

Sistemas de expressão de proteínas

Prof. Alan McBride
Proteômica
Biotecnologia, CDTec, UFPel

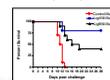
Porque produzir proteínas recombinantes?

- Produção de antígenos para usar no desenvolvimento de testes diagnósticos.



Leptospirose

- Produzir vacinas tipo subunidade.



- Genômica estrutural.



- Produção de anticorpos e biomarcadores.



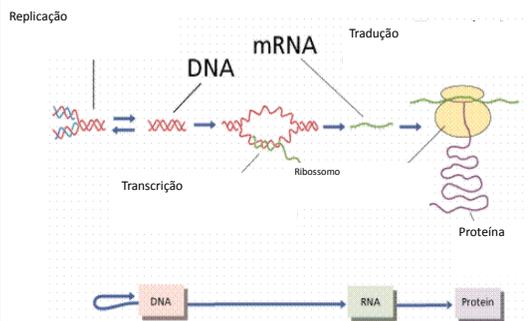
Objetivos

- Sistemas disponíveis para expressão.
- *Escherichia coli* – o sistema mais simples e usado.
- Sistemas alternativos
 - Leveduras – *Saccharomyces* e *Pichia* spp.
 - Baculovírus e células de inseto.
 - Sistema livre de células.
 - Vantagens e desvantagens dos sistemas.

O que significa síntese protéica?

- Síntese protéica é um fenômeno relativamente rápido e muito complexo, que ocorre no interior das bactérias e das células.
- Este processo tem duas fases:
 - transcrição e a tradução
- Essas fases resultam na produção de uma proteína:

O que significa síntese protéica?



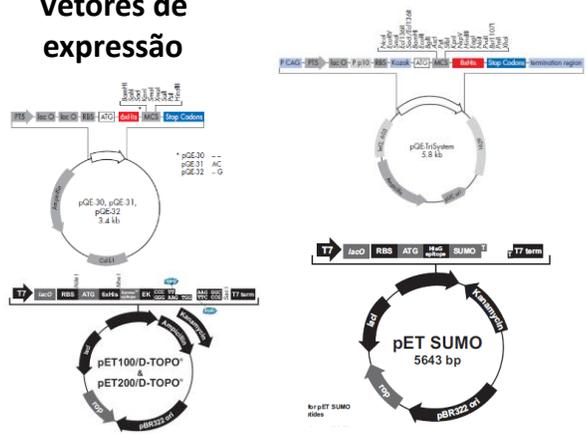
Francis Crick – palestra Nobel 1962

- “The genetic code describes the way in which a sequence of twenty or more things is determined by a sequence of four things of a different type.”

Introdução de DNA heterólogo

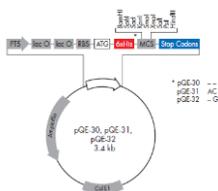
- Vírus
 - Baculovírus, retrovírus, adenovírus
- Plasmídeos
- Cromossomos artificiais
- Bacteriófagos
 - Lambda

Vetores de expressão



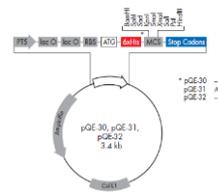
O que tem um vetor de expressão?

- Origem de replicação
 - *E. coli*
 - Shuttle vector
- Marcador de seleção
 - Ex. ampicilina, kanamicina
- Local de clonagem
 - TOPO
 - Enzimas de restrição



O que tem um vetor de expressão?

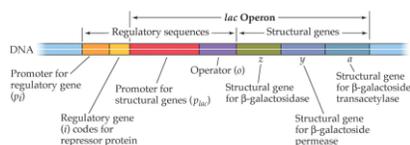
- Promotor induzível:
 - PT5 e PT7 mais comum, Ptac
- Iniciador de tradução:
 - Sequência Shine-Dalgarno (procariotos):
 - Consenso: AGGAGG
 - Sequência Kozak (eucariotos):
 - Consenso: (gcc)gccRccAUGG
 - Sítio de ligação ribossomal (RBS);
 - Códons de iniciação:
 - ATG, GTG ou TTG
 - Códons de terminação:
 - TAG (âmbar), TGA (opala) e TAA (ocre)
- Cauda para purificação:
 - Ex. 6xHis, GST, e MBP



