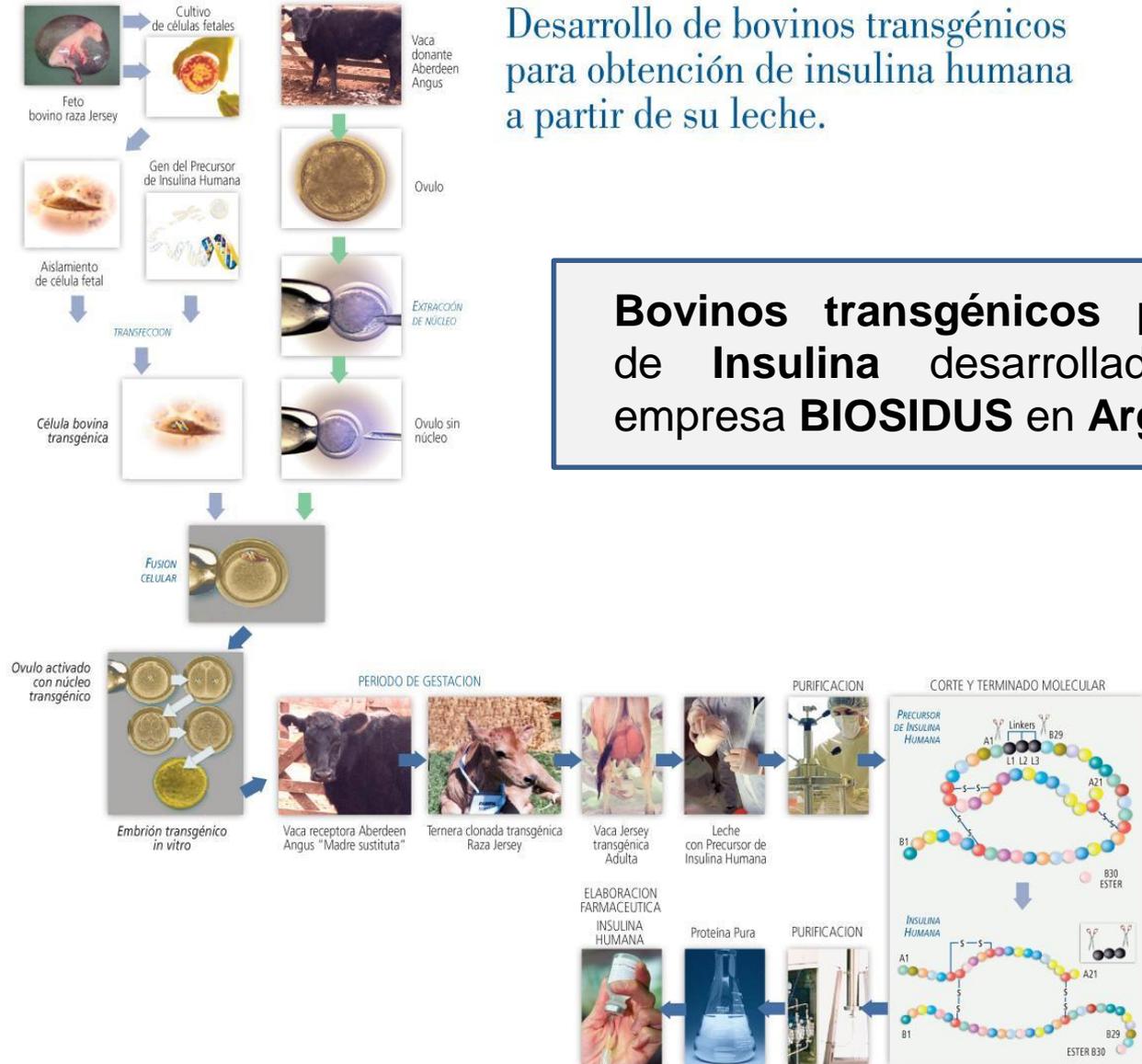
Hormona de
crecimiento

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**