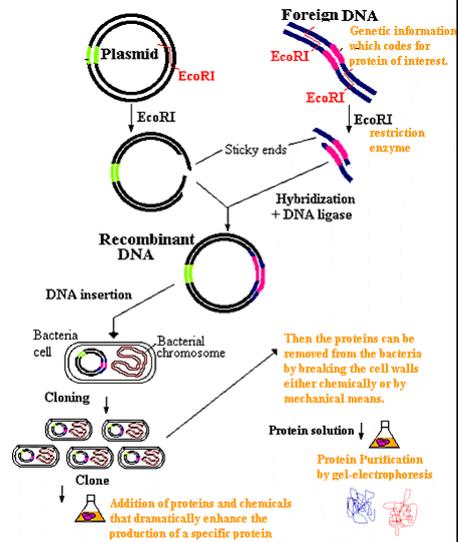
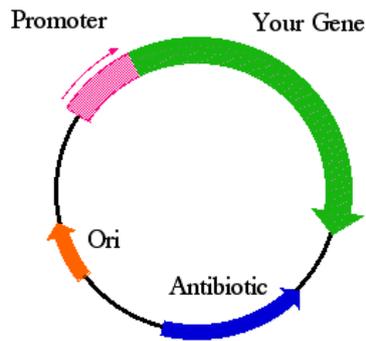
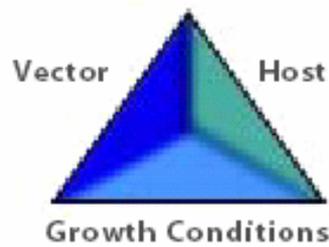


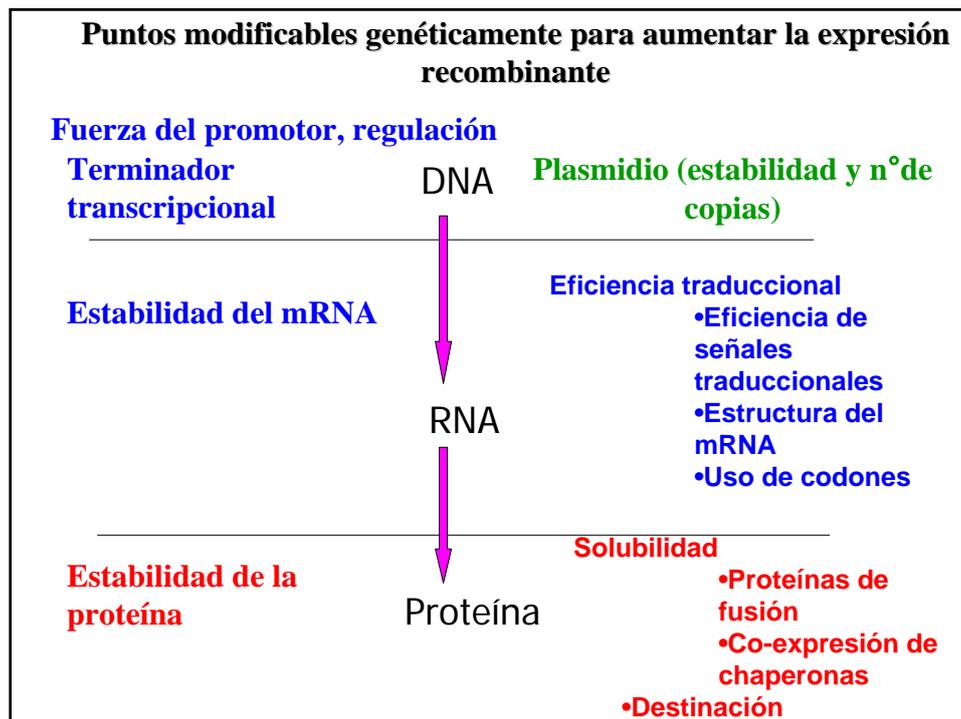
Producción de proteínas recombinantes



Factores que afectan el rendimiento



Cambiando uno o mas de estos factores se pueden generar cambios dramáticos en los niveles de expresión y en la solubilidad de la proteína recombinante