Promotor induzível: operon lac

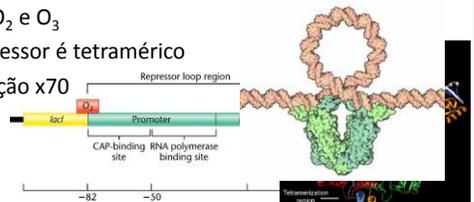
- Regulado pelo repressor codificado pelo *lacI* gene
- Repressor se-liga no local do operador O

Promotor induzível: operon lac



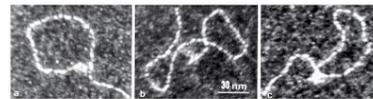
Promotor induzível: operon *lac*

- IPTG (análogo de alolactose) se-liga no repressor Lac para inibir repressão do promotor
- >1 operador
 - O₁, O₂ e O₃
 - Repressor é tetramérico
 - Inibição x70



Promotor induzível: operon *lac*

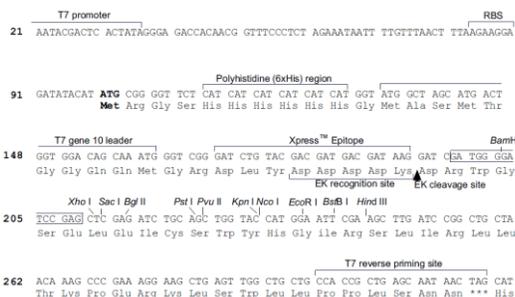
- IPTG (análogo de alolactose) se-liga no repressor Lac para inibir repressão do promotor
- >1 operador
 - O₁, O₂ e O₃
 - Repressor é tetramérico
 - Inibição x70



Promotor induzível: operon *lac*

- Equilíbrio constante de ligação (K_B).
- Repressor Lac::O₁ ligação K_B = 10¹³ M⁻¹:
 - Uma da ligações biológicas mais forte;
 - O repressor fica ca. 20 min no operador;
 - Eventualmente dissocia do operador e transcrição vai começar.
- 10 cópias do repressor/célula para ocupar os locais de operadores.

Região promotor vetor pRSET A



Caudas (tags) de fusão

Fusion Tag	Immobilized Ligand	Binding Conditions	Elution Conditions	Available Formats
Glutathione S-transferase (GST)	Reduced glutathione	Neutral (physiologic) pH, and non-denaturing; glutathione must be reduced and GST must be active	Free reduced glutathione at neutral pH (competitor)	Prepacked column kits, spin cup column kits, Swell/Gel Discs, coated microplates
Histidine	Chelated Nickel or Cobalt	Neutral (physiologic) pH without reducing or oxidizing agents; small tag must be accessible in fusion protein structure; high ionic strength and denaturants (chaotropes such as 8 M urea) compatible.	>200 mM Imidazole, low pH, or strong chelators	Prepacked column kits, spin cup column kits, Swell/Gel Discs, Swell- Gel Discs in 96-well filter plates, coated microplates
Maltose Binding Protein (MBP)	Dextrin	Neutral (physiologic) pH and non-denaturing; NaCl added to reduce nonspecific binding	Maltose at neutral pH (competitor)	Gel slurry, coated microplates
Green Fluorescent Protein (GFP)	Anti-GFP antibody	Neutral (physiologic) pH and non-denaturing	Usual antibody/antigen elution buffers (e.g., low pH or chaotropic salts)	Coated microplates

Cauda de fusão GST

- Glutathione S-transferase:
 - 220 aa, 26 kDa
 - Catalisadora
 - Função desconhecido
 - Aumenta solubilidade dos substratos;
 - Fusão N-terminal;
 - Pode usar para purificar a proteína recombinante:
 - Coluna de glutathione
 - GST fusões avaliar interações proteína-proteína.