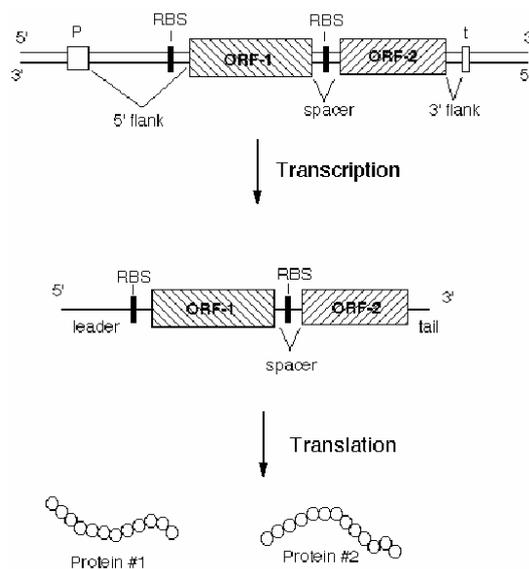
Opciones de expresión

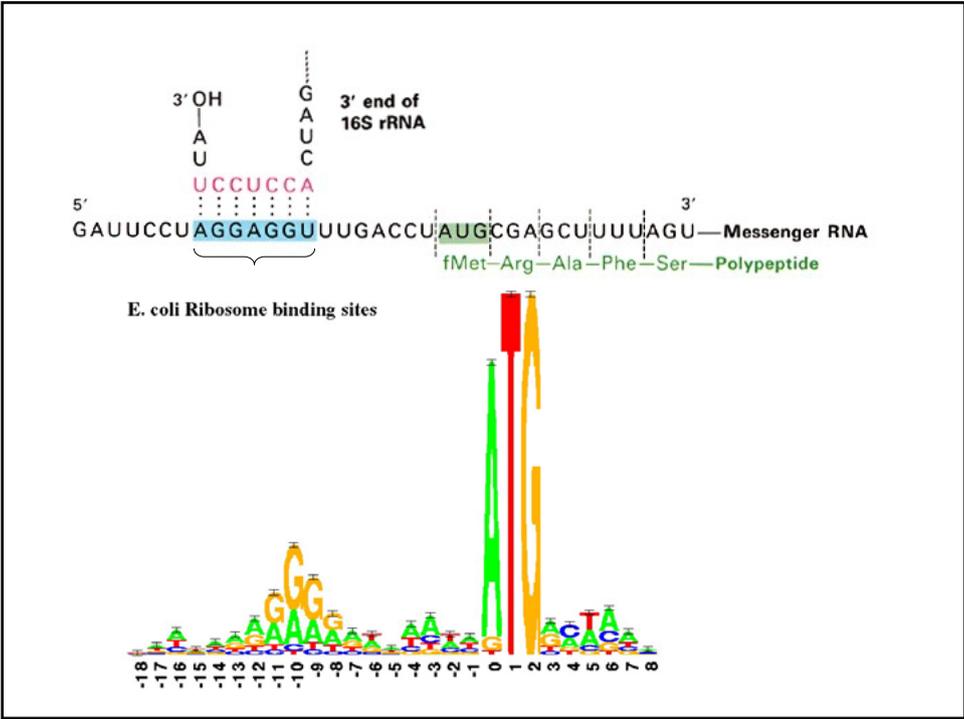
- **Expresión directa intracelular.**
 - Inconveniente: citoplasma de *E. coli* es reductor (difícil asegurar la formación apropiada de puentes disulfuros).
- **Secreción. Se requiere que las proteínas estén fusionadas a péptidos que las dirigen al periplasma.**
 - El periplasma es mas oxidante, mejor plegamiento.
 - Mayor inconveniente es la capacidad limitada de *E. coli* para secretar proteínas (rendimientos pueden ser 0.1-0.2% de la proteína total)
- **Presentación en superficie.**

Características de los Vectores de Expresión

- Un **promotor regulable** y altamente **inducible**
- **Señales de transcripción, traducción y exportación** apropiadas para la expresión en el huésped
- **Alto nº de copias** del vector para aumentar el “dosage génico”.
- **Señales para la expresión como proteína de fusión**
 - Estabilizante
 - Ayuda en la purificación

Transcripción/traducción en bacterias





Estructura de un promotor bacteriano

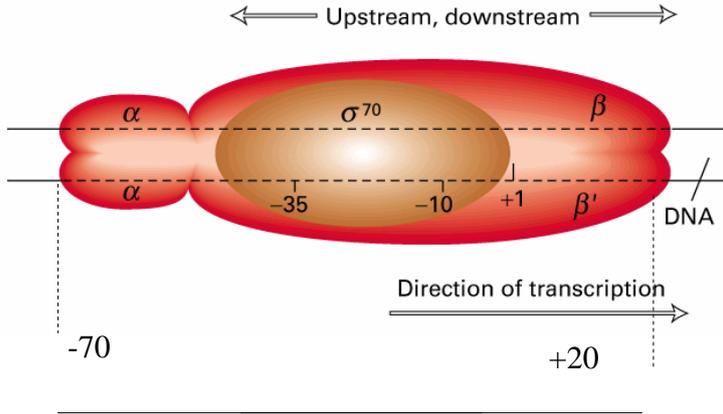


Table 4-C-1. *E. coli* σ factors and the consensus sequences of their recognition sites (promoters).

σ Factor	Promoter Consensus Sequence	
	-35 Region	-10 Region
σ^{70}	TTGACA	TATAAT
σ^{32}	TCTCNCCCTTGAA	CCCCATNTA
σ^{28}	CTAAA	CCGATAT
	-24 Region	-12 Region
σ^{54}	CTGGNA	TTGCA

* -10 region is also called Pribnow box, after its discoverer.

† N = any

Secuencia de consenso de un promotor

Operon	-35 region	-10 region (Pribnow box)	Initiation site (+1)
<i>lac</i>	ACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	TATGTT	GTGTGGAATTGTGAGCGG
<i>lacI</i>	CCATCGAATCGCGCAAAACCTTTCGCGGTATGG	CATGAT	AGCGCCCGGAAGAGAGTC
<i>galP2</i>	ATTTATTCATGTCACACTTTTCGCATCTTTGT	TATGCT	ATGGTTATTTACATACCAT
<i>araBAD</i>	GGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTC	IAC TGT	TTCTCCATAACCCGTTTTT
<i>araC</i>	GCCGTGATTATAGACACTTTTGTTACGCGTTTT	TGTCAT	GGCTTTGGTCCCGCTTTG
<i>trp</i>	AAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGAACTAG	TAACT	AGTACGCAAGTTCACGTA
<i>bioA</i>	TTCCAAAACGCTGTTTTTGTGTTAATTCCGGTG	IAGACT	TGTAACCTAAATCTTTT
<i>bioB</i>	CATAATCGACTTGTAACCAAATTGAAAAGATT	TAGGTT	TACAAGTCTACACCGAAT
<i>rRNA^{Tyr}</i>	CAACGTAACACTTTTACAGCGGCGGTCATTTGA	TATGAT	GCGCCCCGCTTCCCGATA
<i>rrnD1</i>	CAAAAAAATACTTGTGCAAAAAAATTGGGATCCC	TATAAT	GCGCCTCCGTTGAGACGA
<i>rrnE1</i>	CAATTTTCTATTGCGGCCTGCGGAGAACTCCC	TATAAT	GCGCCTCCATCGACACGG
<i>rrnA1</i>	AAAAATAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCG	TATTAT	GCACACCCGCGCGCTG

	-35 region	-10 region	Initiation site
Consensus sequence:	TTGACA ... 16-19 bp ...	TATAAT ... 5-8 bp ...	A 51 T 55 C 48 G 42
	69 79 61 56 54 54	77 76 60 61 56 82	

Figure 25-5. The sense (coding) strand sequences of selected *E. coli* promoters. [After Rosenberg, M. and Court, D., *Annu. Rev. Genet.* 13, 321-323 (1979). Consensus sequence from Lissner, D. and Margalit, H., *Nucleic Acids Res.* 21, 1512 (1993).]

Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

El concepto de fuerza del promotor

- Un promotor fuerte como el promotor *recA* tiene pocas diferencias c/respecto al consenso
TTGATA -- 16 -- TATAAT
TTGACA -- 17 -- TATAAT consenso
- Un promotor débil como el promotor *araBAD* tiene varias diferencias
CTGACG -- 18 -- TACTGT
TTGACA -- 17 -- TATAAT consenso

Es posible mutar un promotor para hacerlo mas fuerte

***lac* wild-type** TTTACA -- 18 -- TATGTT
***lac* UV5** TTGACA -- 18 -- TATAAT
consenso TTGACA -- 17 -- TATAAT

P_{RM} wild-type TAGATA -- 17 -- TAGATT
P_{RM}Up-1 TAGACA -- 17 -- TAGATT
consenso TTGACA -- 17 -- TATAAT

Formas de expresión de secuencias clonadas

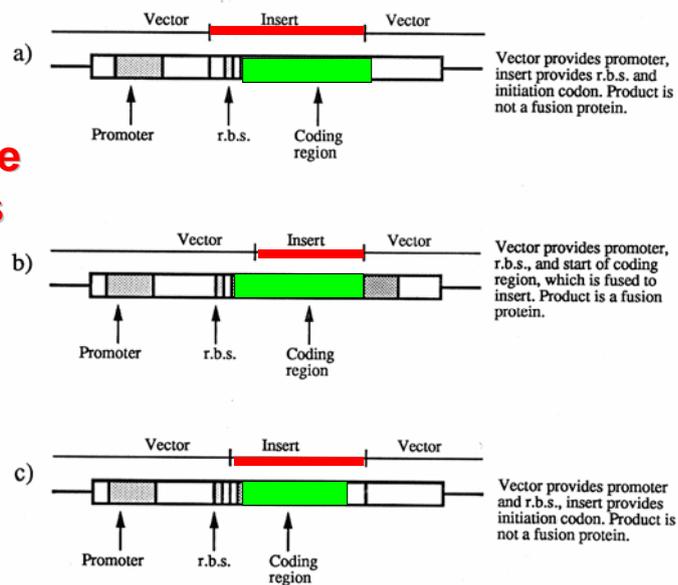


Figure 8.2 Expression of cloned sequences. r.b.s. = ribosome binding site.

Promotores de *E. coli* mas usados

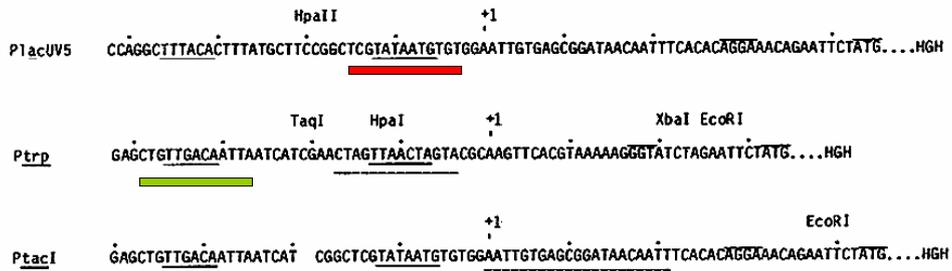
• Promotor *lac* (*P_{lac}*)

- Regulado por control negativo (*lacI*).
- Inducible por lactosa (IPTG)
- Represión no es 100 % eficiente. Se necesita genes adicionales de *lacI* en el vector (*lacI_q* and *lacI_{q1}*).
- *P_{lac}UV5* es muy popular porque su regulación no es dependiente de CAP-glucosa y es mas fuerte que el promotor silvestre.