Cauda polihistidina

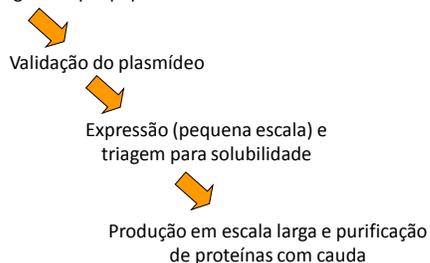
- Pelo menos 5 histidinas;
- Fusão N ou C-terminal;
- Maior vantagem em purificar a proteína recombinante:
 - Não ajudar solubilizar a proteína clonada;
 - Purificação de afinidade:
 - Ex. IMAC
- Sistemas de expressão procariótico
 - *E. coli* é mais comum

Proteína de ligação maltose (MBP)

- Origem *E. coli*
- Envolvida no catabolismo de maltodextrinas
- 42,5 kDa
- Aumenta a solubilidade de proteínas recombinantes expressadas em *E. coli*
- Pode usar para purificação:
 - Coluna de amilose
- Cauda MBP clivada por protease

Protocolo típico

PCR e clonagem de polipeptídeo



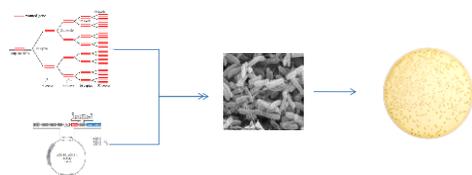
O sistema de *E. coli*



- Primeiro passo:
 - Identificar a proteína de interesse;
 - Escolher o vetor de expressão e a cepa de *E. coli*:
 - pQE32 e *E. coli* cepa TOP10F'
 - Usando ferramentas de bioinformática identificar a região a ser clonada e desenhar os iniciadores;
 - Preparar o molde: DNA, cDNA:
 - DNA genômico (somente procariotos!!!)
 - Bibliotecas comerciais de cDNAs

O sistema de *E. coli*

- Segundo passo:
 - PCR para amplificar os produtos a serem clonados
 - Clonagem dos produtos de PCR no vetor de expressão
 - Transformar as células competentes de *E. coli*



O sistema de *E. coli*

- Terceiro passo:
 - Prepara-se o pré-inóculo: repique das colônias (x3) para meio líquido (5 ml) mais o antibiótico para selecionar o plasmídeo
 - ex. ampicilina 100 µg/ml
 - Incubar no shaker a 37°C, 16 h

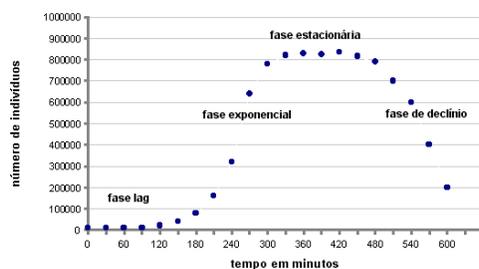


O sistema de *E. coli*

- Quarto passo:
 - Prepara-se a cultura (10 ml) obedecendo uma proporção de 1/50 a partir do pré-inóculo mais o antibiótico (CQ: sequenciar o plasmídeo)
 - Incubar a cultura no shaker (180 rpm) sob uma temperatura 37°C até atingir uma densidade óptica (600 nm) de 0,6 – 0,8 (2 – 8 h)
 - Induzir a cultura a expressar a proteína recombinante com IPTG [1 mM]
 - Incubar a cultura mais 2 – 4 h.

O sistema de *E. coli*

Figura 3. Padrão típico de crescimento de uma cultura bacteriana em um sistema fechado



O sistema de *E. coli*

- Quarto passo cont...
 - Centrifugar a cultura (4°C, 6.000 rpm, 15 min) para coletar o pellet
 - Descarta-se o sobrenadante e resuspender o pellet em tampão de lise (ex. Tris 20 mM, EDTA 1 mM, Triton-X-100 0,1%)
 - Congelar a suspensão overnight a -20°C.

O sistema de *E. coli*

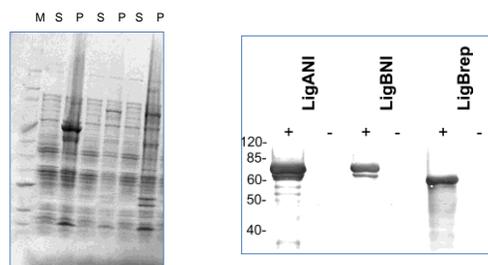
- Quinto passo:
 - Descongelar a suspensão de células
 - Adicionar 1 mg/ml de lisozima e incubar no gelo para 30 min
 - Sonicar a suspensão: 3 ciclos (10 seg com intervalo de 10 seg) no gelo (inibidores de proteases)
 - Centrifugar a suspensão (4°C, 16.000 rpm, 30 min)
 - Coletar o sobrenadante e o pellet separadamente e guardar a 4°C.