Promotor *trp* (*P_{trp}*)

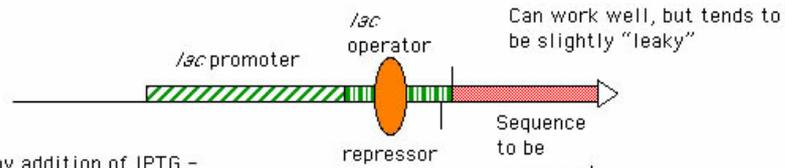
- Regulado negativamente por *trpR*.
- La inducción es realizada por privación de triptofano (o por el análogo AIA).
- No apropiado para expresión de proteínas con alto contenido de triptofano.
- **Promotores híbridos: *P_{tac}* (-35 *P_{trp}* + -10 *PlacUV5*).**
 - Inducibles por IPTG, mucho mas fuertes que *P_{lac}* and *P_{trp}*.
- **PT7 (del bacteriófago T7)**
- **PBAD – Inducido por arabinosa (*In vitro*gen)**
- **Promotor PL del fago lambda. Inducido por temperatura**

Promotor *tac* híbrido



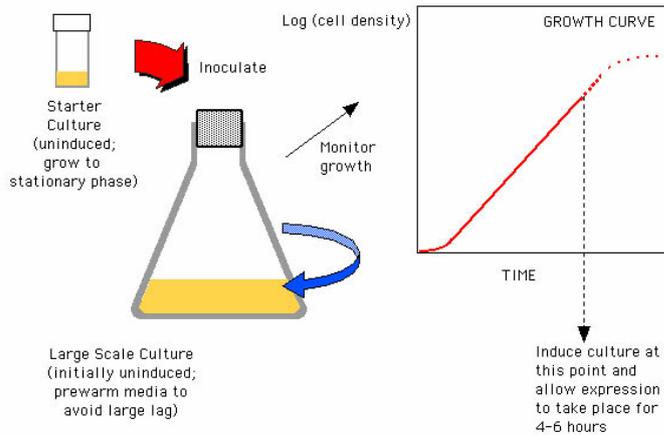
A simple inducible promoter system:

The *lac* promoter (already present in cloning vectors like pUC):



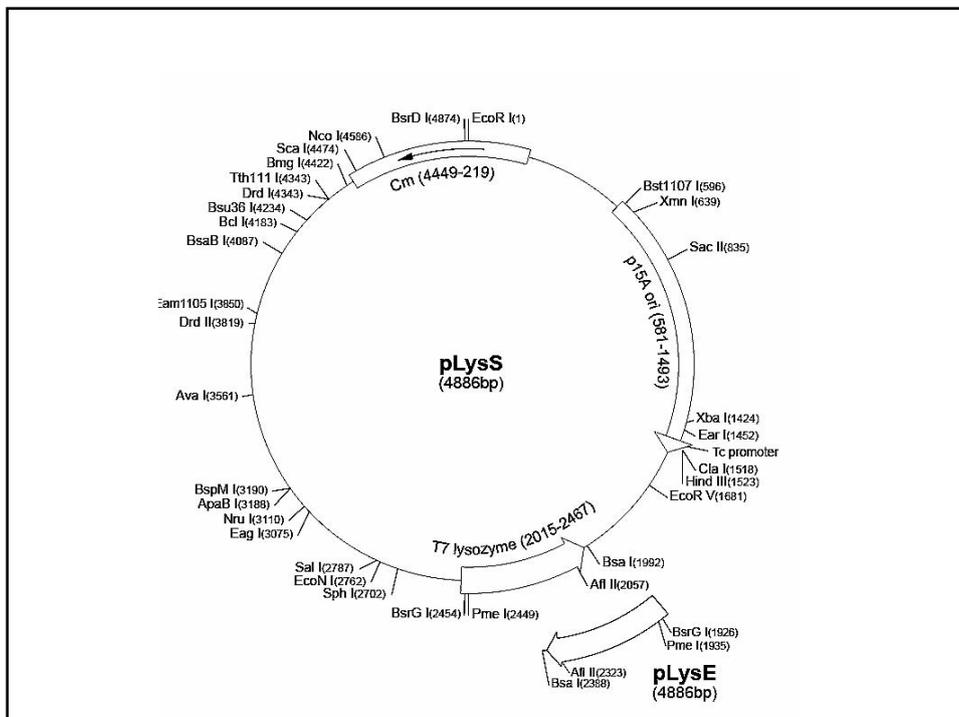
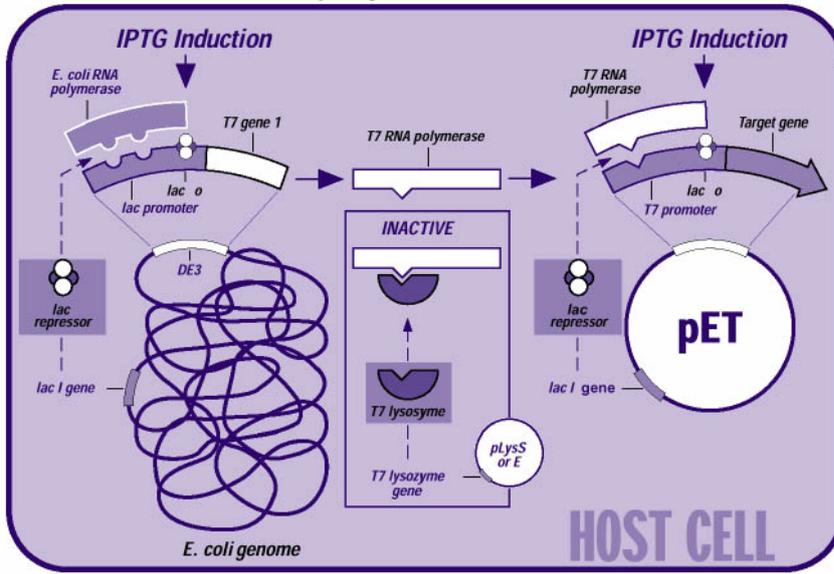
Induced by addition of IPTG - causes repressor to dissociate, allowing transcription to take place