O sistema de *E. coli*

- Sexto passo:
 - Localizar a expressão da proteína recombinante usando um gel de SDS-PAGE e amostras do sobrenadante (proteína solúvel) e do pellet (proteína insolúvel)

Exemplo de SDS-PAGE e Imunoblot



O sistema de *E. coli*

- Otimizar o protocolo para cada proteína recombinante:
 - Temperatura de crescimento (16 – 37°C)
 - Fase de crescimento (fase log. até estacionário)
 - Concentração de IPTG (0,1 – 1,0 mM)
 - Tempo de indução (1 – 12 h)
 - Vetor de expressão
 - Solúvel ou insolúvel?

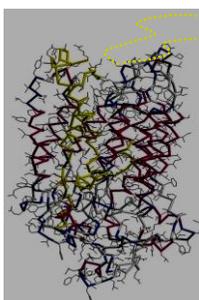
O sistema de *E. coli*

- Oitavo passo:
 - Prepara-se a cultura de larga-escala (100 – 500 ml) da colônia que expressou a proteína recombinante certa
 - Seguir o POP para a cultura de pequena escala
 - Purificar a proteína...

Proteínas inteiras vs. fragmentos

Vantagens:

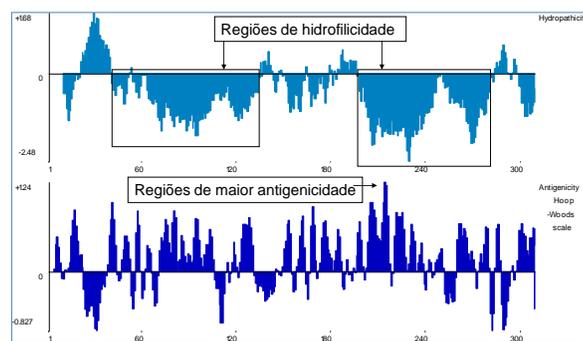
- **Proteína inteira:**
 - Todos epitopos presentes
 - Conformação nativa
- **Fragmento:**
 - Solúvel.
 - Plataforma larga-escala.
 - Antigênico.



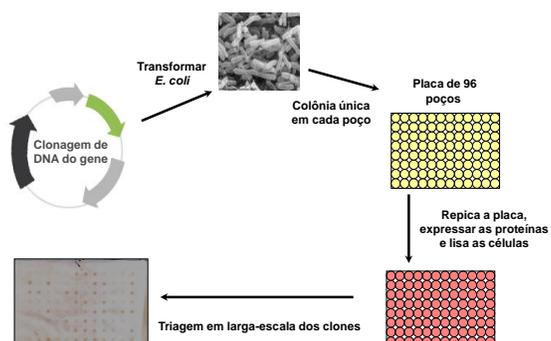
Problemas:

- **Proteína inteira:**
 - Insolúvel (90%).
 - Tóxico.
 - Pesado para hospedeiro
- **Fragmento:**
 - Insolúvel (30%).
 - Conformação.

Hidrofobicidade e antigenicidade



Fusion Antibodies Ltda. – plataforma de larga-escala em *E. coli*



SISTEMAS ALTERNATIVOS

Sistemas de Levedura

- *Saccharomyces spp.* e *Pichia spp.* vantagens:
 - Proteínas recombinantes com alto rendimento (g/L).
 - Glicosilação.
 - A ponte dissulfeto.
 - Proteínas recombinantes com estrutura mais parecida com a proteína nativa.
 - Secreção da proteína recombinante.
 - Indução de expressão com metanol (*Pichia spp.*).
 - Estabilidade genética.
 - Baixo custo de produção.



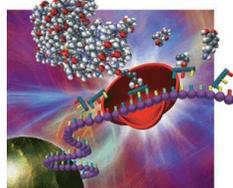
Baculovírus e células de inseto

- Rendimento alto.
- Modificações pós-tradução.
- Apresentação de antígenos.
- Baixo custo de produção:
 - Insetos como Lepidópteros;
 - Células de inseto – Sf-9 e Sf-21.



Sistema Livre de células

- Produção de proteínas tóxicas.
- Adição de reagentes que podem ajudar no dobramento de proteína recombinante ex. chaperonas e detergentes.