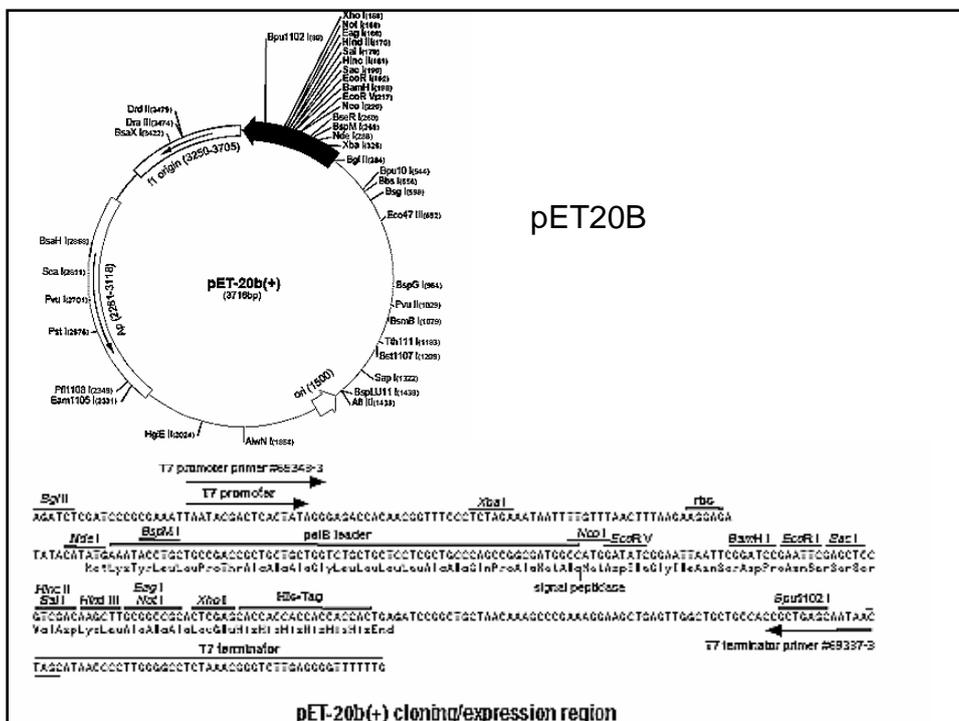
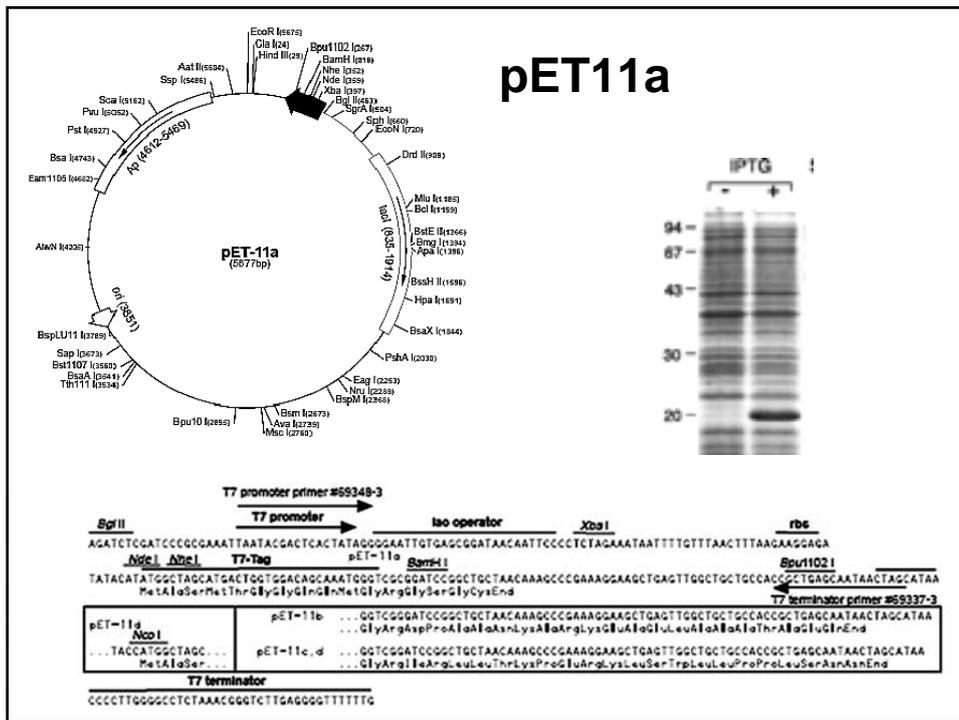
Growing and inducing the final construct in its expression host

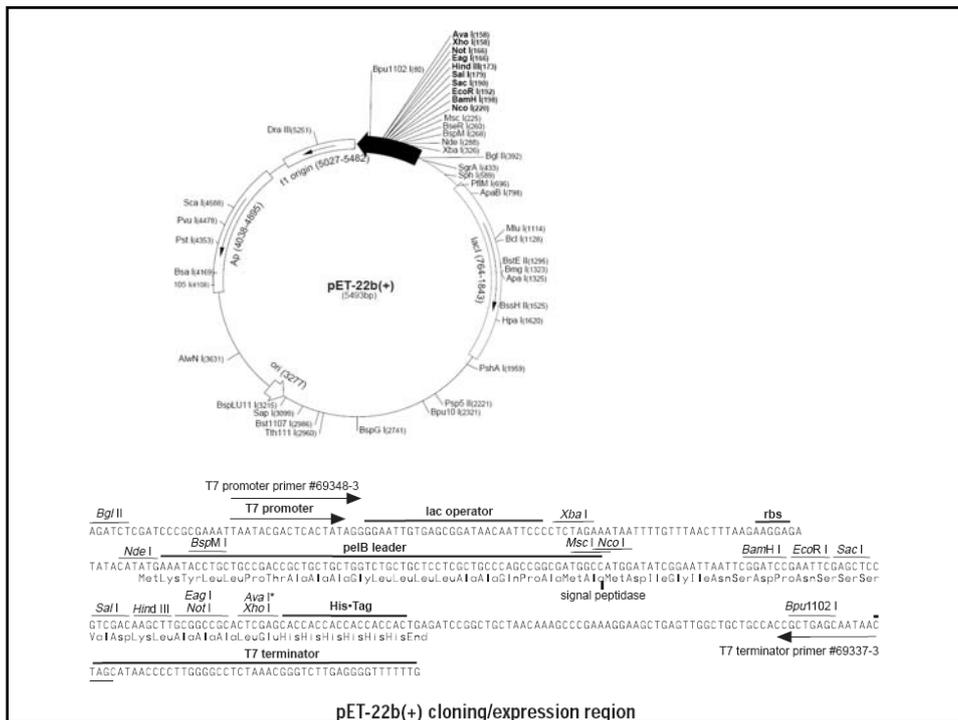


HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEMS FOR PROTEINS

Control elements of the pET System







Estrategias de Control de la Expresión Basal

Table 2. Relative Basal (Uninduced) Expression Levels of Cloned β -Galactosidase with Various Vector/Host Combinations

Promoter	T7	T7	T7	T7/lac	T7/lac	T7/lac
Host*	(DE3)	(DE3)	(DE3)	(DE3)	(DE3)	(DE3)
		pLysS	pLysE		pLysS	pLysE
Activity	100	30	10	10	3	1

* BL26, *lacZ*-deleted derivative of BL21

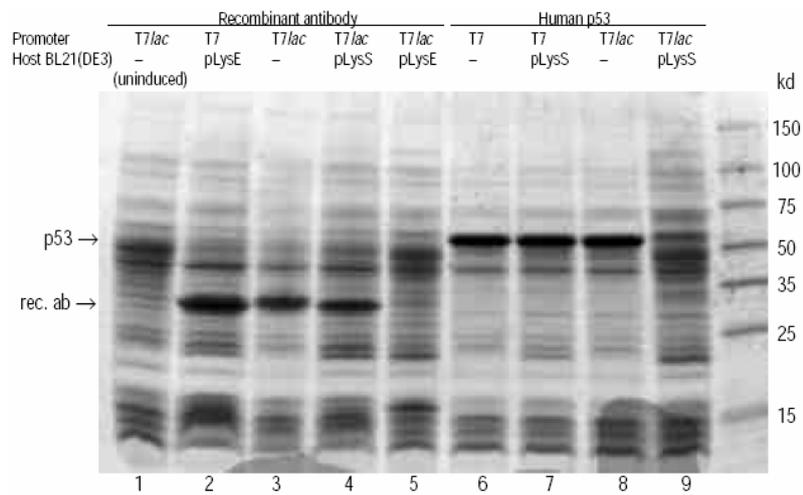


Figure 2. Effect of vector/host combination on expression levels of two proteins.

The indicated cell cultures were grown at 37°C to OD₆₀₀ of approximately 0.8 and expression induced with 1mM IPTG for 2.5hr. Total cell protein samples were run along with Novagen's Perfect Protein™ Markers on a 4–20% SDS polyacrylamide gradient gel followed by staining with Coomassie blue. Vectors were pET-20b(+) and pET-22b(+) for the recombinant antibody and pET-23b(+) and pET-21b(+) for p53.