Células mamíferos

- *Chinese hamster ovary* (CHO), HEK e COS linhagens são os mais comuns
- Plasmídeos usados:
 - pSV e pCMV
- Plasmídeos são usados para transfecção das células
- Principalmente para proteínas de origem eucariótico
 - Modificações pós-tradução

Plantas transgênicas

- *Golden Rice*
 - Foram clonados dois genes para a expressão de vitamina A (β -caroteno) na genoma de arroz e o β -caroteno agora pode acumular no grão de arroz.
 - Este arroz está sendo fornecido gratuitamente para os países em desenvolvimento.



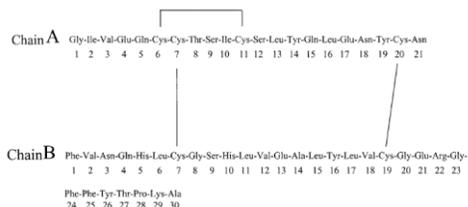
Golden Rice Versão 2

- Melhoramento de valor nutricional de arroz, aumentando o conteúdo de pro-vitamina A. (Paine et al. 2005 Nat Biotechnol 23(4):482-7)
- 70 g/dia de *Golden Rice* ver 2 é igual a recomendação diária para vitamina A.

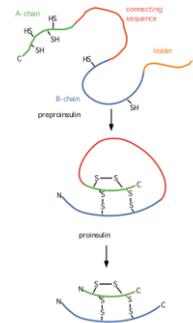
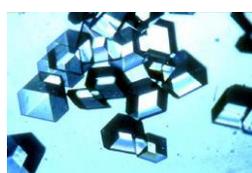


Produção de hormônios humanos

- Insulina para o tratamento de diabetes:
 - Um hormônio peptídico (51 amino ácidos) originalmente clonado e expressado como duas proteínas separadas em *E. coli*.



Insulina

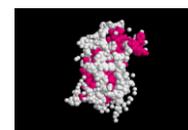
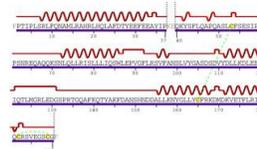
- Os plasmídeos usam o promotor *lac* para expressar o DNA clonado como uma proteína fusionada com β-galactosidase.

Produção de hormônios humanos

- A proteína fusionada é purificada, a β-galactosidase é clivada e as cadeias A e B são unidas por pontes dissulfeto para produzir a insulina humana biosintética (humulina).
- Problema com a estrutura conformacional pois a *E. coli* não consegue modificar as proteínas.
- Clonagem do DNA para proinsulina em células de levedura (*S. cerevisiae*) onde ela foi expressada e processada corretamente para produzir insulina humana.
- 70% da insulina vendida hoje é biosintética.

Hormônio de crescimento humano (hGH)

- hGH é usado para o tratamento de esclerose múltipla e nanismo pituitário.
- A fonte original era de glândulas pituitárias humanas removidas durante necropsias.
- O hGH foi clonado e expressado em *E. coli*.



Hormônio de crescimento humano

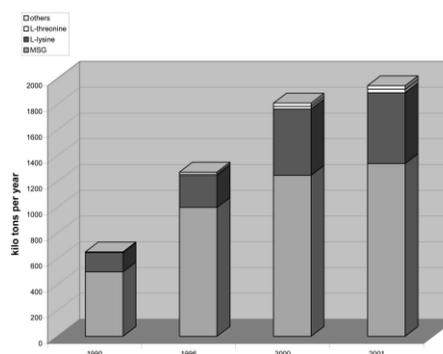
- A biotecnologia mais recente usa células de mamíferos (CHO) e plantas, ex. tabaco.



Efeitos colaterais de uso de hGH:



Produção industrial de amino ácidos



C. glutamicum

- Produção comercial de amino ácidos
 - Glutamato e lisina
 - Componentes de comida humana, animal e produtos farmacêuticos
- Proteínas secretadas
 - Vias Sec ou Tat
- Sem lipoproteínas
- *Genome breeding*
 - Mutações introduzidas numa maneira controlada

Qual sistema de expressão?

- Não existe um sistema de expressão otimizado para todas as proteínas.
- Cada sistema tem suas vantagens.
- Fatores para considerar:
 - Rendimento
 - Controle de expressão
 - Solubilidade
 - Modificações pós-tradução
 - Dobramento (estrutura 3D)
 - Secreção da proteína recombinante

